



KLINICKÁ A TOXIKOLOGICKÁ ANALÝZA

Praha

2008

Tato skripta vznikla pro potřeby kurzu **Klinická a toxikologická analýza**, pořádaného v rámci projektu „Pražské analytické centrum inovací“ CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 v grantovém schématu JPD3: Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací. Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem České republiky.

Odborný garant prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.

Editoři prof. Ing. Karel Štulík, DrSc., a prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.

Technická redakce RNDr. Eva Juláková, CSc.

Vydáno ve spolupráci s Českou společností chemickou

ISBN: 978-80-86238-51-7

OBSAH

1.	Analytika a medicina – trendy v laboratorní diagnostice	5
	<i>prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., a doc. RNDr. Petr Štern, CSc.</i>	
2.	Co analytická chemie nabízí biomedicíně	11
	<i>prof. Ing. Karel Štulík, DrSc.</i>	
3.	Využití analytických metod léčiv ve farmakologii	17
	<i>prof. MUDr. František Perlík, DrSc.</i>	
4.	Vibrační spektroskopie v medicině	24
	<i>prof. Ing. Karel Volka, CSc.</i>	
5.	Analytické aspekty diagnostiky porfyrií	31
	<i>doc. MUDr. Libor Víttek, Ph.D.</i>	
6.	Moderní směry ve vysokoúčinných separacích pro biomedicínské aplikace	41
	<i>doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.</i>	
7.	Použití přístrojů pro atomovou spektrometrii jako prvkově selektivních detektorů při speciační analýze	51
	<i>doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.</i>	
8.	Biosenzory pro detekci chemických látek	61
	<i>prof. RNDr. František Opekar, CSc.</i>	
9.	Využití MS v klinické biochemii	71
	<i>RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.</i>	
10.	Současné využití elektroforézy v klinické laboratoři	79
	<i>RNDr. Hana Benáková</i>	
11.	Analytická hmotnostní spektrometrie	89
	<i>doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.</i>	
12.	Záchyt neznámých nox a konfirmace v toxikologii	103
	<i>doc. Ing. Marie Balíková, CSc.</i>	
13.	Požadavky na HPLC a CE v klinických a toxikologických analýzách	105
	<i>prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.</i>	
14.	Alternativní materiály v toxikologii	113
	<i>doc. Ing. Marie Balíková, CSc.</i>	
15.	Přínos molekulárně biologických metod	116
	<i>prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.</i>	
16.	Mitochondriální genom, choroby s ním spojené, úskalí a specifika	116
	<i>prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.:</i>	
17.	Možnosti elektrochemických metod v klinické a toxikologické analýze	117
	<i>prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.</i>	
18.	Využití uhlíkových pastových elektrod v analýze léčiv a toxických látek	124
	<i>doc. RNDr. Jiří Zima, CSc.</i>	
19.	Patobiochemie a analytika lipidů	131
	<i>prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc., a RNDr. Eva Tvrzická, CSc.</i>	
20.	Problematika imunoanalytických metod (analytika nádorových markerů a hormonů)	140
	<i>Ing. Drahomíra Springer</i>	

PŘEDMLUVA

Ohromný rozvoj přírodních a technických věd a z nich odvozených technologií vede mimo jiné i k tomu, že discipliny, které byly ještě nepříliš dávno založeny spíše na pozorování jevů, jejich fenomenologickém popisu a na rozsáhlém využití empirie, rychle získávají matematicko-fyzikálně-chemický základ a z něho odvozené možnosti popisu mechanismu dějů, jejich predikce a ovlivňování technickými prostředky. Velmi výstižným příkladem je biologie, která je jedním ze základních pilířů rozsáhlého pole mediciny. Je nutno zdůraznit, že interakce je obousměrná – složité, obdivuhodně dokonalé děje v živých organismech jsou stále více inspirací pro řešení problémů exaktních věd a jejich technologických aplikací.

Jako vždy je kladná stránka situace doprovázena i odvrácenou stranou. Abychom dokázali zvládnout stále náročnější výzkumné i aplikační úkoly, více a více se specializujeme, stále méně se rozhlížíme do okolí a stále méně spolu hovoříme a méně si vzájemně rozumíme. To platí v moderní rozvinuté společnosti zcela obecně a je nanejvýš žádoucí snažit se vzájemné, poučené komunikaci napomáhat.

Pražské analytické centrum inovací (PACI) je program, který má přispívat k řešení tohoto problému. Analytická chemie je vhodným tématem – bez informací o identitě látek a jejich množství se již obejde málokterý vědní či technologický obor (včetně humanitních disciplín, jako jsou např. archeologie, historie či vědy o umění). Proto k důležitým aktivitám PACI patří pořádání seminářů, na kterých se setkávají odborníci v analytické chemii s odborníky v oblastech, které analytických výsledků využívají. Sem patří i tento kurs. Jeho hlavním záměrem je ukázat analytikům biomedicínskou problematiku, aby lépe chápali účel svých výsledků a mohli požadavky a omezení kvalifikovaně brát v úvahu při vývoji nových přístupů k analýze, zatímco biomedicínským pracovníkům by měl demonstrovat možnosti a limity analytických postupů, tak aby analytické výsledky dokázali kriticky posoudit a racionálně využít.

Tato skripta vznikla pro potřeby kursu „Klinická a toxikologická analýza“, pořádaného v rámci projektu „Pražské analytické centrum inovací“ cz.04.3.07/4.2.01.1/0002 v grantovém schématu jpd3 „Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací“.

Karel Štulík

1. ANALYTIKA A MEDICÍNA – TRENDY LABORATORNÍ MEDICÍNY

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., doc. RNDr. Petr Štern, CSc.

Ústav klinické biochemie a laboratorní medicíny I. LF UK a VFN Praha

tomas.zima@lf1.cuni.cz; petr.stern@vfn.cz

Laboratorní diagnostika slouží v současnosti až k 70 % zdravotnických rozhodnutí u hospitalizovaných pacientů. Dramatický rozvoj oboru a analytických technik s ním spojených je zejména v posledních 30-40 letech.

Nejstarší znalost vyšetřování vzorků pacienta je vyšetření tělesných tekutin – okolo roku 400 př. n. l. se vyšetřovala barva a vzhled moče. Hlavní Hippokratova doktrína spočívala v patologii tělních tekutin – šťáv. Opět v centru pozornosti byla moč, její sediment. Hematurie byla poprvé popsána Rufusem z Dresu okolo roku 50 jako známka poruchy ledvin. Poznatky z pozdějšího období okolo Galéna (130-201 n. l.) přetrvávají do středověku. Uroskopie je hlavním znakem středověké medicíny. Okolo roku 900 Isak Judaeus popisuje pravidla, jak vyšetřovat moč. Paracelsus (1493-1541) zdůrazňuje význam chemických látek v medicíně. Objev mikroskopu Antonem van Leeuwenhoekem (1632-1723) byl zásadním zlomem v studiu podstaty nemocí.

Na přelomu 17. století je provedena gravimetrická analýza moče, později byla popsána bílkovina v moči a vyšetřování moče postupovalo na vědeckém podkladě. Thomas Willis (1621-1675) poprvé popsal změny moče u diabetes mellitus a insipidus. V 18. století se objevují znalosti poruch při srážení krve Williamem Hewsonem (1739-1774) a jsou předchůdcem testů INR, protrombinového času, které se užívají dnes. Roku 1776 je prokázáno, že sladkost moče a krve je dána cukry a v roce 1780 Francis Home vytvořil kvasinkový test na průkaz cukrů v diabetické moči. V roce 1789 je objeven cholesterol.

V 19. století vznikají první laboratoře a rozvíjejí se zejména oblast bakteriologie a virologie s rozvojem mikroskopie. Vznikají chemické a bakteriologické laboratoře

Koncem 19. století vznikají první laboratoře (Guys Hospitál v Londýně), v Americe jsou to laboratoře s mikroskopem u lékaře a roku 1898 Sir William Osler píše první učebnici klinické chemie a založil v John Hopkins Hospital laboratoř. Roku 1886 Jaffe popisuje stanovení kreatininu a 1893 objevuje T.W.Riochrd's nefelometr.

Pokud se podíváme na instrumentarium laboratoře kolem roku 1920, pak se skládá z váhy, mikroskopu, centrifugy, Bunsenova kahanu a Duboscqova kolorimetru.

Rozvoj laboratorní diagnostiky ve světě začal v padesátých letech minulého století.

Období **1950-1959** je někdy nazýváno „čas pokusů a omylů“. Klade se důraz na klasickou techniku kvantitativní biochemické analýzy a počítání buněk se děje manuálně. Vyzdvihuje se zručnost při pipetování a přísné dodržování analytického protokolu. Jedinou instrumentací v laboratoři kromě pH-metrů často bývají fotometry měřící procenta transmitance. Laboratoře si připravovaly často vlastní reagencie. K analýze sodných a draselných iontů se používaly neskladné plamenové fotometry, které byly na počátku rozvoje. Mnohem běžnější byly elektroforetické systémy k frakcionaci proteinů. Všechny používané systémy vyžadovaly manuální pipetování vzorků a pracnost metod byla vysoká. Lékaři dostávali výsledky z laboratoří obvykle bez doprovodné interpretaci informace. V průběhu dekády se začala objevovat automatizace. Komerční vývoj sys-

tému Technicon AutoAnalyzer v roce 1957 zavedl kontinuální průtokovou analýzu jako rutinní technologii v klinické biochemii. Simulace manuálních technik v automatickém systému byla základem pro vývoj zařízení Robot Chemist (Warner-Chilcott Instruments Division). Tyto první chemické analyzátorby byly jednokanálové systémy, provádějící testy jeden za druhým stejnou metodou. Po ukončení jednoho typu testu mohly být přepnuty na další metodu a provádět požadované analýzy.

Léta **1960-1969** jsou věnována automatizaci laboratoří. Počíná rychlá expanze jednokanálových analyzátorů do různých typů laboratoří. V roce 1965 byl již dostupný multikanálový analyzátor pro biochemické a hematologické metody. V roce 1968 se konala první konference v Oak Ridge, kde byla představena koncepce centrifugační analýzy. Automatizované pracovní stanice v této době mohly provádět pouze fixní konfigurace analýz (batch), které byly obvykle požadovány od téhož vzorku, např. vápník a fosfáty, albumin a celková bílkovina, resp. sodné, draselné a chlорidové ionty. Začíná se uplatňovat kontinuální průtoková analýza. Automatizace se netýká pouze biochemie, ale objevují se i analyzátorby pro hematologii. AutoAnalyzer stanovuje hemoglobin z celé krve, SMA 4 navíc dokáže počítat leukocyty, erytrocyty a hematokrit. Systém Coulter S měří kromě hemoglobinu, erytrocytů a leukocytů také MCV a další parametry vypočítává.

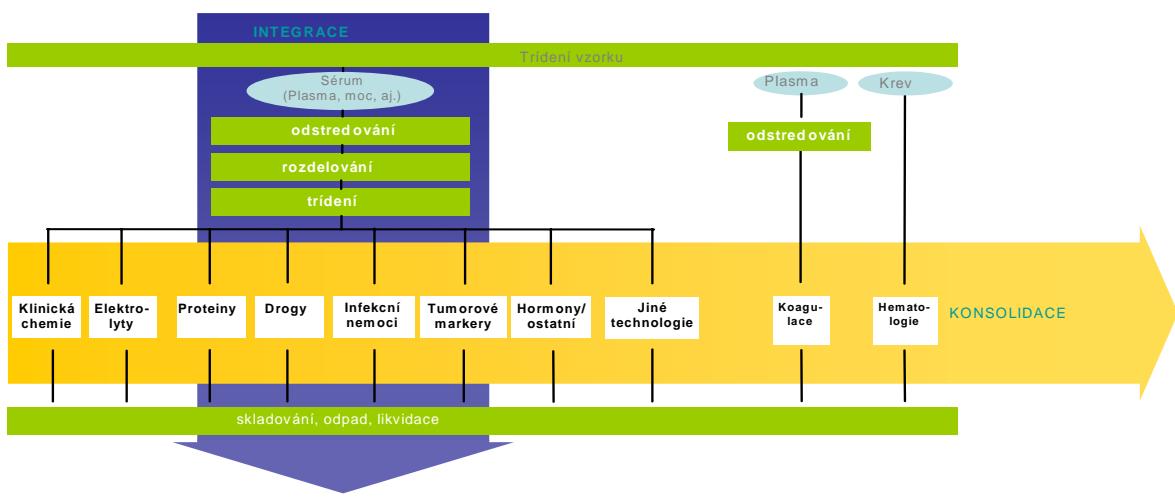
Pro léta **1970-1979** je typické řízení analyzátorů počítači. To se objevilo i v názvu tehdy vyrobeného Techniconu SMAC (Sequential Multiple Analyzer Plus Computer). Na začátku sedmdesátých let se začínají používat iontově selektivní analyzátorby ke stanovení aktivity sodných a draselných iontů. Ke konci sedmdesátých let vyvinuly IL a Roche druhou generaci centrifugačních analyzátorů, které byly rychlejší, umožňovaly automatické dávkování vzorku a byly schopné se připojit k laboratornímu informačnímu systému. Při automatizaci měření krevního obrazu se uplatňovaly jak zobrazovací techniky, tak cytochemická kontinuální průtoková analýza. Tyto systémy byly vybaveny mikroskopy umožňujícími digitální zpracování obrazu k identifikaci jednotlivých morfologických struktur bílých krvinek.

Následující dekáda **1980-1989** je charakterizována analyzátorby s přímým přístupem (random access) kteréhokoliv vzorku k jakékoliv analýze, pro kterou jsou v systému vytvořeny vhodné předpoklady. Na analyzátorech bylo možné provádět v sérii kolem 30 typů testů a přístroje provedly 120 až 480 analýz za hodinu. V této době byl vyvinut také vícevrstvý film Kodak Ektachem – jako nouzové uplatnění, když veřejnost neocenila vynález vícevrstvého „plastického“ filmu v kinech. Detekce analytů se prováděly reflexní fotometrií nebo ISE, jak známe z analyzátorů Vitros dodnes.

V 60. až 80. letech kromě rozvoje automatických analyzátorů dosahuje vrcholu elektroforeza umožňující detekci řady proteinů v séru a moči s kombinovaným přístupem imunochemických metod, které se rozvíjejí. Imunochemické techniky s různým způsobem značení se rozvíjejí od radiální imunodifúze dle Manciniové, detekce pomocí protilátek – ELISA, RIA až chemiluminiscenční techniky. Rozvíjejí se chromatografické techniky a jejich citlivost a výtěžnost, která je dána novými konstrukcemi nejen kolon, ale též možným vyšším tlakem při dělení. Rozvíjí se zejména plynová a kapalinová a postupně nastupuje chromatografie hmotnostní, i když ta se rozvíjí zejména koncem století.

Konec minulého století bývá označován jako éra konsolidace, i když u nás k tomu docházelo teprve ke konci této dekády. Výrazný celosvětový tlak na snížení nákladů ve zdravotnictví se projevil také ve snižování cen velké laboratorní techniky. Software analyzátorů umožňoval: sledovat kvalitu provedení analýzy, výsledky, přístroj a jeho jednotlivé pracovní kroky; provést rozhodnutí o opakované analýze, reflexním testu a zrušení testu; koordinovat celkový počet laboratorních operací tak, aby byla dodržena doba odezvy, propustnost, využití a doba provozuschopnosti přístrojů.

Laboratorní automatizaci můžeme rozdělit do dvou hlavních směrů: úplná laboratorní automatizace (zejména Japonsko) a modulární automatizace (USA a EU). Tyto procesy snižují počet chyb až 4krát a snižují mzdové nákladů při stagnaci materiálových nákladů. Analytické principy současných sofistikovaných analyzátorů pro metody biochemické, imunochemické, hematologické a koagulační jsou podobné a má smysl spojovat tyto analyzátory dohromady v blízkosti místa zpracování vzorků. Využívá se jednotného příjmu a zpracování materiálu, které má též etický aspekt (použití menší množství biologického materiálu) při nutnosti zachovat identitu jednotlivých oborů (Obr. 1.1).



Obr. 1.1: Integrace a konsolidace laboratoří

Úplná automatizace se zavádí zejména v Japonsku, kde byla již na více než 100 místech. Nicméně hlavním světovým trhem pro laboratorní automatizaci jsou středně velké laboratoře a u nich se uplatňuje modulární automatizace. Také v našich laboratořích se začínají objevovat kombinované moduly biochemických a imunochemických analyzátorů. Dávkovací technika se dostala na hranice možností mechanických dávkovačů (1 µl) a měřících kyvet (80 µl), kdy kapilarita, tvar kyvety a způsob míchání roztoku mají podstatně větší roli než dříve. V roce 1991 je k dispozici automatizovaná centrifuga, ale její zapojení do analytické linky je až v následující dekádě. Vývoj nových analytických systémů do jisté míry stagnuje a úsilí výrobců směruje především k automatizaci preanalytické a postanalytické fáze, jakož i k vytvoření spojovacích cest a řídícího softwaru pro multimodulární systémy.

Na počátku 21. století v našich laboratořích zaznamenáváme další postup konsolidace, vstup prvních preanalytických automatů, rozsáhlé zavádění POCT glukometrů v nemocnicích, vyšší podíl robotizace v imunochemických analyzátorech a používání chemických mikročipů (ojediněle). Hmotnostní spektrometry ve spojení s LC nebo HPLC se stávají alespoň ve velkých laboratořích běžným vybavením. Dochází i k automatizaci při vyšetřování vzorků arteriální krve na elektrochemických analyzátorech a nabízí se softwarově řízené zaplavování elektrod podle množství vzorku. Automatizované modulární komplexy jsou tak snadno obsluhovatelné, že v některých (např. německých) laboratořích pracují nepřetržitě, přestože by z energetického hlediska bylo nehospodárné je vypínat.

Očekávané změny v laboratorní medicíně a její trendy můžeme shrnout následovně:

- laboratorní automatizace a robotika;
- konsolidace laboratoří;
- integrovaná organizace IT sítě včetně webů pro veřejnost (Lab test on line);
- akreditace laboratoří;
- molekulární diagnostika;
 - DNA čipy;
 - proteomika,
 - farmakogenomika;
- POCT (point of care testing) a vyšetřování doma;
- neinvaziovní testování;
- zobrazovací analýza;
- hmotnostní spektrometrie;
- identifikace pacienta – el. žádanka, barrcoding;
- telekomunikace + medicína;
- regionální, národní a mezinárodní skupiny dodavatelů;
- efektivní spojení laboratoří na různých místech;
- interdisciplinární zaměření a týmy.

Tyto předpoklady se naplňují pokud jde o sledování trendů v jednotlivých oborech laboratorní diagnostiky v USA v posledních letech (2004-2007), kdy rostoucí je segment molekulární biologie a POCT:

- klinická biochemie 1-3 %
- hematologie 1-3 %
- koagulace 0-2 %
- mikrobiologie 4-6 %
- imunochemie 3-7 %
- statim 5-8 %
- glukosa 10-15 %
- POCT 12-15 %
- průtoková cytometrie 10-15 %
- molekulární biologie 25-35 %

Hlavní oblasti rozvoje analytiky a laboratorní medicíny na počátku 21. století jsou problematika automatizace preanalytické části vyšetření při centrifugami a aliquotaci vzorků.

Oblast tzv. POCT – diagnostiky u pacienta ve zdravotnickém zařízení nebo doma s vlastním vyhodnocením nebo přenosem dat lékaři. Nejčastěji je pacienty monitorována hladina krevního cukru a porucha srážlivosti krve. Tyto systémy jsou založené na elektrochemické analýze nebo iontově selektivních elektrodách. Na jednotkách intenzivní léče jsou rutinně vyšetřovány základní biochemické parametry a analýza krevních plynů. V této oblasti se bude rozvíjet neinvazivní vyšetřování pomocí senzorů, kdy pokrok je nejdále ve vyšetřování glukosy.

Molekulární diagnostika slouží k lepší péci o pacienty zejména v oblasti infekčních a nádorových nemocí i tzv. personalizované medicíně.

V oblasti molekulární biologie se jedná o automatizaci izolace humánní a extrahumánní DNA i RNA a vysoko výkonné sekvenování geonomu a RT-PCR přístupy. Diagnostika závažných infekčních onemocnění – hepatitida B a C, HIV a další infekce (chlamydiové infekce, lidský papilomavirus atd.) jsou rutinně diagnostikovány technikou PCR, kde se též uplatňuje kvantifikace virové zátěže, V současné době jsou zaváděny na trh i systémy detekující DNA bakterií pro rychlou diagnostiku. V humánním geonomu jsou vyšetřovány mutace spojené s řadou nemocí – Leydenská mutace spojená s rizikem trombózy nebo mutace genu pro polycystickou chorobu ledvin, cystickou fibrózu a další). Na druhé straně je riziko tzv. prediktivní genetiky a jejího zneužití či komerčního zneužití.

Rozšiřují se možnosti imunochemických přístupů, kdy citlivost chemiluminiscenčních technik jsou srovnatelné s původně velmi citlivou RIA technologií. Výzkum je zaměřen do vývoje standardů pro jednotlivé analýzy a co nejvyšší specificity protilaterek.

Chromatografické techniky jsou zlatým standardem řady stanovení v oblasti aminokyselin, lipidů, glykovaného hemoglobinu, forenzní toxikologie a dalších analytů. V posledních letech z pohledu vysoké specificity stanovení se rozvíjejí metody hmotnostní spektrometrie pro rutinní stanovení například hormonů a je možné v budoucnu nahradit imunochemická stanovení. Technika tandem mass spektrometrie může být využívána ve screeningu novorozenců na vyhledávání vrozených metabolických vad.

Proteomika je oblastí rozvíjejícího se využití zejména v oblasti hledání specifických proteinů, respektive jejich modifikací, specifických pro jednotlivá onemocnění, kdy středem zájmu jsou především maligní onemocnění. Vytvářejí se diagnostické proteinové čipy. V oblasti čipové technologie (např. Randic) jsou na trhu biočipy umožňující detekci řady biochemických parametrů včetně jejich kvantifikace.

Rozvíjí se oblast preimplantační diagnostiky (prevence vrozených onemocnění), diagnostika fetální DNA z krve matky (možný screening vrozených vývojových vad),

Jedním z trendů současné medicíny je tzv. personalizovaná medicína nebo medicína „šitá na míru“, kde klíčovou roli hraje farmakogenomika. Odezva pacienta na podání léku může vyvolat nežádoucí reakci, ale též může být podání léku neúčinné. Studium metabolických systémů a jeho aktivity a kapacity metabolizovat podané léčivo je klíčové. Hlavním systémem je cytochrom P450, ale také další metabolické dráhy.. V případě dvou isoenzymů P450 (2D6, 2C19) byl vyvinut genetický čip umožňující rychlé testování. Farmakogenomika může predikovat účinnost léku zejména v psychiatrii, kardiologii a onkologii.

Genetické čipy významnou měrou zrychlí diagnostiku a vyhledávání polymorfismů jednotlivých genů. Multiplex Initiative – NIH 2007 sleduje prioritně vyšetřování 15 genů hrajících roli při diabetes mellitus II, ischemické chorobě srdeční, hypercholesterolémii, osteoporóze, karcinomu plic a kolorekta plicní rakovině a maligním melanomu.

V oblasti cytogenetiky je jedním z hlavních přístupů metoda FISH v různém provedení: m-band, multicolor a další, které umožňují přesně detektovat změnu na chromosomu, jejich deleci, translokaci a další změny, které mají nejen diagnostický, ale i prognostický význam zejména u nádorového bujení.

Oblast tzv. *in vitro* diagnostiky z pohledu na financování zdravotnictví je relativně nízká a jedná se o cca 2 % veškerých výdajů na zdravotnictví.

V současné době nelze zapomínat na klasické analytické metody, které stále z hlediska svého významu jsou nezastupitelné. Je využívána absorpční, reflexní, plamenová emisní fotometrie. Nefelometrie a turbidimetrie jsou standardem v rutinní proteinové diagnostice. Elektrochemické metody vyjma potenciometrie u iontově selektivních elektrod jsou trochu na ústupu. Elektroforetické metody jsou díky rozvoji imunoanalýzy trochu na ústupu, ale stále slouží elektroforéza nebo kapilární elektroforéza pro analýzu jednotlivých isoenzymů či vyhledávání paraproteinu. Atomová absorpční spektrofotometrie je zlatým standardem pro analýzu stopových prvků.

Ammerické studie Lab in future popisuje 10 strategických imperativů pro laboratoř nejen z analytických aspektů:

- redesign centralizovaných laboratoří
- přesun části testů k rychlým testům – POCT
- investice do molekulární biologie
- IT infrastruktura
- široká nabídka testů
- požadování přiměřených a adekvátních testů
- analýza – náklady/přínos
- obchodní činnost
- vstup do dalších oblastí – trh, činnosti
- udržení personálu – vzdělávání
- monitorace výkonu

Praktické dopady rozvoje molekulární biologie byly v devadesátých letech menší než předpokládaly prospektivní studie, nicméně rozvoj tohoto oboru je obrovský. V laboratorní praxi je rozvoj limitován cenovou náročností těchto analýz a poměrně vysokými požadavky na zručnost a zkušenosť laboratorního personálu (komplexní automatizace dosud chybí). Futurologové píší krásné myšlenky o nanotechnologických jako přístupu detekující z malého množství materiálů řadu analytů včetně jejich kvantifikace. Také úvahy o sekvenování lidského genomu každého jednotlivce pro zjišťování individuálních predispozic jsou v této dekádě asi předčasné, i když technicky při velkých nákladech možné, avšak bez konkrétního výstupu pro jednotlivce s možným vysokým rizikem zneužití.

2. CO ANALYTICKÁ CHEMIE NABÍZÍ BIOMEDICÍNĚ

prof. Ing. Karel Štulík, DrSc.

*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie
stulik@natur.cuni.cz*

2.1 Úvod – účel a charakter kursu

Jedním ze základních problémů současného života vůbec a zvláště pak vysoce kvalifikovaných činností, jako jsou věda, technika a jejich aplikace, je obrovský a prudce rostoucí objem poznatků a rychlý technologický rozvoj. Všichni se proto úzce specializujeme, abychom dokázali zvládnout moderní požadavky a máme stále větší a větší těžkosti ve vzájemné komunikaci, při získávání do statečného nadhledu a schopnosti zobecnění. A přitom se nejdůležitější věci dějí právě na hranicích oborů, takže řešení výzkumných i aplikačních problémů vyžaduje soustavnou spolupráci specialistů, často ve velmi početně i oborově rozsáhlých seskupeních.

Tématika tohoto kurzu je velmi dobrým příkladem. Pole biomedicíny je neobyčejně široké po všech stránkách. Jak z hlediska výzkumného, tak aplikačního se rozkládá od molekulární biologie, biofyziky a biochemie, přes větší část systematických biologických disciplín, až po vybrané obory humanitní, matematicko/informatické a technologické. Většina biomedicínských aktivit vyžaduje soustavné, dostatečné a spolehlivé informace o identitě a množství širokého spektra látek v systémech, které jsou předmětem studia či vyplývají z klinické praxe a často jsou zapotřebí i data o prostorové distribuci látek a změnách jejich množství v čase. A zde přichází ke slovu analytická chemie.

Tento kurz by proto měl přispět k vzájemnému porozumění mezi výzkumnými i klinickými biomedicínskými odborníky a analytickými chemiky. Analytikům by měl blíže ukázat cíle a účely jejich výsledků, charakter aktivit, pro které se analytické výsledky vytvářejí, a blíže je seznámit s požadavky a omezeními vyplývajícími z biomedicínské aplikace. Pracovníky z biomedicínské oblasti by pak měl informovat o hlavních oblastech a směrech současné analytické chemie, o jejich možnostech a omezeních a měl by zdůraznit zásadní význam kritického posouzení významu a spolehlivosti experimentálních dat.

Na tomto základě je kurz koncipován jako dialog mezi biomedicínskými a analytickými pracovníky. Přednášky z obou polí se střídají a pokud je to možno, obdobné problematiky jsou zařazovány vedle sebe. Významnou roli by měly hrát diskuse po přednáškách a v závěru jednotlivých dní kurzu.

2.2 Současná analytická chemie

Podle definice uveřejněné Federací evropských chemických společností (WPAC/FECS, 1993) "Analytical chemistry is a scientific discipline which develops and applies methods, instruments and strategies to obtain information on the composition and nature of matter in space and time". V tomto kurzu se nebudeme zabývat výzkumnou částí a budeme hovořit o aplikacích, nicméně i v tomto kontextu lze vysledovat několik hlavních charakteristik současné analytické chemie:

- a) obrovský technologický rozvoj, který umožňuje složitá, citlivá a spolehlivá měření v širokých koncentračních oblastech a jejich automatizaci;
- b) významný posun k fyzikálním měřením (např. hmotnostní a vibrační spektroskopie);
- c) stále rostoucí podíl výpočetních technik a informatiky, z něhož plyne nejen daleko promyšlenější příprava experimentu a hlubší analýza a interpretace experimentálních výsledků, ale i nahrazení mnoha hardwarových řešení řešeními softwarovými – např. oddělování analytického signálu od šumu, či zlepšování selektivity elektrochemických a spektroskopických měření;
- d) inspirace biologií, což je zvláště významné u biomedicínských aplikací, např. oblast biosensorů či použití biospecifických interakcí v afinitních separačních postupech;
- e) zvyšující se nároky na kvalitu analytické informace, především na selektivitu měření při stanovení velkého počtu velmi podobných analytů ve složitých matricích, vedou k propojování více měřicích technik do jednoho celku ("*hyphenation*").

Překotný technologický rozvoj má samozřejmě výrazné pozitivní vlivy, především na servisní analytickou činnost. Produktivita analytické činnosti se rychle zvyšuje, nároky na lidskou práci se snižují, použití kvalitní automatizované instrumentace do určité míry snižuje nebezpečí chyb způsobených lidským selháním, široká aplikace informatických a výpočetních technik usnadňuje interpretaci analytického signálu a přispívá ke zlepšování selektivity a spolehlivosti analýz.

Na druhé straně zde jsou i vlivy negativní. Manuální zručnost analytiků a jejich schopnost pohotově řešit neobvyklé situace a problémy mnohdy poněkud upadá, snižuje se schopnost kritického a racionálního posouzení naměřených hodnot ("slepá důvěra v monitor"). Mnozí analytici se rovněž ostýchají použít pro jednoduchý problém i jednoduchý experimentální přístup – typický příklad (i když z jiné oblasti než je biomedicínská analýza): Jednoduchou slitinu dvou kovů lze spolehlivě analýzovat během dvou minut lacinou chelatometrickou titrací a není zapotřebí použít nákladný, automatizovaný systém ICP/MS.

Současná analytická chemie má nejmenší problémy s dosažením dostatečné citlivosti měření. Při použití pokročilých mikroskopických, spektroskopických, či radiochemických technik lze postřehnout a často i charakterizovat jednotlivé atomy či molekuly.

Podstatně obtížnějším problémem je selektivita měření – rozlišení a stanovení velkého počtu velmi podobných analytů vedle sebe, často v neobyčejně složitých materiálech, vyžaduje optimalizované kombinace výkonných separačních a detekčních technik. I v tomto směru však lze dosáhnout obdivuhodných výsledků – viz např. rozsáhlé genomické a proteomické projekty, či naopak vysoce selektivní detekci a stanovení individuálních analytů s použitím biospecifických interakcí.

Nejslabší stránkou, která je současně nejméně atraktivní z hlediska společenského uznání (viz např. dnes tak populární scientometrické údaje, od kterých se ovšem odvíjejí i evaluační aktivity ovlivňující financování), je vazba na reálný život – odběr a úprava analyzovaných vzorků, aby skutečně reprezentovaly mateřský materiál a příprava dobře definovaných standardních materiálů zaručujících dostatečnou spolehlivost měření.

2.3 Biomedicínské požadavky a analytická odpověď

Základní typy analytických zadání, nejen v biomedicínské oblasti, lze charakterizovat takto:

- a) **Jednorázová rutinní stanovení, mnohdy velmi početná a často opakovaná.** Sem patří např. všemu obyvatelstvu dobře známé analýzy tělních tekutin a vzorků tkání při lékařských kontrolách, v průběhu léčení, při pátrání po zdravotně rizikových faktorech, v epidemiologii apod., jakož i soubory toxikologických měření. Hlavní požadavky na tento typ měření jsou jednoduchost, rychlosť a co nejnižší náklady.
- b) **Kontinuální monitorování individuálních analytů.** Těchto analýz je zapotřebí např. v průběhu protrahovaných lékařských procedur (dobrým příkladem je dialýza na umělé ledvině), při sledování pacientů závislých na podpůrných přístrojích, dále např. při toxikologickém monitorování. K požadavkům uvedeným u bodu a) zde přistupuje důraz na dostatečnou rychlosť odezvy analytického systému a stabilitu analytické odezvy v čase.
- c) **Složitější rutinní stanovení, často zahrnující i velké počty analytů.** S tímto typem analýzy se lze setkat např. při studiu vlivu léků, při rozsáhlých zdravotnických průzkumech v populaci, či při podrobných toxikologických průzkumech. Zde již není velký časový stres, stále však platí požadavky na co největší jednoduchost postupu a co nejnižší náklady, protože počty stanovení bývají vysoké.
- d) **Stanovení související s právně-ekonomickými otázkami.** Tyto analýzy přicházejí např. při posuzování a schvalování nových léků. Většinou jde o stanovení individuálních analytů za předem podrobně definovaných podmínek. V tomto případě výrazně vystupují do popředí právě ty požadavky, které jsou obecně nejméně populární – dokonale definované vzorky, úzkostlivě dodržovaný pracovní postup, vysoce spolehlivé výsledky, shoda se všemi relevantními lokálními, národními a mezinárodními předpisy, normami a zákony.
- e) **Složité analýzy v rámci biomedicínského výzkumu.** Zde jsme již na půdě, kde analytik je členem řešitelského kolektivu, využívá celého analytického arsenálu a případně vymýší, ověřuje a aplikuje nové analytické přístupy.

Jaké tedy jsou současné možnosti? Jsou neobyčejně rozsáhlé a rozmanité. Hlavní těžkostí je nesmírný objem publikovaných výsledků velmi kolísavé kvality. Při hledání cesty k řešení daného problému je proto zcela základním požadavkem schopnost "prokopat se" k potřebným informacím a vymyslet si to, co je zapotřebí a k nalezení není.

Uvedu nyní příklady přístupů k řešení analytických problémů. Vzhledem k šíři problematiky jde jen o některé typické případy a přednášející v tomto kursu uvedou řadu dalších.

2.3.1 Sensory

Sensory, čidla, jsou velmi výhodnou alternativou pro značnou část biomedicínských měření, protože umožňují měření *in situ*, většinou se snadno miniaturizují, nebývají nákladné ani investičně, ani provozně a lze je většinou používat pro měření přetržitá i kontinuální.

Funkce sensoru může být založena na veškerých fyzikálních, chemických a biologických principech. Jde jen o to, dokázat primární interakci analytu s čidlem definovaně a reprodukovatelně převést na elektrický signál. Zmíním se zde pouze o sensorech elektrochemických.

Elektrochemické sensory mají v naší zemi velkou tradici, díky polarografii Jaroslava Heyrovského. V současnosti se velmi prudce rozvíjí výzkum elektrodových materiálů. Rtuť nemá naději, nejen pro až hysterický strach z její toxicity a nepohodlnosti jejího kapalného skupenství, ale i proto, že se její použitelný potenciálový rozsah nehodí pro většinu biomedicínských aplikací.

Naopak různé formy uhlíku poskytují mnoho možností. Nosným prvkem výzkumu elektrodových materiálů je nyní modifikace základního elektrodového materiálu.

Modifikovat lze např. pouze povrch elektrody/sensoru: stačí zoxidovat povrch skelného uhlíku krátkým elektrickým pulsem: vytvoří se povrchové aktivní skupiny obsahující kyslík a elektroda se stává do určité míry selektivní, dokáže např. rozlišovat signály askorbové kyseliny a dopaminu, což je významné při molekulárně biologických studiích. Elektrodový povrch je možno modifikovat adsorpcí či chemickou vazbou všemožných selektivních činidel. Velmi populární je v současnosti modifikace nanočásticemi (kultovní předpona nano-).

Lze modifikovat i celý objem elektrody – viz např. různé rtuťové či uhlíkové pastové elektrody. Čilý výzkum probíhá na diamantové elektrodě, modifikované vhodnými krystalovými inkluzem. Základním problémem je skutečnost, že prací tohoto druhu je mnoho a jejich kvalita je velmi rozmanitá.

Zcela základní je **modifikace biochemickými systémy**, se snahou o téměř specifická čidla – viz glukosová čidla pro diabetiky. Biochemická modifikace neobyčejně rozšiřuje možnosti selektivních detekcí, vnáší však často problémy spojené se stabilitou systému a s reprodukovatelností naměřených dat.

2.3.2 Některé důležité směry rozvoje instrumentálních přístupů

Vývoj instrumentálních přístupů k analýze je velmi intenzívní a mnohostranný. Uvedu zde pouze tři příklady, které považuju za zvláště významné.

- a) **Náhrada přetržitých analýz analýzami v proudu tekutiny.** O tuto oblast se výrazně zasloužil náš kolega J. Růžička (v současnosti Čechoameričan). Metody průtokové vstřikovací analýzy (*flow-injection analysis*, FIA) a novější sekvenční vstřikovací analýzy (*sequential-injection analysis*, SIA) neobyčejně rozšiřují možnosti klasických analýz, snadno se automatizují, jejich produktivita je vysoká a přitom jsou podstatně levnější a flexibilnější než laboratorní roboty pro přetržité analýzy.
- b) **Rychlý rozvoj chromatografických mikrokolon a kapilárních kolon, i kapilárních elektroforetických systémů.** Zde se objevují nové, nesmírně výkonné separační soustavy; zmiňme např. problematiku chirálních separací, tak důležitou pro biomedicínské aplikace, nebo gelové kolony, které vhodně doplňují kolony náplňové a přinášejí nové separační možnosti.
- c) V rámci všeobecné miniaturizace přístrojů a postupů se rychle prosazuje **soustředění funkčních částí analytického systému na jediný křemíkový čip**. Vzniká tedy to, co se v mezinárodní laboratorní hantýrce nazývá "lab-on-chip". Řada již dosažených výsledků je velmi slibná a lze očekávat další prudký rozvoj, zejména v oblasti chromatografických a elektroforetických separací a stanovení.

2.3.3 Kombinace analytických metod

Jak uvedeno výše, mnoho složitějších analýz nevystačí s jednou metodou a vyžaduje propojení více měřicích technik – to se v současné době mezinárodně nazývá "*hyphenation*". Ve většině případů jde o kombinaci jedné či více vysokoúčinných separačních technik s více detekčními technikami. Možnosti kombinací je neobyčejně mnoho, podobně jako různých analytických problémů, a záleží

na analytikovi, aby nalezl nejschůdnější cestu k řešení. Nyní si povšimnu některých kombinací separace–detekce a jejich možností.

V posledních letech došlo k rozvoji v řadě experimentálních směrů, zejména:

- a) Podstatně se zkvalitnila **spektrometrická detekce na diodovém poli** (DAD), především zlepšením softwarového vybavení. Detekce DAD se tak stala naprosto běžnou součástí instrumentace.
- b) **Laserové aplikace** se staly běžnými. To vede ke kvalitativnímu zlepšení řady měření, především měření fluorescence. Vznikly nové techniky, např. ELS – *evaporative light scattering*, MALDI – *matrix-assisted laser desorption/ionization*.
- c) **Hmotnostní spektrometrie** se zdokonalila, zlevnila a stala se běžnou součástí laboratoře. Došlo k zásadnímu rozvoji především vlastní instrumentace (hardware) na všech stupních, od různých spojovacích částí (interface) se separačními systémy, přes zdroje iontů, až po iontové analyzátory.
- d) Vpřed se posouvají **aplikace vibrační spektroskopie, nukleární magnetické resonance a obdobných technik**, zatím jsou však problémy se spojovacími částmi (interface), mají-li být použity v přímém spojení s vysokoúčinnou separací.

2.3.4 Pár příkladů možností aplikace měřicích metod

Předpokládáme-li, že dostatečná separace analytů je zajištěna, pak můžeme uvést tyto základní vlastnosti měřicích metod:

- a) **Spektrometrická detekce v ultrafialové a viditelné oblasti.** Tažný kůň při analýzách, nebezpečí překrývání signálů analytů
- b) **Fluorimetrie, voltametrije.** Vysoce citlivé metody, avšak méně robustní. Za vhodných podmínek však voltametrije může být až překvapivě odolná vůči vlivům matrice vzorků.
- c) **Nízkofrekvenční a vysokofrekvenční konduktometrie.** Nízkofrekvenční konduktometrie je pohodlná metoda pro stanovení iontů (viz elektroforéza), zatímco vysokofrekvenční měření impedance je univerzální a stalo se v posledních letech velmi atraktivním.
- d) **Měření indexu lomu, polarimetrie, evaporative light scattering (ELS).** Tyto měřicí postupy nejsou příliš citlivé a hodí se pro velké molekuly; musí být citlivě vybrány.
- e) **Atomová absorpční spektrometrie (AAS), atomová emisní spektrometrie (AES), spektroskopie v indukčně vázaném plasmatu, optická emisní (ICP-OES) a hmotnostně spektrometrická (ICP-MS).** Tyto metody umožňují prvkovou analýzu a jejich aplikace je spíše v anorganické oblasti, nicméně mohou najít použití ve speciálních případech
- f) **Infračervená a Ramanova spektroskopie, nukleární magnetická rezonance, hmotnostní spektrometrie.** Tyto metody jsou především užitečné při určování struktury organických molekul. Hmotnostní spektrometrie a její vyšší řady MS/MS, (MS)ⁿ, mají velký potenciál v objemných databázích. Nukleární magnetická rezonance je nákladná. Infračervená spektrometrie má hlavní problém ve špatné propustnosti vodných roztoků pro potřebné vlnové délky. Ramanova spektrometrie je velmi nadějná, zatím však její analytické aplikace nejsou příliš rozvinuty.

2.4 Závěr

Volba analytického řešení konkrétního problému z širokých možností musí vyplývat ze systematické spolupráce všech zúčastněných odborníků, v tomto případě analytiků, biochemiků a biofyzičků, lékařů a biologů. Tato spolupráce pak vede i dále, k rozvoji nových přístupů, technik i interpretací, které přispívají k rozvoji všech zúčastněných disciplin.

Přednášky v rámci tohoto kurzu by měly demonstrovat současný stav a naznačovat cesty dále do budoucnosti. Námět této přednášky je natolik obecný a široký, že není možné uvádět seznamy konkrétní literatury, a proto cituji jen několik nedávných publikací, které však obsahují mnoho odkazů na další literaturu.

Literatura

1. Encyclopedia of Analytical Science, 2nd. Ed., P.J.Worsfold, A.Townshend, C.F.Poole, Eds. Elsevier, Oxford 2005.
2. J.Barek, F.Opekar, K.Šulík, Elektroanalytická chemie, Karolinum, Praha 2005.
3. K.Šulík a kol., Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2004.
4. I. Němcová, L. Čermáková, P. Rychlovský, Spektrometrické analytické metody I., Karolinum, Praha 2004.
5. I. Němcová, P. Engst, I. Jelínek, J. Sejbal, P. Rychlovský, Spektrometrické analytické metody II., Karolinum, Praha 1998.
6. J. Růžička, E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, 2nd Ed., J. Wiley, New York 1988.

3. VYUŽITÍ ANALYTICKÝCH METOD VE FARMAKOLOGII

*prof. MUDr. František Perlík, DrSc.,
Farmakologický ústav I. LF UK Praha
fperl@lf1.cuni.cz*

Technický pokrok a nové analytické metody podstatně rozšířily možnosti farmakologie při kvantitativním i kvalitativním stanovování léčiv v biologickém materiálu. Výběr analytické metody je ovlivněn fyzikálně chemickými vlastnostmi léčiva, jeho koncentrací v biologických tekutinách, metabolismem i znalostí farmakokinetiky. Nemalý význam mají též požadavky praxe na počet, rychlosť a přesnost stanovení i ekonomické možnosti. Cílem příspěvku je ukázat příklady využití analytických metod při studiu farmakokinetiky a metabolismu nově vyvíjených léčiv i při jejich klinickém používání.

Vývoj nového léku je časově i ekonomicky náročný proces, který v preklinické i klinické části zajišťují týmy vědeckých pracovníků s interdisciplinárním zaměřením. Cílem preklinické části výzkumu je porozumět, co se děje s podanou látkou v organismu, jak lze využít tyto poznatky ke zlepšení léku, při úpravě dávkování a zvýšení bezpečnosti. Činnosti soustředěující se na tyto oblasti zahrnují bioanalýzu, farmakokinetiku a metabolismus léků [1].

Po objevu nového léku je prioritou dalšího výzkumu výběr farmakologicky aktivní látky, případně vhodného analoga.

3.1 Význam fyzikálně-chemických faktorů

Poznatky o fyzikálně-chemických vlastnostech látky významně ovlivňují jak přípravu lékové formy, tak její osud v organismu i možnosti detekce.

Pohyb látek v organismu výrazně závisí na prostupu hydrofobními bariérami. Nepolární látky se snadno rozpouštějí v lipidech, což usnadňuje jejich difúzi buněčnými membránami. Rozpustnost v lipidech tak ovlivňuje řadu farmakokinetických procesů, např. rychlosť absorpce ze střeva, průnik do centrálního nervového systému i rozsah a způsob eliminace.

Další důležitou vlastností je stupeň ionizace léčiva. Neionizované formy jsou lipofilnější, snadněji procházejí lipoidními membránami a v ustáleném stavu dosahují stejně koncentrace ve všech orgánech [2].

Rozdíly hodnot pH v jednotlivých tkáních způsobují, že za rovnovážného stavu se bude lišit celková (ionizovaná a neionizovaná) koncentrace léčiva v různých tělesných kompartmentech. Kyselé léčivo se koncentruje v kompartmentu s vyšším pH. Z těchto poznatků např. vyplývá, že kyselé pH žaludečního obsahu příznivě ovlivňuje absorpci slabých kyselin. Rozdíly v pH jsou také významné při exkreci ledvinami. Alkalizací moči lze například zvýšit vylučování slabých kyselin.

3.2 Farmakokinetické procesy

Vývoj citlivé a specifické bioanalytické metody umožňuje studium osudu látek v plazmě i moči a podstatně ovlivňuje preklinický i klinický vývoj léčiv. Kromě vlastního stanovení koncentrace

léčiva napomáhá bioanalýza detekci endogenních látek, které jsou odezvou na farmakologické působení nebo vývoj nemoci.

Plazmatické koncentrace léčiva získané při preklinickém vývoji nebo při hodnocení u člověka se používají k výpočtu farmakokinetických parametrů. Jejich určení napomáhá optimální základ dávkování a snížit toxicitu.

Časový průběh pohybu léčiv v organismu studuje **farmakokinetika**, která se zabývá zejména kvantitativními závislostmi vstupu léčiv do organismu, vlivem prvního průtoku játry, celkovou biologickou dostupností, distribucí a redistribucí léčiv, biotransformací v játrech a eliminací ledvinami. V souhrnu popisuje farmakokinetika absorpci, distribuci a eliminaci látek. Tyto děje lze popsat matematickými metodami a farmakokinetickou analýzou určit farmakokinetické parametry [3].

3.2.1 Farmakokinetické parametry

Mezi klinicky významné parametry řadíme distribuční objem, poločas, celkovou clearance a biologickou dostupnost. **Distribuční objem** (V_d) u jednokompartimentového farmakokinetického modelu vyjadřuje poměr mezi nitrožilně podanou nárazovou dávkou léčiva (D) a koncentrací léčiva v čase 0 (C_0):

$$V_d = D/C_0$$

Distribuční objem je odvozený parametr, který má omezený fyziologický význam. Je to způsobeno tím, že se vychází z předpokladu rovnoměrného rozdělení léčiva v organismu. V klinické praxi se distribuční objem uplatňuje při stanovení počáteční (nárazové) dávky. Čím větší je distribuční objem, tím menší je koncentrace dosažená po stejně dávce léčiva.

Poločas eliminace ($t_{1/2}$) je farmakokinetický parametr, který charakterizuje rychlosť eliminace léčiva z organismu. Nevýhodou tohoto parametru je jeho závislost na poměru hodnot distribučního objemu (V_d) a celkové clearance léčiva (CL). Při použití jednokompartimentového modelu platí vztah

$$t_{1/2} = 0,7 \cdot V_d / CL$$

Poločas eliminace je mírou schopnosti organismu eliminovat léčivo pouze za předpokladu, že se nemění distribuční objem léčiva. V klinické praxi nám poločas usnadňuje odhadnout nástup ustáleného stavu (C_{ss}) při opakovém podávání léčiva. Ustálený stav je charakterizován dosažením rovnováhy mezi rychlosťí přívodu léčiva a jeho eliminací z organismu, ustálený stav vzniká po uplynutí 4-5 poločasů. Dosažení ustáleného stavu je prakticky významné pro terapeutické monitorování léčiv, kdy hodnotíme dosažení doporučovaného terapeutického rozmezí. Pokud se léčiva podávají v intervalu kratším, než je dvojnásobek poločasu, potom dochází k jejich výrazné kumulaci. Množství léku v ustáleném stavu závisí vždy na dávce a frekvenci podávání.

Celková clearance (CL) je mimořádně významný farmakokinetický parametr, který vyjadřuje množství plazmy nebo krve, které se úplně očistí od dané látky za jednotku času všemi eliminačními cestami. Clearance je určující parametr dávkování léčiv při jejich opakovém podávání. Na clearance se podílí distribuce léčiva, jeho metabolismus a exkrece. Celková clearance se nejčastěji určuje z teoretického vztahu

$$CL = D/AUC_{0-\infty}$$

Při jednorázovém nitrožilním podání dávky léčiva (D) je nutné nejprve určit celkovou plochu pod křivkou koncentrací v čase $0-\infty$ ($AUC_{0-\infty}$).

Biologická dostupnost souhrnně označuje podíl účinné látky, který se dostává do systémového krevního oběhu. V praxi se biologická dostupnost týká zejména perorálního podávání léků. První etapa zahrnuje farmaceutické děje jako jsou dezintegrace a disoluce galenické formy léčiva. Tyto procesy jsou ovlivněny zpracováním léčiva do lékové formy a vytvářejí základní předpoklad úspěšné absorpce. Jestliže různí výrobci uvádějí na trh tutéž účinnou látku, mohou se různé přípravky lišit rozdílnou biologickou dostupností. Základním předpokladem registrace nového generického přípravku je průkaz **bioekvalence**. Podle současné definice jsou dva přípravky bioekvalentní, jestliže jsou farmaceuticky ekvivalentní nebo farmaceuticky alternativní a jestliže jejich biologická dostupnost je po podání stejně molární dávky natolik podobná, že lze předpokládat stejnou účinnost i bezpečnost přípravků.

Pro registraci léčiv i pro jejich používání je důležitý termín **přípravky v zásadě podobné**. Jsou to takové přípravky, které mají kvalitativně i kvantitativně shodný obsah účinných látek, stejný způsob použití a jejichž léková forma je totožná nebo má obdobné vlastnosti. Přípravky, které splňují tuto definici, umožňují využít odkaz na údaje jiného, již v registraci schváleného léčiva. Při bioekvalenčních studiích se srovnává relativní biologická dostupnost nové lékové formy se standardem.. Pomocí farmakokinetických parametrů se posuzuje vždy rychlosť i množství vstřebané látky. Cílem je průkaz ekvalence v akceptovatelném rozmezí. Z toho vyplývají i požadavky statistické analýzy. Dva léky jsou bioekvalentní, jestliže 90%ní interval spolehlivosti poměru testované léčivo/referenční léčivo leží uvnitř intervalu 0,8 až 1,25.

Z klinického pohledu může být biologická dostupnost ovlivněna řadou patologických stavů a interakcí při vstřebání léčiv. Významná je též neúplná biologická dostupnost způsobená tzv. presystémovou eliminací, zahrnující u perorálně podávaných léčiv biotransformaci léčiva ve střevní sliznici nebo při průchodu portálním oběhem. Účinek prvního průchodu játry (first-pass effect) se uplatňuje u léčiv s vysokým jaterním extrakčním koeficientem, jejichž jaterní clearance je významně ovlivněna změnami krevního průtoku játry.

3.3 Biotransformace léčiv

Součástí studia pohybu podané látky v organismu je i sledování pochodů, které mění strukturu léčiva. Počet používaných léčiv je velký, ale přesto se jejich biotransformační přeměna v organismu děje na základě relativně malého počtu reakcí. Jejich cílem je vytvořit hydrofilnější, polárnější metabolity vylučující se z organismu snadněji než původní lipofilní látka. Znalost těchto metabolismických cest je při preklinickém vývoji významná pro výběr vhodného zvířecího druhu, který nejlépe odpovídá situaci u člověka. Neméně významná je i znalost enzymů s biotransformační aktivitou umístěných především v endoplazmatickém retikulu a cytosolu. Převážná část biotransformačních oxidačních reakcí je katalyzována cytochrom P450 monooxygenasovým systémem. Přestože je u člověka popsáno více než 50 různých proteinů cytochromu P450, probíhá metabolismus léčiv převážně pěti až šesti hlavními enzymovými cestami.

3.3.1 Metabolický polymorfismus

Schopnost organismu léčiva metabolizovat a eliminovat je často ovlivněna genetickou vlohou organismu [4,5]. Přibližně 40 % léčiv je přitom odbouráváno geneticky polymorfní cestou, přičemž

nejvýznamnější je cytochrom P450 2D6 (CYP2D6). Polymorfismus metabolické cesty znamená, že můžeme v populaci nalézt jedince, u kterých je příslušná enzymatická aktivita neaktivní (tzv. pomalí metabolizátoři, PM), jedince s nekompletním deficitem aktivity enzymu (intermediární metabolizátoři, IM) i skupinu rychlých metabolizátorů (EM) s obvyklou aktivitou metabolické přeměny. U enzymu 2D6 cytochromu P450 známe také ještě skupinu tzv. ultrarychlých metabolizátorů (UM), což jsou lidé s neobvykle vysokou aktivitou metabolické cesty CYP2D6.

Při podávání obvyklých dávek léčiv dochází u pomalých metabolizátorů ke kumulaci látek. Jejich vysoké koncentrace v cílových tkáních se mohou projevovat jako toxicke a nežádoucí účinky léků. Naopak u ultrarychlých metabolizátorů nedochází k vytvoření ustáleného stavu a i koncentrace léčiv v cílových tkáních mohou být nižší než minimální účinné. Proto jsou tito lidé rezistentní k běžnému terapeutickému dávkování. Hlavními formami cytochromu v lidských játrech jsou dále CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4.

3.3.2 Farmakogenetika

Perspektivní jsou metody zaměřené na odhalování genetického polymorfismu v metabolismu léčiv, jehož podstatou jsou genové mutace. V podmínkách *in vivo* se provádí určování fenotypu a genotypu. Genotyp lze určit analýzou DNA pomocí PCR. Analýza vychází z polymorfismu délky restrikčních fragmentů RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*), na něž je DNA štěpena endonukleasami, a to v místě sekvence bazí specifických pro každý enzym.

Uvedenými otázkami se zabývá **farmakogenetika**, která se snaží tyto determinanty nejenom popsát, ale na základě jejich znalosti individualizovat terapii a predikovat metabolickou přeměnu i odpověď nemocných na konkrétní léčivo. Z dosavadních poznatků je zřejmé, že kromě vlastního genotypu jednotlivých forem cytochromu P450 rozhoduje o aktuální metabolické aktivitě fenotypu i řada dalších zevních faktorů. Podílí se na nich procesy metabolické indukce a inhibice metabolizujících enzymů vyvolané současně podávanými jinými léčivy nebo složkami potravy. Významnou součástí vnitřních faktorů je chorobný stav, např. jaterní cirhóza, vedoucí ke snížení syntézy řady enzymů. Výsledná metabolická aktivita jednotlivých enzymů – metabolický fenotyp léčiva – se testuje pomocí tzv. modelových substrátů (tab 3.1).

Princip stanovení fenotypu spočívá v podání látky, která je pro testovaný enzym vysoko specifickým substrátem. Rychlosť biotransformace modelové látky musí záviset především na aktivitě studovaného enzymu, nikoli na průtoku krve játry. Podle metabolického poměru mateřská látka/metabolit se testovaný subjekt zařadí do odpovídající skupiny, kterou např. označujeme jako „pomalí metabolizátoři“ nebo „rychlí metabolizátoři“.

Klinická farmakologie využívá výsledky fenotypizace i genotypizace při odhalování interindividualních rozdílů v metabolismu léčiv, což přispívá k optimalizaci léčby a snížení výskytu nežádoucích účinků.

3.4 Terapeutické monitorování léčiv

Působení léčiv se uskutečňuje na různých úrovních: na úrovni celého organismu, na úrovni jednotlivých orgánů a tkání i na úrovni buněčné a molekulární. Určujícím činitelem farmakologického působení je koncentrace léčiva [6].

Tab. 3.1: Přehled modelových substrátů a možnosti jejich použití

Enzym	Modelová látka	Výhody	Nevýhody
CYP1A2	coffein	relativní bezpečnost, vhodné biologické vzorky: krev, sliny a moč, současně lze určit fenotyp <i>N</i> -acetyltransferasy	komplexní metabolismus s podílem řady dalších enzymů; <i>CL</i> coffeingu i metabolitů závisí na krevním průtoku
	theophyllin	méně komplikovaný metabolismus	malá korelace poměru v plazmě a moči
CYP2C9	tolbutamid		riziko hypoglykémie, nedostatečná validace <i>in vivo</i>
	phenytoin	poměr v plazmě i v moči	úzké terapeutické okno; <i>CL</i> renální závislá na průtoku
	warfarin	S-warfarin je téměř výhradně metabolizován CYP2C9	riziko krvácení, nedostatečná validace <i>in vivo</i>
	losartan	relativní bezpečnější než jiné látky	metabolický podíl dalších enzymů
CYP2C19	mephenytoin	dobrá detekce PM	riziko nežádoucích účinků, nedostatečné koncentrace u části vzorků
	omeprazol	snadnější detekce a možnost odlišení subjektů s vysokou aktivitou, větší bezpečnost	omezený počet publikací <i>in vivo</i>
	proquanil	dostatečné množství literárních údajů	neúplné odlišení PM od EM ve vzorcích moči
CYP2D6	dextromethorphan	dostupnost léčiva a možnost vyšetření plazmy, slin i moči	možné nepřesnosti u subjektů se sníženou renální funkcí.
	debrisoquin	snadnější rozlišení osob s vyšší aktivitou	riziko nežádoucích účinků, není používán jako léčivo
	spartein	možnost použití u subjektů se sníženou renální funkcí	riziko nežádoucích účinků, není používán jako léčivo
	metoprolol	široké terapeutické použití	vysoko variabilní korelace s ostatními látkami
	propafenon	relativně časté klinické použití	malý počet publikací
CYP2E1	chlorzoxazon	jediná dobře popsaná modelová látka	pravděpodobná spoluúčast dalších enzymů
CYP3A	cortisol	endogenní substrát	možnost extrahepatálního metabolismu, použitelný pouze k detekci indukce
	midazolam	není substrát pro glykoprotein P	možný vliv průtoku krve játry, nutnnost vícenásobných odběrů krve
	dapson	současné stanovení aktivity <i>N</i> -acetyltransferasy	možnost extrahepatálního metabolismu, slabá korelace s ostatními modelovými látkami
	dextromethorphan	současné stanovení aktivity CYP2D6	ovlivnění metabolismu jinými enzymy, slabá korelace s ostatními modelovými látkami.
	14C-erythromycin	dostatečné ověření <i>in vivo</i>	substrát glykoproteinu P, možnost ovlivnění vazbou na proteiny

Cílem této oblasti farmakologie je vytvořit objektivní základ pro racionalizaci dávkování léků, ale také pro individualizaci léčby, která přihlídí k odlišnostem jednotlivých nemocných. Snažba o individualní úpravu dávkování má velký význam při zajištění efektivnosti terapie a snížení nežádoucích účinků.

Většina léků vykazuje charakteristický vztah mezi dávkou a účinkem, jak na úrovni individuálního nemocného, tak v dané skupině nemocných.

Při bližší analýze se dále ukázalo, že intenzita farmakologického působení léčiv koreluje lépe s plazmatickou koncentrací než s dávkou léčiva. Z těchto základních předpokladů vychází i terapeutické monitorování léčiv, které se snaží o klinické využívání určování koncentrace léčivých látek v organismu s cílem individuální úpravy dávkování. Individuální úprava dávky se opírá o dosažení specifické cílové koncentrace léčiva. Tím se snižuje hlavní zdroj variability koncentrací léčiva, který je způsoben individuálními rozdíly ve farmakokinetice. Ovlivnění cílové koncentrace integruje dávku, koncentraci a účinek s cílem přesnějšího pochopení farmakokinetiky a farmakodynamiky léku u individuálního nemocného.

Charakteristickými rysy léčiv vhodných pro monitorování jsou tyto vlastnosti: malá terapeutická šíře, nebezpečí toxicity, velká interindividuální variabilita, strmá závislost mezi dávkou a účinkem, definovaný vztah mezi koncentrací a účinkem, dlouhodobé léčení, nelineární farmakokinetika, život ohrožující stavy a dostupnost analytické metody. Příklady monitorovaných léčiv a doporučované rozmezí terapeutických koncentrací shrnuje tab 3.2.

3.5 Závěr

Analytické metody léčiv a cizorodých látek mají nezastupitelné místo nejenom při preklinickém i klinickém vývoji léčiv, ale také po jejich zavedení do širší terapeutické praxe. Pomáhají optimálně zároveň dánkování a spolupůsobí při prevenci nežádoucích účinků.

Použitá literatura

7. Evans G (Ed): *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*. CRC Press, 2004.
8. Lincová D, Farghali H (Eds): *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vydání. Galen, Karolinum, 2007.
9. Perlík F: *Základy farmakologie*. Galén, Karolinum, 2005.
10. Anzenbacher P: *Úvod do farmakogenetiky*. Klin. farmakol. a farmacie 2002, 16, s, 7-9 .
11. Slanař O, Dražďáková M et al.: *Genotypizace cytochromu P450 2D6 a 2C19*. Čas Lek Čes 2007, 146, s.708-711.
12. Zima T (Ed): *Laboratorní diagnostika*, 2.vydání. Galén, Karolinum, 2007.

Tab. 3.2 Obvyklé terapeutické rozmezí léčiv

Léčivo	Obvykle doporučované rozmezí: minimální účinná koncentrace $C_{ss,min}$, nebo maximální bezpečná koncentrace $C_{ss,max}$ (obojí v mg l ⁻¹)		Doba nástupu ustáleného stavu
Aminoglykosidová antibiotika			
	$C_{ss,min}$	$C_{ss,max}$	
Amikacin	3-5	20-30	8 hodin
Gentamicin	1-2	5-10	8 hodin
Netilmicin	1-2	5-10	8 hodin
Tobramycin	1-2	5-10	8 hodin
Antiarytmika			
Amiodaron	1,0-2,5		> 1 měsíc
Disopyramid	2-5		24 hodin
Chinidin	1-5		24 hodin
Lidokain	1,5-5		12 hodin
Mexiletin	0,5-1,9		2 dny
Prokainamid	3,6-10		16 hodin
Sotalol	1-2,5		48 hodin
Antiepileptika			
Ethosuximid	50-100		8 dnů
Fenobarbital	15-40		2 týdny
Fenytoin	10-20		> 2 týdny
Karbamazepin	5-12		2 týdny
Klonazepam	0,025-0,075		5 dnů
Kyselina valproová	50-100		40 hodin
Primidon	5-15		2 dny
Psychofarmaka			
Amitriptylin	0,1-0,25		3 dny
Haloperidol	5,2-15		3 dny
Imipramin	0,12-0,3		2 dny
Lithium	5,5-7		3 dny
Nortriptylin	0,05-0,15		5 dnů
Ostatní			
Cyklosporin	0,08-0,25		3 dny
Digoxin	1-2 µg l ⁻¹		7 dnů
Salicyláty	150-300		2-5 dnů
Theofylin	10-20		36 hodin

4. VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE A MEDICÍNA

prof. Ing. Karel Volka, CSc.,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská,

Ústav analytické chemie

Karel.Volka@vscht.cz

4.1 Úvod

Jednou z technicky nejjednodušších cest, jak získat informace o chemickém složení, molekulové struktuře a molekulárních interakcích v buňkách a tkáních, je vibrační spektroskopie. Každá změna molekulové struktury se více či méně projeví ve vibračním spektru, a pokud je tato změna charakteristická pro určitou nemoc, lze vibrační spektroskopii využít jako velmi účinný analytický či diagnostický nástroj, a to jak *ex vivo*, tak *in vivo*. Snaha o uplatnění vibrační spektroskopie v medicíně je velmi rozsáhlá a sleduje řadu cílů:

- nahrazení současných invazivních technik metodami neinvazivními nebo minimálně invazivními,
- kontinuální monitoring,
- řízení chirurgických zásahů,
- monitorování účinku léků či radiační terapie,
- identifikaci patogenních mikroorganizmů,
- charakterizaci vzorků tkání,

a řadu dalších. V současnosti existuje řada studií, které možnosti vibrační spektroskopie přesvědčivě dokumentují, na druhé straně zřejmě neexistuje žádná, která by byla dotažena do rutinní klinické praxe. Je pro to řada důvodů, které budou dále stručně diskutovány.

Vibrační spektrum získáváme obvykle dvěma technikami: infračervenou spektroskopíí a Ramanovou spektroskopíí. Vznik infračerveného a Ramanova spektra se řídí odlišnými zákonitostmi, interpretací spekter však získáme podobnou informaci.

Infračervená spektroskopie obvykle využívá absorpčního experimentu: na vzorek necháme dopadnout svazek infračerveného záření a zjišťujeme, k jakému zeslabení došlo po průchodu měřeným vzorkem pro jednotlivé vlnové délky dopadajícího záření. Infračervené záření dělíme na oblast blízkou, střední a dalekou. Nejsnáze interpretovatelné informace nese oblast střední, pro kterou je také charakteristická poměrně silná absorpcie záření. Díky tomu je vrstva vzorku, kterou potřebujeme měřit, velmi tenká, rádu desítek mikrometrů. To je v řadě případů výhoda, častěji však nevýhoda, neboť je třeba zkoumaný vzorek vhodným způsobem ředit. Podstatně menší absorptivitu pozorujeme v blízké infračervené oblasti, kde záření může procházet vrstvami podstatně tlustšími, interpretace spekter je však většinou podstatně komplikovanější a spokojujeme se proto s jejich chemometrickým hodnocením.

Ramanova spektroskopie je technika založená na rozptylu záření. Interakce fotonů s vibrujícími molekulami vzorku vede k pružné srážce (Rayleighův rozptyl) či nepružné srážce (Ramanův rozptyl). Zatímco v prvním případě foton zachovává svoji frekvenci, při Ramanově rozptylu se jeho frekvence změní o diferenci odpovídající rozdílu vibračních hladin v molekule. Příspěvek se podstatně častější odečítá (Stokesovy linie) než přičítá (anti-Stokesovy linie). Pro ozáření

vzorku používáme vhodný laser, a to nejčastěji v oblasti viditelného záření: např. helium-neonový laser s excitační vlnovou délkou $\lambda = 633$ nm, argonový laser s $\lambda = 458$ nm. Ramanův efekt je velmi slabý: jen část záření je rozptýlena nepružně a intenzita Ramanova záření je podstatně slabší než intenzita záření Rayleighova. Ramanův rozptyl může být navíc překryt fluorescencí, pokud pro excitaci použijeme laser o vlnové délce schopné převést molekuly zkoumané látky do excitovaného elektronového stavu. Výhodné je proto použít k excitaci záření o takové vlnové délce, která ve zkoumané látce fluorescenci nevyvolá, tedy z oblasti blízké infračervené. Optimální je oblast 785 až 840 nm, která je kompromisem z hlediska minimalizace interference fluorescence a možnosti využít oblast vysoké citlivosti CCD-detektorů.

Současný rozvoj mikroelektroniky, laserové i počítačové techniky způsobil, že infračervená i Ramanova spektroskopie jsou dnes technikami rutinními. V posledních několika letech prodělala rychlý vývoj především Ramanova spektrometrie, která přestala být nákladnou technikou výlučně pro specializované laboratoře.

Infračervený spektrometr je dnes konstruován většinou na principu Michelsonova skenovacího interferometru. Výsledkem měření je interferogram, který se na infračervené spektrum převádí Fourierovou transformací (FT). Hovoříme proto o FTIR-spektrometru, jehož pracovní rozsah může být optimalizován pro dalekou, střední či blízkou infračervenou oblast. Přístroj lze doplnit mikroskopem s dosažitelným rozlišením 10 μm .

Ramanova spektroskopie s viditelnou excitací dnes využívá velmi účinné holografické mřížky a filtry (notch-filtry), které dovolují konstruovat spektrografy o minimálních rozměrech. Ramanova mikroskopie dovoluje o řád vyšší rozlišení než mikroskopie infračervená, tj. ca 1 μm . Excitační i Ramanovo záření lze vést optickými vlákny, což usnadňuje řadu experimentů. Při excitaci v blízké infračervené oblasti (Nd:YAG laser, $\lambda = 1\ 064$ nm) se pro měření používá Michelsoňův skenovací interferometr schodný s FTIR-spektrometrem optimalizovaným pro blízkou infračervenou oblast.

Pomocí infračervené i Ramanovy spektroskopie lze provádět také spektrální zobrazování (imaging).

V dalším textu jsou shrnutý některé aplikace vibrační spektroskopie, které se autorovy jeví jako zajímavé. Nejde zdaleka o výčet vyčerpávající a dotýká se jen některých oblastí výzkumu.

4.2 Analýza *ex vivo*

4.2.1 Analýza tělních tekutin bez použití činidel

Jednou z nejpoužívanějších analytických technik je absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti. Ta je atraktivní především poměrně levnou instrumentací, kterou lze také relativně snadno automatizovat a dosáhnout tak velké prostupnosti vzorků. Nevýhodou je skutečnost, že většina látek nevykazuje dostatečnou absorpci ve viditelné oblasti, a proto je nutno analyt převádět vhodnou reakcí na barevný reakční produkt. To sebou nese řadu problémů principiálních (nutno zohlednit kinetiku reakce, interference ostatních látek), ale i problémů technických či ekonomických (cena činidel, nezbytnost použití organických rozpouštědel atp.).

Vibrační spektrum nese naproti tomu často tolik informací, že danou látku můžeme na základě tohoto spektra spolehlivě identifikovat i v poměrně složité matrici. Typickou ukázkou jsou pokusy stanovovat klinicky důležité analyty v krvi, krevní plazmě, moči atp. Problému s vysokou

absorpcí vody se lze s úspěchem vyhnout, pokud se vlastní měření provádí na vysušených vzorcích tělních tekutin. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo např. při kvantifikaci glukosy a močoviny v plné krvi. Vzorek plné krve byl nejdříve doplněn zředěným roztokem thiokyanatanu draselného a poté jeho část odpařena na okénku z fluoridu barnatého. Spektra byla získána transmisní technikou a thiokyanatan draselný sloužil k normalizaci spektra, a tím k eliminaci variací v tloušťce vrstvy. Dosažená hodnota SEP (*standard error of performance*) činila pro glukosu $1,20 \text{ mmol L}^{-1}$, pro močovinu $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$. Bylo rovněž ukázáno, že metodu lze kalibrovat přímo na hodnoty získané na krevním seru.

S výhodou lze využít také techniku zeslabeného totálního odrazu (*attenuated total reflection*, ATR). V tomto případě je vzorek umístěn na krystal o vysokém indexu lomu, na němž dochází k totálnímu odrazu infračerveného záření. Totálně odražený svazek paprsků dává na rozhraní s opticky řidším prostředím vzniknout evanescentní vlně, která je zeslabena v závislosti na absorpčních vlastnostech tohoto prostředí. Odražený svazek paprsků tedy nese analogickou informaci jako svazek, který prošel vzorkem při transmisním experimentu. Vhodným materiélem pro krystal je např. diamat a pro mikrohranol o ploše 1 mm^2 a vzorky sera o objemu $1 \mu\text{L}$ lze dosáhnout SEP $0,11 \text{ mmol L}^{-1}$. Jsou činěny pokusy analyzovat vzorky o objemu stovek nanolitrů.

4.2.2 Analýza tkání

Zvláštní pozornost je věnována možnosti využít Ramanovu spektroskopii pro diagnostiku rakoviných tkání, zejména rakoviny prsu. Vychází se z faktu, že např. mamograficky nalezené léze jsou ze 70-90 % benigní, přičemž plná diagnostika trvá až několik měsíců a vyžaduje často opakování biopsie. Snaha je nalézt takové znaky v Ramanově spektru, které dovolí benigní a maligní léze bezpečně odlišit. K jejich odhalení lze použít chemometrické techniky (např. analýzu hlavních komponent, PCA), byl ale také navržen morfologický model, který hledá maximální shodu makroskopickou technikou získaného spektra s modelem tvořeným lineární kombinací spekter jednotlivých morfologických složek či chemických komponent. Tento model sestává např. ze spektra buněčné cytoplazmy, buněčného jádra, tuku, β -karotenu, kolagenu, hydroxyapatitu vápenatého, dihydrátu oxalátu vápenatého a lipidů (podobných cholesterolu). Výsledkem je sada koeficientů charakterizujících jednotlivé tkáně.

S výhodou je pro tyto studie možno použít mapovací techniku nebo techniku spektrálního zobrazování. V prvním případě získáváme postupně jednotlivá spektra pro každý zobrazovaný element obrazu, v druhém získáváme celkový obraz pro jednotlivé vlnové délky a spektra poté rekonstruujeme pro jednotlivé pixely zobrazovacího elementu.

Většina spektroskopických studií analyzuje zmrazené nebo čerstvé vzorky tkání. Existuje však velké množství vzorků uložených v bankách nádorů, které jsou pro tyto účely fixovány formalinem a uloženy v parafinu. Odstranění parafinu představuje poměrně náročný krok, který by se mohl projevit dalšími chemickými změnami vzorku. Byla proto navržena kombinace FT-infračerveného spektrálního zobrazování a chemometriky, která dovoluje rozlišit oblasti tumoru od ostatní tkáně a parafinu.

4.3 Analýza *in vivo*

4.3.1 Neinvazivní měření

Jako neinvazivní označujeme takové měření, při kterém nedochází k přímému kontaktu mezi převodním elementem a zkoumanou biologickou kapalinou. Nejobvyklejší cestou je zkoumat část tkáně svazkem elektromagnetického záření a údaje o koncentraci hledané složky extrahovat ze získaného spektra. Jde o velmi náročný úkol, který se dosud nepodařilo vyřešit ani pro tak velmi sledovaný analyt, jakým je glukosa. Neinvazivnímu stanovení glukosy je věnováno velké úsilí již téměř 20 let, aniž by bylo dosaženo úspěchu. Důvodem je to, že je potřeba určit velmi malou koncentraci glukosy ve velmi komplikované a proměnné matrici, což je mimořádně obtížné. Uvádí se, že zvláště kritické je rozmezí 2 až 5 mmol L⁻¹, kde minimální nesprávnost může mít závažné klinické důsledky.

Infračervenou spektroskopii lze aplikovat pouze v blízké infračervené oblasti. Záření ve střední infračervené oblasti je silně absorbováno vodou a ostatními složkami tkáně, takže pronikne kůži pouze do hloubky několika desítek mikrometrů. Absorpce vody limituje aplikaci i v blízké infračervené oblasti, avšak oblasti 5 000 až 4 000, 6 500 až 5 500 a 14 286 až 7 300 cm⁻¹ představují transmisní okna, ve kterých optimální tloušťka měřené vrstvy činí cca 1, 5, resp. 10 mm. V použité oblasti se musí nacházet čistý analytický signál, který je jedinečný pro sledovaný analyt, a to s přihlédnutím k variabilitě spektra způsobené změnami v chemické matrici, ve fyzikálních vlastnostech vzorku, či instrumentálními a dalšími podmínkami měření. Kritickým parametrem, a vlastně jediným, který může experimentátor do jisté míry ovlivnit, je tloušťka měřené vrstvy. Její obtížná definovatelnost spočívá mj. ve skutečnosti, že tkáň představuje silně rozptylující, heterogenní prostředí, kterým jen část fotonů projde, aniž by jejich dráha byla změněna. Přesto existuje celá řada pokusů o komericializaci této techniky. V roce 2006 bylo vyvinuto minimálně šest komerčních přístrojů pracujících na principu blízké infračervené spektroskopie, které byly v různém stádiu schvalování u FDA. Hodnocení jejich úspěšnosti zatím chybí.

K neinvazivnímu sledování analytů v krvi byla použita i Ramanova spektrometrie. Intenzita pásů glukosy je v případě transkutánního měření několiksetkrát menší než intenzita pásů kůže, které se s pásy glukosy silně překrývají, a fluorescence dominuje i při excitaci vlnovou délkou 830 nm. Signál je samozřejmě ovlivněn hloubkou, resp. objemem zasažené tkáně, a tak výsledky zatím nejsou příliš uspokojivé.

Naproti tomu poměrně snadno lze Ramanovu spektroskopii použít pro analýzu kůže, např. pro sledování karotenoidů v kůži. Karotenoidy patří mezi látky, u kterých se setkáváme s tzv. resonančním Ramanovým rozptylem. To je případ, kdy vlnová délka použitého laseru excituje danou látku do excitovaného elektronového stavu a díky tomu dojde k enormnímu zesílení Ramanova efektu. Pozorované Ramanovo spektrum je přitom velmi charakteristické.

Podobně lze sledovat obsah karotenoidů v oku a jsou činěny pokusy sledovat pomocí této techniky i další látky, mj. antibiotika nebo glukosu. Zatímco tkáně oka jsou pro záření relativně transparentní, podstatně obtížnější je sledování analytů pod kůží.

Poslední výzkum ukazuje i v této oblasti slibné výsledky. Vychází totiž z pozorování rozdílného chování fotonů excitačních fotonů a fotonů Ramanova rozptylu. Pro informace o hlubokých vrstvách vzorku mají největší význam fotony difuzně rozptylené (na rozdíl od balistických či „hadovitých“ fotonů), přičemž Ramanovo záření je nejen zeslabováno tímto rozptylem (případně

absorpcí), ale také zesilováno díky působení elasticky rozptýlených fotonů. Ramanovo složka záření tedy klesá se vzdáleností mnohem pomaleji než složky Rayleighova záření. Na základě pochopení migrace fotonů byly navrženy dva neinvazivní přístupy: časový a prostorový. Ten první spočívá na velmi sofistikované technice schopné odlišit signály detegované v pikosekundové škále (Kerrovým hradlem ovládaná Ramanova spektroskopie), druhý na jednoduchém triku sledování Ramanova signálu mimo oblast jeho excitace (*spatially offset Raman spectroscopy*).

4.3.2 Identifikace a charakterizace klinicky důležitých mikroorganismů

Zajímavou aplikaci vibrační spektroskopie představuje také identifikace a charakterizace klinicky důležitých mikroorganismů. Slibné výsledky ukázaly pokusy s měřením Ramanových spekter mikrokolonií po 6 h přímo na pevném kultivačním mediu. Na rozdíl od konvenčního mikrobiologického přístupu, který vyžaduje několikadenní kultivaci, lze touto cestou získat stejné výsledky během jednoho dne, s minimální spotřebou chemikálií a materiálu a bez nutnosti manipulovat se vzorkem. Vlastní zpracování dat lze provádět pomocí vhodného softwaru. Metoda však vyžaduje pečlivou korekci na proměnné parametry, kterými je obsah vody, množství a složení media atd.

4.4 Perspektivy

Všechny tyto výsledky ukazují široké možnosti aplikace vibrační spektroskopie v různých oblastech medicíny. Mezi identifikací potřeb a implementací do klinické praxe je však řada důležitých kroků, které nelze přeskočit:

- zhodnocení technických a metodických předpokladů,
- zhodnocení proveditelnosti,
- zhodnocení klinické důležitosti informace,
- optimalizace,
- klinické testy,
- vytvoření neexpertního systému,
- další klinické studie.

Řada současných studií je provedena na nedostatečném počtu vzorků, nebyly provedeny řádné klinické testy, není dostatečně zajištěna kalibrace přístroje atp. Má-li být dosaženo úspěchu, je třeba velmi těsná spolupráce spektroskopiků, klinických lékařů, patologů, biochemiků a dalších specialistů.

Literatura

1. Amerov A. K., Chen J., Small G. W., Arnold M. A.: Scattering and absorption effects in the determination of glucose in whole blood by near-infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* 77(14), 4587-4594 (2005).
2. Arnold M. A., Small G. W.: Noninvasive glucose sensing. *Analytical Chemistry* 77(17), 5429-5439 (2005).
3. Budinova G., Salva J., Volka K.: Application of molecular spectroscopy in the mid-infrared region to the determination of glucose and cholesterol in whole blood and in blood serum. *Applied Spectroscopy* 51(5), 631-635 (1997).

4. Buschman H. P., Marple E. T., Wach M. L., Bennett B., Schut T. C. B., Bruining H. A., Bruschke A. V., van der Laarse A., Puppels G. J.: In vivo determination of the molecular composition of artery wall by intravascular Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* 72(16), 3771-3775 (2000).
5. Darvin M. E., Gersonde I., Albrecht H., Meinke M., Sterry W., Lademann J.: Non-invasive in vivo detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters* 3(9), 460-463 (2006).
6. Darvin M. E., Gersonde I., Albrecht H., Sterry W., Lademann J.: Resonance Raman spectroscopy for the detection of carotenoids in foodstuffs. Influence of the nutrition on the antioxidative potential of the skin. *Laser Physics Letters* 4(6), 452-456 (2007).
7. de Jong B. W. D., Bakker T. C., Maquelin K., van der Kwast T., Bangma C. H., Kok D. J., Puppels G. J.: Discrimination between nontumor bladder tissue and tumor by Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* 78(22), 7761-7769 (2006).
8. Diesel E., Kamphaus P., Grothe K., Kurte R., Damm U., Heise H. M.: Nanoliter serum sample analysis by mid-infrared spectroscopy for minimally invasive blood-glucose monitoring. *Applied Spectroscopy* 59(4), 442-451 (2005).
9. Enejder A. M. K., Koo T. W., Oh J., Hunter M., Sasic S., Feld M. S., Horowitz G. L.: Blood analysis by Raman spectroscopy. *Optics Letters* 27(22), 2004-2006 (2002).
10. Enejder A. M. K., Scicina T. G., Oh J., Hunter M., Shih W. C., Sasic S., Horowitz G. L., Feld M. S.: Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements. *Journal of Biomedical Optics* 10(3) (2005).
11. Haka A. S., Shafer-Peltier K. E., Fitzmaurice M., Crowe J., Dasari R. R., Feld M. S.: Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(35), 12371-12376 (2005).
12. Heise H. M., Damm U., Bodenlenz M., Kondepati V. R., Kohler G., Ellmerer M.: Bedside monitoring of subcutaneous interstitial glucose in healthy individuals using microdialysis and infrared spectrometry. *Journal of Biomedical Optics* 12(2) (2007).
13. Hering K., Cialla D., Ackermann K., Dorfer T., Moller R., Schneidewind H., Mattheis R., Fritzsche W., Rosch P., Popp J.: SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390(1), 113-124 (2008).
14. Hosafci G., Klein O., Oremek G., Mantele W.: Clinical chemistry without reagents? An infrared spectroscopic technique for determination of clinically relevant constituents of body fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(5), 1815-1822 (2007).
15. Ibelings M. S., Maquelin K., Endtz H. P., Bruining H. A., Puppels G. J.: Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy. *Clinical Microbiology and Infection* 11(5), 353-358 (2005).
16. Krishna C. M., Kegelaer G., Rubin S., Kartha V. B., Manfait M., Sockalingum G. D.: Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic identification approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines. *Biopolymers* 82(5), 462-470 (2006).
17. Krishna C. M., Sockalingum G. D., Vadhiraja B. A., Maheedhar K., Rao A. C. K., Rao L., Venteo L., Pluot M., Fernandes D. J., Vidyasagar M. S., Kartha V. B., Manfait M.: Vibrational spectroscopy studies of formalin-fixed cervix tissues. *Biopolymers* 85(3), 214-221 (2007).
18. Lin S. Y., Li M. J., Cheng W. T.: FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biodiagnosis of human tissues. *Spectroscopy-An International Journal* 21(1), 1-30 (2007).
19. Low-Ying S., Shaw R. A., Leroux M., Mantsch H. H.: Quantitation of glucose and urea in whole blood by mid-infrared spectroscopy of dry films. *Vibrational Spectroscopy* 28(1), 111-116 (2002).
20. Mantsch H. H., Choo-Smith L. P., Shaw R. A.: Vibrational spectroscopy and medicine: an alliance in the making. *Vibrational Spectroscopy* 30(1), 31-41 (2002).

21. Maquelin K., Choo-Smith L. P., van Vreeswijk T., Endtz H. P., Smith B., Bennett R., Bruining H. A., Puppels G. J.: Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Analytical Chemistry* 72(1), 12-19 (2000).
22. Maquelin K., Kirschner C., Choo-Smith L. P., van den Braak N., Endtz H. P., Naumann D., Puppels G. J.: Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 51(3), 255-271 (2002).
23. Maquelin K., Kirschner C., Choo-Smith L. P., Ngo-Thi N. A., van Vreeswijk T., Stammler M., Endtz H. P., Bruining H. A., Naumann D., Puppels G. J.: Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 41(1), 324-329 (2003).
24. Matousek P.: Deep non-invasive Raman spectroscopy of living tissue and powders. *Chemical Society Reviews* 36(8), 1292-1304 (2007).
25. Matousek P., Stone N.: Prospects for the diagnosis of breast cancer by noninvasive probing of calcifications using transmission Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* 12(2) (2007).
26. Qi D. H., Berger A. J.: Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy. *Applied Optics* 46(10), 1726-1734 (2007).
27. Rohleider D., Kiefer W., Petrich W.: Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy. *Analyst* 129(10), 906-911 (2004).
28. Sandt C., Madoulet C., Kohler A., Allouch P., De Champs C., Manfait M., Sockalingum G. D.: FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 101(4), 785-797 (2006).
29. Sha M. Y., Xu H., Penn S. G., Cromer R.: SERS nanoparticles: a new optical detection modality for cancer diagnosis. *Nanomedicine* 2(5), 725-734 (2007).
30. Shafer-Peltier K. E., Haka A. S., Motz J. T., Fitzmaurice M., Dasari R. R., Feld M. S.: Model-based biological Raman spectral imaging. *Journal of Cellular Biochemistry*, 125-137 (2002).
31. Shaw A., Liu K., Low-Ying S., Man A., Leroux M., Dembinski T., Mantsch H.: Reagent-free clinical chemistry. *Clinical Chemistry* 47(6), A114-A115 (2001).
32. Shaw A., Man A., Ying S. L., Liu K., Asker T., Bewsky C., Bemhardt R., Procca A., Leroux M., Dembinskiz T., Mantsch H.: Automated reagent-free clinical analysis. *Clinical Chemistry* 49(6), A158 (2003).
33. Shaw R. A., Low-Ying S., Leroux M., Mantsch H. H.: Toward reagent-free clinical analysis: Quantitation of urine urea, creatinine, and total protein from the mid-infrared spectra of dried urine films. *Clinical Chemistry* 46(9), 1493-1495 (2000).
34. Shaw R. A., Mansfield J. R., Rempel S. P., Low-Ying S., Kupriyanov V. V., Mantsch H. H.: Analysis of biomedical spectra and images: from data to diagnosis. *Journal of Molecular Structure-Theochem* 500, 129-138 (2000).
35. Sideroudi T. I., Pharmakakis N. M., Papatheodorou G. N., Voyatzis G. A.: Non-invasive detection of antibiotics and physiological substances in the aqueous humor by Raman spectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine* 38(7), 695-703 (2006).
36. Stone N., Baker R., Rogers K., Parker A. W., Matousek P.: Subsurface probing of calcifications with spatially offset Raman spectroscopy (SORS): future possibilities for the diagnosis of breast cancer. *Analyst* 132(9), 899-905 (2007).
37. Tura A., Maran A., Pacini G.: Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice* 77(1), 16-40 (2007).

5. LABORATORNÍ ASPEKTY VYŠETŘOVÁNÍ PORFYRIÍ

doc. MUDr. Libor Vitek, PhD., MBA,

*Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky a 4. interní klinika 1. LF UK a VFN
v Praze*

vitek@cesnet.cz

5.1 Úvod

Porfyrie řadíme do skupiny poruch biosyntézy hemu, jejichž charakteristickým rysem je značná rozmanitost klinického obrazu. Ačkoli to jsou onemocnění relativně vzácná, je jejich poznání velmi významné zejména z hlediska diferenciálně diagnostického. I přes velké snahy problematiku těchto onemocnění neznají dostatečně nejen praktičtí lékaři, ale mnohdy ani supecialisté. Nízké povědomí o porfyrické nemoci přitom není jen specifikum České republiky, je to problém celosvětový. Také laboratorní diagnostika porfyrické nemoci není jednoduchá a je významně ovlivněna faktorem, že porfyriny patří mezi látky velmi nestabilní a zejména chromatografické metody stanovení porfyrinů jsou poměrně komplikované a náročné i na interpretaci výsledků.

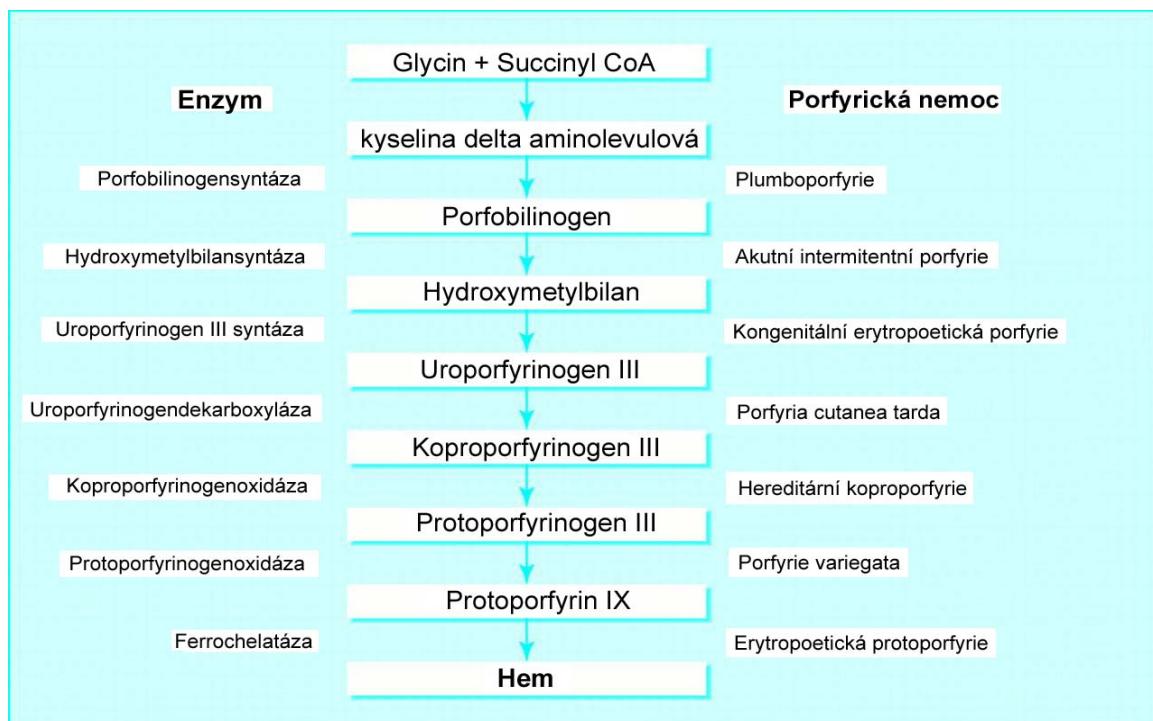
Cílem tohoto příspěvku je uvést základní fakta o porfyrické nemoci, její klasifikaci a rozdelení, popsat jednotlivé porfyrie a zejména poukázat na komplexní problematiku laboratorního vyšetřování porfyrií.

5.2 Dělení a klasifikace porfyrií

Porfyrie lze dělit podle různých kritérií, základní je dělení na **primární** a **sekundární**. Jako primární označujeme všechny porfyrie způsobené vrozeným defektem některého z enzymů biosyntetické dráhy hemu (Obr. 5.1), za sekundární porfyrie jsou považovány defekty získané, ať už v důsledku například intoxikace (otrava olovem), nebo při některých systémových onemocněních, jako jsou chronické hepatopatie, lymfoproliferativní onemocnění nebo hemolytické anémie (nejčastěji sekundární koproporfyrinurie).

Další rozdelení je na porfyrie **akutní** a **chronické**. Tento typ klasifikace nejlépe respektuje způsob manifestace porfyrické choroby. Mezi akutní porfyrie řadíme akutní intermitentní porfyrii (AIP), dále hereditární koproporfyrinu (HK) a porfyrii variegatu (PV). Plumboporfyrerie (Dossova porfyrie) způsobená vrozeným defektem dehydratasy δ-aminolevulové kyseliny) je také akutní porfyrií, je však extrémně vzácná a v České republice nebyla doposud diagnostikována. Mezi chronické porfyrie patří u nás nejčastější porfyria cutanea tarda (PCT) a dále pak velmi vzácné erythropoetická protoporfyrerie (EPP) a kongenitální erythropoetická porfyrie (CEP, Güntherova porfyrie).

Jiným způsobem klasifikace je dělení patofyziologické v závislosti na zdroji nadměrné produkce porfyrinů. Takto lze tyto choroby dělit na porfyrie erythropoetické (sem patří CEP a EPP) a hepatální (kam řadíme AIP, HK, PV a PCT). Existují také vzácné porfyrie duální, kombinace dvou typů porfyrií (nejčastěji AIP + PCT, AIP + HK, AIP + PV, PCT + PV) s charakteristickým klinickým i diagnostickým obrazem.



Obr. 5.1: Poruchy biosyntézy hemu

5.3 Porfyrie chronické

Mezi chronické porfyrie řadíme zejména nejčastější porfyrickou chorobu v České republice, porfyrii cutanea tarda (PCT), dále pak vzácnou erytropoetickou protoporfyrii (EPP) a kongenitální erytropoetickou porfyrii (CEP).

5.3.1 Porfyria cutanea tarda (PCT)

PCT je nejčastější porfyrií v České republice s výskytem 1 případu na zhruba 5 000 obyvatel, což je podstatně více než v jiných zemích. PCT klasifikujeme do třech podtypů:

- 1) Typ I, sporadic PCT, představuje 80 % všech případů PCT. Je způsobena defektem jaterní uroporfyrinogendekarboxylasy. Postihuje především muže ve věku 40-50 let.
- 2) Typ II je familiální, vzácná, autosomálně dominantně dědičná PCT.
- 3) Typ III je také familiální, vzácná forma PCT, její příčina není známá.

Existuje ještě PCT symptomatica, která je způsobena zevním činitelem. Známá je epidemie této formy PCT v Turecku v druhé polovině 50. let minulého století, která byla vyvolána pesticidem hexachlorobzenem.

Příznaky PCT lze rozdělit podle orgánové lokalizace na symptomatologii kožní a jaterní. Kožní příznaky jsou vyjádřeny také u CEP a EPP, ačkoli tato onemocnění mají i další typické symptomy (viz dále).

V klinickém obrazu dominují kožní příznaky charakterizované bulózními lézemi, kožní vulnerabilitou a jizvením na oblastech kůže exponované slunci, dále pak postižení jaterní tkáně ve formě chronické hepatopatie, která přechází asi v jedné třetině případů v cirhózu jater. Významnou komplikací onemocnění je rozvoj hepatocelulárního karcinomu s popisovanou incidencí 4 až 47 %.

Mezi vyvolávající faktory nebo faktory zhoršující průběh patří abusus alkoholu, akumulace železa v játrech (asociace s hemochromatózou), souběžná infekce virem hepatitidy C, infekce HIV, užívání estrogenů (perorální antikoncepcie, substituční hormonální léčba, hormonální léčba pacientů s karcinomem prostaty), kouření a nízký příjem vitaminu A a C.

Z hlediska diagnostického je pro PCT patognomická vysoká hladina plazmatických porfyrinů s typickým emisním maximem plazmatických porfyrinů při 619 nm a dále vysoký odpad porfyrinů močí (nad 500 µg za 24 hodin) při normálních hladinách ALA (i když ALA může být někdy mírně zvýšena) a PBG. V moči nacházíme charakteristický chromatografický profil porfyrinů s převahou uroporfyrinu a porfyrinu se sedmi skupinami COOH (Obr. 5.2). Typický je také chromatografický profil porfyrinů ve stolici, toto vyšetření je indikováno při nejednoznačných výsledcích předchozích vyšetření (Obr. 5.3).

5.3.2 Kongenitální erytropoetická porfyrie (CEP)

CEP je autosomálně recesivně dědičné onemocnění způsobené deficitem enzymu uroporphyrinogen III syntasy. Je to jedna z nejvzácnějších porfyrií, doposud bylo popsáno pouze asi 200 případů na celém světě.

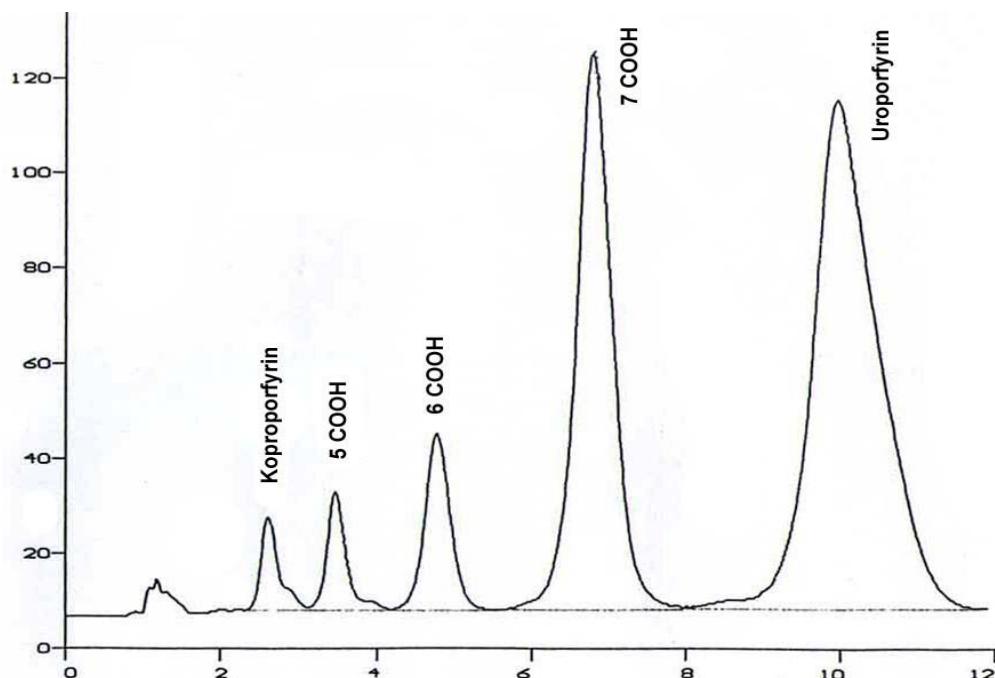
Klinický obraz je značně různorodý, od těžké hemolytické anémie vznikající již *in utero* až po mírné formy s pozdním začátkem příznaků ve formě kožních lézí. U většiny pacientů se však již krátce po narození objevuje výrazná fotosenzitivita vedoucí k těžkému kožnímu postižení rezultujícímu v deformity, jizvení a mutilacím tkání. Dalšími klinickými rysy je poměrně závažná hemolytická anémie, jizvení rohovky mající za následek slepotu, erytrodontie, tedy ukládání porfyrinů v zubním dentinu, a dále osteopatie způsobená ukládáním porfyrinů v kostech.

Na CEP je nutno pomýšlet u novorozenců s růžovou až načervenalou barvou moči, která je způsobena vysokou exkrecí uroporfyrinu a koproporfyrinu I, jak je možno prokázat chromatograficky. Diagnózu CEP lze provést i prenatálně vyšetřením amniotické tekutiny.

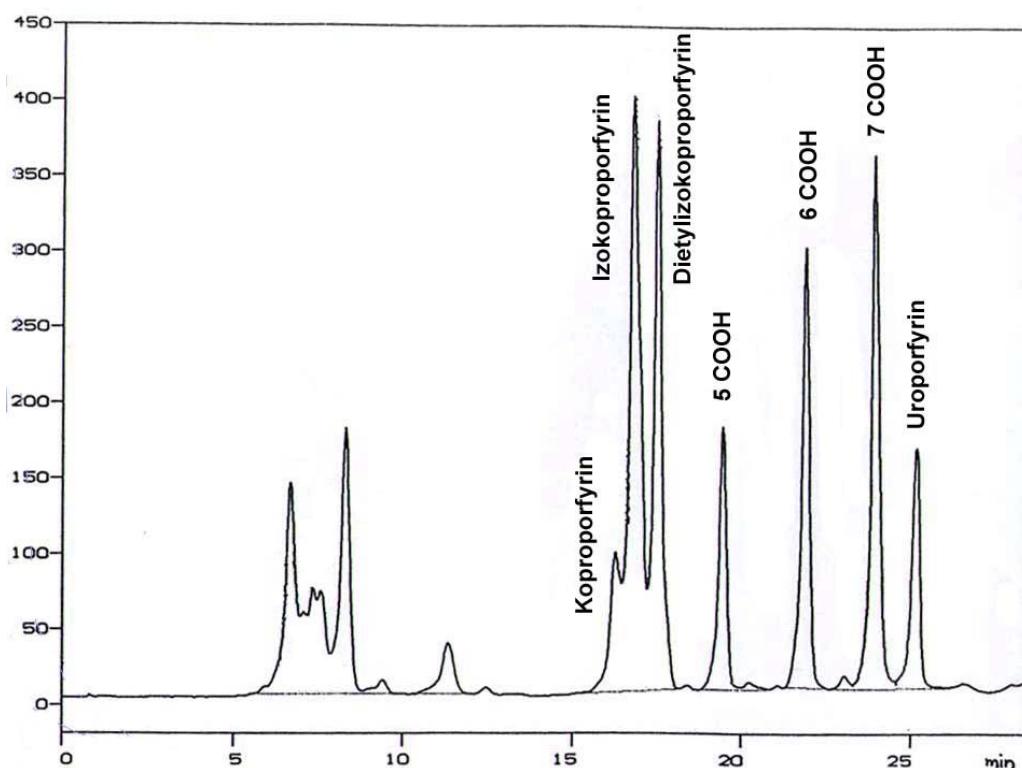
5.3.3 Erytropoetická protoporfyrrie (EPP)

EPP je autosomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené deficitem posledního enzymu v biosyntetické dráze hemu, a to enzymu ferrochelatasy. Protoporfyrrie se nazývá z důvodu akumulace protoporfyrinu v kostní dřeni. Je to porfyrie relativně vzácná, byla poprvé popsána až v roce 1961 a popsáno bylo doposud jen několik stovek pacientů, v České republice jsou známi jen čtyři pacienti s touto chorobou. Tato čísla jsou však jistě podhodnocena a nevyjadřují skutečný výskyt onemocnění. To je dán zejména faktum, že u této porfyrie dominují kožní příznaky s normální exkrecí porfyrinů močí, což většina lékařů považuje za marker vyloučující diagnózu porfyrické choroby. Navíc kožní příznaky jsou odlišné od manifestace jiných porfyrií, převažuje svědění, edém kůže a kopřivka, které se objevují po několika minutách po expozici slunci. Nebývá hyperpigmentace ani jizvení kůže. Ostatní projevy jsou vzácnější a vyskytují se jen u menšiny nemocných; zejména to je postižení jater způsobené akumulací protoporphyrinu, které je plíživého charakteru a může vést v malém procentu případů i k selhání jater.

Charakteristickým diagnostickým markerem pro EPP je elevace protoporfyrinu v erytrocytech, typické emisní maximum plazmatických porfyrinů při 633-635 nm a také zvýšený odpad protoporfyrinu stolicí.



Obr. 5.2: HPLC profil porfyrinů v moči u PCT



Obr. 5.3: HPLC profil porfyrinů ve stolici u PCT

Převládá porfyrin se sedmi skupinami COOH, dále jsou přítomny porfyriny s pěti a šesti skupinami COOH a uroporfyrin, a také patologické porfyriny se čtyřmi skupinami COOH (isokoprotoporphyrin a diethylizokoprotoporphyrin) vznikající bakteriální metabolismem porfyrinu s pěti skupinami COOH. Vysoká koncentrace porfyrinů se sedmi skupinami COOH a patologických porfyrinů ve stolici je typická pro PCT a nikdy se nevyskytuje fyziologicky

5.4 Akutní porfyrie

Jak bylo uvedeno výše, patří do této skupiny porfyrických chorob AIP, HK, PV a plumboporfyrerie.

Charakteristickým rysem akutních porfyrií je manifestace ve formě akutních atak, nejčastěji jako kolikovité bolesti břicha. Druhou formou manifestace atak akutních porfyrií jsou příznaky neurologické, třetím typem symptomů jsou příznaky psychiatrické. Neurologické příznaky zahrnují zejména periferní neuropatie motorických nervů, častěji jsou postiženy horní končetiny, může dojít i k rozvoji kvadruparézy až kvadruplegie s respirační a bulbární paralýzou vedoucí ke smrti. Přeměně častý je výskyt křečí, v této souvislosti je třeba upozornit, že antikonvulziva mohou u pacientů s akutními porfyriemi vyvolávat ataku, a tudíž podávání těchto léků pacientům s primomanifestací akutní porfyrie ve formě křečového stavu může zhoršit celkový klinický obraz. Psychiatrická manifestace atak akutních porfyrií zahrnuje zejména generalizované úzkostné stavy, hysterii, deprese, fobické a delirantní stavy a někdy i psychotické poruchy.

Kožní příznaky nejsou u akutních porfyrií příliš vyjádřeny, avšak vyskytují se zejména u PV, v mírnější formě i u HK, a mohou napodobovat kožní symptomatologii typickou pro PCT.

Ataky akutní porfyrie jsou nejčastěji vyvolány podněty, jako jsou například změny v sérových hladinách pohlavních hormonů, léky, alkohol, stres, infekce nebo dietní faktory. Vliv estrogenů a gestagenů je nepopiratelný, neboť 80 % všech pacientů s atakami akutní porfyrické choroby jsou ženy ve fertilním věku. Navíc je velmi dobře znám precipitující efekt perorálních kontraceptiv. Kromě těchto léků je známa řada porfyrinogenních xenobiotik, mezi která patří například griseofulvin (specifický inhibitor ferochelatasy) nebo pesticid hexachlorobenzen, dále pak také běžné léky, např. barbituráty, sulfonamidy, ACE-inhibititory, makrolidová antibiotika, některá antimykotika, ale třeba i ranitidin či paracetamol.

5.4.1 Charakteristiky jednotlivých akutních porfyrií

5.5.1.1 Akutní intermitentní porfyrie (AIP)

Je nejčastější akutní porfyrií v České republice s incidencí 1/30 000. Jedná se o autozomálně dominantně dědičné onemocnění, jehož podkladem je defekt profobilinogendeaminasy. Charakteristickým rysem akutní ataky AIP je vysoký odpad PBG močí (20-200násobek hodnot oproti normálu). Zhruba u jedné třetiny nemocných přetrvávají zvýšené hodnoty PBG v moči (2-5násobně oproti normálu) i mimo ataky. Proto se někdy setkáváme v literatuře i s názvem pyroloporfyrie, jiným označením je švédská porfyrie pro vysokou prevalenci v této zemi (60-100/100 000).

Z hlediska klinického obrazu je nejvýznamnějším souborem příznaků bříšní symptomatologie, i když neurologické symptomy nebývají vzácností. Charakteristickým laboratorním rysem je elevace PBG v moči, která přetrvává často i mezi jednotlivými atakami, při normálním odpadu porfyrinů stolicí, což je faktor diskriminující toto onemocnění od PV a HK.

5.5.1.2 Porfyria variegata (PV)

Byla poprvé popsána v roce 1937, variegata se nazývá pro variabilní manifestaci zahrnující neurologické příznaky, kožní symptomatologii nebo obojí. Nazývá se také někdy jihoafrická porfyrie pro její vysokou prevalenci v bělošské populaci Jihoafrické republiky – dosahuje neuvěřitelné 3 případy na 1 000 obyvatel a je důsledkem četných sňatků v nepříliš velké imigrantské populaci holandských osadníků. V České republice je poměrně vzácná. Z hlediska klinického obrazu se od AIP liší zejména přítomností kožních příznaků a častějším výskytem neurologické symptomatologie. Ex-

krece ALA a PBG nebývá v atace tak vysoká jako u AIP, mimo ataku pak dochází k normalizaci exkrece těchto prekurzorů. Od AIP i HK lze PV odlišit pomocí vyšetření plazmatických porfyrinů a dále zvýšenou exkrecí protoporfyrinů stolicí. Významné je také vyšetření plazmatického emisního maxima porfyrinů, které je pro PV typicky při 626-629 nm. Od HK lze PV odlišit chromatografickou analýzou porfyrinů v moči a ve stolici.

5.5.1.3 Hereditární koproporforyrie (HK)

Je to onemocnění popsané poprvé v roce 1955, které svou klinickou manifestací velmi připomíná AIP, avšak u pacientů s HK občas dochází i k rozvoji kožních lézí. Ačkoli prevalence HK nebyla detailněji studována, odpovídá podle odhadu její výskyt zhruba výskytu PV a jde tedy o poměrně méně častý typ porfyrické choroby. Z hlediska diagnostického je u pacientů s atakou HK typicky nacházena elevace koproporfyrinu v moči a stolici. V této souvislosti nutno však připomenout, že u řady onemocnění a stavů, např. při chronické hepatopati, hemolytické anémii, hemoblastóze či podávání určitých léků, dochází k tzv. sekundární koproporfyrinurii, při které však exkrece porfyrinu moči bývá maximálně do 500 µg za 24 hodin (norma je do 200 µg za 24 hodin), zatímco u ataky HK je hodnota 500 µg prakticky vždy překročena.

5.5.1.4 Plumboporforyrie

Poslední akutní porfyrii je tzv. plumboporforyrie, také nazývaná Dossova porforyrie, která je však extrémně vzácná a v České republice nebyla doposud zaznamenána. Je způsobena vrozeným defektem enzymu dehydratasy δ-aminolevulové kyseliny.

5.5 Laboratorní metody používané v diagnostice porfyríí

Laboratorní metody používané v diagnostice porfyrické nemoci můžeme rozdělit na metody základní, které by měly být k dispozici ve všech větších laboratořích klinické biochemie, a na metody speciální, které jsou v současnosti v České republice k dispozici pouze v Hepatologické laboratoři UKBLD 1. LF UK a VFN v Praze (pracoviště autora, Obr. 5.4).

Za základní vyšetření považujeme stanovení koncentrace δ-aminolevulové kyseliny (ALA) a porfobilinogenu (PBG) v čerstvé ranní moči, a dále odpadu celkových porfyrinů za 24 hodin. V rámci základního vyšetřovacího programu provádíme také stanovení emisního maxima plazmatických porfyrinů, které nabývá typických hodnot v závislosti na typu porforyrie (viz dále).

Metody speciální spočívají v HPLC-frakcionaci porfyrinů v moči sbírané 24 hodin, even-tuálně ve vzorku stolice. K dispozici je také vyšetření enzymových aktivit (například enzymu ALA dehydratasy), stanovení izomerů koproporfyrinů I a III (důležité pro diagnostiku Dubin-Johnsonova syndromu), stanovení volného protoporfyrinu a Zn-protoporfyrinu (důležité pro diagnostiku EPP), event. molekulární diagnostika porfyrické nemoci.

Pro vyšetřování porfyrinů platí důležitá preanalytická omezení. Porfyriny jsou sloučeniny velmi nestabilní, citlivé na světlo, okolní teplotu i na čas od odběru. Z tohoto důvodu by měla být moč na stanovení porfyrinů skladována v nádobách/odběrových zkumavkách zabalených do aloba-lu a zpracována co nejrychleji. Při vyšetřování porfyrinů ve stolici je nutné, aby pacient alespoň na tři dny vyloučil ze své diety potraviny a jídla obsahující hem (zejména maso a masné výrobky).

Speciální biochemické vyšetření		Hepatologická laboratoř ÚKBLD VFN a I.LF UK			
Rod. č. (ID): <input type="text"/>		U Nemocnice 2, 128 08 PRAHA 2 tel.: +420 224 962 537, +420 224 962 536			
Příjmení: _____		Odběry: odběrové centrum FP, Karlovo n. 32, tel. +420 224 966 670			
Jméno, titul: _____		č. odb. sestry <input type="text"/>			
Diagnózy: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		Odd., NS, IČL: _____			
Klinika: _____		Poznámky ÚKBLD <input type="text"/>			
Pojišťovna: <input type="text"/> Tel.: _____		Razítka (vč. IČP) a podpis: <input type="text"/>			
Materiál (zaškrtněte)		<input checked="" type="checkbox"/> Nesrážlivá krev	<input checked="" type="checkbox"/> Čerstvá moč	<input checked="" type="checkbox"/> Jaterní biopsie	
(zaškrtněte)		<input type="checkbox"/> Srážlivá krev	<input type="checkbox"/> Sbíraná moč	<input type="checkbox"/> Stolice	
Datum, čas odběru: <input type="text"/> . <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> : <input type="text"/>					
Vysvětlivky: ☎ prosime, objednejte telefonicky na l. 2537 dieta Vzorky na porfyrická vyšetření musí být chráněny před světlem ! Konzultace: MUDr. Libor Vitek PhD. tel.: +420 224 962 532					
NESRÁŽLIVÁ KREV – 5 ml		MOČ - 10 ml		SPECIÁLNÍ ODBĚRY	
PORFYRICKÁ VYŠETŘENÍ		PORFYRICKÁ VYŠETŘENÍ		PORFYRICKÁ VYŠETŘENÍ	
<input type="checkbox"/> Fluorescenční emisní maximum		<input type="checkbox"/> Porfobilinogeneaminasa v Ery		<input type="checkbox"/> Celkové porfyriny	
<input type="checkbox"/> Dehydratasa k. δ-aminolevulové		<input type="checkbox"/> Kyselina δ-aminolevulová		<input type="checkbox"/> Spektrum porfyrinů HPLC	
Pro stanovení cestovné hodnotu hematoskótru: <input type="text"/>		Sbíraná moč		Biopsie jaterní tkáně – min 10 mg	
<input type="checkbox"/> Protoporfyrin a jeho Zn komplex		Objem (ml) <input type="text"/>		<input type="checkbox"/> Celkové porfyriny	
OSTATNÍ VYŠETŘENÍ		Sběr za (hod) <input type="text"/>		<input type="checkbox"/> Spektrum porfyrinů HPLC	
<input type="checkbox"/> Cyklosporin A		<input type="checkbox"/> Celkové porfyriny		OSTATNÍ VYŠETŘENÍ	
SRÁŽLIVÁ KREV – 5 ml		<input type="checkbox"/> Spektrum porfyrinů HPLC		<input type="checkbox"/> Měď v jaterní biopsii	
<input type="checkbox"/> Celkové žlučové kyseliny		<input type="checkbox"/> Acidifikační test s CaCl ₂		FUNKČNÍ TESTY	
<input type="checkbox"/> Spektrum žlučových kyselin GC		<input type="checkbox"/> S-ceruloplasmin oxidázovou reakcí		<input type="checkbox"/> Celkové porfyriny	
<input type="checkbox"/> S-ceruloplasmin oxidázovou reakcí		<input type="checkbox"/> Spektrum porfyrinů HPLC		<input type="checkbox"/> Měď v jaterní biopsii	

Obr. 5.4: Žádanka pro biochemické vyšetření porfyrinů

5.6.1 Jednotlivé metody

5.6.1.1 Stanovení PBG v čerstvě ranní moči

- Jak již bylo uvedeno, PBG je marker ataky akutní porfyrie.
- Je citlivější než ALA.
- Je citlivý na světlo, teplo, dobu skladování (70% ztráta PBG za 10 hodin při laboratorní teplotě) a výkyvy pH (optimum 8-9).

- Vyšetření se provádí z 10 ml čerstvé moči. Principem stanovení je Ehrlichova reakce v kyselém prostředí za vzniku růžovofialového produktu, jehož intenzita se stanovuje spektrofotometricky.
- Stanovení PBG má méně interferencí než ALA.
- Referenční rozmezí: $< 0,25 \text{ mg dL}^{-1}$

5.6.1.2 Stanovení ALA v čerstvě ranní moči

- Podobně jako PBG je i ALA markerem ataky akutní porfyrie.
- Stanovení ALA je důležité pro diagnostiku otravy olovem (ollovo reverzibilně inhibuje enzym ALA-dehydratasu) a plumboporfyrie.
- Také ALA je citlivá na světlo, teplo, dobu skladování a výkyvy pH (optimum 3-4). U nechráněných vzorků dochází k 50% ztrátě za 24 hodin.
- Vyšetření se provádí z 10 ml čerstvé moči. Principem stanovení je reakce ALA obsažené v moči s acetylacetonem za vzniku pyrolové sloučeniny, která reaguje s Ehrlichovým činidlem. Vzniklý barevný komplex se stanovuje spektrofotometricky.
- Referenční rozmezí: $< 0,45 \text{ mg dL}^{-1}$.

5.6.1.3 Stanovení celkových porfyrinů v moči sbírané 24 hodin a ve vzorku stolice

- **Odpad celkových porfyrinů močí** je markerem akutní i chronické porfyrické choroby, stejně tak jako tzv. sekundární koproporfyrinurie.
- Porfyriny jsou opět citlivé na teplo a světlo, moč je třeba sbírat do nádoby obalené aloalem a uchovávat v chladu, potřeba pro stanovení je aspoň 10 ml moči.
- Principem stanovení je kyselá extrakce porfyrinů a stanovení jejich koncentrace spektrofotometricky v oblasti Soretova pásu (405 nm).
- Referenční rozmezí: $< 200 \mu\text{g}$ za 24 hodin.
- Podobným způsobem se stanovují i **celkové porfyriny ve stolici** (ze vzorku cca 5 g stolice), zde se navíc používá ještě krok extrakce chlorofylu a karotenoidů do éteru.
- Referenční rozmezí: $< 200 \text{ ng}$ na 1 g sušiny.

5.6.1.4 Stanovení emisního maxima plazmatických porfyrinů

- Principem stanovení je využití fluorescence porfyrinů. Porfyriny po excitaci světlem o vlnové délce 400 nm červeně fluoreskují. Vlnová délka emitovaného světla je charakteristická pro jednotlivé porfyriny a patognomická pro jednotlivé porfyrie (619-620 nm pro PCT, AIP, HK, CEP a sekundární koproporfyrinurii; 626-629 pro PV; a 633-635 nm pro EPP, eventuálně otravu olovem).

5.6.1.5 HPLC frakcionace porfyrinů v moči a ve stolici

- Vyšetření se provádí v 10 ml sbírané moče/5 g stolice, biologický materiál je možné skladovat do 1 měsíce při -20°C .
- Principem stanovení je okyselení vzorku a esterifikace porfyrinů, neutralizace kyseliny sírové s následnou extrakcí do chloroformu. Směs esterů se poté rozdělí pomocí HPLC (C18 kolona) s použitím fluorometrické detekce.
- Normální hodnoty v moči: 60-80 % koproporfyrin, 10-20 % uroporfyrin.
- Normální hodnoty ve stolici: 60-80 % porfyrit sr dvěma skupinami COOH, 10-20 % koproporfyrin.
- Typický chromatogram porfyrinů v moči a stolici. u nemocného s PCT je uveden na Obr. 5.2 a 5.3.

5.6.2 Vyšetřovací algoritmus při podezření na porfyrickou nemoc

V zásadě je nutné odlišovat tři základní klinické situace.

1. Podezření na chronické porfyrie, v našich podmínkách se jedná prakticky pouze o PCT. Nemoc se manifestuje buďto kožními příznaky, nebo jako jaterní léze nejasné etiologie. Ve sbírané moči nacházíme vysoký odpad celkových porfyrinů při normálních hladinách ALA a PBG v čerstvé ranní moči.
2. Druhou klinickou situací jsou ataky akutních porfyrií, při kterých dochází k elevaci všech tří základních analytů, tedy ALA a PBG v čerstvé ranní moči, i k elevaci odpadu celkových porfyrinů v moči sbírané.
3. Třetí možností je nález u pacientů mimo ataku, který může být prakticky normální. Pokud však máme klinické podezření (např. na základě typických anamnestických údajů), je vhodné provést chromatografické vyšetření porfyrinů ve vzorku stolice a vyšetření emisního maxima plazmatických porfyrinů.

U všech pacientů s odpadem močových porfyrinů nad $200 \mu\text{g L}^{-1}$ provádíme automaticky frakcionaci močových porfyrinů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. K odlišení akutních porfyrií stanovujeme emisní maximum plazmatických porfyrinů (viz výše). K dispozici také máme stanovení aktivit enzymů biosyntetické dráhy porfyrinů v erytrocytech.

Typické výsledky základních vyšetření shrnuje následující tabulka.

	ALA	PBG	Odpad celkových porfyrinů
PCT	v normě	v normě	$> 500 \mu\text{g}$ za 24 hod
Ataka akutní porfyrie	zvýšení	zvýšení	$> 500 \mu\text{g}$ za 24 hod
Akutní porfyrie v remisi	v normě	v normě	v normě
Sekundární koproporfyrinurie	v normě	v normě	200-500 μg za 24 hod
Otrava olovem	zvýšení	v normě	$> 200 \mu\text{g}$ za 24 hod

5.7 Závěr

Porfyrická choroba představuje svými příznaky, etiologií i diagnostickými markery značně heterogenní skupinu onemocnění. Tato problematika je obecně značně podceňována lékařskou veřejností, na možnost porfyrické choroby se v diferenciálně diagnostické rozvaze zpravidla nemyslí, což se bou samozřejmě nese vysoké riziko možného poškození pacienta. Jelikož se jedná o problematiku vysoko detailní a specializovanou, nelze předpokládat, že praktičtí lékaři budou vždy schopni správně indikovat vyšetření nebo interpretovat jejich výsledky. Z těchto důvodů je třeba uvést, že v České republice jsou k dispozici specializovaná klinická a laboratorní pracoviště, která poskytují konzultační činnost z hlediska diferenciální diagnostiky, indikace vyšetření i interpretace výsledků.

Převládá uroporfyrin, výrazně zvýšen bývá i porfyrin se sedmi skupinami COOH, v menší míře i porfyriny s pěti a šesti skupinami COOH a koproporfyrin.

6. MODERNÍ SMĚRY VE VYSOKOÚČINNÝCH SEPARACÍCH PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

doc. RNDr. Pavel Coufal, Dr.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie

pcoufal@natur.cuni.cz

6.1 Úvod

Moderní klinický výzkum prováděný zejména v oblasti vnitřního lékařství je založen na detailních znalostech o hladinách a distribuci biologicky aktivních látek v jednotlivých tělních kompartmentech, jak uvádí ve své habilitační práci P. Tůma¹. Nově vyvážené metody klinické analýzy musí splňovat řadu podmínek, především musí být:

- dostatečně citlivé, aby byly schopny stanovit velmi nízké koncentrace mnohých látek a jejich metabolitů;
- vysoce selektivní se schopností rozlišit danou konkrétní látku od struktur jí velice podobných, se kterými se vyskytuje v komplexní směsi;
- časově nenáročné, což v sobě zahrnuje rychlou vlastní analýzu spojenou se současnou snadnou úpravou biologického materiálu;
- finančně dostupné s malou spotřebou činidel i vlastního vzorku, což umožní provádění analýz velkých souborů vzorků¹.

Mnohé z těchto podmínek kladených na metody klinické analýzy lze s úspěchem splnit miniaturizační vysokoúčinných separačních metod používaných v klinické analýze.

Miniaturizace je velmi významný trend dnešní doby, který zasahuje a ovlivňuje výzkum a vývoj ve všech oblastech vědeckého bádání, technický pokrok a jakékoli lidské činění. V posledních letech se miniaturizace velmi významně začala uplatňovat i v analytické chemii, neboť i tato vědní disciplína byla a je pod neustálým tlakem analytické praxe na zvýšení citlivosti, zlepšení selektivity, zrychlení analýzy, zmenšení vzorku, použití méně běžných substancí, snížení neurčitosti, zajištění správnosti a přesnosti, snížení nákladů a minimalizaci vlivu na životní prostředí. Analytické postupy založené na metodách využívajících přednosti miniaturizace dokáží mnohem lépe vyhovět všem těmto náročným požadavkům analytické praxe pro biomedicínské aplikace. Kapilární separační techniky, jako je kapilární elektroforéza a kapilární kapalinová chromatografie, a nanoseparační techniky, jako je čipová elektroforéza a kapalinová chromatografie na čipu, jsou pak důsledkem rozvoje miniaturizace v oblasti analytických separačních metod.

V posledních letech dosáhla miniaturizace v analytických separačních metodách tak významného pokroku, že mnohé z těchto technik byly přeneseny do planární čipové podoby. Bezprostředně po konstrukci prvních plynových chromatografů na čipu se pozornost obrátila především ke kapilární elektroforéze, neboť její realizace v čipové podobě je snazší než u chromatografie. Kapilární elektroforéza však nevykazuje tak velkou všeobecnost a univerzálnost v separačních mechanismech, jako je tomu u kapalinové chromatografie, jejíž miniaturizace a přenos na čip je ale naopak spojena s mnohými technickými problémy. Přes všechny tyto instrumentální obtíže se daří v posledních letech realizovat v čipové podobě i kapalinovou chromatografii, která nachází uplatnění při řešení tak složitých analytických problémů, jako je například identifikace bílkovin.

Kapilární separační techniky představují miniaturizační stupeň, který se nachází mezi konvenčními analytickými přístupy a planárními čipovými separačními metodami. Přináší výhody miniaturizace a nepotýkají se s tak velkými technickými problémy, jaké nastávají u čipových technik. Navíc kapilární techniky jsou velmi dobře kompatibilní s hmotnostním spektrometrem jako detektorem umožňujícím identifikaci analyzovaných látek. Kapilární zónová elektroforéza je všeobecně považována za vysokoúčinnou separační techniku umožňující rychlé vyvinutí analytické metody poskytující levné výsledky v krátkém analytickém čase, avšak s nižší reprodukovatelností a spolehlivostí. Kapilární kapalinová chromatografie naopak poskytuje reprodukovatelnější a spolehlivější analytické výsledky, jež jsou však dražší a časově náročnější. Částečného snížení finanční i časové náročnosti analytických výsledků produkovaných kapilární kapalinovou chromatografií lze dosáhnout použitím kapilárních monolitických kolon. Tyto kolony, připravované nejčastěji polymerizací vhodných monomerů na pórnatý monolit uvnitř kapiláry, se vyznačují jednoduchou přípravou v porovnání se stacionárními fázemi chemicky vázanými na silikagelu a navíc umožňují, v důsledku své dobře definované a rozsáhlé pórnatosti, zkrátit dobu analýzy. Monolitické kolony připravené polymerizací nejrůznějších organických i anorganických monomerů byly shledány jako velmi vhodná separační média pro bioaktivní látky, především pak pro biomolekuly s velkými relativními molekulovými hmotnostmi.

6.2 Kapilární elektroforéza

První elektroforetické experimenty v různých médiích byly prováděny již na konci 19. století. Hjertén a Tiselius^{2,3} v 50. a 60. letech minulého století prováděli první zónově elektroforetické experimenty v rotujících kapilárách o vnitřním průměru 1 až 3 mm. Na počátku 80. let minulého století použili Jorgenson a Lukacs^{4,5} křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75 µm pro kapilární zónovou elektroforézu a demonstrovali její velkou separační účinnost.

Kapilární elektroforéza (CE) je vysokoúčinná analytická separační metoda, která umožňuje separaci, identifikaci a kvantifikaci nabitéch iontů i neutrálních molekul, neboť zahrnuje několik elektroforetických technik lišících se svým separačním mechanismem. **Kapilární zónová elektroforéza** (CZE) je elektroforetická technika, jejíž separační mechanismus je založen výhradně na rozdílných elektroforetických pohyblivostech analyzovaných iontů. Přídavkem vhodných komplexotvorných činidel do separačního média v CZE lze dosáhnout dalších separačních mechanismů, které mohou být vhodnější a účinnější pro právě analyzované látky. Takovými činidly mohou být i chirální selektory vhodné k separacím a kvantifikacím enantiomerů různých léčiv. Velmi specifickým případem je pak přídavek tenzidu, který při nadkritické micelární koncentraci vytváří v separačním médiu nabité micely, jež umožňují separaci neutrálních molekul v kapilární elektroforéze na principu rozdílné distribuce mezi pseudostacionární (micelární) a vodnou fází. Tuto elektroforetickou techniku, vhodnou pro separaci a kvantifikaci neutrálních molekul, pak nazýváme **micelární elektrokinetická chromatografie**.

Abychom v elektroforéze dosáhli separace velkých biomolekul, které mají značně podobné vlastnosti, musíme separační médium zkomplikovat přídavkem vhodného gelu, jenž zvýrazní rozdíly elektroforetických pohyblivostí vzájemně podobných biomakromolekul tím, že k prosté elektroforetické pohyblivosti přistoupí i rozdílná rychlosť pohybu v pórech gelu. V plošné elektroforéze se již po několik desetiletí pro tyto účely používá sesítovaný polyakrylamid a agarosa. Kombinace sesítovaného polyakrylamidového gelu s dodecylsíranem sodným umožňuje dokonce elektroforeticky dělit bílkoviny podle jejich relativních molekulových hmotností. V kapilární gelo-

vé elektroforéze se osvědčily stejné typy gelů včetně fyzikálních gelů (*entangled polymers*), které nejsou sesírovány pomocí chemické vazby, a jsou tudíž snadno vyměnitelné v separační kapiláře. Pro separace biomolekul, které velmi často mají amfolytický charakter, lze s výhodou použít další elektroforetickou techniku, **kapilární isoelektrické fokusování**, jež dělí molekuly podle jejich izolektrických bodů.

Kapilární zónová elektroforéza, jako nejjednodušší kapilární elektroforetická technika, nachází široké uplatnění při analýze nejrůznějších analytů ve velmi složitých a komplikovaných matricích s minimální předúpravou analyzovaného vzorku. Při použití této separační techniky musí nést analyty náboj, aby vykazovaly elektroforetickou pohyblivost. Mohou se však nacházet ve velmi komplexní matrice, neboť ta může být po každé analýze, na rozdíl od kapilární kapalinové chromatografie, velmi jednoduchým způsobem odstraněna ze separační kapiláry jejím vypláchnutím a naplněním novým separačním médiem. Kapilární elektroforézu lze s výhodou kombinovat s mnoha detekčními technikami⁶ umožňujícími univerzální (např. UV-VIS absorpční fotometrický a bezkontaktní vodivostní detektor), či velmi specifickou (např. fluorescenční a hmotnostně spektrometrický detektor) a citlivou detekci analyzovaných látek.

Křemenná separační kapilára pokrytá polyimidovou vrstvou nabízí v CZE mnohé výhody. Lze ji vyrobit v různých průměrech, díky svému sendvičovému usporádání je pružná, lze ji snadno upravit na požadovanou délku keramickým nožem, po odstranění povrchové polyimidové vrstvy je velmi dobře prostupná pro viditelné i ultrafialové záření, je levná a díky ionizovatelným silanolovým skupinám na vnitřním povrchu vykazuje rychlý elektroosmotický tok (EOF), který většinou podstatně zkracuje dobu analýzy. Vnitřní povrch křemenné kapiláry však není jednoznačně definován, velmi lehce podléhá fyzikálně chemickým změnám vlivem látek obsažených v separačním médiu a jako důsledek generuje nestabilní EOF kolísající od analýzy k analýze, ba dokonce i během jedné analýzy. V křemenných kapilárách je navíc velikost EOF silně závislá na pH separačního média. Z analytického hlediska nestabilita elektroosmotického toku činí CZE analytickou technikou méně reprodukovatelnou než chromatografie⁷. Stabilitu EOF, tedy i reprodukovatelnost CZE lze zvýšit dynamickým nebo trvalým, chemickým pokrytím vnitřní stěny křemenné kapiláry vhodným činidlem, které stabilizuje či úplně eliminuje EOF. Tím se ovšem doba analýzy mnohdy prodlužuje a ztrácí se významný prostředek manipulace separační selektivity. Křemenné kapiláry modifikované na vnitřním povrchu silně kyselými funkčními skupinami (např. -SO₃H) vykazují stabilní EOF v široké oblasti pH a výrazně zlepšují reprodukovatelnost migračních časů analytů v CZE.

Množství vzorku potřebné pro analýzu v kapilární zónové elektroforéze je velmi malé, což přináší obrovskou výhodu při analýze obtížně dostupných vzorků, např. tělních tekutin. Nadávkovat do křemenné kapiláry o průměru několika desítek mikrometrů reprodukovatelně vzorek o objemu několika nanolitrů může být značný technický problém. Nereprodukovanost dávkování vzorku v CE se pak promítá do nereprodukovanosti kvantitativních analytických výsledků získaných touto separační technikou při analýze reálných vzorků⁸.

Přestože CE obecně vykazuje nižší reprodukovatelnost získaných analytických dat v porovnání s kapilární kapalinovou chromatografií, je vysokoúčinným analytickým nástrojem k separaci anorganických iontů⁹, aminokyselin v reálných vzorcích¹⁰, metabolitů v moči¹¹, enantiomerů léčiv¹² či ke kvantifikaci farmaceutických preparátů a jejich nečistot^{13,14}. CZE je i užitečnou fyzikálně chemickou metodou k určování disociačních konstant nových analytů se slabě kyselými či slabě zásaditými vlastnostmi¹³.

6.3 Kapilární kapalinová chromatografie

První pokusy o použití kolon malých průměrů v kapalinové chromatografii byly prováděny ke konci 60. let minulého století. V této době jako první Horváth se svými spolupracovníky^{15,16} zrealizoval mikrokapalinově chromatografický experiment v naplněné ocelové kapiláře o vnitřním průměru 1 mm. Kapilární kapalinová chromatografie (CLC) se stala záhy experimentální náplní dalších významných chromatografistů, jako Scotta a Kučery¹⁷, Ishiiho se spolupracovníky¹⁸, dále pak Kennedyho a Jorgensonu¹⁹.

Separační mechanismus v CLC podobně jako v HPLC, tenkovrstevné či papírové chromatografii je, na rozdíl od CE, založen na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Mobilní fází je v CLC kapalina neboli eluent a stacionární fází může být tuhá látka nebo nemísitelná kapalina, tedy sorbent. Eluent po nadávkování vzorku na separační kolonu unáší zóny analytů ze vzorku, které více či méně interagují se sorbentem, čímž se zpožďují ve svém transportu kolonou, a tím se vzájemně dělí. Transport zón analytů sorbentem pomocí eluentu vede kromě separace analytů i k rozmývání zón separovaných látek v důsledku vířivé difúze, podélné molekulární difúze a odporu proti přenosu hmoty ve stacionární a mobilní fázi. Oba dva jevy, tedy separace a disperze, působí vzájemně proti sobě a naši snahou je neustále maximalizovat separaci a minimalizovat disperzi, abychom získali v chromatogramu dobře rozlišené úzké píky analyzovaných látek.

Z hlediska separačních mechanismů je CLC v porovnání s CE metodou všeestrannější a univerzálnější, neboť umožňuje libovolně kombinovat nepřeberné množství stacionárních a mobilních fází s celou škálou nejrozmanitějších vlastností. Dnes nejčastěji používanou kombinací sorbentu a eluentu pro řešení většiny separačních problémů v kapalinové chromatografii je hydrofobní sorbent promývaný hydrofilním vodně-organickým eluentem, který jako organický modifikátor obsahuje methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Toto nepolárně/polární uspořádání stacionární/mobilní fáze se běžně označuje jako **reverzní kapalinová chromatografie**. Pro silně polární látky iontové povahy se mnohem lépe uplatňuje kombinace iontoměničového sorbentu s eluentem o vhodném pH a iontové síle. Mnoho molekul analytů včetně biologicky aktivních látek vykazuje částečně hydrofobní a zároveň částečně i hydrofilní charakter a pro jejich separaci se osvědčily stacionární fáze, které kombinují reverzní a iontoměničový separační mechanismus na jednom a tomtéž sorbentu.

Chceme-li určovat relativní molekulovou hmotnost biomakromolekul, oligomerů či polymerů, zvolíme vylučovací gelovou chromatografii na stacionární fázi o vhodné a dobře definované velikosti pórů. Pro separaci enantiomerů se používají stacionární fáze s navázaným chirálním selektorem, který při separaci interaguje s opticky aktivními analyty za vzniku diastereomerů. Sorbenty pokryté vhodným afinandem slouží k separaci biologicky aktivních látek, které jsou schopné jedinečné vazby s afinandem pomocí velmi specifické interakce.

Dříve běžně používané vnitřní průměry separačních kolon v HPLC (4-5 mm) jsou dnes velmi často nahrazovány průměry menšími (1-3 mm), neboť umožňují dosáhnout stejných, v mnoha případech však lepších výsledků z hlediska účinnosti separace za současné redukce finančních nákladů na jednu analýzu. Kapalinová chromatografie prováděná v kolonách o vnitřním průměru 0,5 až 1,5 mm se označuje jako **mikrokapalinová**, operující s průtoky desítek mikrolitrů eluentu za minutu. Kapilární kapalinová chromatografie používá průtoky jednotek mikrolitrů eluentu za minutu v kapilárních separačních kolonách o vnitřním průměru 0,15 až 0,50 mm. O nanokapalinové chromatografii mluvíme tehdy, používáme-li kapilární kolony o vnitřním průměru 0,010 až

0,150 mm s průtoky stovek nanolitrů eluentu za minutu. Nanokapalinovou chromatografií lze také realizovat v plošném čipovém uspořádání a čipy k tomu určené velmi často označujeme obecnějším termínem mikrofluidní zařízení (*microfluidic devices*).

Zmenšování vnitřního průměru separačních kolon v kapalinové chromatografii přináší mnohé výhody, ale i některé nevýhody, spojené především s technickými problémy realizace kapilární nebo nanokapalinové chromatografie. K výhodám separačních kolon o menších průměrech patří především menší spotřeba stacionární a mobilní fáze, která umožňuje použít dražší sorbenty a komponenty eluentů s vyhraněnými specifickými vlastnostmi, vyžaduje-li to řešení daného analytického problému. Redukované množství stacionární fáze v koloně si žádá menší objem vzorku, který má být nadávkován na separační kolonu. Nižší průtok mobilní fáze kolonou vede k menšímu naředění analytů eluentem během jejich transportu kolonou k detektoru, což může vést k větším citlivostem u některých detektorů. Neplatí to však obecně pro všechny typy detektorů, neboť menší množství nadávkovaného vzorku a nižší průtok mobilní fáze vyžaduje detekční celu menšího objemu s kratší optickou dráhou u spektrofotometrických detektorů. Při použití tohoto detektoru nevede obecně redukce průměru separační kolony ke zvýšení koncentrační citlivosti, ale pouze ke zmenšení absolutné detegovaného množství analytu.

Kapilární kapalinová chromatografie, pokud to finanční situace dovolí, se v mnoha laboratořích kombinuje s hmotnostní spektrometrií a laserem indukovanou fluorescencí. Hmotnostní spektrometr je velmi citlivý, téměř univerzální detektor, umožňující získat o analytech další velmi důležité informace, které slouží k jejich identifikaci. Laserem indukovaná fluorescence je velmi citlivá, ale zároveň i velmi specifická detekční technika, neboť pouze některé analyzované látky fluoreskují. K dalším detekčním metodám, které mohou být snadno využity v CLC, patří vodivostní a elektrochemické detektory.

Komplikace, které jsou spojeny s miniaturizací separačních kolon, leží především v oblasti instrumentace. Menší množství dávkovaného vzorku a nižší průtoky eluentu kladou velké nároky na minimalizaci mimokolonových mrtvých objemů kapilárního kapalinového systému, chceme-li dokonale využít vysoké separační účinnosti, jež kapilární kolony nabízejí. Nejčastějšími technickými problémy CLC mohou být příprava účinné kapilární separační kolony, efektivní napojení vstupu kapilární kolony na dávkovací ventil a výstupu kolony na detekční celu, konstrukce detekční cely kompatibilního objemu, realizace nadávkování malého objemu vzorku na kolonu, termostatování kolony během analýzy a zajištění dostatečně malého stabilního toku mobilní fáze kolonou. V několika posledních letech jsou komerčně dostupné separační kolony s velmi malým průměrem částic sorbentu (1,7-1,8 μm), které umožňují v kombinaci s vysokými tlaky (40-100 MPa) a průtoky eluentu zkrátit analýzu komplikovaných vzorků až na jednotky minut či dokonce desítky sekund. Tyto techniky se označují jako UPLC a RRLC.

Přes všechny nevýhody, se kterými se můžeme setkat při použití CLC k řešení biomediцинských analytických problémů^{20,21}, je CLC stále více využívána k separaci a kvantifikaci řady substancí ve vzorcích s nejrůznějšími matricemi²²⁻²⁸. Výhody a strasti spojené s použitím CLC pro separaci a kvantifikaci analytů ve vzorcích s reálnými matricemi mohou být demonstrovány na léčivu proti Parkinsonově chorobě, tedy ropinirolu a jeho pěti nečistotách ze syntézy²⁹, nebo na potenciálních chemoterapeutikách, kterými mohou být thioakridiny^{14,30-33} a pyridochinoliny³⁴.

6.4 Kapilární monolitické kolony

První pokusy o vytvoření jednoho bloku porézního sorbentu, který by vyplňoval celý vnitřek separační kolony, byly prováděny již v 60. a 70. letech minulého století³⁵⁻³⁷. Praktické použití těchto kolon však nebylo možné kvůli jejich nízké propustnosti a stabilitě v některých organických rozpouštědlech. Hjertén se svými spolupracovníky³⁸ v roce 1989 připravil stlačený měkký polyakrylamidový gel, který nazval kontinuální lože (*continuous bed*), a úspěšně použil toto monolitické separační médium jako stacionární fázi v kapalinové chromatografii. Švec a Fréchet³⁹ o tři roky později zavedli nový typ sorbentu založený na pevném makroporézním organickém polymeru, tzv. monolitu, který se stal díky svým jedinečným vlastnostem široce se rozvíjející stacionární fází v kapalinové chromatografii a elektrochromatografii⁴⁰⁻⁴⁵.

V posledních deseti letech se výzkum v oblasti separačních kolon pro CLC velmi silně orientuje na přípravu a vývoj právě monolitických kolon⁴⁶, jež se připravují začleněním vhodných monomerních jednotek do bloku porézního polymeru. Do polymerizační směsi se přidává směs vhodných porogenních rozpouštědel, která vytvoří ve vzniklém monolitu pory, jimiž může prostupovat mobilní fáze. Celý blok takto vzniklého porézního polymeru vyplňuje vnitřek kapilární separační kolony a plní funkci stacionární fáze v koloně. Přípravu a vývoj monolitických kolon podnítil především v posledních letech prudký rozvoj **kapilární elektrochromatografie** (CEC)⁴⁶, protože monolitické kolony na rozdíl od náplňových kolon můžeme připravit velmi elegantně a pohodlně v křemenných kapilárách i o průměru pouze několika desítek mikrometrů. Monolity připravované pro CEC musí mít navíc zabudované monomery s ionizovatelnými funkčními skupinami, aby docházelo v jejich pórech při aplikaci elektrického pole ke vzniku EOF, který unáší molekuly analytů pory monolitu během vlastní separace. Například 2-akrylamido-2-methylpropan-1-sulfonová kyseleina je jedním z monomerů sloužících k tomuto účelu.

K dosažení vhodné pevnosti monolitu se do polymerizační směsi kromě funkčního monomeru přidává i síťující monomer, který při polymerizaci propojí lineární řetězce funkčního monomeru do trojrozměrné prostorové sítě. Monomery zabudovávané do monolitů zpravidla obsahují dvojnou vazbu, a proto se s výhodou používá k jejich propojení radikálová polymerizace. Iniciace této radikálové polymerizace lze dosáhnout použitím vhodného iniciátoru, který rozpuštěný v polymerizační směsi rozštěpíme na radikály termostatováním při vyšší teplotě nebo ultrafialovým zářením. Iniciace vyšší teplotou je univerzální, na rozdíl od iniciace ultrafialovým zářením, kterou lze použít pouze u křemenných kapilár pokrytých speciálním polymerem propustným pro toto záření, protože hnědá polyimidová vrstva pokrývající běžně používané křemenné kapiláry nepropouští téměř viditelné ani ultrafialové záření. Další možností iniciace radikálové polymerizace je rozklad iniciátoru v polymerizační směsi za laboratorní teploty za přispění vhodného katalyzátoru.

Vymýt částic sorbentu eluentem z náplňových kolon se musí zabránit fritami na vstupním i výstupním konci, jejichž realizace uvnitř kapilárních náplňových kolon pro CLC je však značně složitým technickým problémem. Velkou výhodou monolitických kolon používaných v CLC je právě to, že nemusí být opatřeny fritou jako náplňové separační kolony. Aby však mobilní fáze, která je v CLC do monolitické separační kolony pumpována pod tlakem, nevytláčila z kapiláry celý blok monolitu, musí být monolit k vnitřní stěně kapiláry zachycen chemickou vazbou. K tomuto účelu se vnitřní povrch kapiláry před vlastní polymerizací silanizuje činidly obsahujícími dvojnou vazbu, která se účastní radikálové polymerizace – tím se zachytí vlastní blok monolitu kovalentní vazbou k vnitřní stěně kapiláry. Silanizačním činidlem s dvojnou vazbou vhodným pro tyto účely je např. 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylát.

Charakterem funkčního monolitu v polymerizační směsi lze velmi jednoduše a efektivně měnit charakter a separační vlastnosti vzniklého monolitu. Pro přípravu monolitických kolon se používá řada různých monomerů. Polyakrylamidové monolity se připravují polymerizací akrylamidu nebo jeho derivátů a síťujícího methylenbisakrylamidu či piperazindiakrylamidu. Polystyrenové monolitické kolony syntetizujeme ze styrenu nebo jeho derivátů a síťovadla divinylbenzenu. Pro přípravu polybutylmethakrylátových, polymethakrylátových a polyglycidylmethakrylátových monolitů používáme butylmethakrylát, methakrylovou kyselinu a glycidylmethakrylát sesítované ethylendimethakrylátem. Díky možnosti připravit monolity nejrůznějších chemických vlastností jsou monolitické kolony využívány k separacím širokého spektra analytů, jako jsou peptidy a bílkoviny, oligonukleotidy, oligosacharidy, fragmenty DNA a další organické látky.

Kromě monolitických kolon na bázi porézních organických polymerů byly vyvinuty monolitické kolony připravené z chemicky modifikovaného silikagelu či spečených, chemicky modifikovaných silikagelových částic. V dnešní době jsou silikagelové a polystyrenové monolitické kolony již komerčně dostupné na trhu.

Polymerní monolitické kolony převážně používané pro separace biomakromolekul⁴⁷ se nechají využít i k separacím malých organických molekul. Podařilo se připravit polybutylmethakrylátové monolitické kolony o vnitřním průměru 320 µm, použitelné v CLC pro separace malých organických molekul⁴⁸⁻⁵³. Tyto práce o kapilárních monolitických kolonách jasně demonstруjí jejich hlavní přednost v porovnání s kapilárními náplňovými kolonami, a to je jednoduchost jejich přípravy, která určuje i jejich nízkou výrobní cenu. Je zřejmé, že v oblasti monolitických kolon jsou stále ještě nevyřešené otázky a problémy, jež čekají na svoji jednoznačnou odpověď a elegantní řešení. Jedním z nich je například účinné a oddělené řízení velikosti velkých pórů (tzv. *through-pores*) o velikosti mikrometrů, nutných pro tok eluentu monolitem, a malých pórů (tzv. *mesopores*) s velikostí nanometrů, potřebných pro interakci analytu s monolitem. I navzdory těmto faktům, jsou kapilární monolitické kolony velmi jednoduchým a levným konkurentem náplňových kolon nejen pro CLC, ale i CEC⁴⁶.

6.5 Závěr

CZE a CLC jsou vysokoúčinné kapilární separační techniky, které se liší především svým separačním mechanismem. CZE jako instrumentálně jednodušší umožňuje rychlé vyvinutí analytické metody a následně analýzu vzorků malých objemů s komplexní matricí bez nutnosti větší předúpravy vzorku. CLC je komplikovanější metodou z hlediska technické realizace, avšak nabízí větší robustnost kombinovanou s univerzálností a navíc poskytuje reprodukovatelnější kvantifikační data za cenu větší finanční a časové náročnosti. Přes všechny tyto rozdíly nelze CZE a CLC chápát jako vzájemně si konkurující techniky, ale zejména jako doplňující se nástroje chemické analýzy. Kapilární monolitické kolony jsou jednoduchou a levnou alternativou náplňových kolon, jejichž přednosti může být úspěšně využíváno jak v CLC, tak i CEC. Přestože miniaturizace v separačních metodách dospěla v posledních letech dále od kapilárních technik až k nanotechnikám na mikrofluidních čipech^{54,55}, budou se zajisté kapilární separační techniky i nadále rozvíjet a sloužit v analýze biomedicínských vzorků.

Kapilární separační techniky zaujímají v analytické chemii nezastupitelné místo, které si vybudovaly zejména v posledním desetiletí svým posunem z oblasti akademického výzkumu směrem do analytické praxe. Jejich společným jmenovatelem je hlavně to, že umožňují analýzu složitých vzorků s velkou separační účinností, malými finančními náklady, v krátkém čase a s malým

negativním vlivem na životní prostředí. Všechny tyto klady kapilárních separačních technik jsou spojeny nejen s větší technickou a instrumentální náročností při jejich realizaci, ale také s většími nároky kladenými na znalosti a dovednosti obsluhujícího personálu.

Literatura

1. Tůma, P., *Využití moderních elektromigračních metod pro monitorování biologicky aktivních látek v tělních tekutinách*, Habilitační práce, 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2007, Praha.
2. Hjertén, S., Arkiv Kemi, 1958, 13, 151.
3. Tiselius, A., Hjertén, S., Jerstedt, S., Arch. Ges. Virusforsch., 1965, 17, 512.
4. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., Anal. Chem., 1981, 53, 1298.
5. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., J. Chromatogr., 1981, 218, 209.
6. Coufal, P., Pacáková, V., Štulík, K., Electrophoresis, 2007, 28, 3379.
7. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Cramers, C.A., J. High Resolut. Chromatogr., 1994, 17, 325.
8. Coufal, P., Claessens, H.A., Cramers, C.A., J. Liquid Chromatography, 1993, 16, 3623.
9. Pacáková, V., Coufal, P., Štulík, K., J. Chromatogr. A, 1999, 834, 257.
10. Coufal, P., Zuska, J., van de Goor, T., Smith, V., Gaš, B., Electrophoresis, 2003, 24, 671.
11. Samcová, E., Kvasnicová, V., Urban, J., Jelínek, I., Coufal, P., J. Chromatogr. A, 1999, 847, 135.
12. Maier, V., Horáková, J., Petr, J., Tesařová, E., Coufal, P., Ševčík, J., J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, 39, 691.
13. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Hardy, M.J., Webb, M., J. Chromatogr. B, 1998, 720, 197.
14. Nejmanová, J., Coufal, P., Bosáková, Z., Suchánková, J., Tesařová, E., J. Sep. Sci., 2007, 30, 2123.
15. Horváth, C.G., Preiss, B.A., Lipsky, S.R., Anal. Chem., 1967, 39, 1422.
16. Horváth, C.G., Lipsky, S.R., Anal. Chem., 1969, 41, 1227.
17. Scott, R.P.W., Kučera, P.J., J. Chromatogr., 1976, 125, 251.
18. Ishii, D., Asai, K., Hibi, K., Jonokuchi, T., Nagaya, M., J. Chromatogr., 1977, 144, 157.
19. Kennedy, R.T., Jorgenson, J.W., Anal. Chem., 1989, 61, 1128.
20. Vissers, J.P.C., Claessens, H.A., Cramers, C.A., J. Chromatogr. A, 1997, 779, 1.
21. Vissers, J.P.C., J. Chromatogr. A, 1999, 856, 117.
22. Koivisto, P., Tornkvist, A., Heldin, E., Markides, K.E., Chromatographia, 2002, 55, 39.
23. McKenzie, J.A.M., Watson, C.J., Rostand, R.D., German, I., Witowski, S.R., Kennedy, R.T., J. Chromatogr. A, 2002, 962, 105.
24. Ogawa, C.A., Diagone, C.A., Lancas, F.M., J. Liq. Chromatogr., 2002, 25, 1651.
25. Chankvetadze, L., Kartozia, I., Yamamoto, C., Chankvetadze, B., Blaschke, G., Okamoto, Y., J. Sep. Sci., 2002, 25, 653.
26. Delinsky, D.C., Greis, K.D., J. Proteome Res., 2002, 1, 279.
27. Rosales-Conrado, N., Leon-Gonzalez, M.E., Perez-Arribas, L.V., Polo-Diez, L.M., Anal. Chim. Acta, 2002, 470, 147.
28. Zhang, S., Huang, F., Zhao, J.W., Wen, L.J., Zhou, F., Yang, P.Y., Talanta, 2002, 58, 451.
29. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H.A., Hardy, M.J., Webb, M., J. Chromatogr. B, 1999, 732, 437.
30. Bosáková, Z., Tesařová, E., Coufal, P., Kafková, B., Barbe, J., Chem. Listy, 2001, 95, 569.
31. Coufal, P., Bosáková, Z., Tesařová, E., Kafková, B., Suchánková, J., Barbe, J., J. Chromatogr. B, 2002, 770, 183.

32. Kafková, B., Bosáková, Z., Tesařová, E., Suchánková, J., Coufal, P., Štulík, K., Chromatographia, 2002, 56, 445.
33. Srbek, J., Bosáková, Z., Tesařová, E., Suchánková, J., Coufal, P., Němcová, I., Chromatographia, 2004, 60, S37.
34. Srbek, J., Coufal, P., Tesařová, E., Bosáková, Z., Suchánková, J., J. Sep. Sci., 2003, 26, 1582.
35. Kubín, M., Špaček, P., Chromeček, R., Collect. Czech. Chem. Commun., 1967, 32, 3881.
36. Ross, W.D., Jefferson, R.T., J. Chromatogr. Sci., 1970, 8, 386.
37. Hileman, F.D., Sievers, R.E., Hess, G.G., Ross, W.D., Anal. Chem., 1973, 45, 1126.
38. Hjertén, S., Liao, J.-L., Zhang, R., J. Chromatogr., 1989, 473, 273.
39. Švec, F., Fréchet, J.M.J., Anal. Chem., 1992, 64, 820.
40. Švec, F., Peters, E.C., Sýkora, D., Yu, C., Fréchet, J.M.J., J. High Resolut. Chromatogr., 2000, 23, 3.
41. Švec, F., Peters, E.C., Sýkora, D., Fréchet, J.M.J., J. Chromatogr. A, 2000, 887, 3.
42. Peters, E.C., Petro, M., Švec, F., Fréchet, J.M.J., Anal. Chem., 1998, 70, 2288.
43. Fujimoto, Ch., Fujise, Y., Matsuzawa, E., Anal. Chem., 1996, 68, 2753.
44. Peters, E.C., Petro, M., Švec, F., Fréchet, J.M.J., Anal. Chem., 1997, 69, 3646.
45. Zou, H., Huang, 6., Ye, M., Luo, Q., J. Chromatogr. A, 2002, 954, 5.
46. Štulík, K., Pacáková, V., Suchánková, J., Coufal, P., J. Chromatogr. B, 2006, 841, 79.
47. Holdšvendová, P., Suchánková, J., Bunček, M., Bačkovská, V., Coufal, P., J. Biochem. Biophys. Methods, 2007, 70, 23.
48. Coufal, P., Čihák, M., Suchánková, J., Tesařová, E., Chem. Listy, 2001, 95, 509.
49. Coufal, P., Čihák, M., Suchánková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z., Štulík, K., J. Chromatogr. A, 2002, 946, 99.
50. Holdšvendová, P., Coufal, P., Suchánková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z., J. Sep. Sci., 2003, 26, 1623.
51. Grafnetter, J., Coufal, P., Tesařová, E., Suchánková, J., Bosáková, Z., Ševčík, J., J. Chromatogr. A, 2004, 1049, 43.
52. Graffneter, J., Coufal, P., Suchánková, J., Štulík, K., J. Chromatogr. A, 2006, 1121, 76.
53. Širc, J., Bosáková, Z., Coufal, P., Michálek, J., Přádný, M., Hobzová, R., Hradil, J., e-Polymers, 2007, no. 117.
54. Tůma, P., Samcová, E., Opekar, F., Jurka, V., Štulík, K., Electrophoresis, 2007, 28, 2174.
55. Srbek, J., Eickhoff, J., Effelsberg, U., Kraiczek, K., van de Goor, T., Coufal, P., J. Sep. Sci., 2007, 30, 2046.

7. POUŽITÍ PŘÍSTROJŮ PRO ATOMOVOU SPEKTROMETRII JAKO PRVKOVĚ SELEKTIVNÍCH DETEKTORŮ PŘI SPECIAČNÍ ANALÝZE

doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.,

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie

rychlov@natur.cuni.cz

7.1 Úvod

Vliv stopových prvků na živé organismy obecně záleží na chemické formě, ve které prvek do organismu vstupuje a na možných transformacích těchto forem v organismu. Identifikace jednotlivých specií prvků poskytuje možnost lépe porozumět chemickým a biochemickým procesům a může podat ucelenější informaci o toxicitě, či naopak esencialitě jednotlivých sloučenin stopových prvků.

I v potravinách a potravinových surovinách představují stopové prvky důležité součásti výživy. Účinky esenciálních, benefitních, ale také toxických prvků obsažených ve stravě, závisejí na chemické formě prvek a možnostech jejich změn. Znalosti o speciaci stopových prvků v různých tělních tekutinách a tkáních jsou velmi důležité pro pochopení jejich úlohy a významu pro lidský organismus, jejich vstřebávání, pohyb v organismu, uchovávání, využování a toxicitu.

7.2 Speciační analýza

Identifikovat a stanovit jednotlivé formy stopových prvků je cílem **speciační analýzy**, která je definována jako analytická činnost vedoucí ke stanovení zastoupení jednotlivých specií prvek ve vzorku. Zahrnuje celý analytický proces od vzorkování, přes kvantifikaci až k zabezpečení jakosti analytických metod. Analytické postupy, které nevedou k úplné identifikaci chemické specie, ale charakterizují pouze skupiny specií, jsou označovány jako **frakcionace**.

Jednotlivými **speciemi** mohou být:

- a) jednotlivé oxidační stavy prvek (cation nebo anion);
- b) organokovové sloučeniny charakterizované silnou kovalentní vazbou kov-uhlík (vazba nepodléhá disociaci a zajišťuje přijatelnou stabilitu během úpravy vzorku);
- c) komplexy kovů charakterizované koordinační vazbou prvek a ligandu:
 - malé organické ligandy (citrát, vínan, šťavelan, aminokyseliny, oligopeptidy);
 - makrocyclické chelatační molekuly a makromolekuly (proteiny, DNA fragmenty, polylsacharidy).

Příklady jednotlivých typů specií jsou uvedeny v následujícím přehledu

- a) oxidační stavy: Se^{IV,VI}; As^{III,V}; Sb^{III,V}; Cr^{III,VI}; Mn^{II,VII}; ...
- b) alkylspecie: Me_nEt_mPb^(4-m-n); Me_nSn⁽³⁻ⁿ⁾⁺; Bu_nSn⁽³⁻ⁿ⁾⁺; Ph_nSn⁽³⁻ⁿ⁾⁺; Me₂Hg; Et₂Hg; MeHg⁺; MeCd⁺; Me₂Cd; ...

- c) sloučeniny s vazbou C-heteroatom: selenoaminokyseliny; organosloučeniny arsenu; arsenocukry; ...
- d) metalopeptidy: fytochelatiny; metalothioneiny; transferrin; metaloenzymy; ...
- e) léčiva: cisplatina; karboplatina; aurothioglukosa; CT-činidla; ...
- f) ostatní: komplexy s aminokyselinami; metaloporfyriny; deriváty ferrocenu; ...

Hlavními cíly speciační analýzy stopových prvků v klinických vzorcích je objasnit na základě specifitějších analytických údajů vztahy jednotlivých vazebných forem prvku k fyziologickým a metabolickým procesům (Obr. 7.1) spojených se zdravím a nemocemi.

arseničnan ($i\text{As}^{\text{V}}$)	$\text{As}^{\text{V}}\text{O}_4^{3-} + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{As}^{\text{III}}\text{O}_3^{3-}$	arsenitan ($i\text{As}^{\text{III}}$)
arsenitan ($i\text{As}^{\text{III}}$)	$\text{As}^{\text{III}}\text{O}_3^{3-} + \text{CH}_3^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{As}^{\text{V}}\text{O}_3^{2-}$	methylarseničná kyselina (MAs^{V})
methylarseničná kyselina (MAs^{V})	$\text{CH}_3\text{As}^{\text{V}}\text{O}_3^{2-} + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{As}^{\text{III}}\text{O}_2^{2-}$	methylarsenitá kyselina (MAs^{III})
methylarsenitá kyselina (MAs^{III})	$\text{CH}_3\text{As}^{\text{III}}\text{O}_2^{2-} + \text{CH}_3^+ \rightarrow (\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{V}}\text{O}_2^-$	dimethylarseničná kyselina (DMAAs^{V})
dimethylarseničná kyselina (DMAAs^{V})	$(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{V}}\text{O}_2^- + 2 \text{e}^- \rightarrow (\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{III}}\text{O}^-$	dimethylarsenitá kyselina ($\text{DMAAs}^{\text{III}}$)

Obr. 7.1: Metabolismus anorganického arsenu v lidském těle

Postup speciační analýzy můžeme obecně rozdělit do jednotlivých fází:

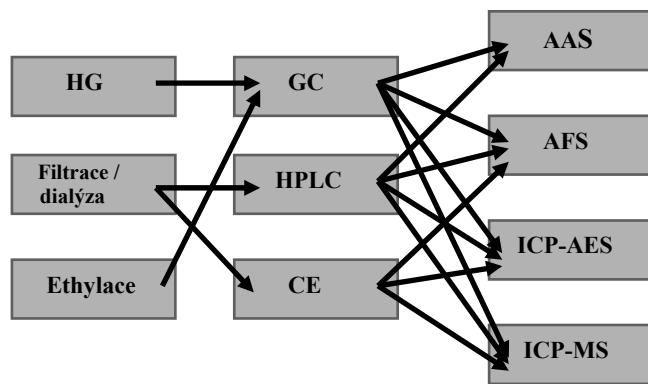
- a) příprava vzorku;
- b) separace jednotlivých specií prvků nebo alespoň frakcí obsahujících skupinu specií pomocí vybrané separační techniky;
- c) detekce a stanovení hledaného prvku v izolované frakci pomocí vybrané prvkově selektivní detekční techniky;
- d) identifikace struktury vazebného partnera prvku pomocí vhodné molekulově specifické detekční techniky (hmotnostní spektrometrie, NMR...).

Metody speciační analýzy mohou existovat v *off-line* uspořádání i v *on-line* uspořádání. Postupy frakcionizace se doposud provádějí převážně v *off-line* uspořádání, naopak speciační techniky již prakticky výhradně v *on-line* uspořádání pomocí tandemových (*hyphenated*) technik.

7.3 Tandemové techniky

Tandemové techniky ve speciační analýze využívají výkonné spojení účinné separační techniky s vysokou citlivostí prvkově selektivním detektorem. Toto spojení je realizováno buď přímým propojením výstupu separační techniky (plynová chromatografie – GC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC; kapilární elektroforéza – CE, superkritická fluidní extrakce – SFE, extrakce kapalina–kapalina, ...) se vstupem prvkově selektivního detektoru, nebo je použit vhodný spojovací

článek (*interface*). Často musí být toto spojení doplněno derivatizačním stupněm (generování těkavých sloučenin – HG, ethylace, ...) buď před detekčním krokem, nebo ještě před separačním krokem. Ze separačních technik je nejčastěji využívána kapalinová a plynová chromatografie a kapilární elektroforéza. Jako prvkově selektivní detektory jsou nejčastěji využívány přístroje pro atomovou spektrometrii (atomový absorpční spektrometr – AAS, atomový fluorescenční spektrometr – AFS, atomový emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem – AES-ICP, hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem – ICP-MS). Přímé propojení bez interface se nejčastěji týká spojení HPLC-AES-ICP a HPLC-ICP-MS, propojení přes příslušný interface pak ostatních metod. Příklady nejčastěji používaných propojení jednotlivých technik jsou na Obr. 7.2. Tandemovými technikami, které se používají speciálně pro ultrastopovou speciační analýzu jsou spojení: GC-AFS; HPLC-HG-AFS; HPLC-ICP-MS a GC-ICP-MS.



Obr. 7.2: Tandemové techniky pro speciační analýzu

7.4 Separační techniky používané při speciační analýze

7.4.1 Kapalinová chromatografie

Z technik kapalinové chromatografie se pro potřeby speciační analýzy používá iontově výměnná chromatografie – IEC, gelová permeační chromatografie – SEC a chromatografie s reverzními fázemi – RP-HPLC.

7.4.1.1 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je založená na interakcích mezi kationty analytu v mobilní fázi s negativně nabitymi funkčními skupinami stacionární fáze (katex) nebo anionty analytu s pozitivně nabitymi funkčními skupinami stacionární fáze (anex). Oba typy měničů, katex i anex, jsou široce užívané pro separaci specií kovů. Kolony se silným anexem jsou např. používány při speciačních analýzách sloučenin arsenu a selenu. Dále je technika IEC aplikována např. na analýzu metallothioneinů (nízkomolekulárních proteinů a polypeptidů s vysokým obsahem cysteinu a schopností vázat kovy) – slabý anex s diethylaminoethylovými funkčními skupinami a sérových proteinů – silně bazické anexy s kvartérními amoniovými skupinami.

Separace vyžadují použití vodních mobilních fází s pufry s různými hodnotami pH a s poměrně vysokými koncentracemi solí; to může způsobit problémy při detekci technikou ICP-MS (ucpávání zmlžovačů, konusů). Často se při eluci používá dvou mobilních fází s lineárním gradientem. Průtoky mobilní fáze jsou zpravidla v intervalu $0,7\text{--}1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Použití katexu při

speciační analýze je méně časté, např. separace arsenobetainu a dalších sloučenin arsenu v kyselém prostředí.

7.4.1.2 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je založena na efektu molekulárních sít. Umožňuje dělení specií podle velikosti či tvaru jejich molekul. Čas, po který je molekula zadržována v pórech souvisí přímo s její molární hmotností. Technika SEC je vhodná pro speciaci velkých molekul proteinů a polysacharidů. Separace menších specií (zvláště iontů), může být významně ovlivněna adsorpcí a efektem iontové výměny. Oproti jiným technikám má velkou výhodu ve vysoké toleranci k biologickým matricím. Průtoky mobilní fáze jsou opět nejčastěji v intervalu $0,7\text{--}1,0 \text{ ml min}^{-1}$ a jejich složení je dobře kompatibilní (vodné roztoky, použití nízkého obsahu solí) se všemi detekčními technikami: F-AAS, ICP-AES i ICP-MS. Nevýhodou techniky SEC je poměrně malý počet teoretických pater chromatografické kolony, nedostatečný pro rozlišení peptidů o podobné molární hmotnosti lišících se pouze složením aminokyselin. Každá frakce eluovaná z SEC kolony tak může obsahovat řadu sloučenin. V mnoha případech je tedy před charakterizací nezbytné další dělení pomocí jiné chromatografické techniky.

7.4.1.3 Chromatografie s reverzními fázemi

V případě chromatografie s reverzními fázemi je analyt dávkován do polární mobilní fáze (směs voda–methanol, voda–acetonitril, ...) a je separován na nepolární stacionární fázi (např. silikagel s chemicky navázaným uhlíkatým řetězcem, zpravidla C4-C18).

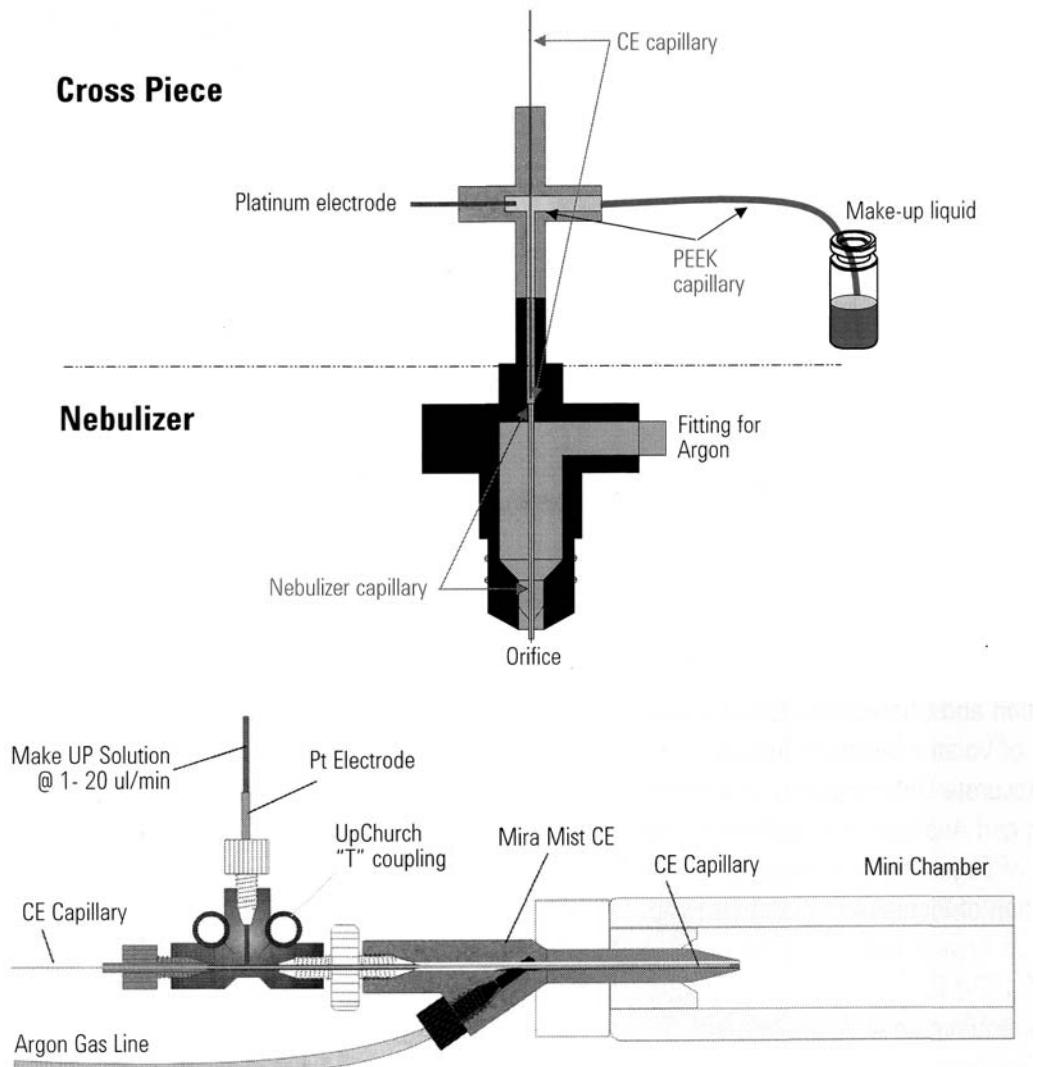
Výhodou této techniky pro speciační analýzu, oproti IEC a SEC, je fakt, že plnící materiál kolony neobsahuje žádné ligandy umožňující konkurenční vazbu kovů. Typickými představiteli analyzovaných látek jsou polární sloučeniny bez náboje s molární hmotností menší než $3\,000 \text{ g mol}^{-1}$. Dnes existuje velké množství kolon s vysokou účinností separace, lišících se rozmezry (kolony *narrow-bore*, mikrokolony). Miniaturizace kolon vede ke snížení spotřeby mobilní fáze, ale tím také ke snížení průtoku, což může být problematické při spojení s prvkově selektivními detektory. V případě použití ICP-MS nebo AES-ICP je proto potřeba použít např. mikrokonceptrické nebo přímé zmlžovače (DIN) pro zavádění vzorků malými průtoky. Vyšší podíl organických látek v mobilní fázi pak také může způsobovat nestabilitu až zhašení plazmatu u těchto detekčních technik. Dalším negativním faktorem je usazování uhlíku na kónusech a plazmové hlavici. To je možno částečně potlačit přidáním velmi malého množství kyslíku do proudu Ar pro účinnější rozložení organické fáze.

Příkladem aplikací chromatografie s reverzními fázemi v bioanorganické chemii je separace specií ve filtrátech po ultrafiltraci nebo extraktech o molární hmotnosti do $10\,000 \text{ g mol}^{-1}$, event. podrobnější charakterizace čistoty metallothioneinových frakcí izolovaných metodou SEC nebo aniontové IEC.

7.4.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je charakteristická vysokou separační účinností. Je vhodná pro širokou škálu vzorků se speciemi od velkých biomolekul až po malé anorganické ionty. Výhodou je zpracování minimálního množství vzorku. Spojení kapilární elektroforézy s prvkově selektivním detektorem je obecně méně časté než v případě HPLC. Důvodem menšího rozšíření spojení obou technik je obtížnější spojení s prvkově selektivním detektorem, které vyžaduje použití příslušného interfa-

ce. Z důvodu aplikace velmi malých množství vzorku je používaným prvkově selektivním detektorem výhradně ICP-MS. Dva příklady komerčních interface jsou uvedeny na Obr. 7.3.



Obr. 7.3: Příklady komerčních interface pro spojení kapilární elektroforézy a ICP-MS

7.5 Prvkově specifické detektory

Základním požadavkem na prvkově specifický detektor je dostatečná citlivost pro detekci daného prvku, práce v kontinuálním režimu a možnost snadného propojení se separační technikou.

7.5.1 Atomová absorpční spektrometrie

Hlavní předností přístrojů pro AAS jako prvkově selektivních detektorů je jejich jednoduchost, snadná dostupnost a nízké pracovní náklady. Nevhodou této techniky je fakt, že není multielementární (s výjimkou simultánní HRCS-AAS). Nemožnost práce v kontinuálním režimu vylučuje použití atomové absorpční spektrometry s elektrotermickou atomizací (ET-AAS), které jinak dosahují pro řadu prvků hodnot detekčních limitů srovnatelných s ICP-MS. Pro detekci se tedy používá AAS s plamenovou atomizací (F-AAS) nebo s křemennými atomizátory (QF-AAS). První použití

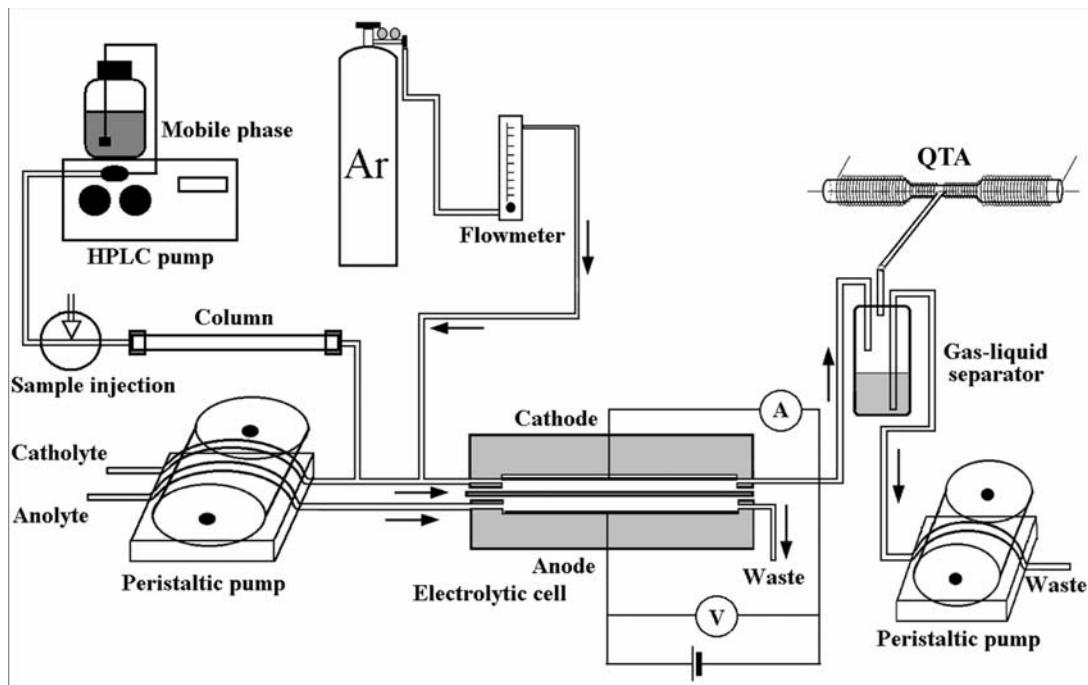
AAS jako prvkově selektivních detektorů se datuje do roku 1980, kdy bylo použito pro stanovení komplexů kov–protein.

7.5.1.1 AAS s plamenovou atomizací

Plamenová AAS může být spojena s HPLC přímo, je slučitelná s průtokem i se složením (i s organickými rozpouštědly) mobilní fáze. Citlivost plamenové AAS je obecně poměrně nízká. Využívá se proto dnes pouze pro detekci komplexů s kovy, které dávají vyšší odezvu (Cd, Pb, Zn, Cu).

7.5.1.2 AAS s křemennými atomizátory

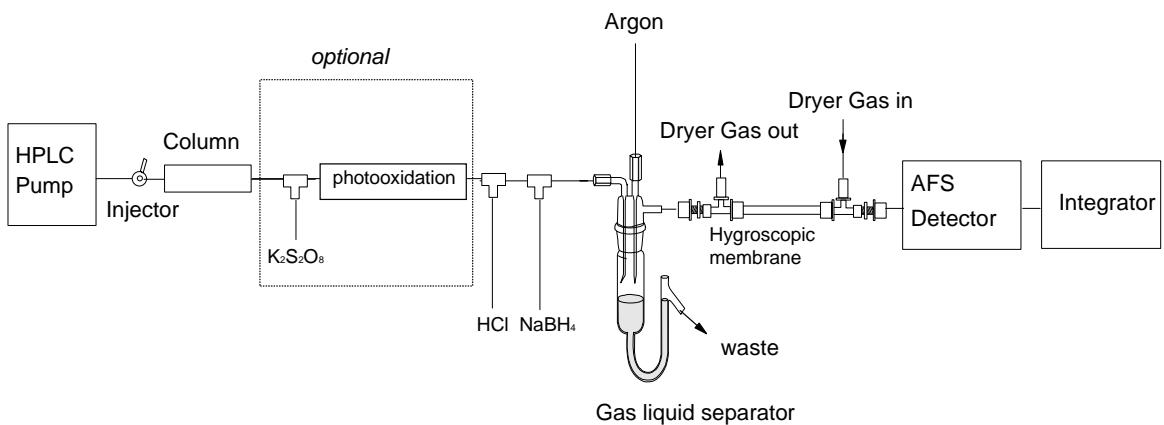
Technika QF-AAS je na rozdíl od plamenové techniky velmi hojně používána pro stanovení specií, které lze *on-line* převést na těkavé hydridy nebo atomární páry (As, Se, Sb, Hg, Cd, ...). Je spojována jak s plynovou, tak s kapalinovou chromatografií (postkolonová derivativace). Spojení je vždy realizováno pomocí interface. Příklad uspořádání experimentu ve spojení s elektrochemickým generováním těkavých sloučenin je uveden na Obr. 7.4. Dosažené detekční limity pro stanovení specií As a Se se při postkolonovém generování těkavých hydridů ve spojení s QF-AAS přibližují detekčním limitům stanovení s ICP-MS s přímým zmlžováním.



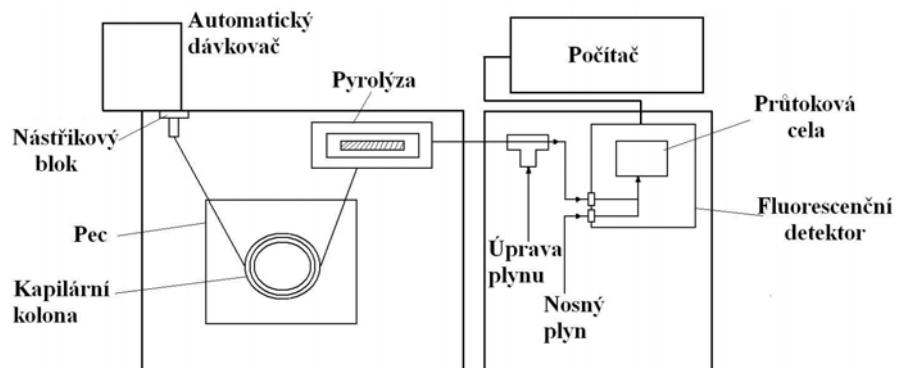
Obr. 7.4: Spojení techniky HPLC-HG-QF-AAS

7.5.2 Atomová fluorescenční spektrometrie

Nespornou výhodou metody AFS je její vysoká citlivost, která je srovnatelná s citlivostí metody ICP-MS, dosažená je však za zlomek provozních nákladů ICP. Atomový fluorescenční spektrometr se dnes používá jako prvkově selektivní detektor především pro stanovení specií hydridotvorných prvků. Je kompatibilní (podobně jako QF-AAS) s průtoky a složením mobilních fází HPLC. Na Obr. 7.5 je komerční spojení HPLC-HG-AFS pro stanovení specií arsenu s postkolonovým chemickým generováním hydridů po předchozí fotooxidační destrukci organických specií arsenu, na Obr. 7.6 je pak opět komerční schéma propojení GC-AFS.



Obr. 7.5: Komerční propojení HPLC-HG-AFS (Millennium Excalibur System, P.S. Analytical Ltd.)



Obr. 7.6: Spojení GC-AFS (Millennium Merlin System, P.S. Analytical Ltd.)

7.5.3 Atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

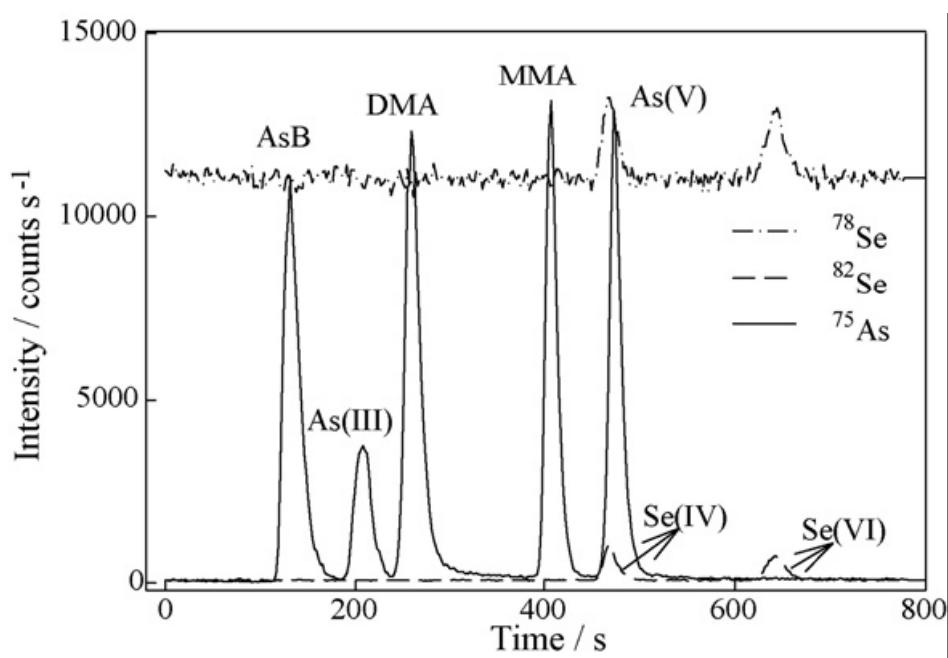
Nespornou výhodou AES-ICP jako prvkově selektivního detektoru je jeho multielementární měření, značná robustnost vůči interferencím z mobilní fáze (obsahující vysoké koncentrace solí a organických rozpouštědel) a nejjednodušší interface pro spojení se separační technikou – kapilára spojující výstup z HPLC kolony a pneumatický zmlžovač přístroje. Pneumatické zmlžovače tolerují vodné roztoky s koncentrací pufru do 50 mmol l^{-1} . Citlivost stanovení je negativně ovlivňována nízkou transportní účinností. Lze ji zvýšit použitím např. hydraulického vysokotlakého zmlžovače nebo ultrazvukového zmlžovače. Přesto jsou detekční limity pro speciaci řady prvků ($10\text{-}100 \text{ ng ml}^{-1}$) mnohdy nedostatečné. Spojení HPLC-AES-ICP se od začátku 80. let používá např. pro speciaci As v biomateriálech.

7.5.4 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, ICP-MS

Hmotnostní spektrometry s indukčně vázaným plazmatem jsou v dnešní době nejpoužívanějšími a nejcitlivějšími prvkově selektivními detektory. Jejich hlavními přednostmi jsou multielementární měření, velmi nízké detekční limity pro stanovení většiny prvků, možnost zjištění izotopového zastoupení a technika *on-line* izotopového zřeďování. Obecným problémem je menší tolerance

k vyšším obsahům solí a organických rozpouštědel v mobilních fázích a spektrální interference. Provozní náklady jsou velké, podobně jako u AES-ICP.

V komerčních přístrojích ICP-MS se běžně používají levnější kvadrupolové analyzátory s horším rozlišením a nižší citlivostí. Citlivost a rozlišení lze zvýšit použitím sektorového nebo průletového analyzátoru. Sektorový analyzátor je v nízkorozlišovacím modu asi dvakrát citlivější než kvadrupolový analyzátor. Většímu rozšíření spektrometrů s vysokým rozlišením (s potenciálně nižšími detekčními limity a nižším rozsahem interferencí) však brání jejich vysoká cena a drahý provoz. V případě kvadrupolových analyzátorů je možné potlačit polyatomické interference u stanovení některých prvků (Fe, Cr, As, Se) použitím kolizní nebo reakční cely umístěné mezi ICP a analyzátem. Na Obr. 7.7 je uveden příklad analýzy směsi specií arsenu a selenu kombinovanou technikou HPLC (IEC) – ICP-MS.



Obr. 7.7: Příklad chromatogramu směsi specií arsenu a selenu získaného kombinovanou technikou HPLC (IEC)-ICP-MS

Doporučená literatura

- R. Cornelis (editor): *Handbook of Elemental Speciation. Techniques and Methodology*, Wiley, Chichester, 2003.
- R. Cornelis (editor): *Handbook of Elemental Speciation II. Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, Wiley, Chichester, 2005.

8. BIOSENSORY PRO DETEKCI CHEMICKÝCH LÁTEK

prof. RNDr. František Opekar, CSc.

*Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie
opekar@natur.cuni.cz*

8.1 Definice chemického sensoru

Problematice chemických sensorů, jejich využití v nejrůznějších oblastech pracovního a životního prostředí a zhodnocení jejich významu byla v tomto kursu již věnována značná pozornost^{1,2}. Připomeňme si, že **hlavním úkolem chemického sensoru je převádět chemický stav nebo projev sledovaného systému na signály-informace, kterým bud' již rozumíme přímo, nebo je lze na srozumitelné snadno převést**. Jednoznačnou a všeobjímající definici chemického sensoru podat nelze, v odborné literatuře se setkáváme s mnohými. Lze souhlasit s tím, že³ „chemický sensor je malé zařízení, které převádí chemický stav na elektrický signál“. Méně obecná je definice⁴, která říká: „**Chemický sensor je převodník, který poskytuje přímo informaci o chemickém složení svého okolí. Je tvořen fyzikálním převodníkem a chemicky citlivou vrstvou**“. Tato definice již popisuje i principiální strukturu chemického sensoru a na jejím základě lze diskutovat problematiku ze dvou hledisek. Na jedné straně je molekulový či iontový selektor a fyzikálně chemická či biochemická interakce sensoru s určitými látkami ve sledovaném prostředí (chemicky citlivá vrstva), na straně druhé je systém převádějící výsledek příslušné interakce na měřitelný a vyhodnotitelný signál, vesměs elektrický (fyzikální převodník).

Velice specifické a citlivé mohou být sensory, v nichž je v chemicky citlivé vrstvě využito biologických či lépe biochemických rozpoznávacích mechanismů na úrovni molekul či makromolekul, jako jsou enzymy, protilátky či nukleové kyseliny. Nemusí jít vždy o izolované sloučeniny, ale mohou být využity i rostlinné nebo živočišné tkáně, konají se pokusy o spojení fyzikálního převodníku s celými orgány. **Chemické sensory obsahující funkční biologickou komponentu jsou známy jako biosensory.** Problematika biosensorů je dnes jednou z nejrychleji se rozvíjejících oblastí chemických sensorů, protože nachází uplatnění především v biochemických a klinických laboratořích, v nichž se provádějí obrovské počty vysoce specializovaných analýz biologických vzorků s komplexními matricemi.

V souladu s výše uvedenou definicí, vymezující v (bio)chemickém sensoru dvě základní struktury, je prezentován následující text. Nejprve budou diskutovány biologické (biochemické) prvky chemicky citlivé vrstvy a poté bude pojednáno o používaných převodnících.

8.2 Chemicky citlivé vrstvy s biologickou či biochemickou komponentou

Biologické prvky využívané v biosensorech jsou vybírány především z několika základních skupin materiálů, především to jsou **enzymy a protilátky**. V poslední době se intenzivně experimentuje i s tzv. **receptory**, tj. biologickými strukturami, které spouští nějaký proces, jsou-li exponovány určité látky nebo skupině látek. Příkladem může být vypreparovaný čichový orgán korýšů s chemoreceptory tvořícími komplex např. s aminokyselinami či hormony. Vznik komplexu je provázen změnou akčního potenciálu na nervovém vlákně, který lze měřit mikroelektrodou. Na rozdíl od biosensorů obsahujících enzym či protilátku, se lze s receptorovými biosensory setkat pouze v la-

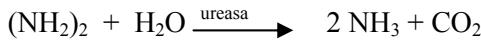
boratořích. Zajímavé je i využití **nukleových kyselin** v biosensorech, slouží však zpravidla nikoli přímo k detekci určitých látek, ale za použití metod genového inženýrství k modifikaci genů např. bakteriálních kmenů tak, aby zvýšily produkci potřebného enzymu nebo zlepšily jeho vlastnosti (menší změna vlastností se změnou pH, vyšší stabilita atp.). Další využití sensorů s nukleovými kyselinami lze spatřovat v problematice detekce poškození genetického materiálu a genetických vad.

8.2.1 Enzymy

Enzymy vysoce specificky katalyzují určité chemické reakce. Detegováno a vhodným převodníkem převáděno na informační signál je množství vzniklého produktu, **P**, či úbytek reakční komponenty, **R**, při této reakci:



kde **E** představuje enzym a **S** analyt (substrát). Nejběžnějšími jsou biosensory močoviny s enzymem **ureasou**, která katalyzuje hydrolýzu močoviny:



a glukosy s enzymem **glukosooxidasou**, která katalyzuje její oxidaci:



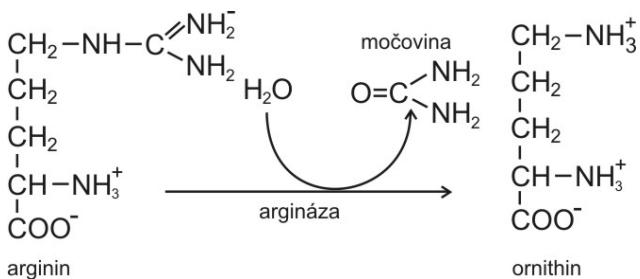
V prvním případě se deteguje množství vzniklého CO_2 nebo (s výhodou) NH_3 (zpravidla potenciometrickým čidlem, viz dále), v druhém případě úbytek kyslíku nebo množství vzniklého peroxidu vodíku (např. ampérometrickým čidlem). Z těchto údajů je na základě kalibrace stanoven analyt.

Kromě izolovaných a čištěných enzymů lze využít přímo biologických tkání nebo mikrobiálních kultur, které enzym obsahují. Výhodou může být to, že enzym je ve svém biologickém prostředí a je tak stabilnější a může být i aktivnější. **Tkáňové biosensory** jsou i levnější než biosensory s izolovanými enzymy. Nevýhodou bývá menší rychlosť odezvy a mohou být i méně selektivní, protože obsahují zpravidla více enzymů. Jako příklad lze uvést tkáňový biosensor pro stanovení glutamové kyseliny, v němž je enzym glutaminasa obsažen v prasečích játrech:



a glutamin je stanoven z množství vzniklého amoniaku.

Některá stanovení mohou být založena i na kombinací více enzymových reakcí. Například stanovení argininu, viz Obr. 8.1, je možné tkáňovým biosensorem obsahujícím arginasu v hořčicích játrech. Vznikající močovina je detegována potenciometrickým sensorem s ureasou. Další příklady tkáňových biosensorů jsou v tabulce 8.1.



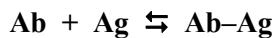
Obr. 8.1: Schéma stanovení argininu, podrobnosti viz text

Tab. 8.1: Příklady tkáňových a mikrobiálních enzymových biosensorů (výběr z publikace⁵)

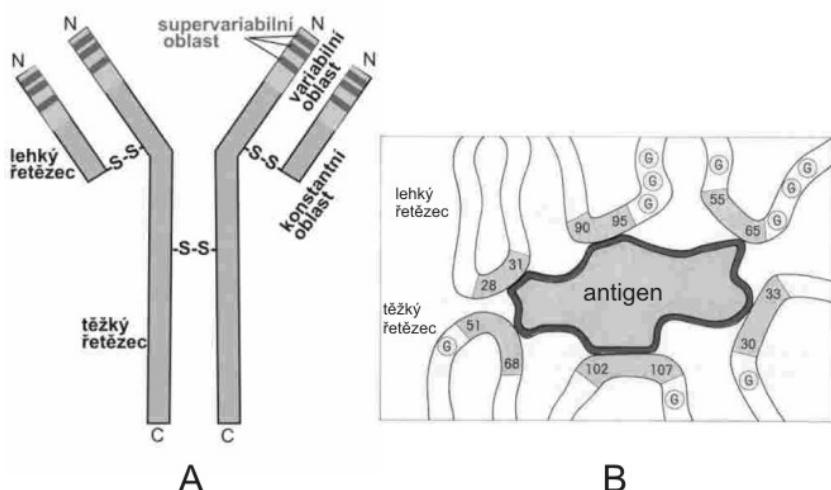
Analyt (substrát)	Bioaktivní materiál	Detegovaný produkt
adenosin	sliznice myšího střeva	NH ₃
guanin	králičí játra	NH ₃
glutamová kys.	tykev	CO ₂
dopamin	banánová dužina	O ₂
cystein	okurkový list	NH ₃
pyrohroznová kys.	kukuřičné zrno	CO ₂
lysin	<i>Escherichia coli</i>	CO ₂
nikotinová kys.	<i>Lactobacillus arabinosis</i>	změna pH
ethanol	<i>Trichosporon brassicae</i>	O ₂
glukosa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	O ₂

8.2.2 Protilátky

Protilátky (antibody, **Ab**) jsou proteiny, které mohou velice specificky vázat určité, pro organismus škodlivé látky (antigeny, **Ag**) do neškodného komplexu:



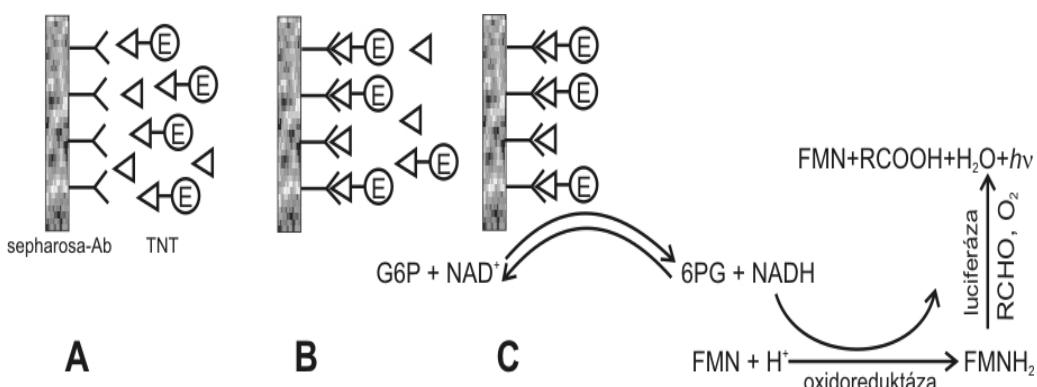
Rovnovážná konstanta reakce, $K = [\text{Ab}-\text{Ag}]/[\text{Ab}][\text{Ag}]$, je vysoká, řádově 10^6 . Protilátky vznikají v organismu jako reakce na přítomnost různých proteinů, ale i relativně malých molekul, haptenu, které (po spojení s vhodným makromolekulárním nosičem) mají rovněž schopnost vyvolat produkcii protilátek. Takto vzniklých protilátek je možno analyticky využít k detekci a stanovení právě těch látek, které jejich tvorbu vyvolaly. Častými používanými protilátkami jsou **imunoglobuliny** (γ -globuliny), které jsou získávány ze zvířecích krevních sér. Schematické znázornění imunoglobuluinu je na Obr. 8.2A. Selektivitu imunoglobulinů určuje struktura variabilní oblasti, jak je naznačeno na Obr. 8.2B.



Obr. 8.2: Model protilátky – imunoglobulin (A) a znázornění specifické tvorby komplexu protilátko-antigen (B); čísla udávají pořadí aminokyselin ve variabilní oblasti imunoglobulinu

Při analýze je biosensor s immobilizovanou protilátkou v kontaktu s analyzovaným roztokem. Po ustavení rovnováhy se zjistí množství vzniklého komplexu a na základě kalibrace obsah antigenu. V mnoha případech se postupuje tak, že do analyzovaného roztoku se přidá známé množství antigenu stejného, jako je stanovovaný, ale vhodným způsobem značeného, **Ag***, (např. enzymem navázaným na nespecifickou část antigenu, radioaktivním izotopem, fluoreskující molekulou atp.) tak, aby se dal detegovat, ale byl pro protilátku nerozlišitelný od antigenu stanovovaného, neznačeného. Podle poměru neznačeného a značeného antigenu v roztoku se na biosensoru ustaví určitý rovnovážný poměr $[Ab-Ag]/[Ab-Ag^*]$. Stanovení antigenu je pak založeno na zjištění množství komplexu se značeným antigenem.

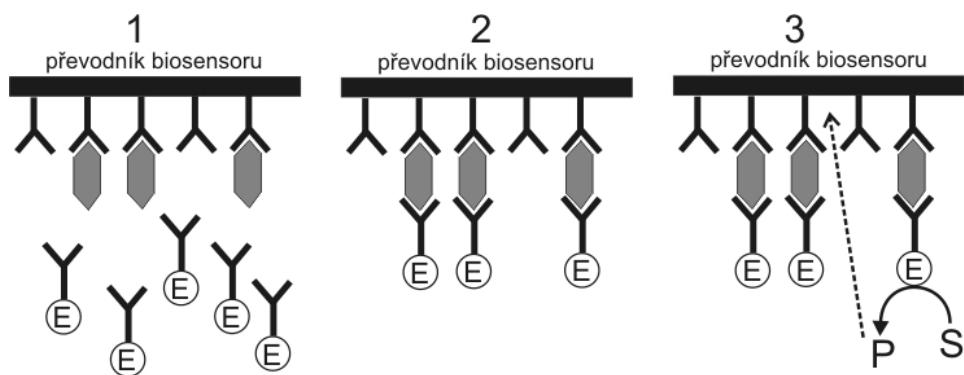
Postupy při praktických aplikacích imunosensorů bývají někdy poměrně složité. Jako příklad lze uvést specifické stanovení stop trinitrotoluenu (TNT)⁶. Imunosensor tvoří TNT-protilátka immobilizovaná na sepharose. Je v kontaktu se vzorkem obsahujícím stanovovaný TNT a známou koncentrací TNT značeného enzymem glukoso-6-fosfát dehydrogenasou (G6PDH), Obr. 8.3A. Neznačený a značený TNT soutěží o místa na immobilizované TNT-protilátky a podle jejich poměru ve vzorku se ustaví i jejich rovnovážný poměr na sensoru, Obr. 8.3B, viz též výše.



Obr. 8.3: Schema stanovení TNT imunosensorem (sepharosa-Ab je sepharosa s immobilizovanou TNT-protilátkou, E je enzym G6PDH). Popis v textu

Po dosažení rovnováhy je z imunosensoru vymyt nenavázaný TNT a množství navázaného značeného TNT se stanoví enzymatickou reakcí, Obr. 8.3C. Enzym G6PDH ve značce katalyzuje oxidaci glukoso-6-fosfátu (G6P) oxidovanou formou nikotinamid-adenindinukleotidu (NAD^+) za vzniku 6-fosfoglukonátu (6PG) a NADH. NADH poté redukuje za katalýzy oxidoreduktasou flavinmononukleotid (FMN) na redukovanou formu $FMNH_2$, která reaguje s kyslíkem za přítomnosti bakteriální luciferasy, přičemž je emitováno záření o vlnové délce 478 až 505 nm. Fotometrickým měřením intenzity tohoto záření lze na základě kalibrace stanovit TNT ve vzorku. Výsledkem tohoto několikastupňového postupu je vysoce specifické a citlivé stanovení výbušniny TNT s detekčním limitem pod $10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

V právě popsaném imunosensoru pro detekci TNT je využito tzv. **kompetitivního uspořádání**. Jinou používanou strukturou imunosensorů je **sendvičové uspořádání**, jehož schéma je na Obr. 8.4.



Obr. 8.4: Sendvičové uspořádání imunosensoru

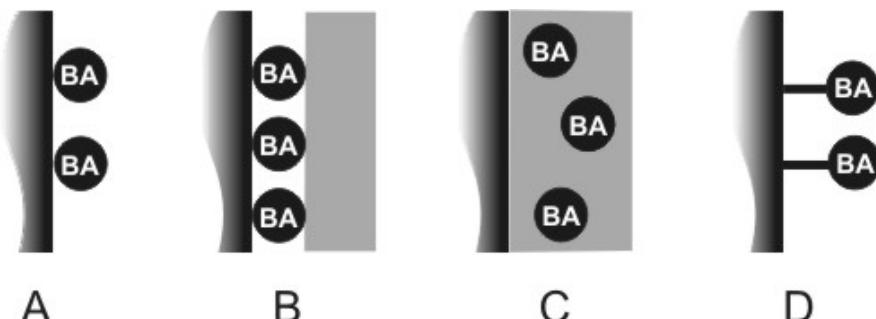
1 – sensor s vytvořeným komplexem **Ab-Ag** je přenesen do roztoku, který obsahuje značenou protilátku, **Ab***; 2 – **Ab*** se naváže na druhém vazebném místě **Ag**; 3 – senzor je v roztoku obsahujícím substrát **S** a deteguje se produkt enzymatické reakce **P**

8.2.3 Imobilizace biologicky aktivní látky na povrchu biosensoru

Aby bylo možno biosensory v praxi používat, musí být biologicky aktivní látka (chemicky citlivá vrstva) imobilizována na povrchu biosensoru, zpravidla přímo na převodníku. K tomu se využívá několika metod. Nejjednodušší metodou je **adsorpce** (Obr. 8.5A). Pevnost vazby je však velice malá a biosensory tohoto typu jsou vhodné pouze pro laboratorní výzkumnou práci. Doba života takto připraveného biosensoru bývá maximálně jeden den.

Další možností je imobilizovat a držet biologicky aktivní látku těsně u povrchu sensoru **permeabilní membránou** (*encapsulation*). Výhodou je to, že membrána, podle struktury a materiálu, může také omezit např. inhibiční vlivy některých látek v roztoku a zajišťuje relativní čistotu aktivní vrstvy (Obr. 8.5B). Běžnými materiály jsou např. acetylcelulosa (dialyzační membrána), polykarbonát, kolagen (přírodní protein) a další. Životnost biosensoru s membránou může být až jeden týden.

Biologicky aktivní látka může být imobilizována v **polymerním gelu** (*entrapment*, Obr. 8.5C). Často používaným polymerem bývá polyakrylamid (známý z gelové elektroforézy). Stálost biosensoru je několik týdnů, ale polymerní matrice představuje značnou difúzní bariéru, což vede k dlouhým dobám odezvy sensoru.



Obr. 8.5: Způsoby imobilizace biologicky aktivní látky (BA) na povrchu detekčního systému (převodníku)

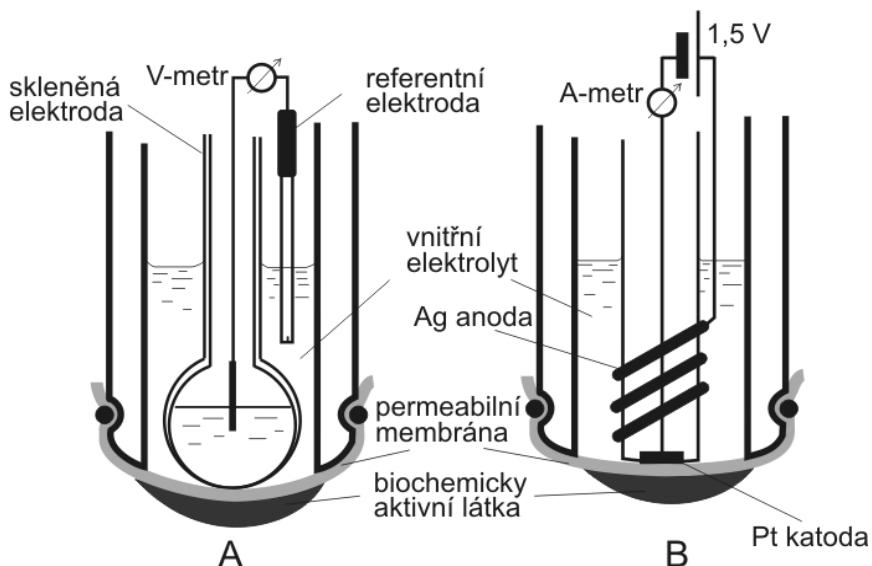
A – adsorpce, B – imobilizace membránou, C – imobilizace v polymerním gelu, D – imobilizace kovalentní vazbou

Nejstabilnější imobilizací biologicky aktivní látky u povrchu sensoru je **kovalentní vazba** (Obr. 8.5D). Tento způsob lze využít tehdy, jsou-li ve struktuře biologicky aktivní látky skupiny, které nejsou nutné pro biologickou aktivitu látky, ale lze je využít k vazbě na sensor. Biosensoře tohoto typu mohou být aplikovatelné až po dobu jednoho roku.

8.3 Převodníky v biosensorech

8.3.1 Převodníky elektrochemické

Mezi elektrochemickými převodníky jsou dnes již klasické **potenciometrické nebo ampérometrické membránové detektory**, Obr. 8.6. Indikačním elementem v prvním z nich je skleněná elektroda nebo iontově selektivní elektroda (ISE), v druhém platinová elektroda. Biochemicky aktivní látka je imobilizována na vnější straně membrány, která odděluje vlastní detekční systém od analyzovaného prostředí, takže k elektrodám se dostanou pouze látky plynné. Z toho plyne, že při biochemické interakci analytu s biologicky aktivní látkou musí vznikat nebo být spotřebovávány plynné látky.



Obr. 8.6: Schema potenciometrického membránového biosensoru (A) a ampérometrického membránového biosensoru (B)

Potenciometrický membránový detektor, Obr. 8.6A, je častým převodníkem pro stanovení látek, při jejichž enzymatické reakci vzniká oxid uhličitý nebo amoniak. Plynná komponenta permeuje membránou do vhodného vnitřního roztoku, kde dochází v důsledku proteolytických reakcí ke změně pH, na což reaguje skleněná elektroda změnou potenciálu. K těmto reakcím dochází v tenkém filmu elektrolytu mezi membránou a skleněnou elektrodou, takže po ukončení analýzy je difúzí z okolního roztoku opět ustaveno počáteční pH. Typickými aplikacemi tohoto typu biosensoru jsou již výše uvedená stanovení močoviny (detekční limit, LOD $\approx 10^{-6}$ mol dm $^{-3}$), glutaminu, argininu a látek v uvedených tabulce 8.1, při nichž je reakčním produktem NH₃ nebo CO₂. Další příklady jsou uvedeny v tabulce 8.2.

Tab. 8.2: Příklady stanovení látek potenciometrickými biosensory

Analyt	Enzym	Produkty *)
kreatinin	kreatinasa	$\text{NH}_3 + \text{kreatinin}$
L-fenylalanin	fenylalaninamoniak lyasa	$\text{NH}_3 + \text{trans-cinnamát}$
adenosin	adenosindeaminasa	$\text{NH}_3 + \text{inosin}$
aspartam	L-aspartasa	$\text{NH}_3 + \text{produkt}$
šťavelan	oxalátoxidasa	$2 \text{ CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
penicilin **)	penicilinasa	$\text{H}^+ + \text{peniciloinát}$

*) detegovaný produkt je vyznačen tučně; **) při tomto stanovení je detektorem jen pH-elektroda

V současnosti se v potenciometrických biosensorech jako pH citlivý převodník často využívá iontově selektivní transistor řízený polem (ISFET). Biologicky aktivní látka je na jeho řídící elektrodě a změna pH v přítomnosti analytu se projeví změnou potenciálu řídící elektrody a tím i změnou proudu tekoucího transistorem. Velikost tohoto proudu je analytickým signálem. Hlavní přednosti tohoto převodníku jsou malé rozměry (možnost tvorby souborů biosensorů) a kompatibilita se zpracovatelskou mikroelektronikou.

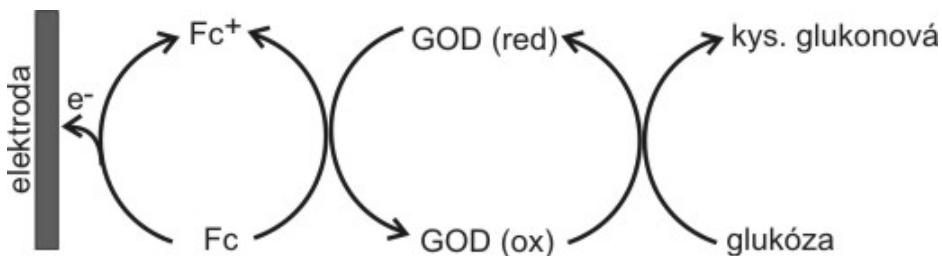
Ve standardním **ampérometrickém membránovém biosensoru**, Obr. 8.6B, je převodníkem detektor kyslíku, který je znám jako Clarkův detektor. Kyslík permeuje membránou k platinové katodě, kde je při jejím vhodném potenciálu redukován; analytickým signálem je odpovídající elektrický proud. Detektor je proto používán v těch případech, kdy se biochemické reakce účastní kyslík. Typickým příkladem je stanovení glukosy:



Stanovení je založeno na úbytku kyslíku v blízkosti membrány v přítomnosti glukosy v analyzovaném prostředí. Podle imobilizované oxidasy lze takto stanovovat mnoho dalších látek. Pro praktické použití jsou k dispozici i tzv. solid-state biosensory založené na planárních detektorech kyslíku, v nichž jsou elektrody a další komponenty sensoru zhotovované např. sítotiskem na inertní podložce. Takto zhotovené biosensory jsou levné a zpravidla se používají jako jednorázové.

Biosensory založené na principu Clarkova kyslíkového detektoru se někdy nazývají **biosensory první generace**. Biosensory, v nichž je místo kyslíku detegován jiný redoxní systém s příznivějším elektrochemickým chováním (systém elektrochemicky reversibilní), tzv. redoxní mediátor, jsou **biosensory druhé generace**. Stanovení glukosy je v tomto případě schematicky znázorněno na Obr. 8.7. Látkou detegovanou na elektrodě je v uvedeném příkladě ferrocen. V problematice biosensorů se využívá mnoha různých typů redoxních mediátorů, umělých i „přirozených“, mezi posledně jmenované patří např. FMN/FMNH₂ nebo NAD⁺/NADH, viz výše stanovení TNT. Nejjednodušší realizací biosensorů tohoto typu je elektroda z uhlíkové pasty, v níž je přimíchán redoxní mediátor a příslušný enzym je imobilizován na povrchu pasty.

Testují se i **biosensory třetí generace**, kdy je na elektrodě oxidován nebo redukován přímo enzym bez redoxního mediátoru. K zajištění dostatečně rychlé elektrodové reakce však elektrodový povrch musí být vhodným způsobem modifikován, používá se např. komplex tetracyano-chinodimethan/tetrathiafulvalen (TCNQ/TTF). Další příklady aplikací ampérometrických biosensorů jsou v tabulce 8.3.



Obr. 8.7: Princip biosensoru pro stanovení glukosy s redoxním mediátorem

Fc a Fc⁺ je ferrocen a jeho oxidovaná forma, GOD je glukosoxidasa

Tab. 8.3: Příklady stanovení látek ampérometrickými biosensory

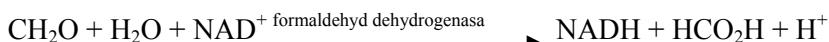
Analyt	Enzym	Detegovaný produkt
polyfenoly *)	polyfenoloxidasa	chinon
cholesterol **)	cholesteroloxidasa	H ₂ O ₂ /Fc
ethanol	alkoholdehydrogenasa	NADH ⁺
mléčnan	laktátmonooxidasa	H ₂ O ₂

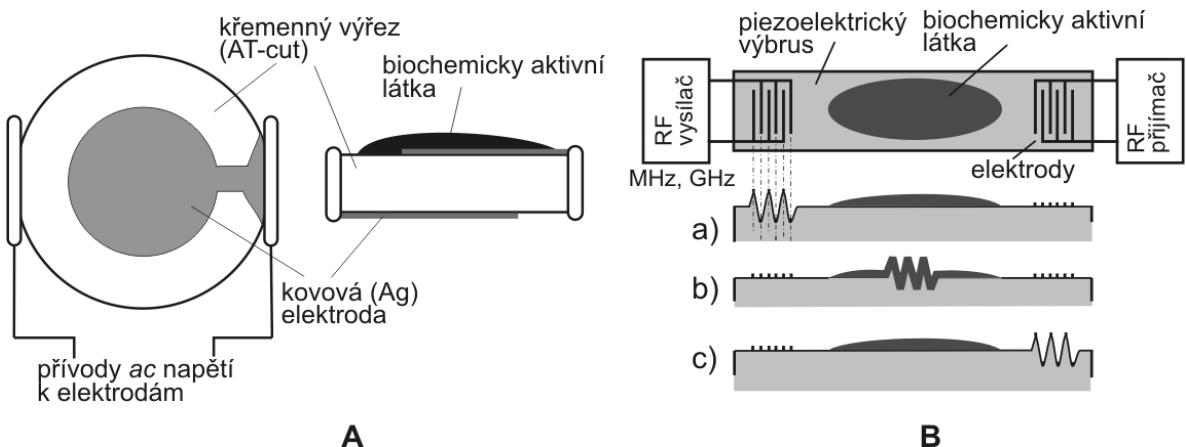
*) jedním z prvních biosensorů byla uhlíková pastová elektroda v níž byla rozmíchána banánová dužina (biosensor byl nazván banantroda). Banánová dužina obsahuje enzym polyfenoloxidázu a biosensor byl použit pro stanovení dopaminu; **) biosensor s redoxním mediátorem ferrocenem.

8.3.2 Převodníky hmotnostní

Převodníky založené na měření změn hmotnosti využívají **piezoelektrické materiály**. Typickým používaným piezoelektrikem je křemen, používají se i jiné materiály, např. LiNbO₃, LiTaO₃. Biologicky aktivní látka je imobilizována na povrchu piezoelektrika a změna její hmotnosti v přítomnosti analytu (adsorpce, tvorba produktu, tvorba komplexu **Ab-Ag** atp.) se projeví změnou rezonanční frekvence těchto materiálů. V praxi se lze setkat s dvojím typem těchto sensorů, s tzv. sensory Bulk Acoustic Wave (BAW), které jsou též známy jako křemenné mikrováhy (Quartz Crystal Microbalance, QCM) a sensory s povrchovou akustickou vlnou (Surface Acoustic Wave, SAW). Princip obou typů je patrný z Obr. 8.8.

V **křemenných mikrovahách**, Obr. 8.8A, je z krystalu křemene vyříznuta destička (tzv. AT-cut), která je na dvou protilehlých stranách opatřena elektrodami (např. napařením kovu). Destička s elektrodami je součástí elektronického oscilátoru a přivádí se na ni střídavé elektrické napětí o frekvenci blízké rezonanční frekvenci křemenné destičky. Pod jeho vlivem se destička rozkmitá. Jestliže biologicky aktivní látka nanesená na jedné z elektrod interaguje s analytem a přitom dojde ke vzrůstu její hmotnosti, sníží se frekvence oscilátoru. Toto snížení pak lze korelovat s obsahem analytu v analyzovaném prostředí. Příkladem může být stanovení formaldehydu sensorem s imobilizovaným filmem vysušené formaldehyd dehydrogenasy s NAD⁺,





Obr. 8.8: Schematické znázornění hmotnostních biosensorů typu BAW (A) a SAW (B)

U biosensorů s povrchovou vlnou je střídavé napětí o vysoké frekvenci (radiofrekvence) přiváděno na dvojici elektrod interdigitálního typu vytvořených na povrchu piezoelektrického materiálu, Obr. 8.8B. Rezonančním rozkmitáním povrchových vrstev piezoelektrika se generuje Rayleighova povrchová vlna. Ta postupuje po povrchu piezoelektrika a může být převáděna další dvojicí elektrod zpět na střídavé elektrické napětí. Pokud je na povrchu piezoelektrika imobilizována biologicky aktivní látka a dojde-li při interakci s analytem ke změně její hmotnosti, mění se rychlosť šíření povrchové vlny, což se projeví změnou rezonanční frekvence (podobně jako v případě BAW-sensorů) a její amplituda. Princip je zřejmý z Obr. 8.8B, schémata a, b, c. V laboratořích se testují i další varianty této techniky, které využívají jiných typů vln šířících se piezoelektrikem.

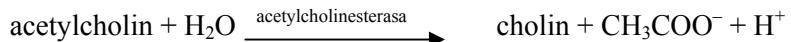
Biosensory s povrchovou vlnou jsou nejcitlivější v plynném prostředí. Příkladem jejich aplikace může být detekce a stanovení sarinu a jiných nervově paralytických látek (NPL) ve vzduchu; biologicky aktivní látkou je enzym acetylcholinesterasa, která tvoří s NPL komplex. U hmotnostních sensorů lze zvýšení citlivosti detekce dosáhnout tím, že ke stanovované molekule je na místo, které není důležité pro specifickou vazbu na biologicky aktivní látku, navázána těžká skupina. Méně selektivní biologicky aktivní látky jsou používány v souborech piezoelektrických biosensorů pro konstrukce elektronických nosů.

8.3.3 Optické převodníky

V biosensorech s optickými převodníky se nejčastěji využívají **optická vlákna**, a to ve dvou základních variantách. V tzv. **extrinsických sensorech** slouží vlákno jako pasivní vodič záření od zdroje k místu detekce a odtud k detektoru. K biochemické interakci mezi analytem a biologicky aktivní látkou, při níž se mění optické vlastnosti, dochází tak mimo optické vlákno. V nejjednodušším uspořádání se měří **absorpce** záření, uspořádání biosensoru připomíná klasickou absorpční spektrometrii, Obr. 8.9A.

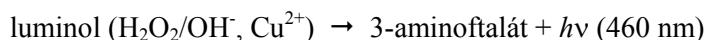
Dvouvláknové uspořádání na Obr. 8.9B je optickou variantou potenciometrických membránových biosensorů. Plynný produkt (CO_2 , NH_3) vznikající při reakci enzymu s analytem permeuje do roztoku s acidobazickým indikátorem. Na změnu pH způsobenou proteolytickými reakcemi reaguje indikátor změnou barvy, která je opticky detegována. Použitím zrcadla v uvedeném sensoru se prodlužuje optická dráha, čímž je umožněna citlivější detekce analytu. Pokud membrána umož-

ňuje transport i malých molekul (dialyzační membrána), nemusí být produktem reakce plynný produkt. Příkladem může být biosensor na stanovení acetylcholINU,

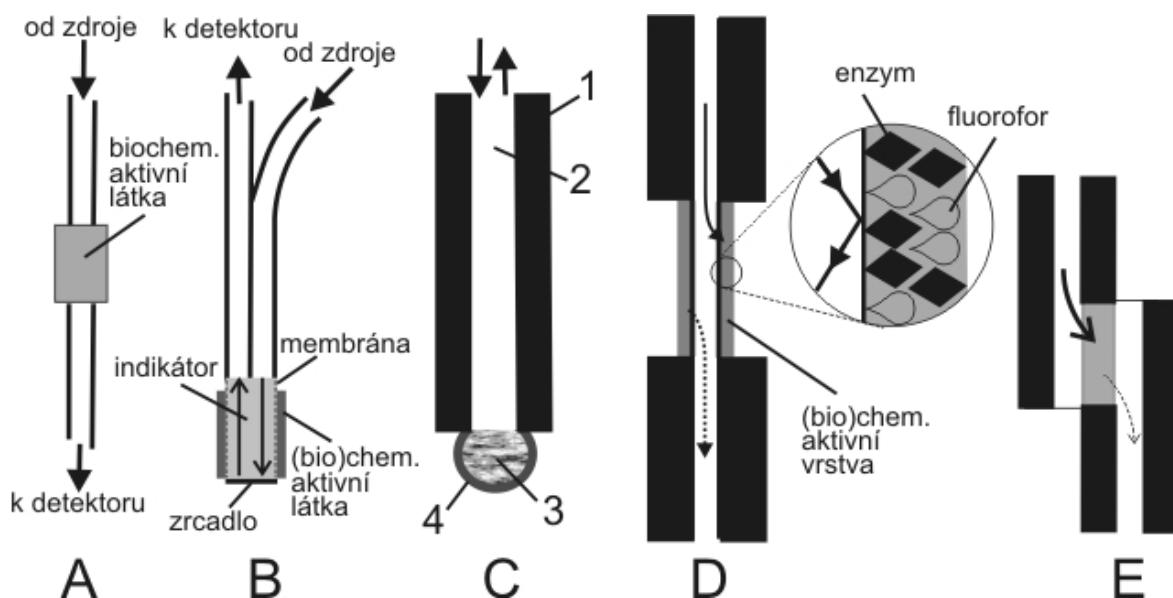


Biosensory na tomto principu lze použít i pro stanovení NPL, viz výše, a jiných organofosfátů, např. pesticidů. Stanovení je v tomto případě založené na inhibici enzymové aktivity acetylcholinestrázy vazbou s analytem.

Další často využívanou optickou metodou je **chemiluminiscence** či **bioluminiscence**. Analyt, např. Ag, je místo enzymem označen luminolem. Po imunochemické reakci s protilátkou imobilizovanou na světlovodném vlákně společně s oxidačním čimidlem (H_2O_2) a katalyzátorem (Cu^{2+}) se měří se intenzita záření emitovaného při reakci



(této reakce se používá i při detekci stop krve – hemoglobinu, při soudních analýzách). Podobně se využívá i jiných reakcí spojených s emisí záření, viz např. výše stanovení TNT. V těchto případech je v biosensoru použito jedno světlovodné vlákno podobně jako v příkladu biosensoru na Obr. 8.9C. Některé optické biosensory uvedených typů bývají nazývány optrody (či optody).



Obr. 8.9: Základní principy biosensorů s optickými vlákny

A, B – extrinské sensory přívodem a odvodem záření samostatnými vlákny;
 C – exintrický biosensor pro stanovení penicilinu s jedním vlákном pro přívod a odvod záření (1 – obal, 2 – jádro, 3 – porézní kulička s imobilizovaným fluoresceinem, 4 – film s imobilizovanou penicilinázou; při hydrolýze penicilinu se snižuje pH, což způsobuje změnu intenzity fluorescence fluoresceinu)
 D, E – intrinské biosensory

Při druhém způsobu využití optických vláken je část ochranného obalu vlákna odstraněna a na obnažené vlákno je nanesena biochemicky citlivá vrstva. Jde o tzv. **intrinsické sensory**, k detekci analytu dochází přímo na optickém vlákně. Vedení záření optickým vláknem je založeno na totálním odrazu záření na rozhraní dvou látek o různém indexu lomu (rozhraní jádro vlákna/optický izolátor). Při tom se však neodrazí záření zcela, část ho vystupuje z vlákna do určité vzdálenosti jako tzv. **evanescentní vlna**. Toto záření může interagovat s chemickým prostředím na povrchu optického vlákna a měnit své vlastnosti.

V biosensorech založených na měření změn **fluorescence** lze využít jedno vlákno pro přívod i odvod záření, Obr. 8.9D, protože budící a emitované záření se liší vlnovými délkami. Pokud by vstupní záření interferovalo se zářením ovlivněným biochemickou reakcí, lze využít varianty uspořádání vláken jako na Obr. 8.9E.

V imunochemických biosensorech je možno vznik komplexu **Ab-Ag** sledovat tak, jak bylo dosud v tomto textu diskutováno, tj. nepřímo přes enzymatickou reakci vyvolanou enzymem, jímž byl značen jeden z reakčních partnerů, nebo přes chemiluminiscenční značku. Intrinsicke optické sensory umožňují sledovat vznik tohoto komplexu přímo. Jeden z reakčních partnerů je imobilizován na povrchu vlákna (používány jsou i planární světlovodiče, tzv. *integrated optical sensors*, ISO), druhý je v roztoku. Vznik komplexu **Ab-Ag** je doprovázen změnou optických vlastností prostředí, jímž se evanescentní záření šíří, a tím dochází ke změnám jeho parametrů (intenzita, fázový posun). Ke snímání těchto změn je využívána řada specializovaných optických systémů, jako např. povrchová plasmonová rezonance (SPR), reflexní interferometrická spektroskopie (RIFS), totální vnitřní reflexní fluorescence (TIRF) a další.

8.4 Závěr

Problematika biosensorů chemických látek je velice rozsáhlá a do značné míry komplikovaná, protože jejich nejdůležitější komponentou je biologicky aktivní látka, která v sensoru pracuje mimo „své pracovní prostředí“, tj. mimo živý organismus. Na druhé straně biosensory umožňují stanovovat vysoce selektivně nízké koncentrace látek v komplikovaných matricích. Nacházejí uplatnění v mnoha oblastech např. v medicíně, potravinářství, ochraně životního prostředí, biotechnologiích, toxikologii atd. Kromě zde uvedených typů nejběžnějších převodníků se v biosensorech uplatňují i převodníky snímající změny teploty, převodníky založené na měření rozptylu světla a řada dalších. Pro další čtení a získávání informací o problematice biosensorů existuje řada zdrojů, ať již knižních, např. ^{6,7}, nebo časopiseckých, např. *Biosensors and Bioelectronics* (Elsevier). Nepřeberně informací lze nalézt na internetu, lze doporučit např. materiál na adresu ⁸.

Poděkování

Práce vznikla za podpory MŠMT ČR, výzkumný záměr MSM 0021620857.

Literatura

1. J. Barek a kol.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Pražské analytické centrum inovací. Praha 2006.
2. K. Štulík, J. Barek a kol.: *Senzory*. Pražské analytické centrum inovací. Praha 2007.
3. W. Göpel, J. Hese, J. N. Zemel, Edits, *Sensors. A Comprehensive Survey, Vol. 2 a 3*, VCH Publishers Inc., New York 1991.

4. J. Janata, A. Bezegh, Anal. Chem., 60 (1988) 62R.
5. M. A. Arnold, G. A. Rechnitz, *Biosensors based on plant and animal tissues*, v *Biosensors: Fundamentals and Applications*, (A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, Edits), Oxford University Press, Oxford 1987, kap. 3, str. 30-59.
6. B. R. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester 2002.
7. L. Gorton, Ed., *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Elsevier Science, 2005.
8. <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>

9. CHROMATOGRAFICKÉ METODY V LABORATOŘI KLINICKÉ BIOCHEMIE A KLINICKÉ FARMAKOLOGIE

RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.

*Onkologické centrum J. G. Mendela, Klinické laboratoře P&R Lab., s.r.o., Máchova 30,
741 01 Nový Jičín (www.pr-lab.cz)
akrylhydrazid@seznam.cz*

9.1 Úvod

Následující text má za cíl stručně přiblížit možnosti, které nabízejí chromatografické metody v klinické biochemii, klinické farmakologii a toxikologii. Přehled vychází především z našich vlastních zkušeností rutinní klinické laboratoře, a proto není úplný. Zásadní výhody a nevýhody chromatografických metod vzhledem k jiným analytickým metodám vhodným pro použití v rutinní laboratorní praxi budou objasněny na konkrétních případech srovnání dvou a více různých metod z naší praxe.

Zásadním úkolem klinické laboratoře je produkovat dostatečně správné a přesné výsledky v čase, který umožňuje indikujícímu lékaři včasný terapeutický zásah. Především tato kritéria by měla vést rozhodování odpovědných pracovníků při zavádění nových analytických metod. Klinická laboratoř je vystavena vysokým nárokům na plynulý, bezchybný, kapacitní a ekonomický chod, což vede přirozeně k požadavku na co největší automatizaci laboratorního provozu. Za takových okolností se řadě pracovníků rutinných klinických laboratoří mohou chromatografické metody jevit jako příliš ekonomicky, časově a personálně náročné. Tab. 9.1 shrnuje počty účastníků kontrolních cyklů DGKL (*Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laborsmedizin, e.V.*, Německo) u vybraných analytů za poslední tři roky a zastoupení HPLC mezi ostatními metodami. Je patrný jen mírný vzestup HPLC v oblasti tarapeutického monitorování léčiv, zajímavé je však výrazné rozšíření HPLC při stanovení % CDT oproti jiným technikám.

Tab. 9.1: Zastoupení HPLC v kontrolních cyklech DGKL

Analyt	2005			2006			2007		
	n_{total}	n_{HPLC}	podíl HPLC, %	n_{total}	n_{HPLC}	podíl HPLC, %	n_{total}	n_{HPLC}	podíl HPLC, %
Cyklosporin A	165	8	4,85	164	15	9,15	161	15	9,31
Karbamazepin	293	19	6,48	337	25	7,42	333	22	6,6
Fenytoin	19	239	7,95	274	26	9,49	263	23	8,75
Fenobarbital	203	21	10,3	228	30	13,16	219	30	13,7
Primidon	99	28	28,3	104	39	37,5	97	40	41,2
Teofylin	384	7	1,81	426	9	2,11	402	9	2,24
%CDT	121	12	9,92	134	36	27	132	39	29,5
HbA1c	692	241	34,83	685	236	34,45	680	225	33,1
homocystein	155	31	20	78	14	17,95	102	17	16,6

Důvody, které mohou vést laboratoř k rozhodnutí provádět méně konvenční stanovení za pomoci chromatografických metod oproti konvenčnějšímu a jednoduššímu, obvykle imunochemickému nebo enzymatickému komerčně dobře dostupnému stanovení některého z běžných analytů, mohou být následující: požadavek vyšší specifity (analýza metabolitů, strukturně podobných látek apod.), širší měřící rozsah, vyšší přesnost a citlivost nebo nedostupnost alternativní metody. Pro stanovení řady analytů jsou dnes chromatografické metody naprosto nezastupitelné a nemají vhodnou alternativu v jiných metodikách (např. katecholaminy a jejich metabolity, některá léčiva a vitamíny). Na konkrétních příkladech z naší praxe se budeme snažit zdokumentovat výhody, které nám přineslo zavedení vybraných chromatografických technik do rutinní praxe. Vhodnost použití chromatografických metod bude postupně probrána z několika aspektů, a to zejména z hlediska požadavků na specifitu, senzitivitu, pracovní rozsah a linearitu, některých ekonomických aspektů a z hlediska potřeb na odezvu laboratoře.

Následující stručný přehled (tab. 9.2) uvádí známé rozdělení chromatografických metod a jejich nejobvyklejší použití v klinické laboratorní praxi.

Tab. 9.2: Přehled chromatografických metod

Metoda	Použití	Poznámka
TLC	toxikologická kvalitativní analýza	orientační metoda
HPLC-UV, VIS, PDA	léčiva, vitamíny A, C, D, E, některé proteiny	univerzálnost použití, málo specifická detekce
HPLC-RF	porfyriny, vitamíny A, B, E, K, léčiva	velmi citlivá a specifická detekce
HPLC-ED	katecholaminy a jejich metabolity, serotonin	velmi citlivá a specifická detekce
GC-FID	těkavé látky	velmi citlivé, nespecifické
GC-MS	toxikologická kvalitativní a kvantitativní analýza, některé hormony, stopová analýza	univerzálnost použití, velmi citlivé a specifické
LC-MS, LC-MS-MS	léčiva, toxikologická kvalitativní a kvantitativní analýza, stopová analýza, screeningové metody metabolických poruch apod.	velmi rozsáhlá použitelnost, velká citlivost a specifita

9.2 Specifita

Požadavek dokonalé separace analytu je nepřímo úměrný specifitě detekce. Specifita detekce roste v řadě UV-VIS-spektrometrie < fluorimetrie < elektrochemická detekce < hmotnostní spektrometrie a ve stejně řadě klesá požadavek na účinnost separace analytu a rovněž klesá riziko interferencí při stanovení. Snižující se nároky na separaci pak rovněž zkracují dobu analýzy a často i zjednoduší přípravu vzorku. Při detekci UV-VIS-spektrometrií je výhodné použití PDA-detektorů, které umožňují měření na více vlnových délkách současně, případně rozbor celé oblasti spektra, a snižují tak riziko vlivu neočekávaných interferencí. Riziko potenciálních interferencí je obzvláště kritické u *in-house* vyvinutých metod, kdy může být obtížné ověřit potenciální interference s širokou škálou

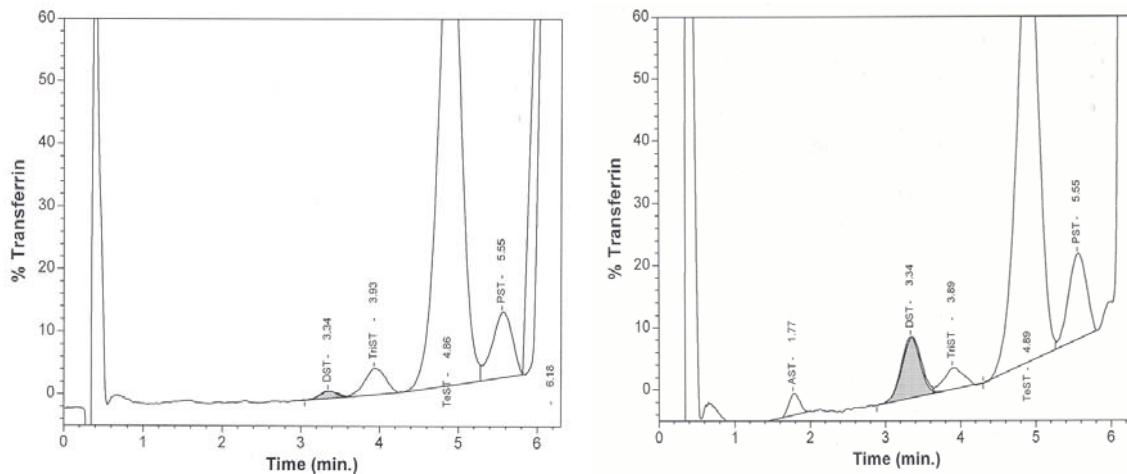
jiných láték, v souladu s doporučeními odborných společností je také nutné zahrnout do validačního programu mimo jiné ověření interfencí s hemoglobinem, triglyceridy a bilirubinem.

Na příkladu stanovení % CDT (*carbohydrate deficient transferrin*) bude předvedena vyšší specifita detekce metodou HPLC s VIS detekcí oproti metodě imunoturbidimetrické, které rovněž předchází jednoduchá manuální separace na iontoměniči.

Transferin je plazmatický glykoprotein ($m = 75$ až 80 kDa) syntetizovaný v játrech; polypeptidický řetězec obsahuje dva oligosacharidové řetězce zakončené kyselinou sialovou. Podle počtu vázaných sialových kyselin lze rozlišit isoformy transferinu asialo-, monosialo- až pentasialo-, nejhojněji zastoupená je tetrasialoforma. Vyšetření CDT je v kombinaci s dalšími (GMT, MCV) velmi dobrým markerem chronického abúzu alkoholu s vysokou dignostickou senzitivitou (muži 83 %, ženy 60 %) a specifitou (muži 97 %, ženy 88 %)^[1]. Při chronické konzumaci alkoholu dochází ke změnám v syntéze a metabolismu transferinu a vzniká podíl především disialo transferinu, méně často i mono- a asialo-forem.

Imunoturbidimetrické stanovení spočívá v inkubaci vzorku krevního séra s ionty Fe^{3+} , následné jednoduché separaci na iontoměniči a stanovení koncentrace transferinu imunoturbidimetricky. Podíl CDT se vypočítá z poměru koncentrací transferinu v eluátu a v původním vzorku séra. V případě většího podílu trisialoformy (např. u některých genetických variant nebo CDG syndromu) není separace dokonale účinná a stanovená hodnota je falešně pozitivní.

Při stanovení CDT metodou HPLC, které předchází rovněž nasycení vazebních míst transferinu ionty Fe^{3+} a následná selektivní precipitace interferujících proteinů, lze na chromatogramu rozlišit všechny isoformy transferinu a riziko možné falešné pozitivity téměř eliminovat. Obr. 9.1 ukazuje chromatogramy isoform transferinu normálního a patologického krevního séra.



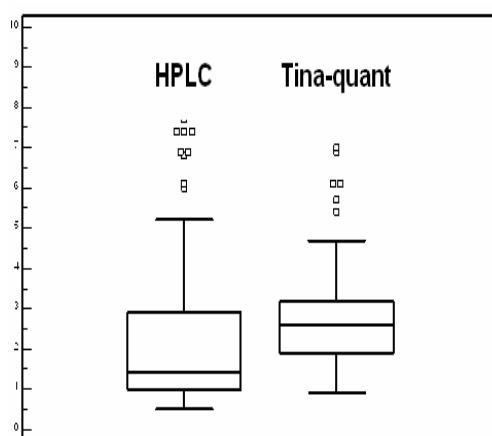
Obr. 9.1: *Chromatogram isoform transferinu v normálním krevním séru (A) a v patologickém krevním séru (B)*

Tabulka 9.3 uvádí vybrané analytické parametry obou srovnávaných metod, z nichž je patrná vyšší míra nejistoty měření u imunoturbidimetrické metody.

Tab. 9.3: Srovnání imunochemického a chromatografického stanovení transferinu

Metoda	Imunoturbidimetrie (Tina-quant, %CDT, Roche Dia-gnostics)	HPLC (Bio-Rad)	Imunoturbidimetrie (Tina-quant, %CDT, Roche Dia-gnostics)	HPLC (Bio-Rad)
Parametr v šarži kontrolního materiálu	Normální kontrola	Normální kontrola	Patologická kontrola	Patologická kontrola
CV (%)	11,86	2,73	9,21	4,45
BIAS (%)	4,29	2,31	3,42	3,51
TEa (%)	28,01	7,76	21,85	12,41

Na Obr. 9.2 je srovnání obou diskutovaných metod pomocí krabicového grafu ze sta paralelních měření, z nějž je jasné patrná výrazně vyšší hodnota mediánu u imunoturbidimetrické metody (2,88 % oproti 2,33 %), která je důsledkem nedokonalé separace disialo- a trisialo-forem transferinu při přípravě vzorku. Tabulka 9.4 ukazuje 8 případů falešně pozitivních nálezů imunoturbidimetrickou metodou a srovnání s hodnotou naměřenou HPLC metodou.



Obr. 9.2: Porovnání metod HPLC a Tina-QUART

Tab. 9.4: Porovnání výsledků imunoturbidimetrie a HPLC

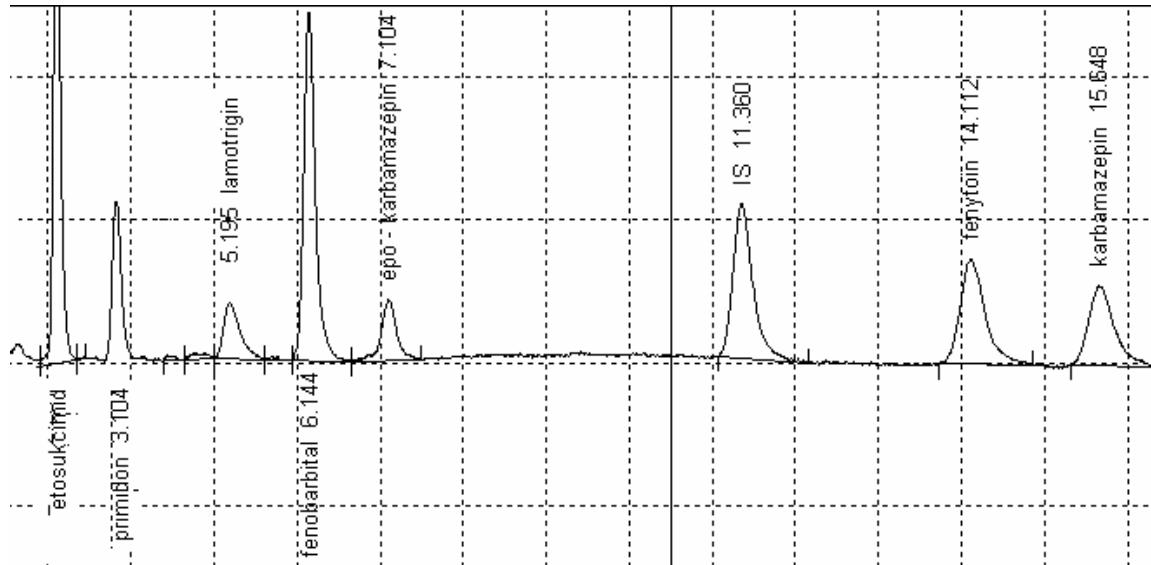
Vzorek	Imunoturbidimetrie (Tina-quant, % CDT, Roche Diagnostics)	HPLC (Bio-Rad)
1	4,0	1,61
2	4,2	2,15
3	3,1	1,26
4	3,9	0,81
5	3,6	2,37
6	3,2	1,71
7	2,9	0,49
8	3,1	1,99

Uvedený příklad srovnání HPLC a imunoturbidimetrické metody stanovení CDT dokumentuje výhodnost účinné separace v minimalizaci falešně pozitivních výsledků.

Dalším příkladem je naše využití HPLC s UV-detekcí pro stanovení šesti různých antiepileptik (ethosukcimid, primidon, fenobarbital, lamotrigin, fenytoin a karbamazepin), které dokumentuje výhodnost chromatografických metod pro možnou současnou analýzu některých metabolitů (viz Obr. 9.3). Současné stanovení primidonu a jeho metabolitu fenobarbitalu, resp. karbamazepinu a jeho metabolitu 9,10-epoxykarbamazepinu umožňuje snazší identifikaci pomalých nebo ultrarychlých metabolizátorů, případně jiných alterací metabolismu a odlišení takových fyziologických, resp. patofyziologických poměrů od non-compliance pacienta. Rovněž je tak možné snáze vysledovat vliv mezilékových interakcí na metabolismus takových léčiv (např. indukci nebo inhibici CyP450 při současném podávání jiných antiepileptik). Tabulka 9.5 ukazuje ovlivnění metabolického poměru epoxykarbamazepinu a karbamazepinu při monoterapii a polyterapii induktorem fenobarbitalem a fenytoinem^[4].

Tab. 9.5: Poměr epoxykarbamazepinu (9,10-epoxyCBZ) a karbamazepinu (CBZ) při monoterapii a polyterapii

Metoda léčby	Počet vzorků <i>n</i>	9,10-epoxyCBZ /CBZ
monoterapie	96	0,25 ± 0,01
polyterapie	37	0,40 ± 0,03



Obr. 9.3: Chromatogram šesti různých antiepileptik

Dostupné imunochemické metody stanovení karbamazepinu a fenobarbitalu pochopitelně nejsou natolik specifické, aby bylo možné provést analýzu metabolitů. Samozřejmou významnou výhodou zmiňované HPLC je možnost současného stanovení více různých léčiv, která jsou často podávána v kombinaci. Takto prováděná analýza zkvalitňuje terapeutické monitorování léčiv a dovoluje klinickému farmakologovi komplexnější hodnocení a individualizaci farmakoterapie.

Vysokou specifitu některých chromatografických metod je třeba brát v úvahu při přejímání nebo vytváření referenčních mezí. Příkladem může být srovnání referenčních mezí cyklosporinu A pro různé metody, které shrnuje tab. 9.6^[5]. Při stanovení relativně málo specifickými imunochemickými metodami poskytují metabolity cyklosporinu A, nejvýznamněji metabolity AM1, AM9 a AM4N, zkřížené reakce (viz tab. 9.7)^[3].

Tab. 9.6: Srovnání referenčních mezí pro cyklosporin A při různých metodách stanovení

Metoda stanovení	Iniciální dávka ($\mu\text{g l}^{-1}$) (ledviny)	Iniciální dávka ($\mu\text{g l}^{-1}$) (srdce)	Udržovací dávka ($\mu\text{g l}^{-1}$) (ledviny)	Udržovací dávka ($\mu\text{g l}^{-1}$) (srdce)
HPLC	150-225	250-325	100-150	125-175
FPIA	250-375	300-400	100-250	150-250
I-RIA	160-200	250-325	75-150	90-160
EMIT	125-200	275-375	75-150	150-250

Tab. 9.7: Zkřížené reakce metabolitů cyklosporinu A při imunochemickém stanovení

Metabolit	Metoda		
	AxSYM	TDx	Emit
AM1	4,4-6,4 %	9,1-11,8 %	-2,0-0,2 %
AM9	7,3-10,2 %	16,7-19,2 %	8,8-15,1 %
AM4N	1,4-2,9 %	4,9-5,7 %	0-4,8 %

Při srovnání HPLC-MS a FPIA (AxSYM) metod byla například zjištěna korelace^[2]

$$c(\text{CsA, FPIA}) = 1,111 \cdot c(\text{CsA, HPLC}) + 0,378 \quad (\mu\text{g l}^{-1})$$

Při optimalizaci terapie je tedy třeba brát v úvahu laboratorní metodiku stanovení, zároveň je obtížné srovnávání hodnot mezi laboratořemi.

9.3 Senzitivita

Na výše uvedeném příkladu stanovení cyklosporinu A zároveň můžeme doložit vysokou senzitivitu stanovení metodou HPLC-MS používanou na našem pracovišti, která umožňuje také terapeutické monitorování hladin cyklosporinu při nízkém dávkování při dlouhodobé terapii autoimunitních chorob. V tab. 9.8 jsou srovnány meze stanovitelnosti vybraných metod stanovení cyklosporinu A, z nichž je patrný vzestup senzitivity směrem k chromatografickým metodám.

Tab. 9.8: Meze stanovitelnosti cyklosporinu A různými metodami

Metoda	Dolní limit stanovitelnosti ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Syva Emit (Dade-Behring)	72
CEDIA CsA Assay (Roche)	25
HPLC-UV [6]	15
HPLC-MS [7]	5

9.4 Pracovní rozsah a linearita, metody kalibrace

Velkou výhodou chromatografických metod oproti imunochemickým je obvykle relativně široký lineární pracovní rozsah, tři až čtyri řady, a absence v imunochemii častých jevů zkreslujících výsledek (hook efekt apod.).

Nejvhodnější kalibrační metodou za předpokladu linearity v celém pracovním rozsahu je metoda **interního standardu**. V tab. 9.9 jsou porovnány vybrané analytické parametry metody HPLC-MS/MS při stanovení antiepileptika levetiracetamu, a to bez interního standardu a s ním. Z porovnání je zřejmá výhodnost použití interního standardu pro zvýšení přesnosti a správnosti metody, další výhoda spočívá v možnosti používat jen jednobodovou kalibraci. V případě složitější přípravy vzorku, jako je extrakce do kapaliny nebo extrakce na pevné fázi, je metoda interního standardu v podstatě nezastupitelná pro výrazné riziko interindividuálních rozdílů ve výtěžnosti extrakce. Kalibrační metoda **externího standardu** vyžaduje použití série kalibračních roztoků a je náchylnější k vlivu nestability měřicího systému, matricových vlivů a náhodných chyb při přípravě vzorku. Nejnáročnější je **metoda standardního přídavku**, která je vhodná pro speciální případy složitých matric nebo při podezření na interference.

Tab. 9.9: Porovnání metody HPLC-MS/MS bez interního standardu a s ním

Parametr	Kontrola 1 ($\mu = 8,87 \text{ mg l}^{-1}$), bez interního stan- dardu	Kontrola 1 ($\mu = 8,87 \text{ mg l}^{-1}$), s interním standar- dem	Kontrola 2 ($\mu = 53,2 \text{ mg l}^{-1}$), bez interního stan- dardu	Kontrola 2 ($\mu = 53,2 \text{ mg l}^{-1}$), s interním standar- dem
CV (%)	5,26	0,51	4,71	0,77
Bias (%)	10,64	3,04	1,69	1,38
Tea (%)	20,97	4,04	10,92	2,92

9.5 Ekonomické aspekty

Poměrně vysoké vstupní náklady na pořízení instrumentace pro HPLC vyžadují důkladnou rozvahu zaměřenou na optimální využití kapacity zařízení. Na příkladu porovnáváme v tab. 9.10 ekonomické náklady na spotřební materiál při stanovení antiepileptik během 200 pracovních dnů v naší laboratoři s hypotetickým prováděním totožných analýz s využitím imunochemických metod (pro výpočet byly použity průměry cen za jedno stanovení vycházející z dostupných ceníků výrobců *Da-de-Behring, Roche Diagnostics a Seradyne*).

Tab. 9.10: Porovnání nákladů na spotřební materiál při HPLC a imunochemických metodách
(ceny jsou uvedeny v relativních hodnotách)

Druh nákladu	HPLC	Imunochemie
Náklady na stanovení	682	1000
Náklady na kalibraci	114	88
Náklady na interní kontrolu kvality	227	328
Opotřebení kolony	25	0
Celkem	1048	1416
Celkem (%)	74	100

Jakkoliv nelze prezentovaná data zobecňovat, je pravděpodobné, že bychom podobných výsledků dosáhli i při jiných analogických srovnáních. Klíčovou otázkou tak zůstává využití kapacity chromatografu vzhledem k vysokým vstupním investicím a na druhé straně možnost začlenění řady analytů do automatizovaného rutinního systému.

Důležitou otázkou je také, zda se laboratoř rozhodne vyvinout analytickou metodu sama, nebo zda využije komerčně dostupné metody HPLC. Vstupní náklady při zavádění metod *in-house* jsou poněkud zvýšeny nutností plné validace takové metody, avšak provozní náklady budou pravděpodobně nižší než při komerčně dostupných metodách. Maximálně výhodné je však při zavádění metod *in-house* využít komerčně dostupné certifikované refrenční kalibrační a kontrolní materiály pro validaci i rutinní provoz. Problémem také může být absence nebo obtížná dostupnost materiálů pro externí kontrolu kvality (z naší praxe například uvádíme plazmatické katecholaminy a metanefriny, antiepileptika topiramát, levetiracetam a lamotrigin). V takovém případě je vhodné provádět minimálně mezilaboratorní porovnání. V hodnocení externí kontroly kvality také může být problémem nízký počet účastníků srovnávané skupiny.

9.6 Závěr

V uvedených případech z rutinní laboratorní praxe jsme se snažili nastínit základní výhody a nevýhody vybraných chromatografických metod a úskalí, která mohou nastat při jejich zavádění. Jak již bylo uvedeno, pro některé speciální analýzy jsou chromatografické metody nezastupitelné. Lze očekávat další prudký rozvoj, který přinese širší dostupnost jednodušších chromatografických metod vhodných pro automatizované laboratoře a na druhé straně vysoce specializované analýzy v oblasti proteomiky, farmakogenomiky a dalších.

Literatura

- [1] Moravcová E., Bednářík J., Dastych M., Novotná H., Pokora J.: *Čas. Lék. Čes.* 2004, 143, 39-43.
- [2] Gholamali K., Freuhwirt F.: *Clin. Chem. Acta* 2007, 380, 217-221.
- [3] Wallemacq P. E., Alexandre K.: *Clin. Chem.* 1999, 45(3), 432.
- [4] Tutor-Crespo M. J., Hermida J., Tutor J. C.:
- [5] Mařha V. a kol: *Cyklosporin A*, Grada 1994, Praha.
- [6] Lensmeyer G.L., Fields B.L.: *Ther. Drug Monit.* 1996, 18(3), 310-314.
- [7] Varian, Inc.: *Application Note 00297*.

10. SOUČASNÉ VYUŽITÍ ELEKTROFORÉZY V KLINICKÉ LABORATOŘI

Ing. Hana Benáková

Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a I. LF UK v Praze

benakova@vfn.cz

10.1 Úvod

Počátky elektroforézy spadají do první poloviny 19. století, kdy ruský fyzik Ferdinand Fridrich Reuss poprvé popsal elektrokinetický pohyb koloidů. V experimentu umístil vertikálně dvě trubice naplněné jílem a vodou do písku, do nich ponoril elektrodu a propojil baterií. Po zapnutí pozoroval, že čirá voda u anody se stala mléčnou (výsledek migrace negativně nabitých částic jemného koloidního jílu), u katody byla voda čirá a zvětšila svůj objem. V tomto experimentu byly pozorovány dva elektrokinetické jevy – elektroforéza a elektroendoosmóza (přenos vody přes porézní membránu v elektrickém poli)¹.

Za zakladatele moderní elektroforézy je obecně považován Arne Tiselius, který se zabýval elektroforézou sérových bílkovin v kyvetě v prostředí volného elektrolytu – tzv. volná elektroforéza, která nepoužívá pevný nosič. Bílkovinné frakce se dělily a vytvářely pruhy s pohyblivým ostrým rozhraním, pohyb frakcí byl sledován refraktometricky. V roce 1937 König použil k elektroforetické izolaci žlutého pigmentu hadího jedu jako média pro elektroforézu proužky papíru saturované elektrolytem. V roce 1950 byla popsána separace bílkovin elektroforézou na papíře. V klinických laboratořích se v současné době převážně používá elektroforéza na pevných nosičích.

10.2 Princip elektroforézy

Elektroforetické metody se používají k dělení látek, které nesou elektrický náboj. Částice migrují na tenké podložce v pufrovaném elektrolytu vlivem vloženého elektrického pole a vytvářejí potenciálový gradient. Dělení se realizuje výlučně v kapalné fázi a převážně ve vodném prostředí. Platí zde následující vztahy:

$$F_1 = zeE = QE$$

kde z je nábojové číslo iontu, Q je náboj částice, E je intenzita stejnosměrného elektrického pole (rozměr V cm^{-1}). F_1 je síla, která uvede ion do pohybu. Jeho pohyb je naopak brzděn odporem prostředí F_2 :

$$F_2 = -6\pi\eta rv = -kv$$

kde η je viskozita, r poloměr iontu, k je konstanta a v je rychlosť. Za ustáleného stavu jsou obě síly v rovnováze a pro rychlosť pak platí:

$$v = \frac{Q}{k} E = uE$$

kde u je pohyblivost částice (rozměr $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$). Pohyblivost je dána rozměrem, tvarem, nábojem částice a teplotou roztoku. K separaci v elektrickém poli dochází na základě rozdílu v pohyblivosti častic. Z rovnice vyplývají dva možné způsoby dělení iontů s rozdílnou pohyblivostí:

- separovat částice na základě jejich rozdílné pohyblivosti v konstantním elektrickém poli ($E = \text{konst}$) – elektroforéza,
- separovat částice při konstantní rychlosti častic ($v = \text{konst}$), která bude dosahována při rozdílných hodnotách E pro různé částice – izotachoforéza².

Systém pro elektroforézu se skládá ze dvou elektrod (katoda a anoda), které jsou spojeny vodivým elektrolytem. Nejčastěji se používá tlumivý roztok (pufr), jehož úkolem je udržovat konstantní pH v průběhu dělení (výjimku tvoří izoelektrická fokusace) a zprostředkovávat přenos elektrického proudu. Částice se dělí podle rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli; ta závisí na velikosti molekuly, pH prostředí, velikosti náboje, na iontové síle tlumivého roztoku, na vlastnostech nosiče a tvaru dělených častic. Volba tlumivého roztoku závisí na charakteru separované látky, většinou se volí pufry o iontové síle 0,05 až 0,1 mol l⁻¹.

Látky amfoterní povahy (např. aminokyseliny, peptidy, bílkoviny) nesou různý elektrický náboj podle pH prostředí, ve kterém se pohybují. V kyselém prostředí se chovají jako zásady, výsledný náboj je kladný a v elektrickém poli se pohybují ke katodě. V alkalickém prostředí se chovají jako kyseliny, mají záporný náboj a pohybují se směrem k anodě. Při určitém pH mají stejný počet kyselých a zásaditých skupin, molekula se navenek jeví jako elektroneutrální a mluvíme o izoelektrickém bodu látky (pI).

Elektroforézu můžeme rozdělit podle použitého pevného nosiče na elektroforézu na papíře, na acetylcelulosových fóliích, na agarovém a agarosovém gelu, agarosovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS), na škrobovém gelu, polyakrylamidovém gelu (PAAG), na SDS-elektroforézu na polyakrylamidovém gelu. Podle způsobu provedení můžeme rozdělit elektroforézu na jednorozměrnou, dvojrozměrnou, kontinuální, na elektroforézu na tenké vrstvě, v trubičkách apod. Elektroforézu lze přitom kombinovat s imunochemickými metodami využívajícími imunologických vlastností separovaných látek (imunoelektroforéza, imunofixace, imunoblotting, imunofluorescenční elektroforéza, imunoselekce, protisměrná imunoelektroforéza a další). Elektroforéza může být také jedním z kroků analýzy nukleových kyselin pomocí PCR, kde se elektroforéza užívá k oddělení frakcí a následné barvení k identifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny.

V klinické biochemii se elektroforéza používá hlavně pro analýzu bílkovin v tělních tekutinách (např. v séru, moči a mozkomíšním moku). Pro rutinní analýzu se nejčastěji používá elektroforéza na agarovém nebo agarosovém gelu a acetylcelulosových fóliích. Pro analýzu bílkovin se používají automatické systémy, které stanovení urychlily, sjednotily a v podstatě standardizovaly.

10.3 Elektroforetické metody v klinické biochemii

10.3.1 Elektroforéza na acetylcelulosových fóliích

Většinou se používají komerční acetylcelulosové fólie. Jsou homogenní a mají relativně stejnou velikost častic. Převládá zde dělení podle velikosti elektrického náboje. Fólie se položí na hladinu pufru, po rovnoměrném zvlhčení se nadbytek pufru odsaje mezi dvěma filtračními papíry. Po aplikaci vzorku se fólie upěvní do rámečku a vloží do elektroforetické komory.

K nanesení vzorku se používá speciální aplikátor. Vzorky séra se nakapou na speciální destičku z PVC, jejíž nesmáčivý povrch udržuje požadovaný tvar kapek, každou kapkou se lehce potáhne aplikátor a kapka vzorku se nanese na fólii.

Pro elektroforézu bílkovin se obecně používá pufr o $\text{pH} > 8,0$. Při $\text{pH} = 8,8$ má albumin $\text{pI} = 4,7$ a γ -globulin $\text{pI} = 7,2$. Albumin má v závislosti na náboji 2,6krát větší pohyblivost než γ -globulin. Pohyblivost dělených bílkovin velmi výrazně ovlivňuje iontová síla. Při vyšší iontové síle je pohyblivost dělených frakcí snížená, dělené zóny jsou však ostřejší, při nižší iontové síle je rychlosť zvýšená, frakce jsou difuzní. Pohyblivost se zvyšuje s teplotou, při teplotách vyšších než 50°C však dochází k denaturaci bílkovin. Sérové bílkoviny se na acetylcelulose dělí na 5 až 6 frakcí. Dělení obvykle probíhá při napětí 10 až 30 V cm^{-1} a při intenzitě proudu 0,3 až 0,5 mA cm^{-1} . Doporučná iontová síla tlumivého roztoku je v rozmezí 0,01 až 0,1 mol l^{-1} , doba dělení se pohybuje mezi 15 až 30 minutami. Delší dělící čas zvyšuje možnost výskytu artefaktů – např. spontánní zařízání, pohyb pufru, volná difuze. Po ukončení se bílkoviny fixují trichloroctovou kyselinou o koncentraci 30 g l^{-1} nebo octovou kyselinou.

Barvení elektroforeogramů: Bílkoviny se barví Ponceau S (červeně), Coomasie blue G 250 (modře), amidočerní 10 B (modře), lipoproteiny se barví sudanovou černí (modročerveně), nigrosinem (černě) apod. Pro bílkoviny v mozkomíšním moku je nutné použít vysoko citlivé barvení koloidním roztokem stříbra nebo zlata. Odbarvení pozadí se provádí většinou octovou kyselinou o koncentraci 20 g l^{-1} nebo metanoloctovou směsí. Fólie se po odbarvení pozadí zprůsvitní ponořením do směsi metanolu a ledové octové kyseliny nebo do cyklohexanolu a vysuší. Vyhodnocení fólií s obarvenými frakcemi se provádí denzitometricky. Fólie lze dlouhodobě archivovat.

Využití v klinické biochemii: Elektroforézy sérových bílkovin (složení sérových bílkovin viz tab. 10.1) se používá k průkazu přítomnosti M-gradientu, tj. paraproteinu (atypická linie, úzký pruh v oblasti β_2 -globulinů až γ -globulinů) u monoklonálních gamapatí, k průkazu polyklonalní hypergamaglobulinémie, která je charakteristická pro normální odpověď organismu na antigenní stimulaci nebo pro chronická zánětlivá onemocnění. Dále se elektroforéza sérových bílkovin používá k důkazu oligoklonální hypergamaglobulinémie, která je detegovaná v séru nemocných jaterní cirhózou¹ (blíže viz tab. 10.2.).

Tab. 10.1: Elektroforéza séra – složení jednotlivých frakcí

+ anoda ← → katoda –					
albumin	α_1 -globuliny	α_2 -globuliny	β -globuliny	β - γ -globulin	γ -globuliny
albumin	α_1 -antiprypsin α_1 -lipoprotein α_1 -kyselý glykoprotein	α_2 -makroglobulin α_2 -lipoprotein haptoglobin ceruloplasmin erythropoetin protrombin cholinesteráza	β -lipoprotein transferin plazminogen komplement hemopexin	fibrinogen	IgA IgD IgE IgG IgM

Tab. 10.2: Některé příklady klinického významu elektroforézy bílkovin séra

Onemocnění	Algumin	α_1 -globuliny	α_2 -globuliny	β -globuliny	γ -globuliny
polyklonální gamapatie	↓	N	N	N	↑
monoklonální gamapatie	↓	N		N N N nebo ↓ nebo přítomnost monoklonálního píku	
zánětlivá onemocnění akutní	N nebo ↓	↑		N	N
zánětlivá onemocnění chronická	N nebo ↓	↑	N nebo ↑	N nebo ↓	↑
horečka	↓	N nebo ↑	N nebo ↓	N nebo ↓	N nebo ↓
malnutrice	↓	N nebo ↑	N nebo ↑	N nebo ↑	N nebo ↑
nefrotický syndrom	↓	N nebo ↑	↑	N nebo ↓	↓

N = negativní

Výhodou metody je rychlosť provedení a možnosť automatizace celého procesu. **Nevýhodou** je menší citlivosť průkazu M-gradientu.

10.3.2 Elektroforéza na agarovém a agarosovém gelu

Agar je směs agarosy a agaropektinu, které jsou obsaženy v mořských řasách. Je to pórénzni nosič, který umožňuje elektroforetickou migraci a imunodifúzi vysokomolekulárních látok do relativní molekulové hmotnosti 6 000 000. Přítomnost sulfátových a karboxylových skupin způsobuje silnou elektroendoosmózu, která vyvolává tok pufu směrem ke katodě a tím snižuje pohyblivost částic k anodě. V některých případech může dojít k zpětnému pohybu. Imunoglobuliny (gamaglobuliny) se proto pohybují ke katodě na rozdíl od ostatních bílkovin, které při pH = 8,6 působí opačným směrem³.

Agarosa je neutrální polysacharid, který se připravuje z agaru po odstranění agaropektinu. Na přípravu gelové plotny se používá 1 až 2 g agaru nebo agarosy ve 100 ml pufu, směs se po krátkém prováření za horka nalévá na skleněné desky. Gel je možné za horka konzervovat azidem sodným. V současné době se používají komerčně dostupné soupravy. Doba dělení a intenzita proudu je závislá na velikosti gelové plotny a pracovních podmíinkách (většinou 20 minut až 3 hodiny, při potenciálovém spádu 10 až 20 V cm⁻¹). Dělíme-li při vyšším napětí, je nutné zajistit chlazení aparatury.

K barvení se pro sérové bílkoviny používá amidočerň 10 B, pro lipoproteiny sudanová čerň, pro izoenzymy alkalické fosfatasy – substrát pro ALP (idolylfosfát-MgCl₂-NTB).

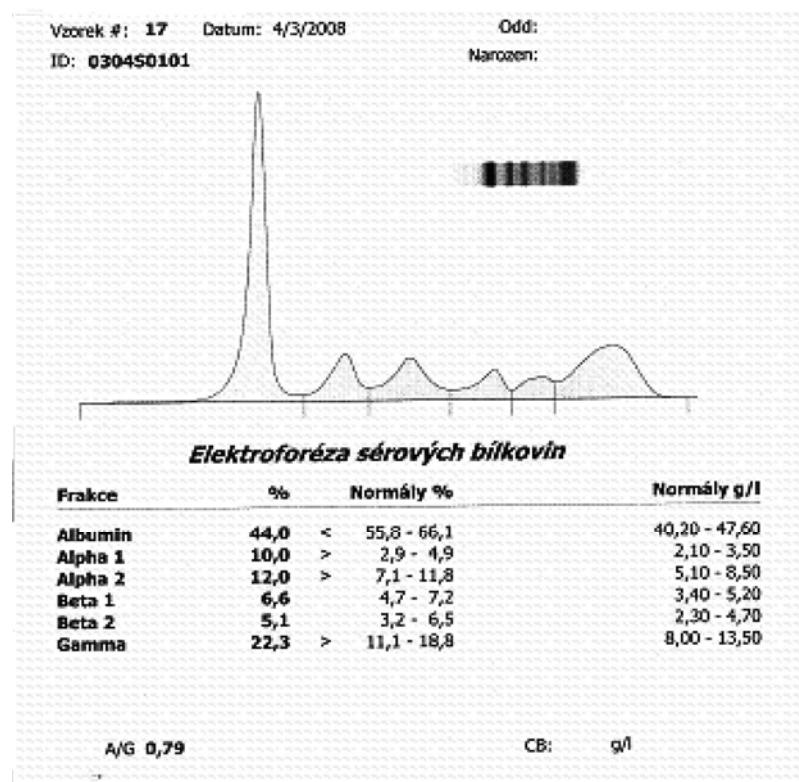
Využití v klinické biochemii: Elektroforéza sérových bílkovin (blíže viz elektroforéza na acetylcelulose), stanovení kostního izoenzymu alkalické fosfatasy (zvýšení hodnoty po prodělaném maligním onemocnění může signalizovat kostní metastázy), kvantifikace jaterní frakce alkalické fosfatasy u dětských pacientů při diagnostice jaterních onemocnění, kdy hodnoty aktivity celkové alkalické fosfatasy mohou být zvýšeny kostní frakcí v průběhu růstu. Stanovení frakcí lipoproteinů je rychlou a levnou metodikou pro odhalení základních poruch lipidového metabolismu a k detekci aterogenního lipoproteinu Lp(a).

Výhodou je rychlé provedení a možnosť automatizace celého procesu.

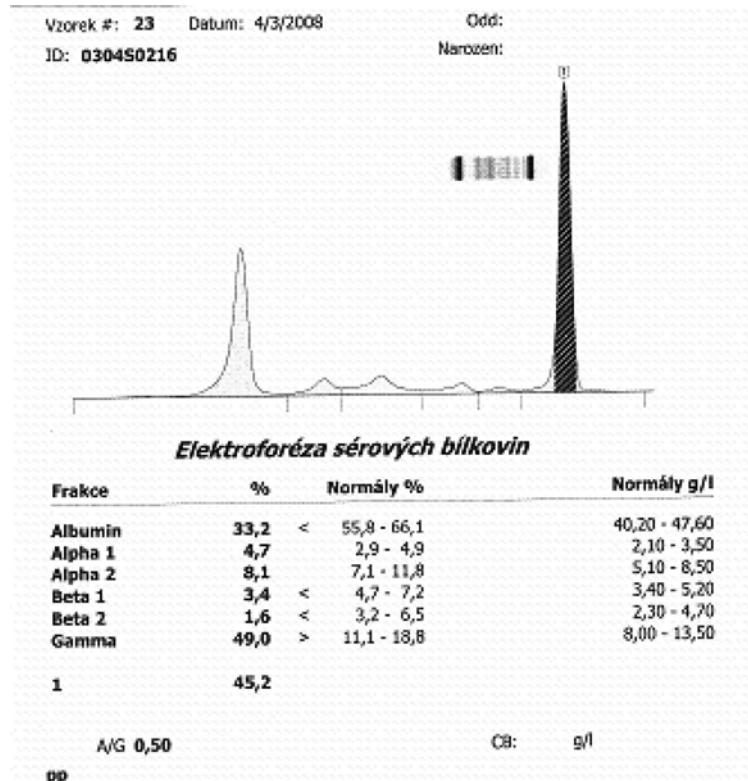
10.3.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je založena na elektromigraci (pohybu látek v elektrickém poli), látky se dělí v pufrovém systému v otevřené křemenné kapiláře o délce 10 až 75 cm, o vnitřním průměru 10 až 100 μm , při napětí 7 až 60 kV. Tato technika se také nazývá HPCE (*High Performance Capillary Electrophoresis*). Používají se pufry borátové, fosfátové, MES, TRIS a další, většinou o koncentraci 0,05 až 0,5 mmol l^{-1} s přídavkem dalších aditiv typu povrchově aktivních organických, komplexotvorných a anorganických látek. Pro detekci se používají detektory typu UV-VIS (citlivost 10^{-5} až 10^{-8} mol l^{-1}), ampérometrická detekce (citlivost 10^{-11} mol l^{-1}) a laserem indukovaná fluorescence (citlivost 10^{-14} až 10^{-16} mol l^{-1}). Bílkoviny se dělí podle iontové pohyblivosti s využitím elektroosmotického toku, který lze vysvětlit následujícím způsobem: vnitřní povrch křemenné kapiláry, která je naplněná vodným elektrolytem, obsahuje zčásti disociované silanové skupiny $-\text{Si}-\text{OH}$ s pK_a cca 6,2. Záporný náboj na vnitřní straně kapiláry je kompenzován kationty pufru a vzniká Sternova elektrická dvojvrstva. Při vložení elektrického pole se kationty začnou pohybovat a v důsledku své hydratace způsobují posun celého elektrolytu a tak vytvářejí mohutný elektroosmotický tok, který unáší ke katodě všechny přítomné látky⁴. Pro dělení bílkovin krevního séra se používá alkalický pufr o pH = 9,9, napětí 7,7 kV a teplotě 35 °C. Dělení probíhá od anody směrem ke katodě a na katodickém konci kapiláry jsou frakce kvantifikovány přímým měřením absorbance při 200 nm.

Využití v klinické biochemii: Elektroforéza sérových bílkovin (záznam vyhodnocení elektroforézy bílkovin lidského séra viz Obr. 10.1. a 10.2.), diagnostika metabolických poruch, analýza nukleových kyselin a peptidů. V současné době se kapilární elektroforézy využívají spíše pro výzkumné účely, rutinní aplikace jsou doménou velkých laboratoří.



Obr. 10.1: Nález bez M-gradientu (paraproteinu)



Obr. 10.2: M-gradient v oblasti γ -globulinů

10.3.4 Elektroforéza bílkovin v moči na fóliích s agarosovým gellem v přítomnosti SDS

Ke vzorkům moči se přidá dodecylsulfát sodný (SDS). Na agarosový gel se nanese vzorek moči, spojení fólie s pufrem se provede pomocí můstků z filtračního papíru, po ukončení dělení a sušení se fólie barví Coomasie blue, bílkoviny se barví modrofialově, pozadí se odbarví octovou kyselinou. V alkalickém pufru se bílkovina dělí směrem k anodě. Největší pohyblivost má mikroglobulin, albumin leží přibližně uprostřed, blíže ke startu (ke katodě) se nacházejí ostatní bílkoviny. Dělení probíhá 60 minut při 60 V. V prostředí SDS mají všechny bílkoviny téměř stejný elektrický náboj a bílkoviny se dělají podle velikosti svých molekul.

Využití v klinické biochemii: Podrobnější dělení bílkovin v tělních tekutinách s nízkou koncentrací bílkovin (např. moč, mozkomíšní mok). Výsledek elektroforézy bílkovin v moči je významný ukazatel poškození ledvin. Spolu se stanovením celkové bílkoviny v moči umožňuje identifikovat poškození tubulů, glomerulů, případně určit jejich rozsah, umožňuje rozlišit tubulární proteinurii, glomerulární proteinurii (selektivní, neselektivní) a smíšené proteinurie:

- **fyziologická proteinurie:** celková bílkovina v moči do 120 mg za 24 hodin. Na gelu je viditelná stopa albuminu;
- **glomerulární proteinurie:** celková bílkovina v moči $> 1 \text{ g l}^{-1}$, rozlišujeme:
 - selektivní glomerulární proteinurii: přítomnost albuminu, transferinu a stop IgG, popř. IgA,
 - neselektivní glomerulární proteinurii, vyznačující se vyloučováním proteinů s M_r vyšší než 70 000 (vyjma obrovských molekul IgM, α_2 -makroglobulinu) do moče,
 - částečně selektivní glomerulární proteinurii, která se nalézá mezi výše uvedenými;

- **tubulární proteinurie:** celková bílkovina v moči $< 1 \text{ g l}^{-1}$; je způsobena defektem v proximálním tubulu, v moči jsou nalézány tyto bílkoviny β_2 -mikroglobulin, lysozym, RBT (retinol binding protein), α_1 -mikroprotein, volné lehké řetězce, dimer volných lehkých řetězců, albumin (obvykle v koncentracích menších než 25 % celkové bílkoviny v moči); objevuje se při infekcích, metabolické kongenitální cystinóze i při léčbě některými medikamenty;
- **smíšená proteinurie:** jedná se o průchod tubulárních i glomerulárních proteinů do moče a objevuje se u tubulární nekrózy, pyelonefritidy a trombózy renálních cév⁵.

Výhody: Moč se nemusí předem zahušťovat, metodu lze automatizovat.

10.3.5 Elektroforéza na škrobovém gelu

Škrob se částečně hydrolyzuje v kyselém prostředí, rozvaří se v pufru, nalije do formy a nechá ztuhnout. Částečně hydrolyzovaný škrob po nabobtnání vytváří trojrozměrnou polymerní síť, bílkoviny se proto dělí nejen podle elektrického náboje, ale i podle relativní molekulové hmotnosti. Bílkovina s menší relativní molekulovou hmotností putuje ve škrobovém gelu rychleji. Dělení probíhá 5 až 13 hodin při potenciálovém spádu cca 6 V cm⁻¹.

Využití v klinické biochemii: Elektroforézu na škrobovém gelu je možné použít pro rozlišení geneticky podmíněných typů haptoglobinů (určování rodičovství v soudním lékařství), dělení patologických hemoglobinů a k dělení tkáňových bílkovin.

Výhodou je to, že sérové bílkoviny se na škrobovém gelu dělí na 15 až 30 frakcí a **nevýhodou** je, že metoda je velmi pracná a je obtížné zajistit standardní podmínky analýzy.

10.3.6 Imunoelektroforéza

Imunoelektroforéza je metoda, při které jsou bílkoviny charakterizovány podle elektroforetické pohyblivosti v gelu a podle imunologických vlastností. Imunoelektroforézu dělíme na klasickou elektroforézu podle Grabara a Williamse, dvojrozměrnou kvantitativní elektroforézu podle Clarka a Freemena a rocket imunoelektroforézu (raketky) podle Laurella.

Klasická imunoelektroforéza (Grabar a Williams) kombinuje dvě techniky: elektroforézu v agarovém nebo agarosovém gelu a dvojitou difúzi v gelu. Po elektroforetickém rozdelení bílkovin se podélné kanálky v gelu naplní polyvalentním antisérem obsahujícím protilátky proti více bílkovinám nebo monovalentním antisérem proti jednotlivým bílkovinám. Protilátky a elektroforeticky rozdelené bílkoviny difundují proti sobě a v místě styku vytvoří precipitační linie. Aby byly precipitační linie kvalitní, je nutné, aby antigen a protilátka spolu reagovaly v ekvivalentním poměru. Precipitace probíhá ve vlhké komůrce do druhého dne. Po vymytí nezreagovaných bílkovin fyziologickým roztokem a vysušení se bílkoviny barví amidočerní 10 B. Detekce je vizuální.

Využití v klinické biochemii: K důkazu vrozeného deficitu některých bílkovinných frakcí, k průkazu plazmatických bílkovin v jiných tělních tekutinách (extrakt ze stolice, moč, mozkomíšní mok apod.). Imunoelektroforéza pomáhá v rozlišení monoklonálních gamapatie od polyklonální gamapatie, protože paraproteiny typicky deformují precipitační linie.

Nevýhody: Metoda je časově náročná, klade značné nároky na zkušenosť pracovníka, který imunoelektroforézu hodnotí. Při vysokých koncentracích polyklonálních imunoglobulinů (hlavně IgG) dochází „umbrella“ efektu, kdy vysoká koncentrace IgG ztěžuje identifikaci relativně

malých koncentrací paraproteinů. V současnosti se v rutinní klinické laboratoři více využívá imunofixace.

10.3.7 Imunofixace

Princip je stejný jako u imunoelektroforézy. Antisérum je aplikováno přímo na elektroforeogram a reakce mezi antisérem a protilátkou proběhne během několika minut. Proces lze rozdělit na dvě části:

- a) elektroforéza na acetylcelulose nebo na agarovém či agarosovém gelu;
- b) fixační část – aplikace protilátky.

Ve fixační části se na povrch fólie s rozdelenými protilátkami položí proužek filtračního papíru nasycený zvolenými monovalentními antiséry, která difundují z proužků do folie s rozdelenými bílkovinami. Nejčastěji se používají antiséra proti IgA, IgG, IgM, příp. IGD, BJ-kappa, BJ-lambda. Metoda je více než desetkrát citlivější než imunoelektroforéza, umožňuje identifikaci paraproteinu v koncentracích $< 25 \text{ g l}^{-1}$. Detekce je vizuální.

Využití v klinické biochemii: Detekce a typizace monoklonálních gamapatií. Používá se pro vzorky krevního séra a pro vzorky zahuštěné moče.

Výhody: citlivá, přesná a spolehlivá diagnostika monoklonálních imunoglobulinů; vysoká kvalita antisér vylučuje falešně pozitivní reakce; není přítomen „umbrella“ efekt.

10.3.8 Protisměrná imunoelektroforéza imunoelektroforéza

Probíhá v agarovém gelu, který je rozpuštěn v pufu o pH = 8,6 a aplikován na skleněnou plotnu. V gelu se vyřežou dvě řady jamek – do řady blíže ke katodě se aplikují vzorky séra (antigen), do jamek blíže k anodě se nanese protilátka proti určované bílkovině. Při elektroforéze putuje antigen k anodě, protilátka se působením elektroendoosmózy pohybují v elektrickém poli ke katodě, v místě setkání antigenu a protilátky se vytvoří precipitační linie.

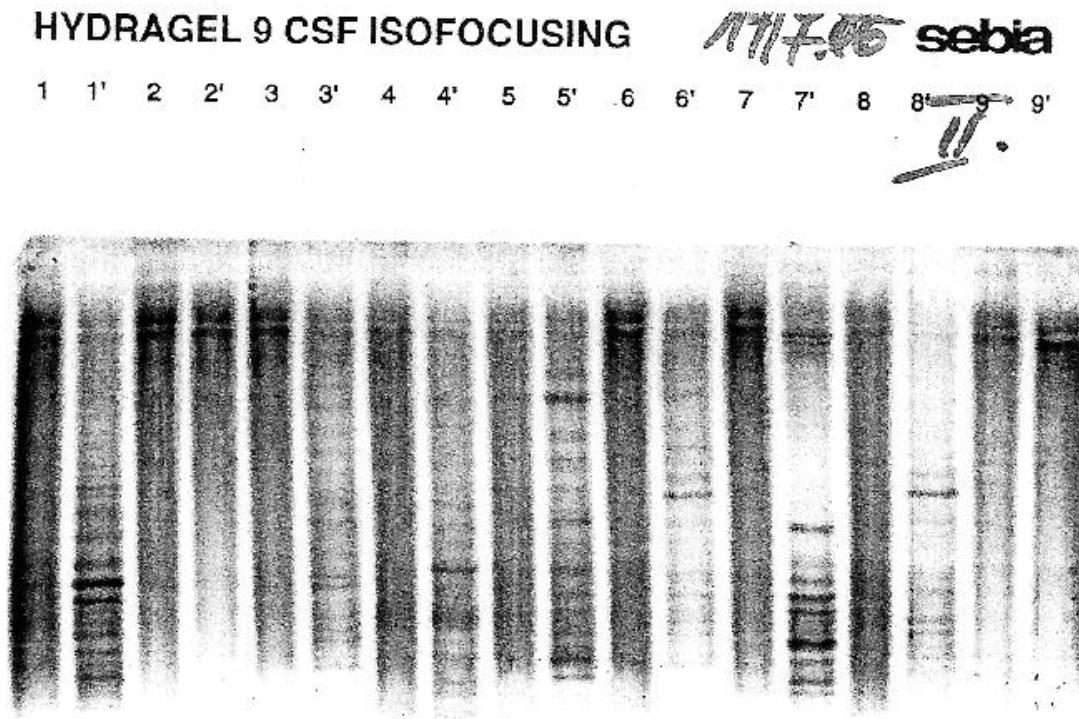
Využití v klinické biochemii: Důkaz přítomnosti např. α_1 -fetoproteinu, lipoproteinu 10.

Výhody: možnost současného vyšetření většího počtu vzorků, rychlé odečtení pozitivních výsledků.

10.3.9 Izoelektrická fokusace

Touto metodou se látka dělí podle hodnoty svého izoelektrického bodu. Dělení neprobíhá při konstantním pH, nýbrž v gradientu pH, jehož je dosaženo pomocí speciálního elektrolytu Ampholine. Elektrolyt se skládá z řady organických látek, které obsahují skupiny $-\text{OH}_2$ a $-\text{COOH}$. Tyto skupiny se ve stejnosměrném elektrickém poli seřadí podle hodnoty svého izoelektrického bodu a vytvoří tak gradient pH. U anody je pH nejnižší a směrem ke katodě roste. Při izoelektrické fokusaci je nosičem agarový nebo palyakrylamidový gel. Používají se dva tlumivé roztoky, katoda je v kontaktu s alkalickým pufrem (obvykle NaOH o koncentraci 1 mol l^{-1}), anoda s kyselým pufrem (např. H_3PO_4 o koncentraci 1 mol l^{-1}). Po rozdělení se frakce fixují (v případě bílkovin směsí trichlorocitové a sulfosalicylové kyseliny), nadbytečné fixační činidlo se vymyje směsí etanolu a octové kyseliny. Bílkoviny se obvykle barví Coomasiie blue. Vyhodnocení se provádí denzitometricky, refraktometricky nebo vizuálně⁶.

Využití v klinické biochemii: Izoelektrická fokusace s následným imunoblottem a specifickou detekcí imunoglobulinů je nejvalidnější metodou pro průkaz oligoklonálních protilátek IgG s diagnostickou specificitou 97 až 98 % a senzitivitou 93 % pro roztroušenou sklerózu (viz Obr. 10.3). Metodu lze použít i pro analýzu bílkovin ve tkáních a jiných tělních tekutinách, pro zkoumání vzácných variant hemoglobinu a k typizaci genetických variant haptoglobinu. Méně často se používá k dělení izoenzymů (AMS, ALP, CK, LD).



Obr. 10.3: Elektroforeogram mozkomišního moku a lidského séra

Vzorek č. 2 (sérum)-2' (CSF), 9-9' normální nález. 1', 3', 4', 5', 6', 7' a 8' oligoklonální proužky v CSF

10.3.10 Kombinace izoelektrické fokusace a SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu

Celý proces se skládá ze dvou fází: nejprve se látky rozdělí podle izoelektrického bodu, ve druhé fázi se provede v kolmém směru na první fázi elektroforéza na polyakryramidovém gelu s přídavkem SDS. Ve druhé fázi se látky dělí podle velikosti molekuly a relativní molekulové hmotnosti.

Využití v klinické biochemii: Metodu využíváme k podrobnějším analýzám bílkovin, v případě použití gelových ploten se poobarvení získávají tzv. „proteinové mapy“. Vlastní využití se provádí pomocí speciálního softwaru. Metoda se využívá hlavně pro výzkumné účely.

10.4 Závěr

Elektroforetické metody nabízejí velmi širokou paletu modifikací, zahrnující jak jednoduché, avšak diagnosticky velmi přínosné rutinní aplikace, tak i metody k řešení velmi specifických analytických

problémů v klinické biochemii, klinické imunologii, v lékařské genetice a samozřejmě i v dalších nelékařských oborech.

Literatura

1. Tichý, M: Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů (paraproteinů), A.L. Instruments s.r.o., Český Těšín, 1997.
2. Čúta, F. *et al*: Instrumentální analýza, SNTL, Praha, 1986.
3. Doležalová, V. *et al*: Laboratorní technika v klinické toxikologii, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 1995.
4. Chromý, V. *et al*: Bioanalytika, Analytická chemie v laboratorní medicíně, Masarykova univerzita, Brno, 2002.
5. Zima, T. *et al*: Laboratorní diagnostika, Galén, Karolinum, Praha, 2. vyd. 2007.
6. Soubor návodů Sebia, firemní tisk, A.L. Instruments s.r.o., Český Těšín, rok neuveden.

11. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie
ijelinek@natur.cuni.cz

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladně nebo záporně nabité ionty. Při vhodné interpretaci výsledků měření má metoda velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek. Těžištěm analytického využití hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury.

Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami (zejména plynovou a kapalinovou chromatografií) výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matrice. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra.

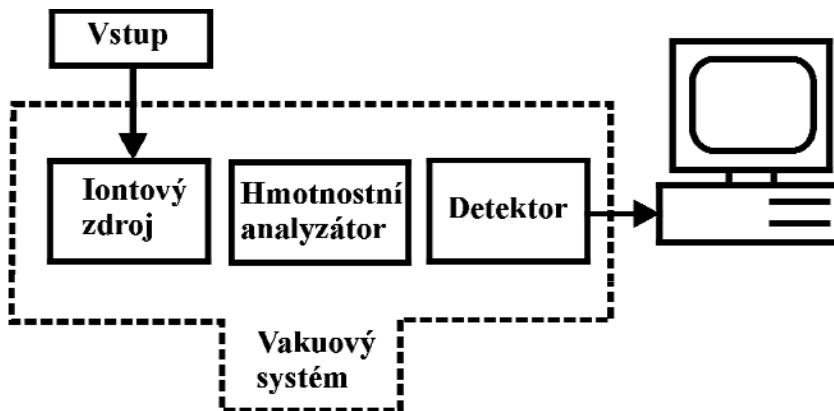
Vývoj přístrojové instrumentace pro hmotnostní spektrometrii prošel v posledních letech rychlým vývojem, kombinované systémy plynové i kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS, LC-MS) jsou v současnosti komerčně dostupné v přijatelných cenových relacích a jsou plně využitelné v analytických laboratořích pro rutinní analýzy. Jejich aplikovatelnost je velmi široká, s oběma metodami se běžně setkáváme ve všech důležitých oblastech chemické analýzy. V souvislosti s rostoucím zájmem chemických, biologických a medicínských oborů o analýzu makromolekulárních látek se v praxi stále častěji využívají uspořádání tandemových hybridních hmotnostních spektrometrů, které dosahují vysoké přesnosti určení molekulových hmotností analyzovaných iontů a umožňují provádět detailní strukturní studie na základě sledování fragmentací vibrantních iontů.

11.1 Úvod do instrumentace

Základní blokové schéma hmotnostního spektrometru je uvedeno na Obr. 11.1. I přes značnou konstrukční rozmanitost současné instrumentace je možno u všech přístrojů identifikovat obdobné základní stavební prvky:

Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu. V prostoru iontového zdroje (kolizní cely) dochází k většině fragmentačních reakcí vedoucích k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu. **Hmotnostní analyzátor** slouží jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých poměrech hmotnosti ku náboji (m/z), produkovanou v iontovém zdroji. **Detektor**, na který je směrován proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátem, poskytuje signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je převeden do **počítače** a vhodným programovým vybavením zpracován do formy hmotnostních spekter. Kromě sběru dat v reálném čase a jejich zpracování zajišťuje počítač další řídící a kontrolní funkce související s chodem přístroje, kalibrací a optimalizací jeho provozních parametrů. Hmotnostní spektrometr je zařízení pracující za velmi nízkých tlaků. Nedílnou součástí zařízení je i výkonný, nejčastěji vícestupňový **vakuový čerpací systém**, umožňující udržet dostatečně nízký tlak za všech provozních podmínek. Další nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru je vhodný **vstup** umožňující převedení vzorku

analyzované látky z prostředí vnějšího do prostoru iontového zdroje. V případě kombinace GC-MS a LC-MS je do prostoru iontového zdroje přiváděna mobilní fáze spolu s látkami vystupujícími z chromatografické kolony a to buď přímo a nebo přes vhodné **rozhraní** snižující podíl mobilní fáze.



Obr. 11.1: Blokové schéma hmotnostního spektrometru

11.1.1 Iontový zdroj

Veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj, ionizace analyzované látky je naprosto nezbytným předpokladem analýzy. Energetická náročnost ionizace závisí na typu analyzované látky, pro většinu organických látek se pohybuje prahová ionizační energie v rozmezí 7-16 eV. Děje, jejichž energie přesahuje tuto prahovou energii, vedou k převedení látky do ionizovaného stavu.

Použitý způsob ionizace zásadně ovlivňuje aplikační zaměření metody. Vývoj v oblasti konstrukce nových typů iontových zdrojů rozšířil aplikovatelnost hmotnostní spektrometrie na netěkavé látky s vysokou molekulovou hmotností. Výtěžek ionizace u většiny používaných ionizačních technik jen výjimečně přesahuje 0,01%, proces ionizace tedy výrazně snižuje citlivost měření a dosažitelnou mez detekce metody. Pokud energie dodaná molekule v průběhu ionizace výrazně převyšuje její první ionizační energii, pak může dojít ke spotřebování nadbytečné vibračně-rotační energie fragmentací vzniklého iontu. Podle množství dodané energie je obvyklé dělit ionizační techniky na tzv. **měkké** (soft), při nichž je energeticky přebytek dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a na **tvrdé** (hard), při nichž dodaná energie postačuje k rozsáhléjší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Dalším třídicím kriteriem je skupenství, ve kterém se látka nachází při ionizaci. Nejběžnější jsou techniky ionizace v plynné fázi; analyzovaná látka je předem odpařena do vakua a nutným předpokladem je její dostatečná těkavost. Techniky ionizace v kondenzované fázi, při nichž dochází k tvorbě iontů přímo ve fázi kapalné nebo tuhé, jsou vhodné zejména pro analýzu netěkavých látek. Přehled běžně používaných ionizačních technik je uveden v tabulce 11.1.

11.1.2 Hmotnostní analyzátor

Slouží k časovému či prostorovému rozlišení iontů produkovaných v iontovém zdroji podle poměru jejich hmotnosti a náboje, m/z .

Tab. 11.1: Přehled běžných ionizačních technik a jejich aplikační oblast

Ionizační technika	Typické použití
ionizace elektrony (EII)	těkavé nízkomolekulární látky
chemická ionizace (CI)	těkavé nízkomolekulární látky
ionizace rychlými atomy (FAB)	peptidy, proteiny – max. hmotnost 10 kDa
laserová desorpce (MALDI)	syntetické polymery, sacharidy, peptidy, proteiny, nukleové kyseliny – max. hmotnost 1 000 kDa
plasmová desorpce (PDI)	biopolymery – max. hmotnost 10 kDa
elektrosprejová ionizace (ESI)	biopolymery – max. hmotnost 100 kDa
ionizace při atmosferickém tlaku (APCI)	netěkavé nízkomolekulární látky – max. hmotnost 1 kDa

Magnetický hmotnostní analyzátor je nejstarší, z hlediska hmotnostního rozsahu a rozlišení velmi kvalitní disperzní prvek, umožňuje prostorové rozdělení monoenergetického svazku iontů podle hodnoty m/z . Bývá součástí hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením, jež jsou jen výjimečně přímo spojeny se separační metodou. Z principu separace iontů dle m/z v magnetickém poli vychází koncepce ion cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FTICR – Fourier transform ion cyclotron resonance). Ionty obíhající vlivem intenzivního konstantního magnetického pole po uzavřených orbitálních drahách jsou současně excitovány střídavým elektrickým polem. Výsledkem působení obou sil je složená epitrochoidální dráha pohybu s frekvencí oscilací úměrnou odmocnině m/z iontu. Technika FTICR v současnosti dosahuje nejvyšších hodnot rozlišení a přesnosti určení m/z iontů.

Kvadruplový analyzátor umožňuje vlivem střídavého elektrického pole filtrovat ionty dle m/z . Běžně se uplatňuje u hmotnostních spektrometrů nízkého rozlišení určených pro spojení s plynovou a kapalinovou chromatografií či s kapilární elektroforézou.

Kvadruplová iontová past je trojrozměrnou obdobou kvadruplového filtru a umožňuje pomocí střídavého elektrického pole uzavřít ionty v ohrazeném prostoru a následně je analyzovat dle m/z . Iontová past prošla intenzivním konstrukčním vývojem, parametry současných konstrukčních usporádání posouvají těžiště jejího využití do oblasti LC-MS, a to i pro analýzy vysokomolekulárních látek.

Lineární iontová past svým uspořádáním vychází z geometrie kvadruplového analyzátoru. Jedná o tři elektricky izolované paralelně orientované kvadrupolové filtry, které při vhodném režimu vkládání napětí umožňují kumulovat ionty produkované v iontovém zdroji a následně je analyzovat dle m/z . Hlavní předností hmotnostních spektrometrů s lineární iontovou pastí je konstrukční jednoduchost, možnost miniaturizace a vysoká citlivost díky efektu kumulace iontů. Lineární iontová past je využívána v hmotnostních spektrometrech spojených s kapalinovou chromatografií a v tandemových hybridních hmotnostních spektrometrech.

Orbitální iontová past (orbitrap) je novým typem hmotnostního analyzátoru s Fourierovou transformací, sestávající ze dvou elektrod – vnější elektrody soudkovitého tvaru a vnitřní elektrody tvaru vřetene. Ionty, které se dostanou do elektrického pole mezi oběma elektrodami se pohybují po orbitálních drahách kolem centrální elektrody, frekvence oscilací je, podobně jako u FTICR, úměrná odmocnině z m/z . Hlavní výhodou hmotnostních spektrometrů s orbitální iontovou pastí je konstrukční jednoduchost a nízké provozní náklady při zachování vysokého hmotnostního rozlišení

a hmotnostního rozsahu srovnatelného s FTICR. V kombinaci s lineární iontovou pastí je orbitrap používán v tandemových hybridních hmotnostních spektrometrech s vysokým rozlišením, které jsou vhodné pro přímé spojení s kapalinovou chromatografií.

Průletový analyzátor (TOF – time of flight) je v principu nejjednodušším hmotnostním analyzátem, tvořeným pouhou evakuovanou trubicí. K časovému rozdělení iontů s rozdílným m/z dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Ionty s odlišným m/z , vystupující z iontového zdroje, mají při stejné kinetické energii rozdílnou rychlosť. Hmotnější ion se pohybuje pomaleji a dorazí do detektoru později. Je zřejmé, že časová diference, a tedy i dosažitelné rozlišení budou záviset na délce dráhy, kterou ionty v trubici průletového analyzátoru urazí. Aby zařízení nemuselo být příliš rozměrné, často se konstruuje s tzv. reflektronem, elektrostatickým zrcadlem znásobujícím průletovou dráhu iontů. Průletový analyzátor vyžaduje použití iontového zdroje pracujícího v pulzním módu. Hlavní předností tohoto zařízení je teoreticky neomezený hmotnostní dosah. V současnosti se průletový hmotnostní analyzátor používá u LC-MS pro analýzu vysokomolekulárních látek a v kombinaci s kvadrupolovými filtry u tandemových hybridních přístrojů. Orientační hodnoty hmotnostního dosahu a rozlišení MS systémů s různými hmotnostními analyzátoři jsou uvedeny v tab. 11.2.

Tab. 11.2: Orientační hodnoty hmotnostního dosahu a rozlišení MS systémů s různými hmotnostními analyzátoři

Hmotnostní analyzátor	Hmotnostní dosah (m/z)	Rozlišení
kvadrupolový filtr	4 000	2 000
magnetický sektor	20 000	20 000
orbitální iontová past	50 000	200 000
kvadrap. iontová past	70 000	5 000
lineární iontová past	70 000	100 000
FTICR	100 000	200 000
TOF	1 000 000	10 000

11.1.3 Detektor

Detektory používané v hmotnostní spektrometrii lze rozdělit do tří kategorií:

- (1) detektory pro přímá měření, detegující elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů;
- (2) násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů a poskytují měřitelné signály dokonce pro jednotlivé ionty;
- (3) detektorová pole, umožňující registraci dopadajících iontů v ploše.

Výběr typu detektoru závisí na uvažované aplikaci. Detektory pro přímá měření, nezbytné například pro měření přesného izotopového zastoupení prvků při určování stáří hornin, jsou většinou součástí specializovaných zakázkových systémů. Násobičové detektory se standardně užívají u veškeré komerční instrumentace, včetně kombinovaných systémů GC-MS a LC-MS. Klasické je použití elektronnásobičových detektorů, v současné době se dává přednost fotonásobičovým detektorům s vyšší citlivostí a delší životností. Detektorová pole jsou využívána v systémech tandemových hybridních hmotnostních spektrometrů.

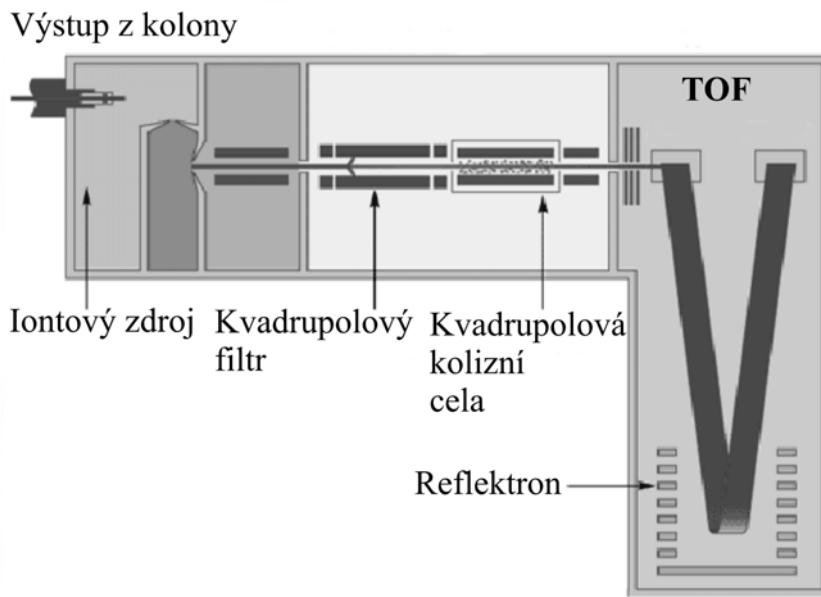
11.1.4 Kolizní cela

Nevýhodou použití měkkých ionizačních technik je nízký rozsah fragmentace vznikajících iontů. Strukturní informace systému LC-MS s jedním hmotnostním analyzátorem je omezena v naprosté většině případů na určení molekulové hmotnosti separované látky na základě pozorovaného molekulárního, kvazi-molekulárního či aduktového iontu. Řešením je použití zařízení, umožňujícího dosáhnout dodatečné fragmentace iontů mimo prostor iontového zdroje – kolizní cely. Kolizně indukovaná či aktivovaná disociace iontů (CID, CAD) se provádí nejčastěji v prostoru kvadrupolu či hexapolu srážkami s molekulami inertního plynu, například argonu. Další využívanou technikou pro dosažení fragmentace je technika povrchově indukované disociace, kdy proud iontů je směrován proti terčíku tvořenému vhodným polymerem či kovem s nanesenou vrstvou nízkomolekulární organické látky.

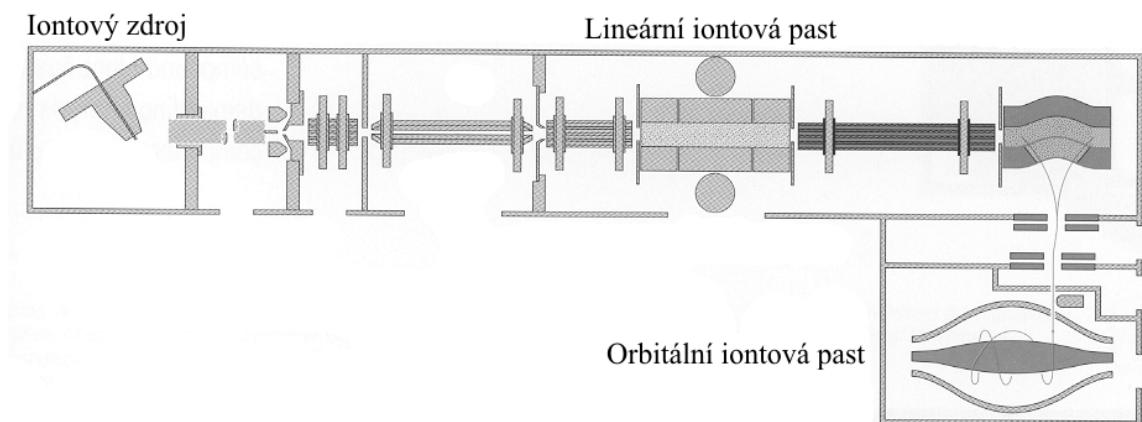
11.1.5 Tandemové a hybridní hmotnostní spektrometry

Pro účely podrobných strukturních studií je nutno použít komplexní systémy tandemové a tandemové hybridní hmotnostní spektrometrie, sdružující více hmotnostních analyzátorů oddělených kolizní celou. Klasickým instrumentálním uspořádáním tohoto typu je tandemový hmotnostní spektrometr sdružující dvojici magnetických hmotnostních analyzátorů a kolizní celu. V prvním je volbou intenzity magnetického pole vybrán ion určitého m/z (tzv. mateřský ion), jež je následně řízeně fragmentován v kolizní cele, vzniklé fragmentové ionty (dceřiné ionty) jsou podle m/z rozděleny v druhém magnetu a následně detegovány. Z hlediska dosažitelného rozlišení je unikátní přístrojové uspořádání sdružující izolační kvadrupól (výběr iontu daného m/z) hexapolovou kolizní celu a celu ion cyklotronové rezonance se supravodivým magnetem, jako hmotnostní analyzátor velmi vysokého rozlišení. Pro účely spojení se separačními metodami se tradičně využívá systém se třemi kvardupoly. Prvý kvadrupól slouží pro výběr mateřského iontu, do druhého kvardupolu se přivádí pod vhodným tlakem inertní plyn a slouží jako kolizní cela pro řízenou fragmentaci mateřského iontu, skenováním třetího kvardupolu se rozdělí vzniklé dceřiné ionty. Pro účely strukturní analýzy makromolekul byly vyvinuty hybridní systémy vyznačující se širokým hmotnostním rozsahem, vysokým rozlišením a vysokou citlivostí, jež jsou vhodné pro spojení s kapalinovým chromatografem. Schematický nákres tandemového hmotnostního spektrometru sdružujícího dvojici kvardupolů a průletový hmotnostní analyzátor je uveden na Obr. 11.2.

Rychlý rozvoj v oblasti konstrukce nových typů iontových pastí (lineární a orbitální iontové pasti) umožnil konstrukci nových typů hybridních hmotnostních spektrometrů dosahujících velmi vysokých hodnot rozlišení, srovnatelných s ICR-FTMS, ale s podstatně nižšími prostorovými a provozními nároky, které jsou vhodné pro přímé spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Příklad tohoto uspořádání je uveden na Obr. 11.3. Ionty produkované API zdrojem jsou přes fokusační kvadrupolovou iontovou optiku přiváděny do lineární iontové pasti, kde jsou zachyceny a analyzovány dle m/z v módu MS či MS^n . Následně mohou být vybrané ionty přiváděny přes „zakřivenou“ iontovou past (C-trap) do orbitální iontové pasti, umožňující stanovit jejich hmotnost s vysokou přesností.



Obr. 11.2: Schéma hybridního tandemového hmotnostního spektrometru s dvojicí kvadrupolů a průletovým hmotnostním analyzátorem



Obr. 11.3: Schéma hybridního tandemového hmotnostního spektrometru s lineární a orbitální iontovou pastí

11.2 Počítačové vyhodnocení hmotnostních spekter

Je v případě spekter po ionizaci elektronem nejběžnějším a nejrychlejším způsobem navržení struktury, zcela nezbytným při zpracování výsledků analýzy komplikovaných směsí látek, kdy je nutno identifikovat velký počet komponent. Nejčastěji je celý proces založen na počítačovém porovnání získaného spektra se standardními knihovními spektry. Počítačové vybavení a knihovna spekter je součástí všech komerčních systémů GC-MS, jsou k dispozici spektra pro ionizaci elektronem i pro chemickou ionizaci. Počítačové vyhodnocení hmotnostních spekter je nezbytným nástrojem pro zpracování výsledků analýzy hmotnostním spektrometrem, získané výsledky však musí být kriticky zhodnoceny a prověřena jejich věrohodnost. Nekritické akceptování výsledků počítačového vyhodnocení spekter může vést ke zcela nesprávným závěrům o struktuře analyzovaných látek.

Většina programů pro počítačové vyhodnocení spekter využívá obdobných algoritmů zpracování dat. Prvním krokem je výběr reprezentativních píků v experimentálním hmotnostním spektru: obvykle se volí 8 až 11 píků, podle klesající intenzity. Tento jednoduchý způsob často vede k zanechaní strukturně významných píků v oblasti vyšších hodnot m/z , proto se provádí korekce intenzit upřednostňující výběr v oblasti vyšších m/z a automaticky se do výběru zařazuje pík o nejvyšší hodnotě m/z odpovídající molekulárnímu iontu. Často se pro výběr aplikuje kombinované kriterium zohledňující kromě intenzity píku i hmotnostní diference s okolními páky. Tak se postupně od vyšších k nižším hodnotám m/z vylučují páky s hmotnostní diferencí v rozmezí 5 až 12 m/z a 15 až 25 m/z .

Algoritmus porovnání experimentálního spektra s databázovými spektry v principu pracuje dvojím způsobem. Při **přímém vyhledávání** (forward search) se zjišťuje, zda veškeré významné páky v databázovém spektru jsou přítomny ve spektru experimentálním. Při **zpětném vyhledávání** (reversed search) se jako základ bere experimentální spektrum a posuzuje se shoda se spektry databázovými. V obou případech se kromě vlastní přítomnosti páku bere v úvahu i jeho poměrné zastoupení včetně ostatním posuzovaným pákům. Výsledek vyhledávání je nejčastěji vyjádřen tabulkou nalezených sloučenin s nejvyšší podobností spektra, míra se vyjádřuje číslem v intervalu 0 až 1 000, přičemž s rostoucí hodnotou stoupá podobnost mezi knihovním a experimentálním spektrem a v případě dosažení horního limitu jsou obě spektra totožná. Přímé a zpětné vyhledávání se může kombinovat, hovoříme pak o algoritmu **vyhledávání čistoty** (purity search).

Základním předpokladem úspěchu při počítačovém hodnocení hmotnostních spekter je použití kvalitní a dostatečně obsáhlé databáze hmotnostních spekter. V současnosti je nejčastěji využívána knihovna spekter organických sloučenin NIST po ionizaci elektronem a po chemické ionizaci. Stále vznikají menší, účelové databáze zaměřené například na léčiva, návykové látky, pesticidy, bojové chemické látky nebo organometalické sloučeniny. Důležitá je i tvorba vlastních, uživatelských databází spekter pro látky, jež jsou v dané laboratoři analyzovány. Výsledky interpretace spekter na základě porovnání se spektry standardů získaných na témže přístroji poskytují nejlepší výsledky.

Nově se při interpretaci hmotnostních spekter prosazují programy určující strukturu analyzované látky na základě automatického vyhodnocení fragmentace. V současnosti je u programů tohoto typu zvládnuta aplikace všech běžných fragmentačních pravidel umožňujících předpovědět vzhled spektra pro danou strukturu a v experimentálním spektru zpětně identifikovat většinu fragmentových iontů běžných organických sloučenin. V současné době jsou programy tohoto typu užitečným pomocníkem umožňujícím určit strukturní typ a charakter substituentů analyzované látky.

11.3 Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS)

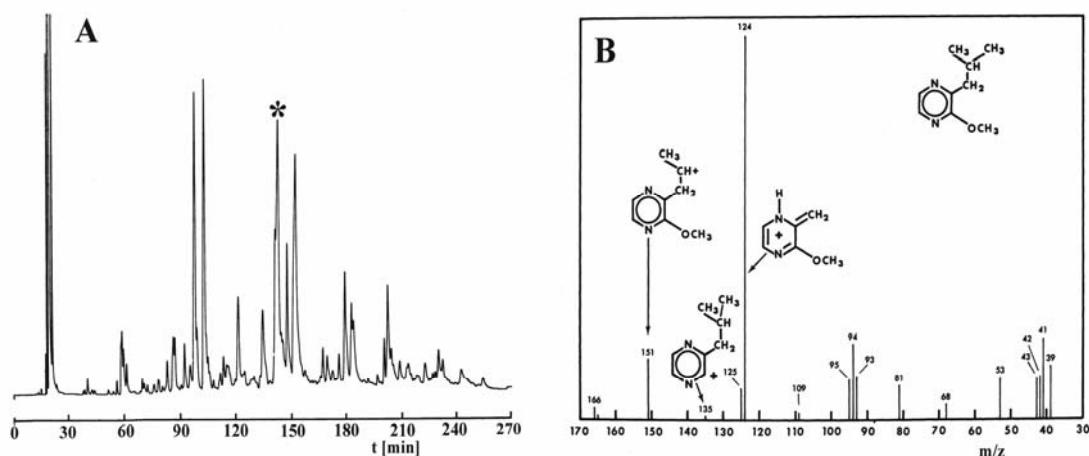
Základním problémem spojení obou zařízení je jejich tlaková nekompatibilita. Tlak na výstupu kolony plynového chromatografu je přibližně atmosférický, iontové zdroje EI, CI, používané pro tuto kombinaci, pracují optimálně za vysokého nebo za velmi vysokého vakua. Zvýšení tlaku v iontovém zdroji a hmotnostním analyzátoru vede k výraznému poklesu citlivosti a zhoršení charakteru spekter (ztráta rozlišení, vyšší signál pozadí, změna poměrného zastoupení jednotlivých iontů aj.). Navíc provoz běžných EI iontových zdrojů při vyšších tlacích výrazně zkracuje životnost jeho součástí. Primárním předpokladem úspěšného spojení GC-MS je dostatečně výkonný čerpací systém, schopný s rezervou odčerpat nadbytek nosného plynu z prostoru ionizace. Připojení kapilárních separačních kolon, které jsou dnes prakticky výhradně používané, je možno považovat za prakticky bezproblém-

mové a instrumentálně nenáročné. Ústí kolony je možno přímo propojit s iontovým zdrojem a při průtocích nosného plynu do 3 ml min^{-1} je možno s běžnými čerpacími systémy udržet v EI zdroji dostatečně nízký tlak.

11.3.1 Aplikační oblast GC-MS

11.3.1.1 Potravinářský průmysl

Metoda se využívá především pro strukturní charakterizaci a kvantifikaci těkavých složek podmiňujících vůni a chuť potravin, významnou roli hraje i při hodnocení jejich trvanlivosti. Na Obr. 11.4A je uveden záznam separace těkavých složek z extraktu papriky roční a na Obr. 11.4B odpovídající hmotnostní spektrum 2-isobutyl-3-methoxypiperazinu, látky způsobující typickou vůni a chuť paprik.



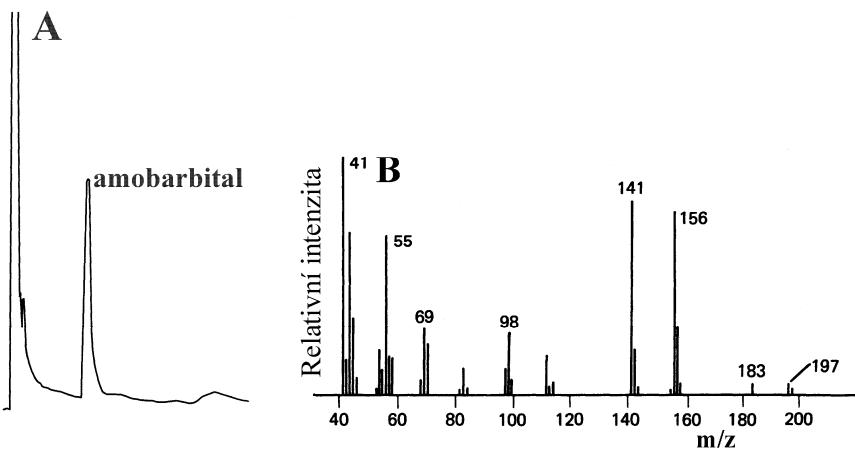
Obr. 11.4: (A) Chromatogram extraktu z papriky roční (*Capsicum annuum*)
(B) Hmotnostní spektrum 2-isobutyl-3-methoxypiperazinu jako látky způsobující typickou vůni a chuť paprik (pík na chromatogramu označený *)

11.3.1.2 Toxikologie

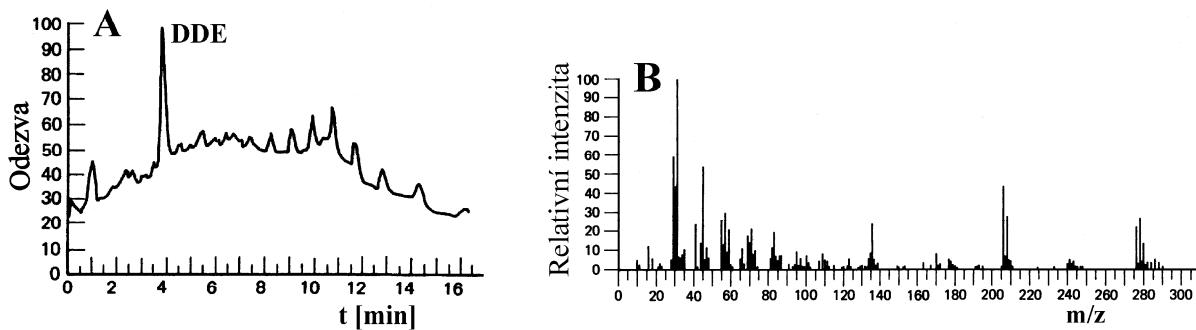
GC-MS umožňuje jednoznačně identifikovat a kvantifikovat běžné návykové látky v tělních tekutinách a je v současnosti standardní analytickou metodou dopingových a toxikologických laboratoří. Na Obr. 1.5A je uveden chromatogram extraktu z krve oběti předávkované amobarbitalem, příslušné hmotnostní spektrum je uvedeno na Obr. 11.5B.

11.3.1.3 Ekologie

Metoda GC-MS se používá pro stopovou a ultrastopovou analýzu organických polutantů ve vzorcích půd, vod a ovzduší. Na Obr. 11.6A je chromatogram extraktu vzorku mořské vody s výrazným pákem odpovídajícím dichlordifenyldichlorethylenu (DDE) jako degradačního produktu v minulosti běžně používaného herbicidu DDT, na Obr. 11.6B je uvedeno hmotnostní spektrum této látky.



Obr. 11.5: (A) Chromatogram extraktu z krve oběti předávkované amobarbitalem
 (B) Odpovídající hmotnostní spektrum této látky



Obr. 11.6: (A) Chromatogram extraktu vzorku mořské vody s výrazným píkem odpovídajícím dichlorodifenyldichlorethylenu (DDE) jako degradačního produktu v minulosti běžně používaného herbicidu DDT
 (B) Hmotnostní spektrum této látky

11.4 Kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (LC-MS)

Základním předpokladem úspěšného spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je účinné odstranění složek mobilní fáze před vlastní ionizací. U současné komerční instrumentace LC-MS se prakticky výhradně využívají sprejové ionizační techniky typu elektrospreje a APCI, jež jsou principiálně uzpůsobeny pro práci s průtokem kapalné fáze a jsou schopny v průběhu ionizace odvést většinu těkavých složek mimo prostor hmotnostního spektrometru. Velkou výhodu pro spojení LC-MS je využití mikrokolonové kapalinové chromatografie, jež je svými průtoky mobilní fáze zcela kompatibilní s moderními sprejovými iontovými zdroji typu elektrospreje. Volba iontového zdroje se řídí typem analyzovaných látek: APCI je primárně určena pro ionizaci nízkomolekulárních látek do $m/z < 1\,000$, ESI je možno použít pro ionizaci makromolekulárních látek typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin.

Z hlediska instrumentální kompatibility s kapalinovým chromatografem neexistuje žádné omezení volby hmotnostního analyzátoru – konkrétní volba se řídí především požadovaným hmotnostním rozsahem, rozlišením a samozřejmě též pořizovacími a provozními náklady. V oblasti komerční instrumentace je v současnosti stále ještě nejběžnější použití kvardupólových hmotnostních

analyzátorů. Jsou prakticky universální a mezi hlavní přednosti systémů LC-MS s těmito typy hmotnostních analyzátorů patří dostatečná citlivost, zejména v módu vybraného iontového proudu (SIM – selected ion current), vysoká rychlosť skenování a především cenová dostupnost. Minimálně srovnatelné jsou parametry iontové pasti. Přístroje s tímto typem hmotnostního analyzátoru umožňují ve srovnání s kvadrupolovými přístroji dosáhnout v módu celkového iontového proudu (TIC – total ion current) nižších mezd detekce a hodí se zejména pro stopovou analýzu. Požaduje-li se velké rozlišení, může být alternativně použit magnetický hmotnostní analyzátor uzpůsobený pro rychlé skenování, iontový cyklotronový rezonanční analyzátor (ion-cyclotron resonance – ICR). Požadavek velmi vysokého hmotnostního dosahu, jež je logickým požadavkem rostoucího zájmu o analýzu biopolymerů typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin, velmi dobře splňuje průletový hmotnostní analyzátor.

Volba vhodného typu detektoru může být kritická zejména pro analýzy vysokomolekulárních látek. Pro detektory typu elektronnásobiče i fotonásobiče platí, že citlivost detekce klesá s rostoucím m/z detegovaného iontu. Proto byly vyvinuty různé typy tzv. postakceleračních detektorů, jež mohou s pomocí vhodné iontové optiky ionty před vlastní detekcí urychlit.

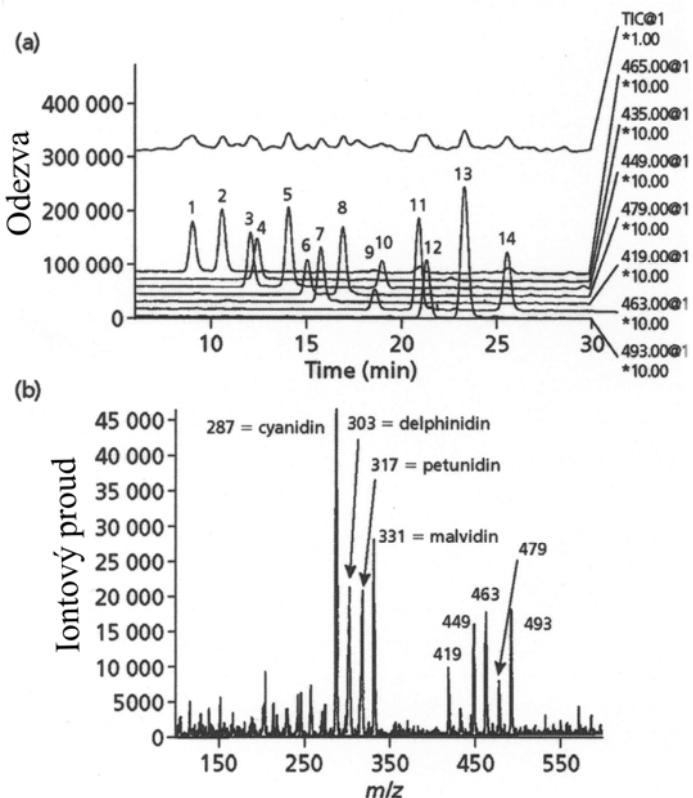
11.4.1 Aplikační oblast LC-MS

11.4.1.1 Potravinářský průmysl

Metoda se využívá pro strukturální charakterizaci a kvantifikaci netěkavých složek podmiňujících chuť, nutriční vlastnosti a možnou toxicitu potravin. Jedná se zejména o analýzu umělých i přirozených barviv, farmak typu antibiotik a růstového hormonu v potravinách živočišného původu, peptidů, proteinů, lipidů, sacharidů, glykoproteinů a vitamínů významně ovlivňujících nutriční hodnotu potravin. S pomocí LC-MS je možno sledovat i strukturní změny jmenovaných typů látek během procesů tepelné úpravy a stárnutí potravin. Z hlediska zajištění nezávadnosti potravin je důležitá i informace o struktuře a obsahu netěkavých xenobiotik. Na Obr. 11.7A je uveden záznam LC-APCI-MS analýzy netěkavých barviv v extraktu z borůvek, jež zodpovídají za jeho charakteristické zbarvení a jež v procesu oxidace během skladování působí nežádoucí barevné a chuťové změny produktu. Na Obr. 11.7B je uvedeno směsné APCI hmotnostní spektrum odpovídající přímému nástríku extraktu do iontového zdroje, bez předchozí chromatografické separace s identifikovanými molekulárními a fragmentovými ionty těchto barviv.

11.4.1.2 Farmaceutický průmysl

Metoda LC-MS nalezla významné uplatnění v oblasti strukturální charakterizace a kvantifikace léčiv, jejich syntetických meziproduktů, doprovodných nečistot a rozkladních produktů. Je často využívána pro studium kinetiky a mechanismu odbourávání léčiv v organismu a strukturní identifikaci vznikajících metabolitů. Technika LC-MS je nezbytná pro strukturální charakterizaci bílkovin jako potenciálních vazebních míst léčiv, kde nahrazuje dvojdimensionální gelovou elektroforézu a izoelektrickou fokusaci.



Obr.11.7: (a) Záznam LC-APCI-MS separace netěkavých barviv v extraktu z borůvek

Identifikované píky: 1 – delphinidin-3-gal ($M_r = 465$), 2 – delphinidin-3-glu ($M_r = 465$), 3 – cyanidin-3-gal ($M_r = 449$), 4 – delphinidin-3-ara ($M_r = 435$), 5 – cyanidin-3-glu ($M_r = 449$), 6 – petunidin-3-gal ($M_r = 479$), 7 – cyanidin-3-ara ($M_r = 419$), 8 – petunidin-3-glu ($M_r = 479$), 9 – petunidin-3-gal ($M_r = 463$), 10 – petunidin-3-ara ($M_r = 449$), 11 – petunidin-3-glu ($M_r = 463$), 12 – malvidin-3-gal ($M_r = 493$), 13 – malvidin-3-glu ($M_r = 493$), 14 – malvidin-3-ara ($M_r = 463$)

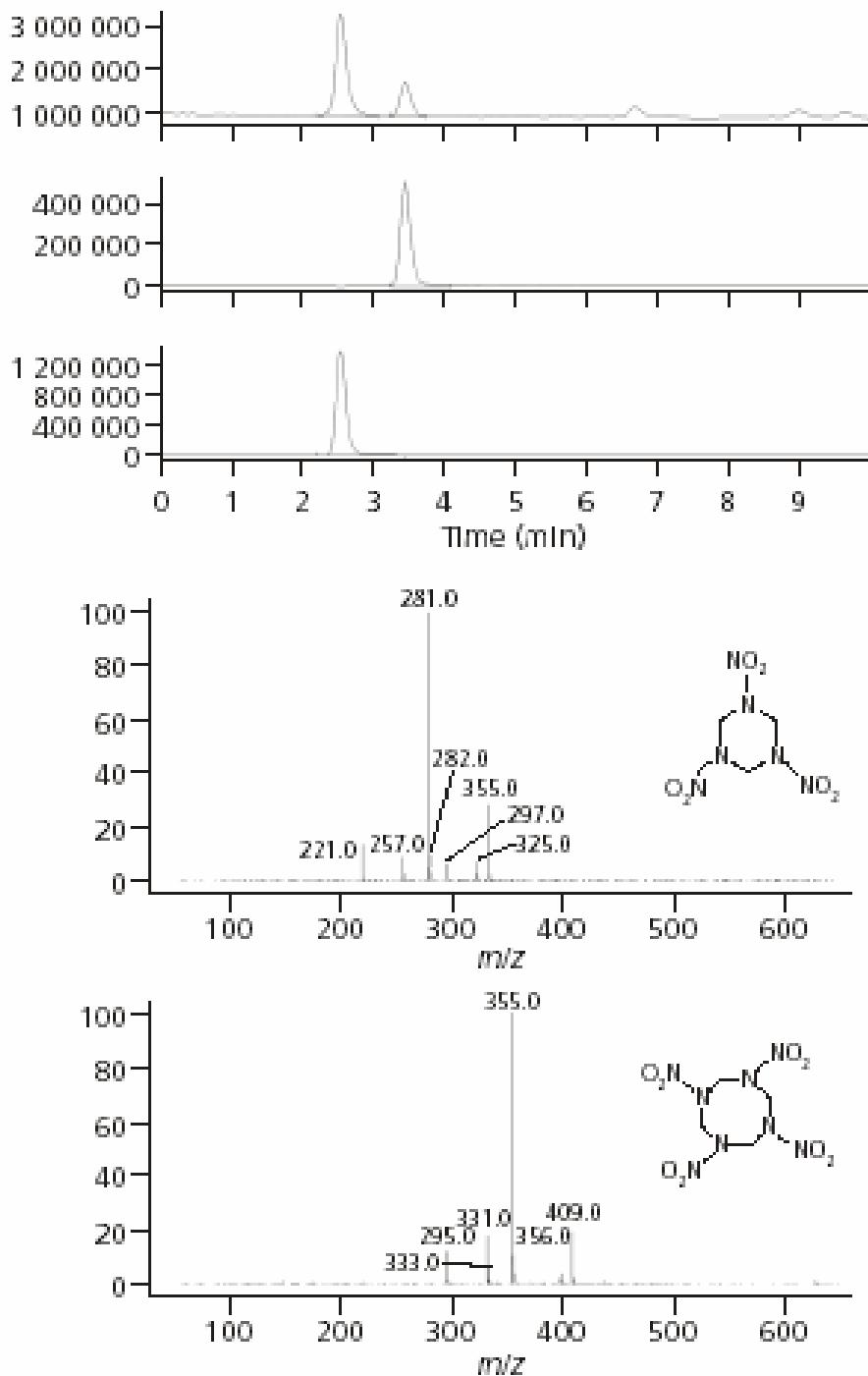
(b) Směsné APCI hmotnostní spektrum s identifikovanými molekulárními a fragmentovými ionty těchto barviv

11.4.1.3 Toxikologie

Metoda LC-MS se využívá pro strukturní charakterizaci a kvantifikaci polárních a netěkavých návykových látek a jejich metabolitů v tělních tekutinách. Je v současnosti nejvýznamnějším nástrojem kontroly nové generace dopingových látek (steroidy, prostaglandiny, peptidy, proteiny) bez nutnosti jejich derivatizace.

11.4.1.4 Ekologie

Metoda se využívá pro analýzu polárních a málo těkavých polutantů ve vzorcích vody a půd. Na Obr. 11.8 je uveden záznam separace stop netěkavých výbušnin v extraktu z půdy metodou LC-APCI-MS s příslušnými hmotnostními spektry umožňujícími jejich strukturní identifikaci.



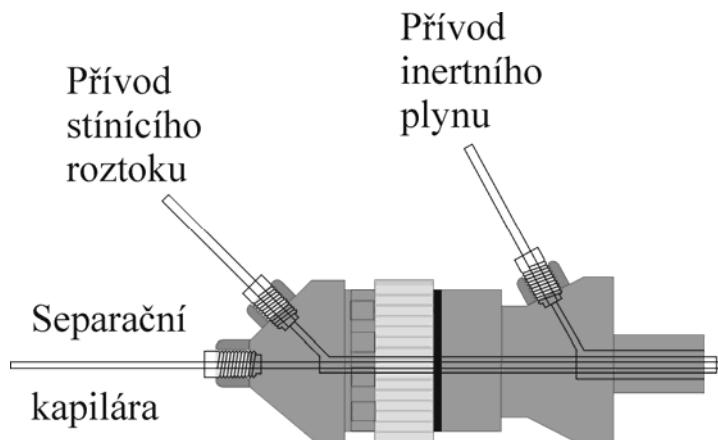
Obr. 11.8: Analýza stop netěkavých výbušnin v extraktu z půdy metodou LC-APCI-MS

11.5 Kapilární elektroforéza – hmotnostní spektrometrie (CE-MS)

Je další, pro analytickou praxi užitečnou kombinací vysokoučinné separační metody s hmotnostní spektrometrií. Obdobně jako v případě kapalinové chromatografie je spojení realizováno nejčastěji pomocí iontového zdroje typu elektrosprej. Mezi hlavní technické problémy komplikující propojení

obou přístrojů patří především příliš nízký průtok základního elektrolytu separační kapilárou a problém realizace vodivého spojení konce separační kapiláry se zemnící elektrodou vysokonapěťového zdroje pro elektroforézu.

Běžný průtok základního elektrolytu, daný elektroosmotickým tokem v křemenné separační kapiláře, se pohybuje v řádu nl min^{-1} , což poskytuje objemové množství nedostatečné pro vytvoření stabilního spreje v běžném zdroji ESI. Chybějící objem kapaliny je tedy nutno dodat z externího zdroje; obvykle se pro tyto účely používá tzv. stínící kapalina (sheath fluid), což bývá nejčastěji vodný roztok těkavé soli a vhodného organického rozpouštědla. Stínící kapalina je protlačována do ESI zdroje tak, aby se celkový objem přiváděné kapalné fáze (tj. nosného elektrolytu a stínícího roztoku) pohyboval v řádu jednotek $\mu\text{l min}^{-1}$. Kromě této funkce stínící roztok umožňuje i vodivé spojení mezi koncem separační kapiláry a zemnící elektroforetickou elektrodou. Pro podpoření tvorby spreje a zvýšení jeho stability se do prostoru zdroje ESI přivádí pod vhodným tlakem inertní zmlžovací plyn. Možná realizace spojení CE-MS s přídavným tokem stínící kapaliny je znázorněna na Obr. 11.9. V principu jde o soustavu tří koncentrických kapilár: vnitřní je vlastní separační kapilára, jež je upevněna v kapiláře pro přívod stínícího roztoku, vně je kovová kapilára přivádějící inertní plyn, jež je spojena přes redukční ventil se zásobní tlakovou nádobou. Stabilní přívod stínící kapaliny je zajištěn nejčastěji lineárním dávkovačem s mikrostříkačkou nebo chromatografickou pumpou s dělicem. Zemnící elektroforetická elektroda je ponořena do zásobní nádobky se stínící kapalinou, v případě použití mikrostříkačky tuto elektrodu tvoří přímo její kovový hrot.

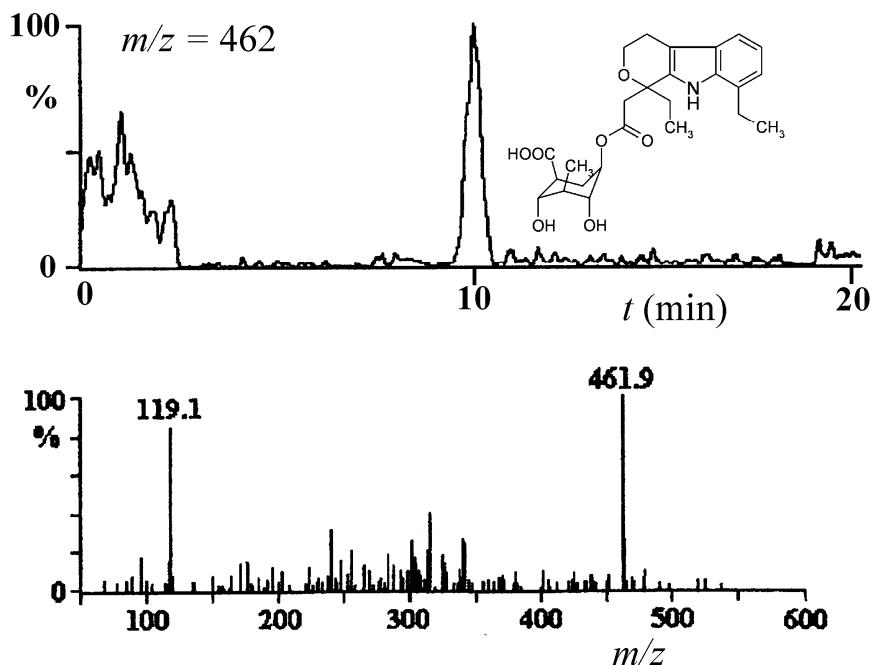


Obr. 11.9: Možná realizace spojení CE s ESI zdrojem s přídavným tokem stínící kapaliny

11.5.1 Aplikační oblast CE-MS

Spojení CE-MS nachází uplatnění v oblasti analýzy látek iontové povahy v komplikovaných matričích, kde se dobře uplatní vysoká účinnost kapilární elektroforézy s možností strukturně selektivní detekce hmotnostním spektrometrem. Významnou aplikaci oblastí je farmaceutická analýza. V praxi je využívána metoda CE-MS při stanovení obsahu a strukturní charakterizaci peptidových léčiv. CE-MS se velmi dobře uplatňuje při analýzách bio-polymerů typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin. Je možno předpokládat, že spolu s LC-MS bude reprezentovat jednu z klíčových analytických metod v oblasti genomiky a proteomiky. Obr. 11.10 dokumentuje možnosti využití kombinace CE-ESI-MS při farmakokineticích studiích. V horní části obrázku je zobrazen SIM chromatogram analýzy kumulativního vzorku moči pacienta 3 až 7 hodin po podání léčiva ethodo-

lak, ve spodní části je uvedeno odpovídající hmotnostní spektrum této látky s výrazným molekulárním iontem ($m/z = 461,9$) umožňujícím její identifikaci. Možnosti aplikací dále rozšiřuje kombinování separačních metod před vstupem do hmotnostního spektrometru, např. HPLC-CE-MS.



Obr. 11.10: SIM chromatogram a ESI hmotnostní spektrum analýzy vzorku moči pacienta po podání léčiva ethodolak

12. ZÁCHYT NEZNÁMÝCH NOX A KONFIRMACE V TOXIKOLOGII

doc. Ing. M. Balíková, CSc

Ústav soudního lékařství a toxikologie, LF UK a VFN v Praze 2

mbali@lf1.cuni.cz

Toxikologická diagnostika intoxikací či abuzu návykových látek není jednoduchá sériová záležitost, ale vyžaduje komplexní individuální přístup s ohledem na okolnosti případu a anamnesticke informace. Příznaky otrav nebývají specifické a vyhledat a určit potencionální noxu a/nebo její metabolity ve stopách v biologickém vzorku předpokládá znalosti o osudu a působení nox v organismu vedle analytických dovedností. Spektrum možných nox bývá časově i lokálně proměnlivé a systém používaných toxikologických metod je nutné neustále aktualizovat. Dnešní metodické vybavení běžné toxikologické laboratoře se zaměřením klinickým či forenzním odráží frekvenci požadavků na praktické laboratorní vyšetření. Požadavky na vyšetření anorganických látek se v současnosti prakticky neobjevují – pomineme-li otravy způsobené např. oxidem uhelnatým. Laboratorní toxikologická vyšetření náhodných či úmyslných otrav jsou proto zaměřena spíše na organické látky – alkohol a rozpouštědla (tzv. těkavé látky, popř. glykoly) a vedle toho na organické extraktivní noxy (tj. zejména léčiva a ilegální návykové látky).

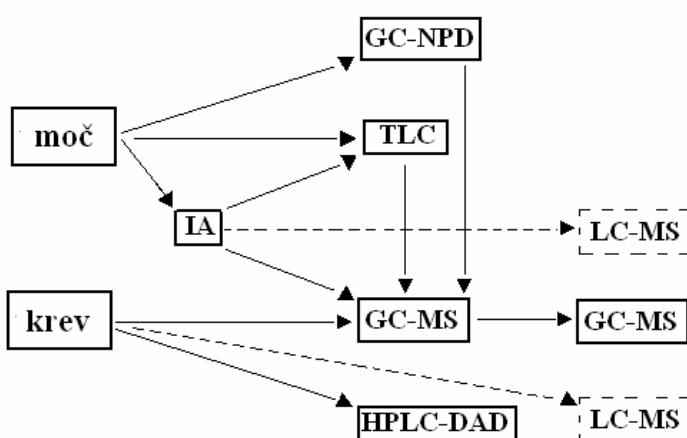
Laboratorní toxikologické nálezy korelují s individuální anamnézou v různé míře a nemusí být zřejmé, zda jde o otravu, anebo jinou příčinu patologického stavu. Z tohoto hlediska má i kvalitativní nalezení a určení správné noxy velký význam se zdravotními či právními dopady na jedince. Předem neznámá noxa je vyhledávána systematickou toxikologickou analýzou, což je soubor logicky za sebou řazených postupů podle postupně zjišťovaných výsledků jednotlivých testů. Základní princip toxikologie, zejména forenzní, je princip potvrzovací, tj. potvrzení nálezu jinou nezávislou metodou, pokud existuje. Teprve po úspěšné detekci a jednoznačné identifikaci škodliviny v biologické matrici může následovat stanovení její koncentrace kvantitativní validovanou metodou.

V současné diagnostice intoxikací léčivy či návykovými látkami se často uplatňují metody imunochemické v kombinaci s metodami chromatografickými. Metody imunochemické bývají komerčně dostupné – ovšem jen se zaměřením na vybrané noxy nebo cílené skupiny nox s častou frekvencí výskytu. Jejich výhoda je technicky jednoduché provedení, často bez úpravy vzorku, a tím rychlá dostupnost výsledku v akutních vážných stavech, pokud jsou příslušné metody v laboratoři zavedeny a udržovány. Tyto metody však nepokrývají dostatečně široké spektrum v úvahu přicházejících nox. Záchytové detekční metody (screeningové) nebývají specifické, nerozlišují chemická individua uvnitř testované skupiny nox (např. morfin od kodeinu) a vyžadují následnou konfirmaci a upřesnění jinou nezávislou a specifickou metodou. Chromatografické metody jsou sice pracnější a odborně náročnější, vyžadují různé izolační postupy, ale jsou flexibilnější a zachytí noxy a jejich metabolity v mnohem širším rozsahu. Jejich uspořádání může být screeningové, pro detekci širokého okruhu potencionálních neznámých nox ve vzorku, anebo cíleně zaměřené pro konfirmaci nebo stanovení specifikované noxy. Obecně platí, že chromatografické screeningové metody jsou méně citlivé než metody cílené, které jsou optimalizované pro užší okruh strukturně blízkých látek. Dostupnost výsledků chromatografických metod je pomalejší dle složitosti a neobvyklosti případu. Vyžadovaným toxikologickým standardem dneška pro záchyt a identifikaci stop organických škodlivin

a jejich metabolitů v biologických tekutinách a tkáních je aplikace tandemových metod plynové nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Následující schéma ukazuje příklad řešení systematické toxikologické analýzy pro záchyt a identifikaci neznámých organických nox v souboru biologických vzorků pacienta:

STA - MOŽNÉ ŘEŠENÍ SYSTEMATICKÁ TOXIKOLOGICKÁ ANALÝZA PRO NEZNÁMOU NOXU



Použité zkratky

STA	systematická toxikologická analýza
IA	imunochemická analýza
TLC	tenkovrstná chromatografie
GC	plynová chromatografie
NPD	dusíkový detektor
MS	hmotnostní spektrometrie
LC, HPLC	kapalinová chromatografie
DAD	detektor diodového pole

Doporučená literatura

J. Večerková: Postupy při záchytu a identifikaci léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu pomocí chromatografie na tenkých vrstvách. SPN, Praha, 1983.

A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, Editors: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Pharmaceutical Press, London, 2004.

M. Balíková: Forenzní a klinická toxikologie. Laboratorní toxikologická vyšetření. Galén, Praha, 2007.

S. Štípek: Stručná toxikologie. Medprint 1997

13. POŽADAVKY NA HPLC A CE V KLINICKÝCH A TOXIKOLOGICKÝCH ANALÝZÁCH

prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie
pacakova@natur.cuni.cz

Požadavky na použitou separační metodu v toxikologické a klinické analýze jsou obdobné jako v jiných odvětvích. V prvé řadě to je spolehlivá identifikace a kvantifikace, dále rychlosť provedení (počet provedených analýz za jednotku času) a s tím i související cena analýzy.

Spolehlivá identifikace a kvantifikace souvisí s **rozlišovací schopnosťí** dané metody. Rozlišení $R_{i,j}$ dvou látek i, j je dáno vztahem (X.1)

$$R_{i,j} = \frac{r_{i,j} - 1}{r_{i,j}} \cdot \frac{k_i}{k_i - 1} \sqrt{n} \quad (13.1)$$

kde $r_{i,j}$ je relativní retence látek i a j (separační faktor), k_i je retenční faktor a n je počet teoretických pater ($n = L/H$; H je výškový ekvivalent teoretického patra).

Jak vyplývá z rovnice (13.1), rozlišení $R_{i,j}$ lze ovlivnit třemi faktory: retenčním faktorem (k_i), separačním faktorem ($r_{i,j}$) a účinností separace n . Retenční faktor i separační faktor závisí v prvé řadě na dané stacionární a mobilní fázi, ale také na teplotě (log k a log r_{ij} jsou nepřímo úměrné teplotě). Účinnost separace, vyjádřená počtem teoretických pater n nebo nebo výškovým ekvivalentem H , závisí na délce kolony, velikosti a distribuci částic náplně, velikosti povrchu, velikosti pórů, rychlosti a viskositě mobilní fáze a teplotě.

Účinnost vyjádřená **výškovým ekvivalentem teoretického patra** H závisí na lineární průtokové rychlosti u podle Deemperováho vztahu

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (13.2)$$

Členy A a C souvisejí s průměrem částic stacionární fáze d_p . Čím je průměr částic d_p nižší, tím je nižší H a tedy účinnost separace a i rozlišení je vyšší.

Rychlosť analýzy je relativní pojmem. Obecným požadavkem při klinických a toxikologických analýzách je snížení doby separace při zachování její účinnosti. Přibližně lze říci, že při ultra-rychlé analýze je doba analýzy pod 1 minutou, při rychlé analýze pod 5 minut a při klasické analýze delší než 5 minut.

Rychlosť analýzy můžeme zvýšit:

- zkrácením kolony (< 100 mm),
- zvýšením průtokové rychlosti,
- použitím malých částic (kolem 3 až 3,5 mm, případně i pod 2 mm),
- použitím vhodné instrumentace, která toleruje vysoké tlaky a vysoké teploty,
- rychlým sběrem a vyhodnocováním dat.

Pro dosažení vysokých účinností separace jsou v současné době používány stacionární fáze s velkosdílkem částic pod $3 \mu\text{m}$. Použití malých částic však má i svá omezení, jak vyplývá z rovnice

$$P = \Phi L \eta u / 100 d_p^2 \quad (13.3)$$

kde P je zpětný tlak generovaný kolonou, Φ je parametr vyjadřující odpor proti průtoku mobilní fáze ($\Phi = 500$), η je viskosity mobilní fáze, u je lineární rychlosť mobilní fáze, L je délka kolony a d_p je průměr částic. Z rovnice (13.3) je zřejmé, že zpětný tlak P generovaný kolonou je nepřímo úměrný velikosti částic, d_p^2 , takže když se sníží velikost částic dvakrát, tlak vzroste čtyřikrát. Je zřejmé, že tyto částice kladou velký odpor a proto se plní do krátkých kolon, které pracují při vyšších průtokových rychlostech, čímž se výrazně zvýší produktivita (množství vzorků analyzovaných za časovou jednotku). V kolonách o malých rozměrech dochází k nižšímu zředění vzorku a tím i ke zvýšení citlivosti měření.

Je obtížné zvyšovat rozlišení použitím dlouhých kolon, zvlášť v konvenčních LC-přístrojích, kde tlak je omezen na hodnoty pod 40 MPa. Proto se používají kratší kolony o délce 30-50 mm a vnitřním průměru 2 mm. Kolona o rozměrech 50 mm x 2 mm s částicemi stacionární fáze o průměru $1,7 \mu\text{m}$ při průtoku 1 mL min^{-1} generuje zpětný tlak 100 MPa.

Rychlé analýzy kladou specifické požadavky na přístrojové vybavení^{1,2}. Systém LC by měl mít minimální mrtvé objemy kolon a čerpadla, čerpadlo, které přesně doručuje rozpouštědlo při dané průtokové rychlosti a dostatečně rychlé detektory (z hlediska doby odezvy a rychlého získávání dat). Životně důležitý pro rychlou LC je vysoký automatický dávkovač. Některé moderní automatické dávkovače mají dávkovací cykly pouze 10 s, což význačně zkracuje dobu analýzy a zvyšuje výtěžnost a produktivitu.

Důležitým faktorem je rovněž rychlá komunikace s počítačem, která ovlivňuje maximální počet vzorků zpracovaný systémem za jednotku času.

V roce 2004 vyvinula firma Waters Acquity system, který byl optimalizován pro použití náplňových kolon s částicemi o $d_p = 1,7 \mu\text{m}$. Tento systém dovoluje práci při tlacích až do 150 MPa (zhruba trojnásobek limitu pro standardní LC-systém). Přístroj byl navržen tak, aby byly využity náplně s malými částicemi, vysoké průtokové rychlosti mobilní fáze, a tím i oblast vysoké účinnosti separace ve van Deemterově rovnici. Čerpadla tolerují vysoké tlaky, používají se kapiláry s velmi malými vnitřními průměry, specializované spojovací části, detektory s rychlou odezvou a rychlý sběrem a vyhodnocování dat.

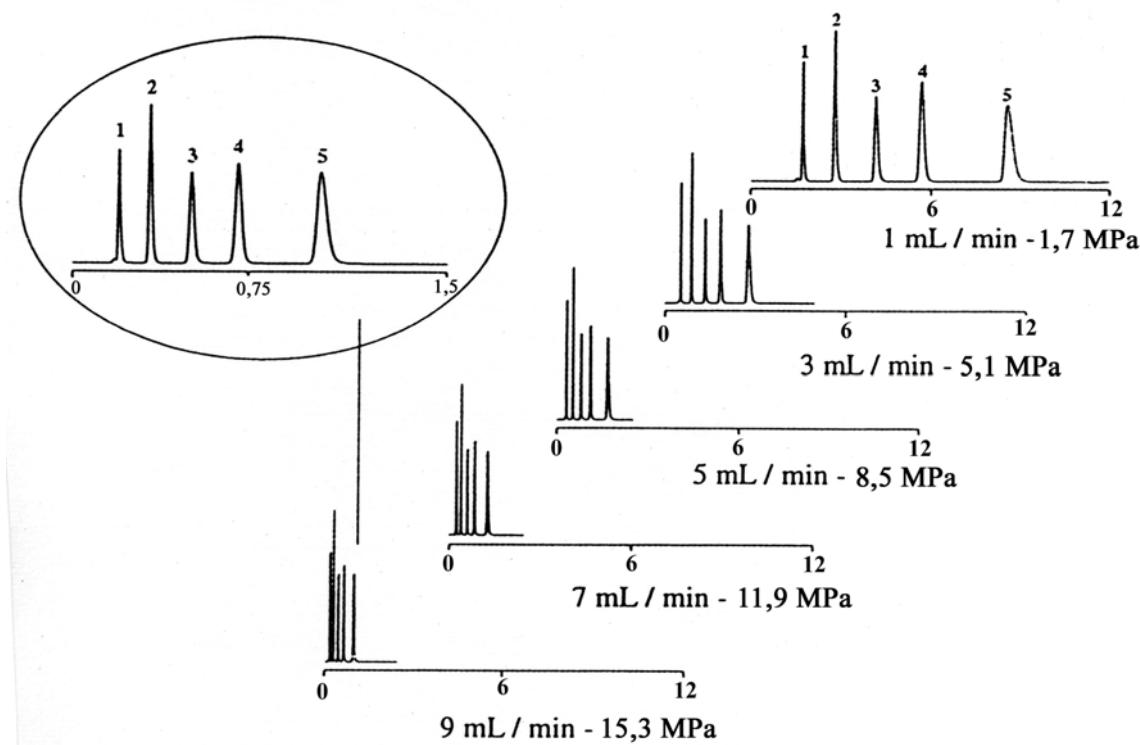
Mezi výhody rychlé a ultrarychlé HPLC patří snížení spotřeby rozpouštědel, vysoká produktivita a nízká cena analýzy. Ultrarychlá analýza se uplatňuje kromě toxikologické analýzy zejména v metabolických studiích, při vývoji metody HPLC a při validacích metod.

K optimalizaci rychlosti analýzy a rozlišení v HPLC přispívají zejména:

1. nové technologie přípravy kolon (doba analýzy se zkrátí až pod 40 s),
2. nové instrumentace (přispívají ke zkrácení doby analýzy bez ztráty rozlišení),
3. automatizované rychlé zpracování chromatogramů (bez snížení kvality dat).

Mezi **nové technologie přípravy kolon** patří monolitické stacionární fáze³, kdy je kolona zcela vyplňena polymerem o definované pórovitosti, buď organického nebo anorganického původu, který se uvnitř kolony vytvoří vhodnou polymeracní reakcí v roztoku. Monolitické kolony na bázi silikagelu se vyznačují vysokou pórovitostí. Obsahují jednak mikropory ($2 \mu\text{m}$), které umožňují používat vysoké průtoky (až 9 ml min^{-1}), jednak mezopory (13 nm), které zase dodávají náplni velký po-

vrch pro interakci s analyty. Kvalita kolon se tak zlepší ve srovnání s kolonami náplňovými. Účinnost monolitických kolon je srovnatelná s náplňovými kolonami o velikosti částic 3 µm a menšími. Monolitické kolony se vyznačují velkou propustností, mechanickou stabilitou, odolností vůči změnám pH a vysokou účinností separace i při vysokých průtocích mobilní fáze. Vliv průtokové rychlosti na separaci směsi látek na monolitické koloně na bázi silikagelu (Chromolith RP-18e) dokumentuje Obr. 13.1. Z obrázku je zřejmé, že na monolitických kolonách nedochází se zvyšováním průtokové rychlosti k poklesu účinnosti separace. Zvýší-li se průtoková rychlosť 9krát, zkrátí se doba analýzy 8krát při zachování stejné účinnosti separace. Výhodou monolitických kolon jsou také nízké zpětné tlaky, jak je zřejmé i z Obr. 13.1.

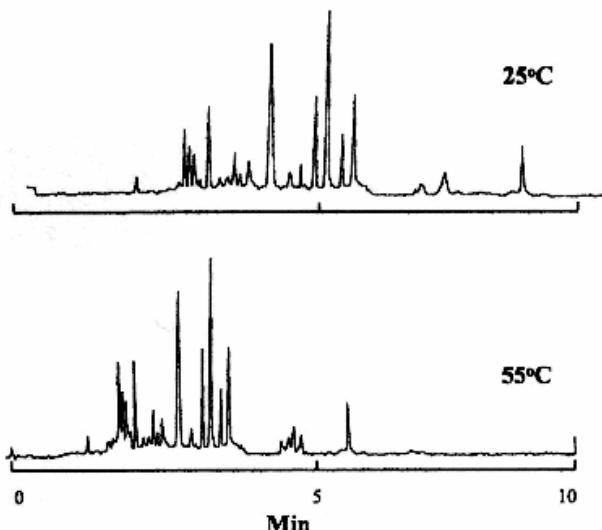


Obr. 13.1: *Vliv průtokové rychlosti na separaci*

Podmínky: Monolitická kolona Chromolith Performance RP-18 e (100 mm x 4,6 mm)

Monolitické kolony však mají i některé nevýhody. HPLC přístroje nejsou obvykle konstruovány na velké průtoky. Spojení s hmotnostní spektrometrií vzhledem k vysokým průtokovým rychlostem vyžaduje použití děliče. Nevýhodou je i vysoká spotřeba a tím i cena rozpouštědel a omezená volba stacionárních fází a jejich dodavatelů.

Rychlou a účinnou separaci na monolitických kapilárních kolonách v elektrochromatografii demonstруje Obr. X.2. Monolitická kapilára byla použita k separaci produktů cytochromu c po jeho štěpení trypsinem. Z Obr. X.2 vyplývá i vliv teploty na rychlosť analýzy. Je zřejmé, že zvýšením teploty z 25 na 55 °C se doba analýzy výrazně zkrátí.



Obr. 13.2: CEC separace produktů štěpení cytochromu c trypsinem

Podmínky: Monolitická kolona na bázi styrenu s kvartérními funkčními skupinami, isokratická eluce při 25 a 55 °C, mobilní fáze obsahuje 40 % CH₃CN v 50 mM fosfátovém pufru, pH 2,5; napětí –30 kV; UV detekce při 214 nm

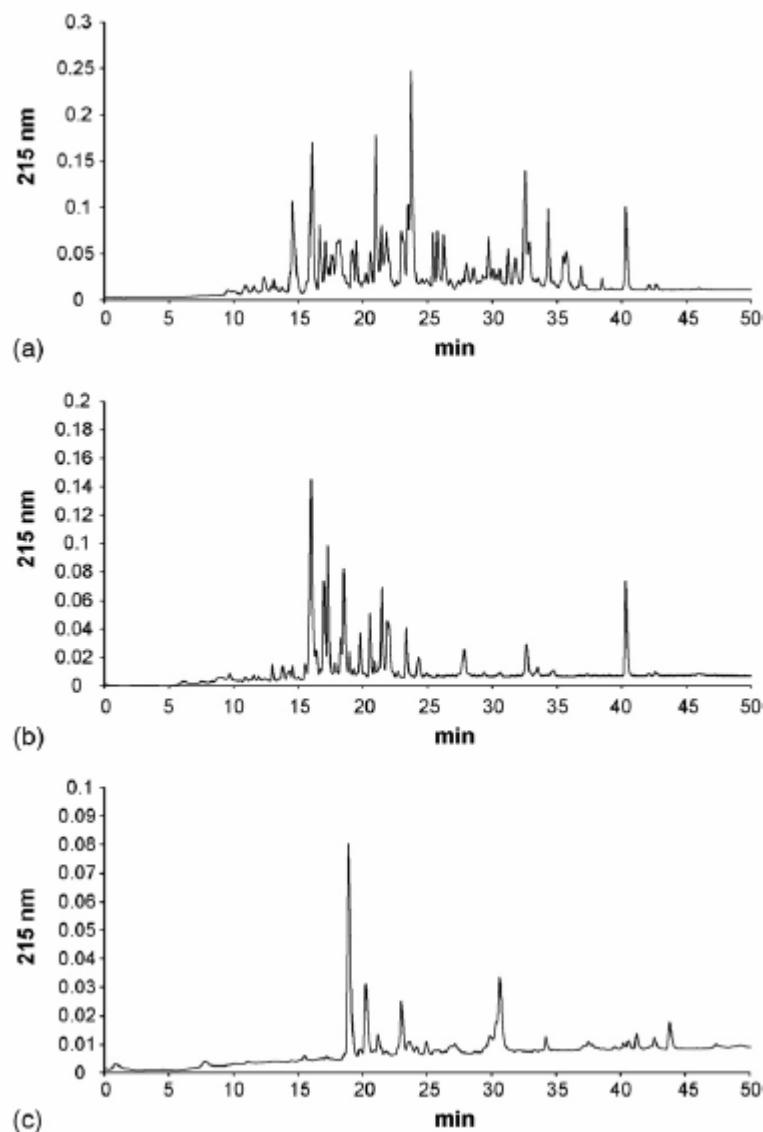
Teplota má vliv nejen na rychlosť analýzy, jak bylo zmíněno výše, ale i na účinnost separace. Zvýšení teploty o 1 °C má za následek nárůst účinnosti separace o 1,5 %¹. Zvýšením teploty se sníží viskosita mobilní fáze, a tím se zlepší převod hmoty (sníží se člen C ve van Deemterově rovnici). Tím se křivky stávají plošší, podobně jako při zmenšování částic. Na rozdíl od vlivu velikosti částic má zvýšená teplota za následek pokles zpětného tlaku v koloně, což umožňuje používat vyšší průtokové rychlosti a tak dosáhnout současně vyšší rozlišení i vyšší rychlosť separace. Teplota má vliv též na retenční faktor a relativní retenci (selektivitu).

Zvyšování teploty může mít však i negativní efekt: při teplotách nad 60 °C se vytváří v koloně teplotní gradient, který má za následek zhoršení tvaru píků a jejich rozštěpení. Abychom se tomu vyhnuli, musí být mobilní fáze předelehřátá. Naopak před vstupem do detektoru je třeba mobilní fázi opět ochladit. Termolabilní látky se mohou v koloně rozkládat, i když tento problém není tak častý, jak se předpokládá. Teplota má i vliv na polaritu vody, takže je nižší spotřeba mobilní fáze a menší odpad. Řada přístrojů nyní umožňuje práci za vyšší teploty.

Rozlišení lze též zvýšit zvýšením selektivity měření. Vysoko selektivní stacionární fáze představují vtištěné polymery (*imprinted polymers*). Jsou obdobou monolitických kolon, ale navíc je do náplně zabudován "obtisk" analytu, který chceme oddělit. Při přípravě polymeru *in situ* v koloně se přidá analyzovaná látka (např. jeden izomer valinu, L-valin) a po ukončení polymerace se tento analyt vymyje z kolony. Po jeho molekule zůstane v náplni charakteristická dutina (obtisk), přístupná pouze pro vtištěnou molekulu (L-valin, D-valin se touto stacionární fází nezadrží). Vtištěné polymery jsou vhodné především pro obtížné separace, jako jsou např. chirální separace léčiv. Časté je jejich použití v extrakci tuhou fází pro selektivní zachycení analytů.

Jiný typ selektivních fází představují afinitní fáze, založené podobně jako vtištěné polymery na molekulovém rozpoznávání⁵. Tyto fáze se vyznačují vysokou stabilitou komplexů afinitní ligand–biologicky aktivní látka. Řada afinitních stacionárních fází je komerčně dostupná, ale stále převažuje jejich příprava v laboratořích pro danou aplikaci. Používají se nejčastěji k izolaci biologicky aktivních látek. Velký význam mají i jako předseparační krok, např. při kombinaci afinitní multilektinové mikrokolony ve spojení s vysokoúčinnými separačními metodami pro obohacení glykoproteinů a glykopeptidů⁶. Mikrokolona byla *on-line* spojena se systémem LC/MS a aplikována na komplexní charakterizaci glykopeptidů a určení polohy glykosylace v lidském transferinu.

Jako další příklad je možné uvést afinitní chromatografiu na imobilizovaných iontech (IMAC)⁷. Metoda Cu²⁺-IMAC byla využita při analýze lidského transferrinu po štěpení trypsinem (Obr. 13.3).



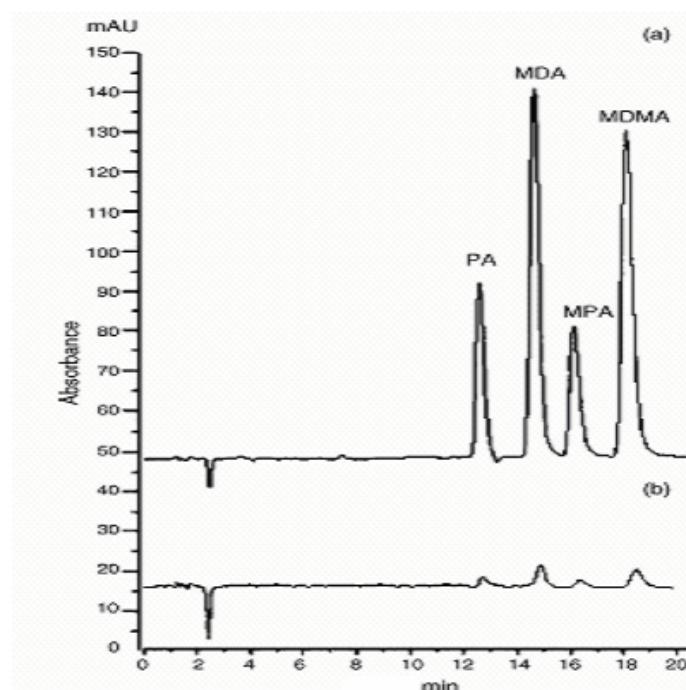
Obr. 13.3: LC lidského transferrinu po štěpení trypsinem⁷

(a) celý vzorek; (b) po separaci Cu-IMAC; (c) po chromatografii na měničích anionů a Cu-IMAC

V klinických a toxikologických analýzách obvykle nelze použít vysoce selektivní stacionární fáze, ale je nutné předřadit vlastní analýze různé metody úpravy vzorku. Metody úpravy vzorku se řídí typem vzorku. Pro kapalné vzorky (moč, sérum, sliny) se vedle klasické extrakce kapalnou používají nejčastěji extrakce tuhou fází (SPE) nebo mikroextrakce na vláknech (SPME). Pro tuhé vzorky (tkáně, vlasy) jsou to vedle klasické Soxhletovy extrakce zrychlená extrakce rozpouštědly (ASE) či extrakce nadkritickými tekutinami (SFE). Tak např. při analýze nox v krvi předchází deproteinizace, extrakce rozpouštědly, extrakce tuhou fází, přečištění extraktu na měničích iontů a zakoncentrování odpařením. Tepřve pak následuje vlastní analýza, obvykle metodou HPLC

s hmotnostní detekcí. Jako příklad tuhého vzorku je možné uvést analýzu vlasů. Po odběru vzorku (důležitou roli hraje místo odběru vlasů, stáří a pohlaví osoby) následuje dekontaminace vlasů (odstranění prachu, kosmetických přípravků apod.), extrakce, přečištění extraktu, jeho zakoncentrování a teprve pak následuje analýza LC-MS.

Jako příklad je uvedena prekoncentrace významných nox na monolitické kapiláře v přímém spojení s HPLC. Na Obr. 13.4 je uvedena analýza vzorku obsahujícího amfetamin, methamfetaminu a jejich methylendioxyderivátů v moči⁸. Porovnány jsou záznamy s mikrokextrakcí SPE (a) a s přímým nástřikem (b). Z obrázku je zřejmé značné zakoncentrování vzorku. Metoda se vyznačuje vysokou reproducibilností (RSD < 2,9 %) v rozsahu koncentrací 0,05 až 5 g mL⁻¹ a nízkým detekčním limitem, 1,4 až 4,0 ng mL⁻¹.

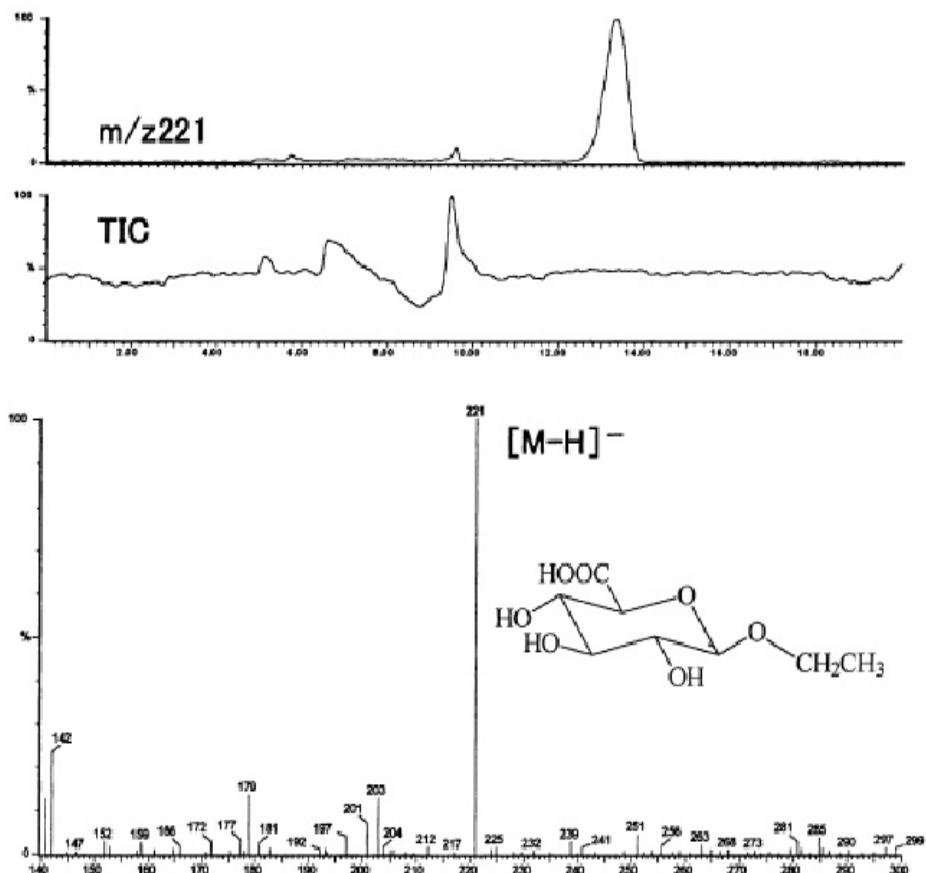


Obr. 13.4: Analýza amfetaminu (PA), methamfetaminu (MPA), 3,4-methylendioxoamfetaminu (MDA) a 3,4-methylendioxomethamfetaminu (MDMA)

(a) s SPE, (b) přímý nástřik

Optimálním řešením v toxikologické a klinické analýze je využití HPLC nebo CE ve spojení s hmotnostní detekcí. MS v SIM-modu (*single ion monitoring*) či MS/MS modu umožňuje detektovat a kvantifikovat látky, které nejsou zcela separované. Příklady jsou uvedeny na Obr. 13.5 a 13.6.

Jako první příklad je uvedeno stanovení ethanolu. Zatímco ethanol v krvi se po relativně krátké době obtížně dokazuje, jeho metabolit ethylglukuronid je daleko stabilnější. Na Obr. 13.5 je záznam celkového iontového proudu (TIC), monitorování iontu $m/z = 221$ (SIM-mod) a hmotnostní spektrum ethylglukuronidu. Z obrázku je zřejmé, že k identifikaci a kvantifikaci nelze použít celkový iontový proud, ale velmi dobře vyhovuje SIM-mod.

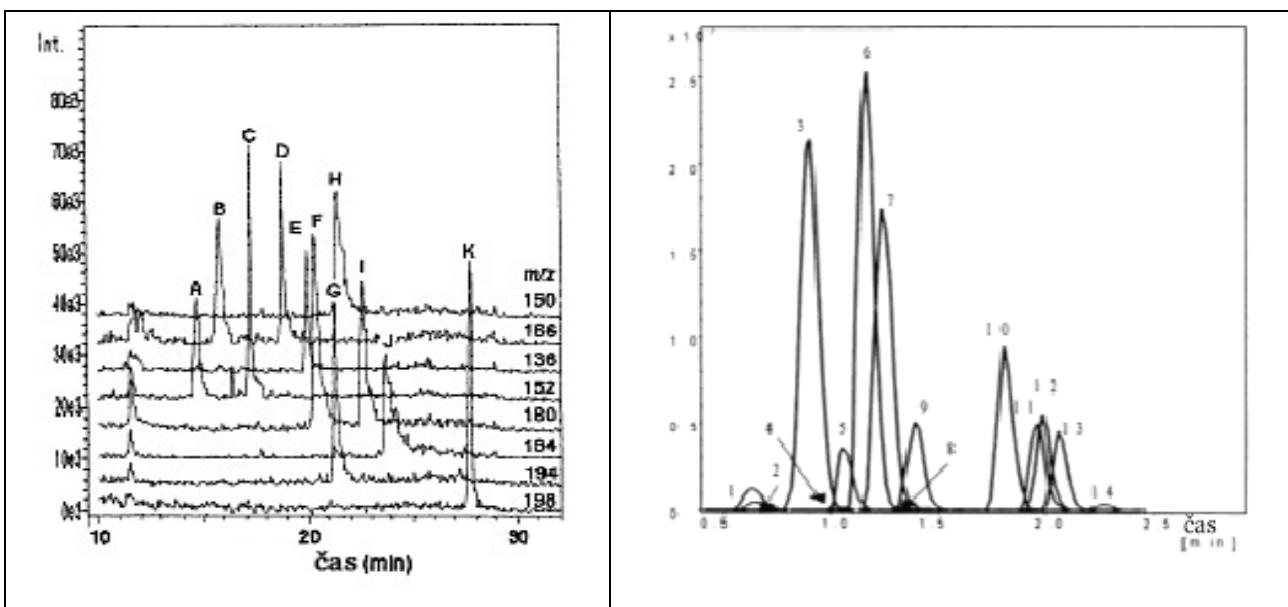


Obr. 13.5: *Extrahovaný iontový chromatogram m/z 221, celkový iontový chromatogram a hmotnostní spektrum ethylglukuronidu (metabolitu ethanolu)*

Jako druhý příklad lze uvést rychlou HPLC-ESI-MS použitou pro identifikaci a kvantifikaci významných nox⁹. Z Obr. 13.6 je zřejmé, že všech 14 látek není separováno (viz rekonstruovaný chromatogram), ale využitím SIM-modu lze látky identifikovat a kvantifikovat. K separaci byla využita monolitická kolona, takže analýza je velmi rychlá (doba analýzy je 5 min. včetně stabilizace). Všech 14 látek, neutrálních, bazických a kyselých, je účinně ionizováno v ESI (ioniace elektrosprejem).

Budoucí trend v toxikologické a klinické analýze LC směřující k vyšším účinnostem separace a rychlejším analýzám není jednoznačný. O tom, zda to budou ještě menší částice, nebo nové technologie přípravy monolitických kolon, nové selektivní stacionární fáze, vysoké teploty separace nebo kombinace všech těchto faktorů, rozhodne budoucnost. Slibnou alternativou je též použití vysokých teplot, které by umožnily kompletní odstranění mobilní fáze a pak detekci s plamenovým ionizačním detektorem.

Zmenšování častic dosáhlo již praktický limit. Pokud budou pokračovat požadavky na vysoké rozlišení při krátké době analýzy a stejném množství analyzovaných vzorků, bude třeba dalšího výzkumu, jak tyto požadavky splnit.



Obr. 13.6: Rekonstruovaný chromatogram 14 významných nox⁹

Podmínky: monolitická kolona Chromolith, gradientová eluce metanolem, který obsahuje 0,1 % mravenčí kyseliny, detekce ESI-MS

(1) psilocybin, (2) morfin, (3) salbutamol, (4) amfetamin, (5) 3,4-MDMA, (6) clenbuterol, (7) LSD, (8) fenobarbital, (9) buprenorfin, (10) temazepam, (11) nandrolon, (12) metandienon, (13) testosteron, (14) stanozolol

Použitá literatura

1. A.C.Mann, LC-GC Europe, May 2007, 290.
2. E.R.Majors, LC-GC Europe, June 2006, 352.
3. K. Štulík, V. Pacáková, J. Suchánková, P. Coufal, J. Chromatogr. B, 841, 2006, 79.
4. S. Zhang, J. Zhang, C. Horváth, J. Chromatogr. A, 914, 2001, 189.
5. T. Vařilová, M. Maděra, V. Pacáková, K. Štulík, Current Proteomics, 3, 2006, 55.
6. M. Madera, Y. Mechref, M.V. Novotny, Anal. Chem., 77, 2005, 4081.
7. Qui R., Zhang X., Reigner F.E., J.Chromatogr.B, 845 (2007) 143.
8. Y. Fan, Yu.-Qi. Feng, J.-T..Zhang, S.-L. Da, Zhang M., J.Chromatogr.A, 1074, 2005.
9. K. Pihlainen, F. Sippola, E., R. Kostainen, J. Chromatogr. A, 994, 2003, 93.

14. ALTERNATIVNÍ MATERIÁLY V TOXIKOLOGII

doc. Ing. M. Balíková, CSc

Ústav soudního lékařství a toxikologie, LF UK a VFN v Praze 2

mbali@lfl.cuni.cz

Převládající spektrum nox objevujících se v laboratořích klinické a forenzní toxikologie jsou organické látky, a sice kromě alkoholu jsou to zejména léčiva a ilegální návykové látky – drogy. Abuzus drog je současným tíživým společenským problémem po celém světě.

Informace o konzumaci drog vyšetřovanou osobou mohou být vyžadovány z různých důvodů – diagnostických, preventivních, kontrolních, ale i forenzních. Potřebné informace jsou pak získávány chemicko-toxikologickým vyšetřením odebraných biologických vzorků, přičemž expozice člověka škodlivinám může nastat za různých okolností, např.:

- úmyslnou či náhodnou aplikací, konzumací,
- podáním jiné osobě,
- během vývoje embrya v průběhu těhotenství,
- pasivní inhalací či jinou expozicí.

Rozsah dostupných informací o konkrétním vyšetřovaném případě bývá variabilní, vyslovená podezření jsou jen podezření a musí být rádně prokázána, nebo vyvrácena objektivním způsobem. V daném případě je velmi kritická volba, které biologické vzorky by měly být vyšetřovány toxikologickými analýzami a jak by měly být tyto analýzy zaměřeny.

Volbu adekvátního vzorku pro daný úkol ovlivňují mj. principy, které řídí dispozici nox v testovaných vzorcích. Faktory, které ovlivňují transport a výskyt nox v parentní či metabolické formě v jednotlivých částech těla, jsou především:

- fyzikálně-chemické vlastnosti noxy
- způsob aplikace noxy
- velikost dávky, trvání a frekvence expozice
- distribuční a metabolické procesy
- doba uplynulá mezi dávkou a odběrem vzorku

Vlastnosti noxy, které řídí její výskyt v konkrétním biologickém vzorku jsou zejména:

- těkavost
- polarita
- ionizovatelnost v daném prostředí, pH tkání, hodnota pK_a drogy
- stupeň vazby na bílkoviny

Způsob podání a fyzikálně-chemické vlastnosti noxy určují rychlosť absorpce do krevní cirkulace a průchod biologickými bariérami. Distribuce do jednotlivých tkání a tekutin začíná, jakmile se droga objeví v krvi. Transportovaný podíl do tkání má vztah k prokrvení tkání, k jejímu charakteru, k polaritě noxy a k vazbě na plazmatické bílkoviny. Jen volná nevázaná frakce drogy je převáděna z krve do jiných tkání či tekutin. Proces, který ovládá přestup noxy buněčnými membránními je zejména pasivní difuze řízená koncentračním gradientem volné frakce drogy. Během distribuční fáze se droga může akumulovat různou měrou v různých tělesných místech (kompartimentech). Nakonec je dosaženo pseudorovnováhy mezi všemi kompartmenty a koncentrace začnou klesat, jak

nastává eliminační fáze. Droga je odstraňována z různých kompartmentů různě rychle a s podobnou rychlostí, s jakou se v nich objevovala. Velmi prokrvené tkáně budou očištěny nejdříve, zatímco méně prokrvené tukové tkáně zadržují drogy déle. Podobně se děje v malých kompartmentech, jako jsou slinné žlázy, kde je droga eliminována podobnou rychlosí jako z krve. Gradient pH mezi krví a tkáněmi je také důležitý pro inkorporaci nox. Z tohoto důvodu je např. výhodný přestup bazí z krve do slin na rozdíl od látek kyselé povahy. Podobně je výhodný prostup bazí placentární bariérou do vyvíjejícího se embrya, kde noxy mohou vytvářet depo ve vyvíjejícím se zažívacím traktu, v tzv. meconiu, které lze krátce po porodu zajistit jako novorozeneckou smolkou. V některých tkáních zůstává droga vázana irreverzibilně – např. ukládání do vlasů či nehtů. Eliminace z těla v tomto případě je odrůstání vlasů. Při opakovaném podání noxy se procesy absorpce, distribuce a eliminace opakují. Jestliže je interval mezi opakovanými dávkami krátký, může nastat akumulace původní formy či metabolitů, a to přednostně v některých kompartmentech. Účinná složka konopných drog, delta-9-⁻tetrahydrocanabinol (9-THC), je např. rychle odstraňována z krve a slin, ale její metabolit se může hromadit a dlouho zadržovat v tukových tkáních zejména při chronických aplikacích.

Časový detekční interval po aplikované dávce drogy, tzv. detekční okno, potom závisí na analytických parametrech použité metody, na její detekční mezi pro konkrétní analyt, a časové možnosti detekce v různých biologických vzorcích po aplikaci je možné zhruba generalizovat dle následující tabulky:

Detekční okno	Vzorek
hodiny	krev, sliny
dny	moč, stolice
týdny, měsíce	meconium, vlasy, nehty

Toxikologická měření paralelně v různých biologických vzorcích poskytují soubor informací významných také pro interpretaci nálezů s možnými dopady pro jedince. Např. přítomnost metabolitu benzoylegoninu v moči řidiče indikuje konzumaci kokainu, ale není důkazem, že by osoba byla pod vlivem kokainu v době odběru moče. Naproti tomu přítomnost kokainu či benzoylegoninu v krvi či slinách dokazuje přímo nedávnou konzumaci kokainu, a podle některých legislativních úprav dokazuje přímo existenci ovlivnění schopností řidiče psychoaktivní látkou při kontrole v době odběru krve či slin. Testy drog ve vlasech zase umožňují monitorovat potencionální konzumaci drog v minulém čase a doplňují potřebné informace o životním stylu osoby, živé či zemřelé, které lze využít mj. ve forenzním rozhodování. Pozornost neonatologů může být upřena na zjištění příčin patologických projevů novorozence a vyšetření případné expozice drogám během těhotenství, a sice pomocí toxikologických analýz v meconiu. Při podezřelé anamnéze nemusí za každých okolností analýza moče dítěte i matky objasnit příčinu potíží.

Odběr alternativních vzorků má některé přednosti:

- je neinvazivní (srov. krev)
- nevyžaduje intimní prostředí (srov. moč)
- je pod dohledem (vylučuje nežádoucí manipulace se vzorkem)

Vypracování a i modifikace toxikologických metod pro jednotlivé matrice musí zahrnovat stabilitní a validační studie. Např. kokain, heroin snadno hydrolyzují, a to během skladování i zpracování vzorku. Chemické složení každé matrice vyžaduje speciální extrakční postupy, zavedení speciálních čisticích kroků odstraňujících rušivé balasty, zajištění dostatečné extrakční účinnosti a tím

dosažení žádoucího nízkého limitu detekce toxikologické metody. Problémem zůstává kvantitativní stanovení u pevných matric jako jsou vlasy z důvodů absence autentických vlasových standardů se známým obsahem navázaných analytů, kdy nelze zcela ověřit účinnost extrakčních postupů. Získané výsledky pak mají význam spíše relativní a naznačují spíše trendy stoupající či klesající expozice v uplynulém čase.

Doporučená literatura

1. M. Balíková: Klinická a forenzní toxikologie, Galén 2007 Praha (ISBN 978-80-7262-284-9).
2. M. Balíková a kol.: Hair analyses for drug abuse and forensic applications. Chemické listy 101(S), 2007, s84-s87.
3. F. Pragst, M. Balíková: State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. Clin. Chim. Acta 370, 2006, 17-49.
4. S. B. Karch, ed.: Drug Abuse Handbook, CRC Press, Boca Raton 1998 (ISBN 0-8493-2637-0).

15. PŘÍNOS MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH METOD

prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

16. MITOCHONDRIÁLNÍ GENOM, CHOROBY S NÍM SPOJENÉ, ÚSKALÍ A SPECIFIKA

prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.

Texty těchto kapitol nebyly bohužel dodány.

17. MOŽNOSTI ELEKTROCHEMICKÝCH METOD V KLINICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ ANALÝZE

prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.,

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie,

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí

Barek@natur.cuni.cz

17.1 Úvod

Klinická a toxikologická analýza má zejména v oblasti analýzy různých typů biologických materiálů celou řadu specifik, které musí analytické metody plně respektovat, mají-li se v této oblasti uplatnit. Není vždy jednoduché nalézt nevhodnější metodu pro daný účel, tj. pro stanovení konkrétního analytu v konkrétní matrici v přítomnosti daných interferentů a v požadovaném koncentračním rozmezí při co nejnižší ekonomické a časové náročnosti a minimální pracnosti. A je výhodné moci při hledání takovéto metody vybírat z co nejsířšího spektra moderních analytických metod. Tato úvaha nás vedla k zařazení problematiky moderních elektroanalytických metod do tohoto kursu, i když jsme si vědomi obrovského potenciálu dnes převládajících moderních separačních a spektrometrických metod. Přesto však v oblasti klinické a toxikologické analýzy existují úkoly, které jsou schopné řešit moderní elektrochemické metody, a to při podstatně nižších pořizovacích i provozních nákladech než metody separační či spektrometrické, a přitom s dostatečnou citlivostí, selektivitou a rychlostí. Jako příklad lze uvést potenciometrické měření pH, využití iontově selektivních elektrod, vodivostní kontrolu kvality deionizované vody či osobní elektrochemické analyzátoru pro stanovení glukosy. Citlivost moderních polarografických a voltametrických metod je předurčuje pro stopovou analýzu elektrochemicky aktivních látek významných z hlediska klinické a toxikologické analýzy a jejich spojení s moderními separačními metodami (vysokoúčinná kapalinová chromatografie či kapilární zónová elektroforéza s elektrochemickou detekcí) může přinést i požadovanou selektivitu. Kombinace průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí pak umožnuje tolik žádané zkrácení doby analýzy. V této kapitole bude i s hledem na výzkumné zaměření autora pozornost zaměřena hlavně na využití moderních polarografických a voltametrických metod v klinické a toxikologické analýze a na jejich kombinaci s moderními separačními metodami.

Elektroanalytické metody se uplatňují ve všech fázích týkajících se jak výzkumu a vývoje léčiv, jejich výroby a kontroly čistoty, tak při studiích mechanismů účinku a metabolických přeměn léčiv. Zatímco při kontrolách čistoty léčiv či analýze metabolických produktů jsou spíše využívány chromatografické a spektrometrické metody, při vývoji nových léčiv a modelování jejich možného metabolického osudu a mechanismu účinku jsou vzhledem ke své podstatě často využívány i moderní polarografické a voltametrické metody. Jednou z důležitých oblastí farmaceutického výzkumu je studium biotransformace léčiv, které je ovšem *in vivo* značně složité a obtížné. Proto se v prvním přiblížení využívá jednodušších modelů *in vitro*, mezi něž patří i elektrochemický model první fáze biotransformace, který je založen na podobnosti oxidačně-redukčních reakcí na elektrodě s oxidačně-redukčními enzymatickými reakcemi v živém organismu.

Z hlediska klinické analýzy je významné i využití iontově selektivních elektrod (ISE), které jsou součástí řady komerčně vyráběných lékařských přístrojů, kde se uplatňují při analýze elektrolytů (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , H^+ , Cl^-). Výhodou ISE je možnost kontinuálního měření v průtokovém uspořá-

dání, což umožňuje sledovat zároveň několik analytů, a dále možnost jejich miniaturizace, čímž lze dosáhnout snížení objemu potřebného vzorku řádově na desítky mikrolitrů, nebo konstruovat ISE s hrotem o průměru menším než 1 μm pro intracelulární měření. V této souvislosti jistě stojí za zmínku i využití mikroelektrod pro voltametrická intracelulární měření. Své místo při analýze klinického materiálu nacházejí i potenciometrické biosensory k detekci plynů (CO_2) či biologicky aktivních látek (močovina, glukosa, aminokyseliny). Dalším často řešeným problémem je stanovení stopových množství kovů v klinickém materiálu, kdy moderní voltametrické metody umožňují dosažení srovnatelných mezí stanovitelnosti s atomovou adsorpční spektrometrií za podstatně nižších pořizovacích a provozních nákladů. Další výhodou voltametrických technik je možnost přímého měření v terénu.

Za hlavní výhody polarografických a voltametrických metod lze považovat toto:

- Mají široký koncentrační rozsah, od řádově 10^{-3} mol L⁻¹ v případě DC-voltametrie až po 10^{-11} mol L⁻¹ v případě adsorpční rozpouštěcí voltametrie (viz tab. 17.1)
- Vyhovují pro široký rozsah analytů (anorganické i organické látky, organokovy, biologické makromolekuly atd.).
- Pořizovací a provozní náklady jsou nízké.
- Metody bývají velmi rychlé a snadno automatizovatelné.
- Molekula analytu je přímo zdrojem signálu, na rozdíl např. od spektrometrických metod, kde je nutné vhodným způsobem nejprve převést elektromagnetické záření na elektrický proud.
- Představují nezávislou alternativu, což je důležité z právního hlediska, neboť důkaz přítomnosti nějaké látky „nade vší rozumnou pochybnost“ vyžaduje použití několika navzájem nezávislých metod.
- Mají určitou inherentní selektivitu, neboť ne všechny sloučeniny jsou elektrochemicky aktivní; lze např. selektivně stanovit elektrochemicky redukovatelné nitrované deriváty polycylických aromatických uhlovodíků či elektrochemicky oxidovatelné aminoderiváty polycylických aromatických uhlovodíků v přítomnosti inaktivních matečných sloučenin.

Tab. 17.1: Koncentrační rozmezí dosažitelné pomocí vybraných polarografických a voltametrických technik

Technika a elektroda	Horní mez použitelnosti, mol L ⁻¹	Dolní mez použitelnosti, mol L ⁻¹
Klasická DC-polarografie na DME	10^{-3}	10^{-5}
Diferenční pulsní polarografie na DME	10^{-3}	10^{-7}
Diferenční pulsní voltametrie na HMDE	10^{-3}	10^{-8}
Anodická rozpouštěcí voltametrie na HMDE	10^{-6}	10^{-10}
Adsorpční rozpouštěcí voltametrie na HMDE	10^{-6}	10^{-11}

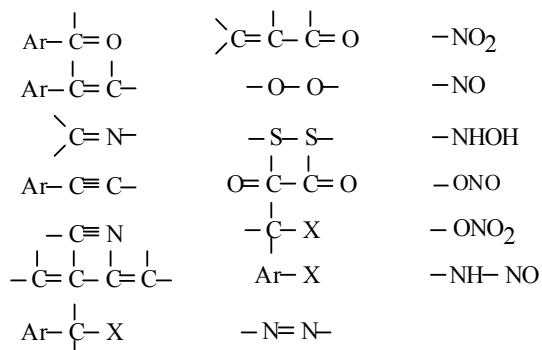
DME – klasická rtuťová kapající elektroda; HMDE – visící rtuťová kapková elektroda

Za hlavní nevýhodu polarografických a voltametrických metod lze považovat vyšší personální požadavky, neboť úspěšná aplikace těchto technik vyžaduje větší zkušenosti a znalosti nežli aplikace např. jednoduché spektrofotometrie ve viditelné oblasti. Podrobnější rozbor této problematiky lze nalézt ve skriptech [1,2].

17.2 Moderní polarografické a voltametrické metody v analýze léčiv a jejich metabolitů

Vrchol využití polarografických metod v analýze léčiv spadá do 50. let minulého století [3]. Přes pozdější útlum těchto metod lze i v moderní literatuře nalézt řadu jejich úspěšných aplikací [4]. Zatímco klasická polarografie je svou citlivostí omezena v podstatě na analýzu farmaceutických připrátů, kterou lze ve většině případů provést i poměrně jednoduchými spektrometrickými či chromatografickými metodami, její moderní modifikace jsou použitelné i ke stanovení stopových množství léčiv či jejich metabolitů v tělních tekutinách [5-8]. Pro stanovení jedné konkrétní látky (at' už výchozího léčiva, či jeho metabolitu) lze často najít vhodnou kombinaci poměrně jednoduché předběžné separace (extrakce, tenkovrstvá chromatografie, extrakce tuhou fází) s dostatečně citlivým polarografickým či voltametrickým stanovením (nejčastěji diferenční pulsní polarografií či adsorpční rozpouštěcí voltametrií) umožňující stanovení jejich submikromolárních koncentrací i v tak složité matrici, jakou je moč, krev či krevní plasma [9]. Pro stanovení léčiv či jejich metabolitů obsahujících elektrochemicky redukovatelné funkční skupiny, jejichž přehled uvádí tab. 17.2, zůstávají nejhodnější rtuťové elektrody, zejména ve spojení s pulsními technikami. Ke stanovení léčiv či jejich metabolitů obsahujících anodicky oxidovatelné funkční skupiny (např. skupina $-OH$ či $-NH_2$ na aromatickém či heterocyklickém jádře nebo skupina $-SH$) se dnes nejčastěji používají buď tuhé elektrody na bázi skleněného uhlíku, nebo uhlíkové pastové elektrody [10], jejichž hlavní výhodou je možnost snadného obnovení pasivovaného povrchu pouhým vytlačením pasty z těla elektrody a jejím otřením.

Tab. 17.2: Přehled polarograficky redukovatelných funkčních skupin využitelných v analýze léčiv a jejich metabolitů



aldehydy, ketony, heterocyklické sloučeniny obsahující O, S či N s násobnými vazbami, alkaloidy, vitaminy, hormony, steroidy, sacharidy

Značná pozornost je v této souvislosti v poslední době věnována borem dopovaným diamantovým filmovým elektrodám, jejichž parafinický povrch je poměrně rezistentní vůči pasivaci adsorbovanými interferenty či produkty elektrodové reakce, vykazuje mimořádně široké potenciálové okno a nízký šum, umožňující snadné dosažení submikromolárních mezí stanovitelnosti [2]. Zde je na místě připomenout, že řada léčiv obsahujících aromatický či heterocyklický systém je metabolicky transformována právě zavedením skupiny $-OH$, jejíž polarita umožňuje vylučování metabolitu močí. Tím se nabízí možnost voltametrického stanovení řady metabolitů v moči, krvi či krevní plazmě. Ještě častěji se využívá možnosti snadného stanovení těchto metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí, popř. pomocí kapilární zonové elektroforezy s elektrochemickou detekcí.

Navzdory zažitým představám však i moderní polarografické a voltametrické metody ve vsádkovém uspořádání vykazují určitou selektivitu, neboť všechny sloučeniny významné z hlediska klinické a toxikologické analýzy nejsou elektrochemicky aktivní, takže lze např. selektivně stanovit elektrochemicky redukovatelné karcinogenní nitrované deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků či elektrochemicky oxidovatelné karcinogenní aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků v přítomnosti inaktivních matečných sloučenin. Totéž platí o elektrochemické detekci elektrochemicky aktivních metabolitů polycyklických aromatických uhlovodíků obsahujících skupinu $-OH$ na aromatickém jádře, které jsou často využívanými indikátory expozice těmto karcinogenům, které neinterferují, neboť sami o sobě nejsou elektrochemicky aktivní. Některá polarografická či voltametrická stanovení lze provádět přímo v celé krvi, jejíž barevnost či turbidita znemožňuje využití spektrofotometrických metod.

Z praktického hlediska je nejdůležitější podmínkou úspěšného stanovení nalezení vhodných podmínek pro provedení polarografické či voltametrické metody při níž musíme optimálně zvolit:

- **Vhodnou pracovní elektrodu.** Při práci se složitějšími matricemi, kde hrozí zvýšené nebezpečí pasivace, jsou vhodnější elektrody s obnovovaným povrchem (klasická rtuťová kapková elektroda či statická rtuťová kapková elektroda). Naproti tomu při potřebě co nejvyšší citlivosti a nutnosti předběžné akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody je nutné pracovat s rtuťovou filmovou elektrodu či visící rtuťovou kapkovou elektrodou.
- **Vhodnou techniku.** Pro přímá stanovení do koncentrací řádově 10^{-7} mol l⁻¹ se dnes nejčastěji používá diferenční pulsní polarografie, pro nižší koncentrace anodická rozpouštěcí voltametrie či adsorpční rozpouštěcí voltametrie.
- **Vhodné prostředí a podmínky.** Tisíce návodů na polarografické či voltametrické stanovení nejrůznějších léčiv a jejich metabolitů a látek významných z toxikologického hlediska lze najít v bohaté řadě monografií, přehledných referátů i původních prací, z nichž jen nepatrny zlomek je citován v tomto článku. Za připomenutí stojí i řada firemních manuálů.
- **Vhodné podmínky pro předběžnou úpravu vzorku.** Předběžná separace či prekoncentrace stanovované látky je ve většině případů nezbytná. Je však nutno si uvědomit, že podobná předběžná příprava je zpravidla nutná i u spektrometrických či separačních metod.
- **Vhodný způsob vyhodnocování výšky vlny či píku, konstrukce kalibrační závislosti atp.**

Rozhodně lze konstatovat, že k dnešnímu dni ve světové odborné literatuře existuje dostatek informací umožňující tato optimální rozhodnutí pro stanovení obrovského množství léčiv či jejich metabolitů, a tím i možnost širokého používání moderních polarografických a voltametrických metod v této oblasti.

18.3 Moderní polarografické a voltametrické metody v analýze chemických karcinogenů

Chemické karcinogeny jsou další skupinou látek, jejichž elektrochemickou aktivitu lze snadno využít k jejich citlivému stanovení i v poměrně složitých biologických či environmentálních matricích. Přehled elektrochemicky aktivních chemických karcinogenů lze najít v článku [11], kde jsou detailně diskutovány i moderní elektroanalytické metody použitelné k jejich stanovení v různých environmentálních a biologických matricích. Jako příklad lze uvést plarografické či voltametrické stanovení řady elektrochemicky snadno redukovatelných nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodí-

ků, z nichž mnohé patří mezi nejsilnější dosud testované mutageny, nitrované heterocyklické sloučeniny, *N*-nitrosaminy, genotoxické deriváty azobenzenu atp. Do této skupiny svým způsobem patří i řada protinádorových léčiv s prokázanými gentoxickými účinky. Jako příklad lze uvést Doxorubicin či Daunorubicin, obsahující redukovatelný anthrachinonový systém, nebo Carmustin, Semustim, Lomustin, Streptozotocin či Chlorozotocin, obsahující snadno redukovatelnou skupinu –NO. V případě Methotrexatu a Dichlormethotrexatu či Vincristinu a Vinblastinu lze naopak využít jejich snadné anodické oxidovatelnosti na vhodné tuhé či pastové elektrodě. Přímé stanovení např. pomocí diferenční pulsní voltametrie v jednodušších matricích typu pitné vody poskytuje mez stanovitelnosti v oblasti submikromolárních koncentrací, avšak jeho selektivita zpravidla nepostačuje pro složitější biologické matrice. Předběžná separace stanovované látky pomocí kapalinové extrakce či pomocí dnes upřednostňované extrakce tuhou fází podstatně zvyšuje selektivitu stanovení a navíc může využít i prekoncentračního efektu k posunu meze stanovitelnosti do oblasti nanomolárních či subnanomolárních koncentrací. Za zmínu stojí i použitelnost moderních elektroanalytických metod ke sledování účinnosti dekontaminace pracovišť yabývajících se nebezpečnými protinádorovými léčivy či jinými typy chemických karcinogenů. Stejně jako v případě analýzy léčiv a jejich metabolitů je i v případě chemických karcinogenů nutné na základě dříve uvedených zásad zvolit optimální podmínky pro jejich polarografické či voltametrické stanovení.

18.4 Kombinace elektroanalytických a průtokových měření.

V poslední době je i v oblasti klinické a toxikologické analýzy věnována zvýšená pozornost využití elektroanalytických metod v průtokových systémech [2,12,13]. Hlavní důvody lze shrnout do následujících bodů:

- potřeba kontinuálních analýz,
- snaha o zrychlení analýz přechodem z vsádkového na průtokový systém,
- snaha o zvýšení selektivity kombinací elektrochemické detekce s předchozí separací pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie či kapilární zonové elektroforézy

Kromě konduktometrické detekce diskutované ve skriptech [2] se při průtokových měřeních často používá i detekce ampérometrická. Při této technice je koncentrace analytu vyhodnocována z velikosti proudu procházejícího pracovní elektrodou při konstantním potenciálu. Ten je zpravidla zvolen tak, aby elektrodou procházel limitní proud daného analytu. Pro úspěšnou funkci elektrochemického detektoru je důležitý objem a geometrické uspořádání průtokové cely, v níž je umístěna pracovní elektroda. V průtokových analytických metodách (průtoková injekční analýza, kontinuální průtoková analýza či sekvenční injekční analýza) a zejména ve vysokoúčinných separačních metodách (vysokoúčinná kapalinová chromatografie či kapilární zónová elektroforéza) vycházejí separované látky z dělícího systému v úzkých zónách. Objem detekčního prostoru elektrochemického detektoru by tudíž teoreticky neměl převyšovat objem odpovídající teoretickému patru, aby detektor minimálně přispíval k rozmyvání úzkých zon separovaných analytů. Základní typy amperometrických detektorů, které jsou podrobně popsány např. ve skriptech [2] či v monografii [12] jsou:

- tenkovrstvý (thin layer) detektor,
- wall-jet detektor,
- tubulární detektor,
- porézní detektor,
- mikrocylindrický detektor.

Konstrukce detektoru pochopitelně závisí i na charakteru a materiálu použité pracovní elektrody, přičemž zejména rtuťové elektrody vyžadují speciální uspořádání, která se poněkud vy-myká výše uvedené klasifikaci. Je však třeba po pravdě přiznat, že malá uživatelské přívětivost kombinace průtokových měření se rtuťovými elektrodami neumožnila její širší rozšíření, na rozdíl od komerčně velmi úspěšných elektrochemických detektorů pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii na bázi tuhých či porésních elektrodových materiálů.

Z elektrodových materiálů se dnes nečastěji používají různé formy uhlíku, zejména skelný uhlík či borem dopovaný diamant, kovy (např. platina či zlato, popř. měď vhodná k elektrochemické detekci aminokyselin, které s ní tvoří stabilní komplexy). Perspektivní se zdá být využití různých typů uhlíkových past se snadno obnovitelným povrchem. I když problémy s pasivací v průtokových systémech bývají zpravidla menší nežli při vsádkovém uspořádání, v řadě případů je nutné eliminovat je elektrochemickou předúpravou používané pracovní elektrody.

Zatímco průtoková injekční analýza s elektrochemickou detekcí je nejčastěji používána v analýze léčiv a lékových forem, kde důležitější roli nežli selektivita a citlivost stanovení hráje rychlosť a cena analýzy, moderní separační metody s elektrochemickou detekcí mohou být s úspěchem použity i pro stanovení submikromolárních koncentrací nejrůznějších elektrochemicky aktivních látek (léčiv a jejich metabolitů, indikátorů expozice atp.) neboť jsou dostatečně citlivé i selektivní, byť instrumentálně, časově i ekonomicky náročnější

18.5 Závěr

Značná rozmanitost problémů stojících před klinickou a toxikologickou analýzou vyžaduje stejnou rozmanitost metod používaných pro jejich optimální řešení. Přes obrovský potenciál současných spektrometrických a separačních metod je zřejmé, že moderní elektroanalytické metody mohou v řadě případů představovat alternativu schopnou konkurence. Není totiž vždy nutné používat tu nejúčinnější – a tím pádem i ekonomicky náročnější – metodu, ale stačí nalézt metodu právě vhodnou pro daný účel (*„fit for the purpose method“*), která splňuje všechny požadavky a přitom není „předimenzovaná“, což se může negativně odrazit v pořizovacích či provozních nákladech. Lze důvodně předpokládat, že moderní voltametrické a amperometrické metody se budou dále rozvíjet a uplatňovat z důvodů ekonomických (nízké pořizovací i provozní náklady), vzhledem k analytickým parametrům (pro řadu případů postačující selektivita, široký lineární dynamický rozsah a mimořádně nízké meze stanovitelnosti a meze detekce), z legislativních důvodů (z právního hlediska bude ve sporných případech požadována analýza několika nezávislými analytickými metodami) a vzhledem k možnosti miniaturizace, která bude stále potřebnější zejména v souvislosti s detekcí v průtokových systémech (kapilární elektromigrační metody, mikrokapalinová chromatografie, separace na čipu či dokonce laboratoř na čipu „*lab on chip*“). Za velmi perspektivní je třeba považovat oblast elektrochemických senzorů, která je podrobně diskutována např. ve skriptech [14].

Poděkování

Řada zda diskutovaných poznatků byla získána v rámci výzkumu podporovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035 a MSM 0021620857).

Literatura

1. Barek J., Opekar F., Štulík K.: Elektroanalytická chemie. Karolinum, Praha 2006.
2. Barek J. a kol.: Možnosti inovací v elektroanalytické chemii. Pražské analytické centrum inovací. Praha 2006.
3. Zuman P.: Polarografie v lékařství, farmacii a biochemii. Zdravotnické nakladatelství, Praha 1953.
4. Smyth, M. R.; Vos, J. G. *Analytical Voltammetry*; Elsevier: New York, 1992.
5. Volke J.: Bioelectroche. Bioenerg. 10, 7 (1983).
6. Smyth W.F.: CRC Crit.Rev.Anal.Chem. 18,155 (1987).
7. Patriarche G.J., Vire J.C.: Anal. Chim. Acta 196, 193 (1987).
8. Bersier P.M.: J.Pharm.Biomed.Anal. 1, 475 (1983).
9. Fogg A.G.: Anal.Proc. 387 (1981).
10. Švancara I., Vytrás K., Barek J., Zima J.: Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. Crit. Rev. Anal. Chem. 31(4), 311-345 (2001).
11. Barek J., Mejstřík V., Muck A., Zima J.:Polarographic and Voltammetric Determination of Chemical Carcinogens. Crit.Rev.Anal.Chem. 30(1),37-57 (2000).
12. Štulík K., Pacáková V.: Elektroanalytická měření v proudících kapalinách. SNTL, Praha 1989; Electroanalytical Measurements in Flowing Liquids. E. Horwood, Chichester 1987.
13. Tóth K., Štulík K., Kutner W., Fehér Z., Lindner E.: Electrochemical Detection in Liquid Flow Analytical Techniques: Characterization and Classification. Pure Appl. Chem. 76, 1119 (2004).
14. Štulík K., Barek J. a kol.: Senzory. Pražské analytické centrum inovací. Praha 2007.

18. VYUŽITÍ UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD V ANALÝZE LÉČIV A TOXICKÝCH LÁTEK

doc. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie,

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí

zima@natur.cuni.cz

18.1 Úvod

Uhlíkové pastové elektrody byly zavedeny do analytické chemie profesorem Ralphem N. Adamsem v roce 1958¹, tedy přesně před 50 roky. Původním zámyslem bylo ze směsi uhlíkového prášku a organické kapaliny nemísitelné s vodou vytvořit obdobu tehdy běžně používané rtuťové kapkové elektrody, která by byla vhodná ke sledování procesů oxidačních. Tento záměr sice nevyšel, ovšem po zvýšení podílu uhlíku ve směsi vznikl pastovitý materiál, jehož příznivé vlastnosti jsou v anorganické i organické analýze využívány i dnes.

Do dnešního dne bylo vyzkoušeno množství typů uhlíkových prášků, a to od běžných spektrálních prášků přes uhlíkové mikrokuličky až k uhlíkovým nanotrubíčkám. Stejně tak byly jako pastovací kapaliny otestovány nejrůznější kapaliny – organické, anorganické, vodivé, nevodivé. Nejčastěji používanými pastovacími kapalinami jsou minerální oleje, silikonové oleje, parafinové oleje, organofosfáty, nověji iontové kapaliny.

Vývoj v oblasti elektrochemických metod využívajících uhlíkové pastové elektrody v analýze anorganických i organických látek byl v minulosti zpracován v řadě přehledných článků či monografií²⁻⁸, které se podrobně zabývají vývojem od nejjednodušších aplikací nemodifikovaných uhlíkových past, až k moderním biosensorům. Postupně tak došlo k rozvoji chemicky modifikovaných uhlíkových past⁹ a uhlíkových past s přimíšenými enzymy či biologickými tkáněmi¹⁰, které zvyšují selektivitu nově vypracovaných metod stanovení a představují stále velmi nadějnou a perspektivní oblast moderní elektroanalýzy. Kombinuje se zde totiž citlivost elektrochemie se specifitou biologického rozpoznávání.

V posledních letech došlo i na využívání nanočásticových uhlíkových materiálů – uhlíkových nanotrubiček – pro přípravu uhlíkových past¹¹ a dále i na využívání iontových kapalin namísto klasických pastovacích olejů¹². Modifikační činidla (jedno i více činidel) se obvykle přímo rozpustí v pastovací kapalině, nebo se vmíchají do již předpřipravené pasty. Účelem modifikace bývá změna lokálního náboje povrchu, usnadnění či umožnění selektivní adsorpce analytů o konkrétní velikosti molekuly či náboje, umožnění extrakce analytu do pasty a tím zvýšení měřeného signálu, případně využití katalytických efektů pro pomalé reakce. Připravené uhlíkové pasty mají typické složení 1 g práškového uhlíku na 0,5 ml pastovací kapaliny, přičemž u modifikovaných elektrod může množství modifikátoru tvořit 10 až 30 % (*m/m*). Těla elektrod jsou vyráběna převážně z teflonových válečků s vnitřním otvorem o průměru od 1 do 5 mm, ze kterého je pomocí nerezového pístu vytlačován elektrodový materiál. Řada v současnosti používaných typů těl pro pastové elektrody je popsána např. v pracích^{8,13}.

Z elektrochemických metod nejčastěji využívajících uhlíkové pastové elektrody je nutno jmenovat především cyklickou voltametrii (CVA), voltametrii s lineárním nárůstem potenciálu

(LSV), diferenční pulsní voltametrii (DPV), square-wave voltametrii (SWV), elektrochemickou rozpouštěcí voltametrii (ESA), adsorptivní rozpouštěcí voltametrii (AdSV), katodickou rozpouštěcí voltametrii (CSV), rovnovážnou potenciometrii (POT), amperometrii (AMP), chronoamperometrii (CA), chronocoulometrii (CCA), použití CPE jako elektrochemického detektoru v průtokové analýze (FIA) a vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC).

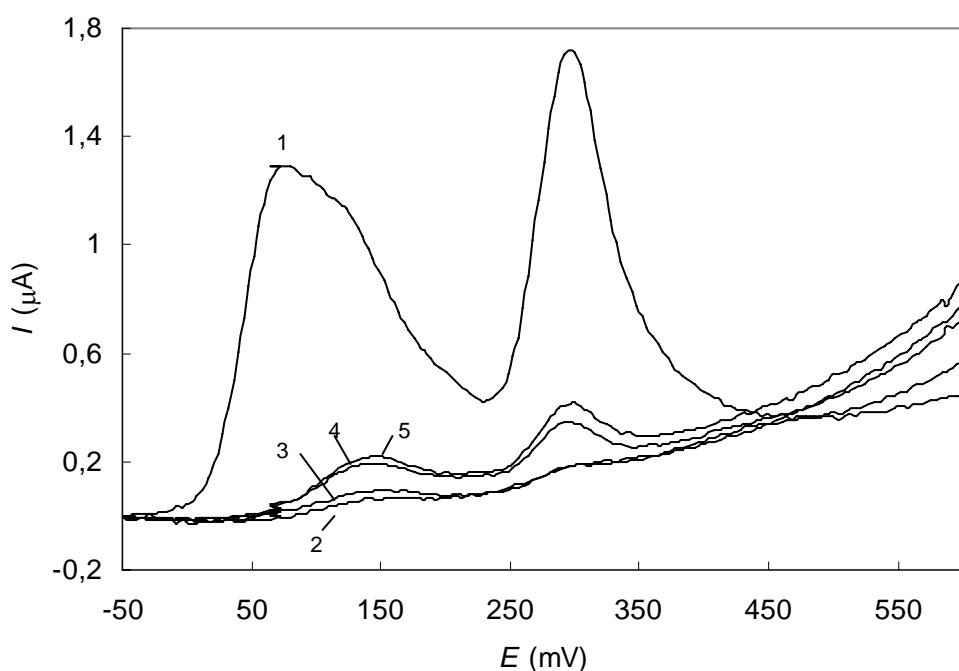
Mezi největší výhody uhlíkových past patří jejich jednoduchá příprava a velmi snadná chemická či biologická modifikovatelnost, nízké kapacitní proudy na těchto elektrodách, snadná obnovitelnost jejich aktivního povrchu i dobrá opakovatelnost a reprodukovatelnost měření. I když se uhlíkové pastové elektrody ve většině případů používají ke studiu oxidačních reakcí – tedy v oblasti kladných potenciálů, je tento materiál využitelný i v oblasti záporných potenciálů, tedy ke studiu redukčních vlastností či ke stanovením založených na redukcích. U redukčních reakcí je však nutné zvolit metodu, kde neruší v pastech či analyzovaných matricích rozpuštěný kyslík. Možnost využít uhlíkové pasty v oblasti kladných i záporných potenciálů jistě zvyšuje selektivitu používaných metod, přesto však není možné takto jednoduše konkurovat metodám separačním, které před vlastní detekcí dokáží stanovované analyty účinně rozdělit. Řešením splňujícím požadavky na vysokou citlivost a vysokou selektivitu nově vypracovaných metod je spojení citlivé elektrochemické detekce se separační účinností HPLC, kde lze běžně konkurovat klasické UV-detekci, a to za nejsrovnatelně nižších investičních nákladů.

Uhlíkové pastové elektrody se ve všech svých výše uvedených formách ukázaly být jako výhodné elektrodové materiály pro vypracování nových metod stanovení vhodných analytů. K počátku roku 2008 lze podle Web of Science i podle citace⁸ (z roku 2006) nalézt více jak 2 000 odkazů na využití uhlíkových past v analytické chemii. Tento příspěvek je zaměřen na využití uhlíkových past v analýze léčiv a farmaceutických produktů i toxických látek v životním prostředí. Analýza různých lékových forem obvykle nečiní problém, neboť tyto formy obsahují velmi často pouze jednu elektrochemicky aktivní účinnou látku, tedy například oxidovatelnou či redukovatelnou sloučeninu v oblastech potenciálů přibližně od -1,2 V do +1,3 V (proti např. Ag/AgCl), a řadu dalších příměsí, plníidel, která vlastní stanovení neruší. Tato situace se však dramaticky mění, máme-li stanovovat nezreagované analyty či jejich metabolické produkty v biologických matricích. Zde již v drtivé většině případů nevystačíme s použitím byť citlivé, avšak málo selektivní vsádkové elektrochemické metody, ale musíme vhodný detekční princip stanovení hledaného analytu zkombinovat například s HPLC, obdobně jako při analýzách polutantů v životním prostředí. Při spojení s HPLC je však nutno vzít v úvahu jednu z negativních vlastností uhlíkových past, kterou je postupné vymývání pastovací kapaliny z pasty účinkem organických modifikátorů mobilní fáze. Zde se však zdá, že použitím mikrokuliček skelného uhlíku^{14,15} lze získat pasty, které lze používat i v mobilních fázích s velmi vysokým procentuálním zastoupením acetonitrilu či methanolu¹⁶.

18.2 Stanovení léčiv

Ve využití uhlíkových pastových elektrod ke stanovení farmaceutických látek převládají jednoznačně aplikace založené na oxidaci. Příspěvky z naší laboratoře z posledních let byly zaměřeny na vypracování nových metod stanovení mitoxantronu¹⁷, doxorubicinu¹⁸, chloramfenikolu¹⁹, thymolu²⁰, ambroxolu²¹, benzokainu²² a benserazidu²³. Mitoxantron (MX) a doxorubicin (DOX) patří mezi antineoplastická léčiva, k jejichž stanovení je vzhledem k jejich vlastnostem třeba mít k dispozici co nejcitlivější metody stanovení. V případě mitoxantronu, který je antineoplastickým léčivem na bázi anthrachinonu, se pomocí DPV na nemodifikované CPE podařilo získat mez detekce $3,4 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹,

při použití CPE jako wall-jet detektoru v HPLC byla vypočtená¹⁷ meze detekce $4,6 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹. Stanovení mitoxantronu pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí je možné využít například pro studium složitých biologických matricí, jako je moč, DPV byla využita ke sledování účinnosti laboratorní destrukce doxorubicinu ultrafialovým zářením v přítomnosti peroxidu vodíku, Obr. 18.1. Ke stanovení doxorubicinu bylo využito a porovnáno mezi sebou několik vsádkových elektrochemických metod, a to LSV, DPV, DPAdSV a DCAdSV¹⁸. Pro přípravu uhlíkových past byl zvolen jednak často využívaný nujol, tak i trikresylfosfát. Vzhledem k silné adsorpce doxorubicinu na povrchu CPE byla nejcitlivější metodou stanovení doxorubicinu DPAdSV, kdy se po akumulaci 120 s podařilo dosáhnout mezi detekce $1,8 \cdot 10^{-9}$ mol l⁻¹ pro pastovací kapalinu nujol a $1,5 \cdot 10^{-9}$ mol l⁻¹ pro pastovací kapalinu trikresylfosfát. Silná adsorpce doxorubicinu na pracovní CPE sice umožnila získat velmi nízké meze detekce, na druhou stranu však vedla k nelineárnímu průběhu kalibračních závislostí při vyšších koncentracích analytu. Metodou HPLC, kde nelze jednoduše využít předběžné akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody, bylo dosaženo meze detekce $2,0 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹.

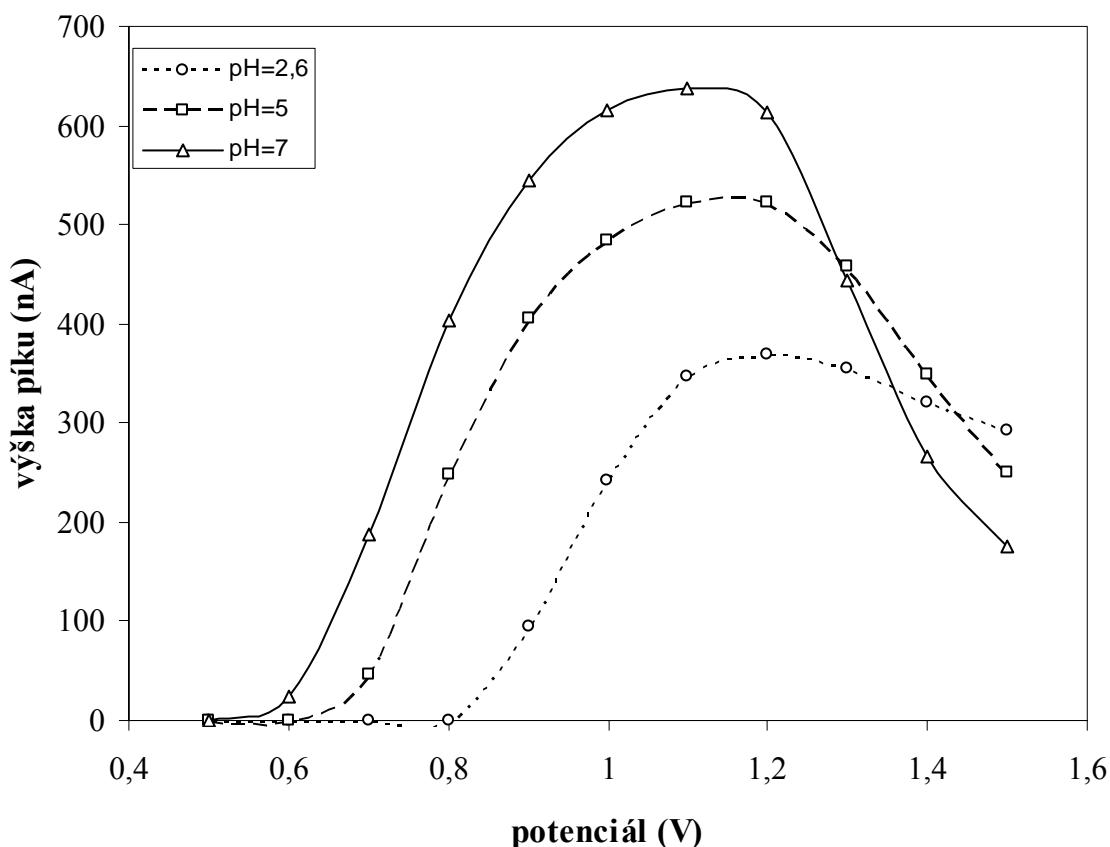


Obr. 18.1: DP-voltamogram MX před destrukcí (1), po 5 hodinách destrukce (2) a s přídavky MX

$c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹; případem 0,25 ml 30% H₂O₂ na 50 ml roztoku
přídavky MX: 1% (3), 2% (4) a 3% (5) původně přítomného množství MX
(proud píku MX $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ již neleží v lineární oblasti kalibrační přímky)

Ke stanovení chloramfenikolu bylo využito snadné redukovatelnosti nitroskupiny na aromatickém jádře, kdy ke stanovení léčiva byly využity metody katodické DC a DP voltametrie¹⁹. Ze stanovovaných roztoků bylo podobně jako u polarografických metod nutno odstraňovat kyslík vytvářející dusíkem, zbavit se kompletně kyslíku obsaženého v uhlíkové pasti však nebylo možné, proto bylo nutno měřit v prostředích, kde nedocházelo k překryvu vlny či píku analytu s vlnou či píkem redukce kyslíku. S využitím adsorpční akumulace analytu na povrchu pracovní elektrody bylo dosaženo pro DPAdSV meze detekce $6 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹. Dříve popsané polarografické metody stanovení chloramfenikolu jsou obecně citlivější, CPE je však elektrodou, která není toxicální.

V případě thymolu, ambroxolu a benzokainu byla věnována pozornost především možnosti stanovení analytů elektrochemickou detekcí na CPE v HPLC. Optimalizace detekce zahrnuje vždy změření hydrodynamických voltamogramů v příslušné mobilní fázi, na základě nichž se volí optimální potenciál detekce. Obecně platí, že čím je tento potenciál nižší, tím je stanovení selektivnější. Použití obecně pozitivnějších potenciálů sice vede k citlivějšímu stanovení, toto je však méně selektivní a pro nízké koncentrace analytů může být komplikováno vyšším šumem základní linie. Příklad naměřeného hydrodynamického voltamogramu je uveden na Obr. 18.2.



Obr. 18.2: Hydrodynamické voltamogramy thymolu vyhodnocené z výšek píků

dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ thymolu v methanolu, mobilní fáze $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ Brittonův-Robinsonův pufr o daném pH : methanol $1 : 9$ (v/v), $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, kolona Lichrospher® RP – 18, $100 - 5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, elektrochemická detekce na CPE

Za optimálních podmínek detekce thymolu byly pro HPLC-ED na CPE proměřeny kalibracní závislosti, výsledky byly porovnány s klasickou UV-detekcí a nově vypracovaná metoda byla ověřena na praktických vzorcích sirupu a pastilek²⁰. Mez detekce thymolu pro HPLC-ED na CPE byla při vloženém potenciálu $+1,1 \text{ V}$ a pH mobilní fáze 7 rovna $2,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

Z mnoha nedávných aplikací CPE ke stanovení léčiv lze vybrat alespoň některé příspěvky, které dobře dokumentují možnosti uhlíkových past ve farmaceutické analýze. Takrin a jeho 1-hydroxysubstituovaný metabolit byly stanoveny pomocí DPV na nemodifikované CPE²⁴. Nalezené meze detekce kolem $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ umožnily bezproblémové stanovení léčiva ve farmaceutických preparátech, ale i ve vzorcích moči v přítomnosti rovněž oxidovatelného metabolitu. CVA, DPV, DPAdSV na CPE a FIA s pracovní CPE byly využity ke stanovení syntetického opioidu buprenorfinu²⁵. Nejcitlivější metodou byla DPAdSV s mezí detekce $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ buprenorfinu.

Stanovení v matrici moče bylo umožněno výměnou elektrolytu po průchodu stanovovaného vzorku a vlastním měření v čistém elektrolytu. Dosud nejnižší mez detekce $9 \cdot 10^{-11}$ mol l⁻¹ pro elektrochemické stanovení hormonu melatoninu²⁶ bylo nalezeno pro AC-voltametrii na CPE s adsorptivní akumulací analytu na povrchu pracovní elektrody. Nízké meze detekce bylo dosaženo především využitím speciálního elektrochemického čištění povrchu pracovní elektrody, předběžnou reakcí analytu na elektrodě, adsorpci produktu této reakce a jeho následného měření. Uhlíkové pastové elektrody modifikované ds DNA byly využity ke stanovení antibakteriálního léčiva pefloxacinu²⁷ pomocí DPAdSV. Akumulace pefloxacinu na ds-DNA-modifikované elektrodě umožnila získat detekční limit $5 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹, a to i pro přímá měření ve vzorcích zředěné moče bez nutnosti mediace prostřednictvím ATP a hořečnatých iontů. Velmi obsáhlá studie možností voltametrických a chromatografických metod pro stanovení avidinu, biotinu je popsána ve sdělení²⁸. Autoři uvádějí femtomolární meze detekce pro avidin a pikomolární pro biotin. Dosažení takto nízkých mezí detekce bylo umožněno přípravou proteinem (avidinem) modifikované elektrody a jeho specifickou reakcí s biotinem. Stanovení je založeno na anodické oxidaci tryptofanových a tyrosinových skupin sledované pomocí metody SWV. Další extrémně citlivé popsané stanovení využívá modifikace složení uhlíkové pasty nanočásticovým hydroxidem lanthanitým²⁹. Mez detekce stanovení mefenamové kyseliny byla $6 \cdot 10^{-12}$ mol l⁻¹. Obrovská citlivost jednoelektronové katalytické oxidace mefenamové kyseliny je přičítána vzniku porézní struktury uhlíkové pastové elektrody. K velkému zvýšení proudu dojde totiž i například při reakci hexakyanoželezitanu draselného, sledované pomocí CVA.

Uhlíkové pastové elektrody, a to především vhodně modifikované, jsou velice výhodným elektrodotovým materiálem, který ve spojení s nějakou běžnou separační metodou umožní stanovovat léčiva nejen v jednoduchých lékových formách, ale i například komplikovaných biologických matričích, kde jsou navíc koncentrace analytu či jeho metabolitu velmi nízké.

18.3 Stanovení toxickejch látek

Využití CPE ke stanovení toxickejch látek je velmi obsáhlé. V tomto příspěvku bude věnována pozornost pouze metodám stanovení vybraných karcinogenů a některých pesticidů a herbicidů. Z naší laboratoře vyšly například příspěvky ke stanovení karcinogenních aromatických aminů^{16,29}. V prvním případě¹⁶ bylo velmi nízkých nanomolárních limitů detekce dosaženo pro HPLC stanovení monoaminoderivátů a diaminoderivátů naftalenu s elektrochemickou detekcí na elektrodě z mikrokuliček skelného uhlíku, které umožňují práci i v prostředích o vyšším obsahu organického modifikátoru. Ve druhém případě²⁹ bylo k podstatnému snížení meze detekce aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků využito modifikace složení CPE cyklodextriny. Ve spojení s adsorptivní akumulací bylo pomocí DPV dosaženo mezí detekce pro jednotlivé analyty v koncentračním rádu 10^{-9} mol l⁻¹.

Velmi zajímavé jsou práce zabývající se biosensory na bázi uhlíkových past. V tomto uspořádání se totiž kombinuje vysoká citlivost elektrochemické metody se selektivitou založenou na inkorporaci enzymů či biologických tkání přímo do past a jejich selektivní reaktivitě.

Pro přímé stanovení organofosfátových nervových činidel Paraoxonu a Methylparathionu byl zkonstruován enzymový biosensor³⁰, jehož mez detekce pro obě látky se pohybovala kolem 20 nmol l⁻¹. Biosensor obsahoval enzym hydrolasu kovalentně navázanou ke skleněným kuličkám. Enzym v průtokovém detektoru obsahujícím modifikovanou uhlíkovou pastu katalyzoval hydrolýzu nitroskupinu obsahujících organofosfátů za vzniku 1,4-dinitrofenolu, který byl detegován při potenciálu +0,9 V (proti Ag/AgCl) na CPE. Rychlá regenerace biosensoru po provedeném měření a zároveň i rychlá odezva umožnily provést 30 měření za 1 hodinu. Biosensor bylo možno při skla-

dování při 4 °C použít i po jednom měsíci od jeho výroby. Totožný princip chemické reakce byl použit i při konstrukci amperometrického mikrobiálního biosensoru pro stanovení organofosfátových pesticidů použitím rekombinantních mikroorganismů coby modifikátorů CPE³¹. Uhlíková pasta obsahovala geneticky upravené buňky (v poměru 10 mg buněk na 100 mg uhlíkové pasty) uvolňující příslušnou hydrolasu. Ze studia vlivu pH na odezvu biosensoru se jako optimální ukázalo být prostředí o pH 7 až 9, což je ostatně typická oblast pro biosensory tohoto typu. Nejvyšší citlivosti a lineárních kalibračních závislostí bylo dosaženo při pH 8,5, ve kterém probíhalo konečné testování. I zde byl anodicky detegován 1,4-dinitrofenol při potenciálu +0,9 V (proti Ag/AgCl). Tento mikrobiální sensor nebyl tak citlivý jako v případě³⁰, meze detekce byly v mikromolárním koncentračním rozmezí. Biosensor však lze při plném uchování citlivosti skladovat až 45 dnů při teplotě 4 °C.

Jiný sensor určený pro stanovení stejné skupiny organofosfátových sloučenin byl popsán v práci³². Tento biosensor je založen na modifikaci CPE pomocí ftalocyaninu dvojmocného železa a spřažení s bienzymatickým systémem obsahujícím acetylcholinesterasu a cholinesterasu, společně imobilizované na dialyzační membráně. Aktivita cholinesterasy je nekompetitivně inhibována v přítomnosti organofosfátových pesticidů. Detekce s acetylcholinem coby substrátem je založena na oxidaci cholinu a následné detekci vzniklého peroxidu vodíku při potenciálu +0,35 V (proti Ag/AgCl). Pokles konstantního proudu substrátu způsobený pesticidem je úměrný jeho koncentraci a využívá se ke konstrukci kalibračních závislostí. Jako optimální prostředí byl zvolen fosfátový puffer o pH 7,5. Autoři uvádějí vynikající citlivost metody s mezí detekce kolem 10 nmol l⁻¹ pro Paraoxon. Měření však byla prodlužována nutnou dobou inkubace asi 30 minut. Skladovatelnost biosensoru v suchém stavu a při 4 °C se uvádí až 6 měsíců (s 98 % původní odezvou biosensoru). Z nedávné doby pochází práce zabývající se konstrukcí biosensoru na základě enzymu tyrosinasy, určeného ke stanovení endokrinního disruptoru bisfenolu³³. Biosensor je určen ke sledování výskytu této nebezpečné látky v pitné a povrchové vodě. Jako optimální složení biosensoru byla zvolena pasta sestávající z 10 % tyrosinasy, 45 % uhlíkových nanotrubiček a 45 % minerálního oleje. Limit detekce byl $2 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹ při době odezvy do 6 minut. Skladovatelnost biosensoru je minimálně 1 měsíc při 4 °C, kdy se uchová 90 % jeho původní aktivity.

18.4 Závěr

Uhlíkové pastové elektrody i 50 let po svém uvedení do analytické chemie stále představují velmi užitečný analytický nástroj, jehož největší výhodou je široká škála možných modifikací složení uhlíkových past a tím pádem možnost „ušití“ složení pasty specificky pro řešený analytický problém. Moderní uhlíkové materiály, využívání katalytických reakcí, využívání citlivých a selektivních biochemických reakcí, počítacové zpracování signálů způsobují, že uhlíkové pasty dnes představují velmi užitečný a mnohotvárný analytický prostředek ke stanovování i opravdu velmi nízkých koncentrací různých anorganických i organických analytů.

Poděkování

Řada zde diskutovaných poznatků byla získána v rámci výzkumu podporovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035 a MSM 0021620857).

Literatura

1. Adams R. N., *Anal. Chem.* **30**, 1576 (1958).
2. Kalcher K., *Electroanalysis* **2**, 419 (1990).

3. Smyth M.R., Vos J.G., *Analytical Voltammetry*, Vol. 27, Elsevier, New York 1992.
4. Kalcher K., Kauffmann J.M., Wang J., Švancara I., Vytrás K., Neuhold C., Yang Z., *Electroanalysis* **7**, 5 (1995).
5. Kissinger P.T., Heineman W.R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York 1996.
6. Wang J., *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed., Wiley-VCH, New York 2000.
7. Švancara I., Vytrás K., Barek J., Zima J., *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31**, 311 (2001).
8. Kalcher K., Švancara I., Metelka R., Vytrás K., Walcarius A., *Encyclopedia of Sensors*, Vol. 4, (C.A. Grimes, E.C. Dickey, M.V. Pishko, eds.), pp. 283-429. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch (California, USA), 2006.
9. Kuwana T., French W. G., *Anal. Chem.* **36**, 241, 1964.
10. Matuszewski W., Trojanowicz M., *Analyst* **113**, 735, 1988.
11. Rubianes M.D., Rivas G.A., *Electrochem. Commun.* **5**, 689 (2003).
12. Liu H., He P., Li Z., Sun C., Shi L., Liu G., Zhu G., Li J., *Electrochem. Commun.* **7**, 1357 (2005).
13. Svancara I., Metelka R., Vytras K., in: *Sensing in Electroanalysis* (Eds: K. Vytras, K. Kalcher), University Pardubice, Pardubice 2005.
14. I. Svancara, M. Hvizdalova, K. Vytras, K. Kalcher, R. Novotny, *Electroanalysis* **8**, 61 (1996).
15. J. Wang, U.A. Kirgoz, J-W. Mo, J. Lu, A.N. Kawde, A. Muck, *Electrochem. Commun.* **3**, 203 (2001).
16. Zima J., Dejmeková H., Barek J., *Electroanalysis* **19**, 185 (2007).
17. Černá P., Diplomová práce, UK v Praze, PřF, Praha 2005.
18. Jemelková Z., Diplomová práce, UK v Praze, PřF, Praha 2005.
19. Pudilová H., Diplomová práce, UK v Praze, PřF, Praha 2006.
20. Zima J., Cienciala M., Barek J., Moreira J.C., *Chem. Anal. (Warsaw)* **52**, 1049 (2007)
21. Švecová M., Bakalářská práce, UK v Praze, PřF, Praha 2007.
22. Vokálová V., Bakalářská práce, UK v Praze, PřF, Praha 2007.
23. Kocourková M., Diplomová práce, UK v Praze, PřF, Praha 2008.
24. Aparicio I., Callejon M., Jimenez J.C., Bello M.A., Guiraum A., *Analyst* **125**, 2016 (2000).
25. Garcia-Fernandez M.A., Fernandez-Abedul M.T., Costa-Garcia A., *Electroanalysis* **12**, 483 (2000).
26. Corujo-Antuna J.L., Martinez-Montequibn S., Fernandez-Abedul M.T., Costa-Garcia A., *Electroanalysis* **15**, 773 (2003).
27. Radi A., El Ries M.A., Kandil S., *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 451 (2005).
28. Kizek R., Masarik M., Kramer K.J., Potesil D., Bailey M., Howard J.H., Klejdus B., Miklova R., Adam V., Trnkova L., Jelen F., *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 1167 (2005).
29. Ferancová A., Korgová E., Labuda J., Zima J., Barek J., *Electroanalysis* **14**, 1668 (2002).
30. Mulchandani P., Chen W., Mulchandani, A., *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2562 (2001).
31. Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A., Wang, J., Chen L. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 433 (2001).
32. Ciucu A.A., Negulescu C., Baldwin R.P., *Biosens. Bioelectron.* **18**, 303 (2003).
33. Mita D.G., Attanasio A., Arduini F., Diano N., Grano V., Bencivenga U., Rossi S., Amine A., Moscone D., *Biosens. Bioelectron.* **23**, 60 (2007).

19. PATOBIOCHEMIE A ANALYTIKA LIPIDŮ

prof. MUDr. Aleš Žák, DrSc., RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta

Eva.Tvrzicka@vfn.cz

19.1 Patobiochemie

19.1.1 Úvod

Lipidy představují heterogenní skupinu látek rozpustnou v organických rozpouštědlech. Z biologického hlediska mezi nejdůležitější lipidy patří cholesterol, triglyceridy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Protože lipidy nejsou rozpustné ve vodném prostředí, je jejich transport v krevní plazmě umožněn spojením se specifickými bílkovinami, apolipoproteiny (apo), za vzniku lipoproteinových (LP) částic. Ty zajišťují stabilitu lipidů ve vodném prostředí a umožňují jejich transport z místa syntézy do míst jejich katabolismu.

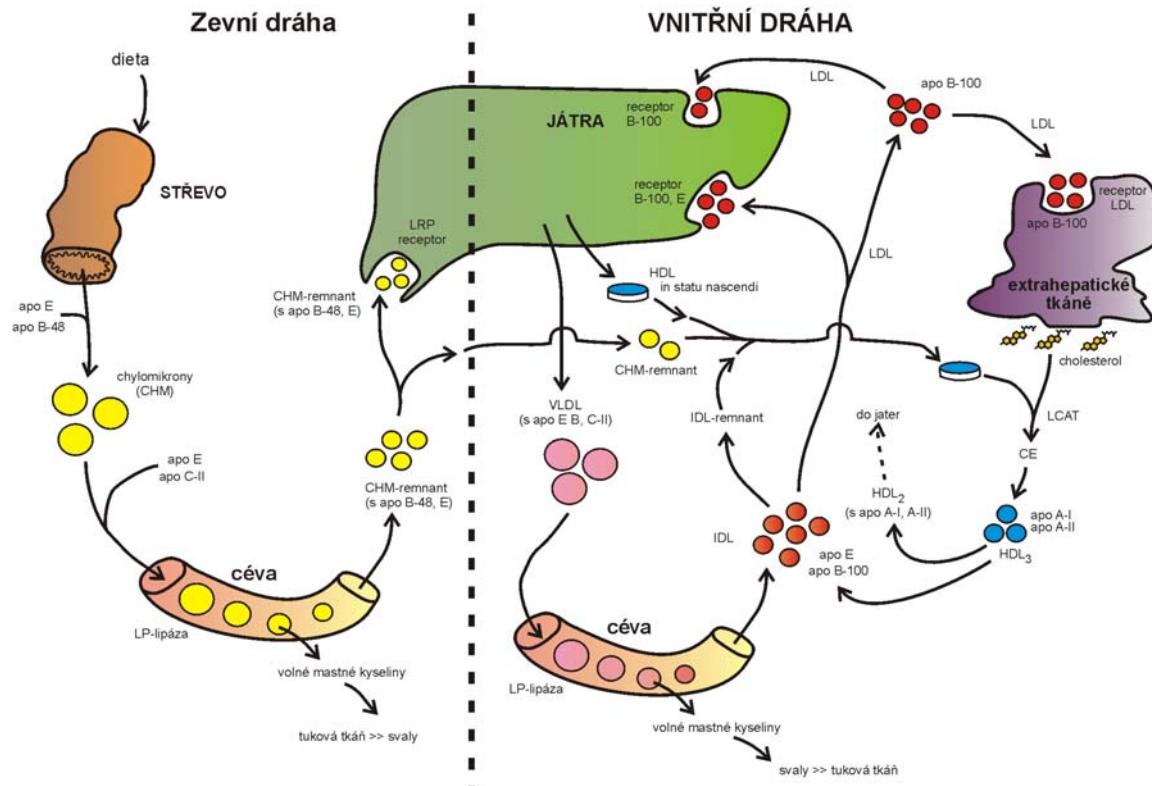
Na základě fyzikálně-chemických vlastnosti, složení a funkce je možné zjednodušeně LP rozdělit do pěti základních tříd, které jsou uvedeny v tab. 19.1. Metabolická přeměna LP v organismu za zachycena na Obr. 19.1.

Tabulka 19.1: Charakteristika základních lipoproteinových tříd

Třída	CM	VLDL	LDL	HDL
Pohyblivost	start	Pre beta	beta	alfa
Hustota (g ml ⁻¹)	≤ 0,94	1,006	1,063	≥1,21
Velikost (nm)	75 až 1 200	28 až 75	28 až 22	7 až 10
Procentový podíl:				
cholesterol	3	17	46	23
triglyceridy	86	55	6	4
fosfolipidy	9	18	23	24
apolipoproteiny	2	10	25	49
Místo syntézy (susbsstrát)	enterocyt	hepatocyt	plasma (VLDL přes IDL)	enterocyt, periferní tkán (CM a VLDL)
Funkce	transport exogen-ních TG	transport endogenních TG	transport CE do periferních tkání	RCT

CM – chylomikrony, VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě (*very low density lipoprotein*), IDL – lipoproteiny o intermediární hustotě, LDL – lipoproteiny o nízké hustotě (*low density lipoprotein*), HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě (*high density lipoprotein*), RCT – reversní transport cholesterolu (*reverse cholesterol transport*)

Pro metabolismus LP existují celkem tři dráhy: první zahrnuje vstřebávání exogenních tuků ve střevě, jejich transport ve formě CM, metabolismus a degradaci dceřinných CM-částic v játrech; ve druhé dráze probíhá transport endogenních lipidů (syntetizovaných *de novo* v játrech) ve formě VLDL, jejich přeměna (přes IDL) na LDL a zánik v periferních tkáních; funkcí třetí dráhy je transport cholesterolu z periferních tkání cestou HDL do jater¹.



Obr. 19.1: Metabolická přeměna lipoproteinů

19.1.2 Poruchy metabolismu lipoproteinů

19.1.2.1 Definice

Hyperlipoproteinémie je stav spojený se zvýšením koncentrace jedné nebo více tříd LP. Podobně hyperlidémie označuje stav spojený se zvýšením koncentrace lipidů. Z celkového cholesterolu (TC, *total cholesterol*) se označuje jako hypercholesterolémie, zvýšení koncentrace triglyceridů (TG) jako hypertriglyceridémie (HTG); zvýšení koncentrace TC i TG se nazývá smíšená hyperlipidémie. Jako dyslipidémie (DLP) se původně označovaly stavy charakterizované poklesem koncentrace HDL-cholesterolu (HDL-C), a to izolované, či v kombinaci s jinou lipidovou či LP-poruchou. Dnes se název hyperlipidémie a dyslipidémie (resp. hyperlipoproteinémie či dyslipoproteinémie) používají jako synonymum. Termín DLP označuje nejen změnu koncentrace TC a/nebo TG, ale současně i přítomnou kvalitativní změnu poměrů lipidů i apo v jejich celém spektru.

Z klinického hlediska se DLP rozdělují na tři skupiny, které jsou uvedeny v tab. 19.2. Všechny typy DLP se mohou kombinovat s normální, zvýšenou, či sníženou koncentrací HDL-C. Dyslipidémie jsou v průmyslově vyspělých zemích v běžné populaci druhou nejčastější metabolickou chorobou (za výskytem abdominální obezity); vyskytují se až u 40 % populace; u osob s klinickými projevy předčasné aterosklerózy jsou poruchy LP-metabolismu častější a podle některých autorů se vyskytují až u 70 % pacientů. Předpokládá se, že zvýšenou koncentraci TC (nad 5,0 mmol l⁻¹) a rizikovou koncentraci (nad 6,50 mmol l⁻¹) má v ČR 30 až 50 % osob².

Tab. 19.2: Současná klasifikace dyslipidémií

Typ hyperlipidémie	Porucha v třídě LP	Příklad nosologické jednotky
hypercholesterolémie	LDL zřídka HDL	familiární hypercholesterolémie polygenní hypercholesterolémie hyperalfafacholesterolémie
hypertriglyceridémie	VLDL zřídka VLDL + CM vzácně izolované CM	familiární endogenní HTG familiární smíšená hyperlipidémie familiární hypercholesterolémie
smíšená hyperlipidémie	VLDL + LDL zřídka IDL	familiární kombinovaná hyperlipidémie HLP III.typu (familiární DLP)

19.1.2.2 Etiologie

V patogeneze DLP se uplatňují tři základní mechanismy:

- (i) zvýšená syntéza C, TG či zvýšené sekrece LP (z enterocytu či hepatocytu),
- (ii) pokles katabolismu LP,
- (iii) porucha remodelace LP.

Častá je kombinace uvedených mechanismů. Dále se rozlišují primární a sekundární DLP; přičemž literatura uvádí, že primárních DLP je většina (60 až 70 %). Jsou to samostatné choroby, v jejichž patogeneze převažují geneticky podmíněné mechanismy. Naproti tomu sekundární DLP, kterých je zhruba 30 až 40 %, jsou důsledkem patogenetického působení některých známých chorob, hormonálních poruch nebo jsou sdruženy s podáváním xenobiotik (nejčastěji léků), které významně ovlivňují metabolismus lipidů a LP. Také překryv mezi těmito dvěma typy DLP je velmi častý, protože k fenotypické manifestaci LP-poruchy dojde nejčastěji u jedinců geneticky predisponovaných, u kterých je porucha zhoršena druhotnou příčinou (přírůstek tělesné hmotnosti, nepříznivé změny příjmu živin, selhání či poškození určitých orgánů či systémů a farmakoterapie). Z praktického hlediska je u každé DLP nutné vyloučit sekundární příčinu^{2,3}.

19.1.2.3 Klinický obraz

Diagnostika DLP nespočívá pouze v laboratorním vyšetření, ale je nutné zevrubné interní vyšetření. Pro posouzení stavu se zaměřujeme v rodinné anamnéze na familiární zátěž z hlediska kardiovaskulárních onemocnění (KVO), hromadných metabolických chorob (obezity, DLP, DM 2. typu). Osobní anamnézu cílíme na symptomy KVO (ICHS i jiné klinické manifestace), příznaky DM a informace nutné k vyloučení sekundárních DLP. Objektivní vyšetření by mělo zahrnovat antropometrická vyšetření (BMI, obvod pasu a boků, event. zjištění podílu tuku), vyšetření šelestů nad srdcem a dostupnými tepnami (aorta, ACC, AFS); vyšetření očí (arcus lipoides cornae), xantelasmat, kůže (eruptivní a tuberoeruptivní xantomata, xantoma striatum palmare) a šlach (šlachové xantomata), vyšetření jater a žlučových cest (hepatomegalie při steatóze a vyšší prevalence cholitiázy u HTG)⁴.

19.1.2.4 Diagnostické metody a diferenciální diagnostika

Základní laboratorní vyšetření zahrnuje stanovení koncentrací lipidů. U nemocných s aterogenní DLP, která představuje DLP komponentu metabolického syndromu (MS) či DM 2. typu, je vhodné vyšetřit koncentrace apo B a non-HDL-cholesterolu (non-HDL-C). Podezření na klinicky asymptomatičkou či subklinickou aterosklerózu se opírá o doplňující vyšetření. Vyloučení sekundární DLP, nález specifických klinických projevů či možné komplikace jsou indikací k vyšetření dalšími specialisty – dermatologem, oftalmologem, gastroenterologem, endokrinologem a nefrologem.

Nedílnou součástí diagnostického postupu a léčby je zhodnocení globálního rizika klinických komplikací KVO⁴.

Doporučená laboratorní vyšetření u DLP:

- celkový cholesterol, triglyceridy, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol;
- apo B, CRP, kyselina močová, glykémie;
- soubor vyšetření k vyloučení sekundárních DLP (TSH, fT4, kortisol v moči, denní profil kortisolémie, jaterní testy, analyty N-metabolismu);
- specifická vyšetření (apo E polymorfismy, ...);
- jaterní testy (AST, ALT, GMT, ALP, bilirubin, cholinesterasa).

Další doporučené metody:

- EKG, zátěžové EKG;
- dopplerovské vyšetření dostupných tepen, IMT (intima-media thickness), FMD (flow mediated dilation);
- ultrazvukové vyšetření břicha;
- angiografické vyšetření.

19.1.2.5 Léčba

Hlavním cílem léčby DLP je snížení rizika klinické manifestace KVO a dalších chorob (především metabolických a zažívacího ústrojí), které mají vztah ke zvýšeným koncentracím specifických lipidů. Cílové koncentrace plasmatických lipidů (v mmol l⁻¹) jsou:

TC	TG	LDL-C	HDL-C	non-HDL-C
≤ 5,0 (4,6)	≤ 1,70	≤ 3,0 (2,6)	≥ 1,0 (muži), 1,30 (ženy)	≤ 3,8 (3,40)

Čiselné údaje v závorce platí pro ICHS a její ekvivalenty.

Léčba DLP je komplexní. Zahrnuje úpravu životního stylu – zanechání kouření, pravidelnou pohybovou aktivitu a úpravy dietního režimu. Nedílnou součástí je léčba modifikovatelných rizikových faktorů (RF) (arteriální hypertenze, obezity/nadváhy, DM). U osob s nadváhou (a viscerální akumulací tuku) či u obezních je nezbytné snížení energetického příjmu a pokles tělesné hmotnosti. Z kvalitativního hlediska má dieta obsahovat do 30 % tuků (stejným dílem nasycených, mononenasycených a vícenenasycených), a denní dávky exogenního cholesterolu do 300 mg, 2 až 3 g fytosterolů, 20 až 30 g vlákniny a 400 g zeleniny a ovoce. Příjem NaCl u jedinců s arteriální hypertenzí by neměl přesahovat 5 g za den. Nedílnou součástí léčby v sekundární prevenci je antiagregační léčba acetylsalicylovou kyselinou^{1,4}.

19.1.2.6 Prognóza

Hyperlipidémie, resp. DLP, je výsledkem interakce genetických faktorů a negenetických činitelů. Neléčená DLP se zpravidla sama nezlepší; s věkem se koncentrace TC i TG zvyšují, riziko KVO roste, dílem nezávisle na zvyšování lipidových koncentrací. Poznatky medicíny založené na důkazech prokázaly, že léčba DLP, která je nedílnou součástí primární i sekundární prevence KVO, může zabránit klinické manifestaci KVO (případně oddálit jeho recidivu). Léčba aterogenní DLP i jednotlivých komponent MS (obezity, inzulínové rezistence, hypertenze) nejen sníží riziko přechodu MS v DM 2.typu, ale současně i pravděpodobnost manifestace KVO. Například dosažení

cílových koncentrací TK a plasmatických lipidů (TG, LDL-C, resp. non-HDL-C a HDL-C) může snížit až o 80 % relativní riziko manifestace KVO (ICHS, cévní onemocnění mozku) u jedinců s DM2 a průvodnou aterogenní DLP.

19.1.2.7 Prevence

Cílem prevence je snížit incidenci prvních (primární prevence) nebo recidivujících klinických příhod (sekundární prevence) v důsledku ICHS, cévních onemocnění mozku a ischemické choroby dolních končetin. Pozornost je zaměřena na prevenci invalidity a předčasného úmrtí.

Prevence zahrnuje úroveň celopopulační, která by měla vést ke zlepšení životního prostředí a životního stylu; selektivní screening, který je cílen na vyhledávání a léčbu vysoce rizikových nemocných; a konečně sekundární prevenci, která se provádí u jedinců s již manifestním KVO. Hlavním těžištěm populační strategie prevence KVO je zdravotní výchova. Ta by měla být zaměřena na prevenci kouření, obezity a DLP. Skupinou zasluhující si zvláštní pozornost jsou děti a mladiství. Cílený screening má být prováděn u osob nemocných s DM 2. typu (resp. DM 1. typu s mikroalbuminurií), s familiárními DLP (FHC, FKH), s hypertenzí (TK nad 180/110 mm Hg), chronickou renální nedostatečností a subklinickou aterosklerózou.

U všech nemocných s DLP je indikována léčba nefarmakologická (režimová a dietní). Farmakoterapie se zahajuje u nemocných v sekundární prevenci a v primární prevenci u nemocných s vysokým rizikem, či u těch osob, u nichž globální (celkové) riziko přesahuje 5 % podle tabulek SCORE (Systemic Coronary Risk Evaluation), která jsou vypracována pro ČR⁴.

19.2 Analytický přístup

Lipidy, jedna ze tří hlavních složek živé hmoty (vedle bílkovin a uhlohydrátů), představují velmi rozmanitou skupinu látek, které se navzájem liší chemickým složením i biologickou aktivitou. Za nejmenší jednoduchý lipid lze považovat octovou kyselinu s pouhými dvěma atomy uhlíku ($M_r = 60$), za největší složený lipid pak gangliosid GH_{1ca} obsahující šest molekul N-acetylneuraminnové kyseliny ($M_r = 3\,028$). Velká rozmanitost jednotlivých lipidů i jejich molekulárních druhů vyžaduje komplexní metodický přístup k jejich analýze. V následujícím textu budou diskutovány jednotlivé formy lipidů (transportní, tkáňové), lipidové třídy i jejich molekulární druhy se zřetelem na využití analytických technik.

19.2.1 Lipoproteiny

Klasickými metodami pro stanovení jednotlivých lipoproteinů jsou elektroforéza a ultracentrifugace. Elektroforetické dělení je umožněno povrchovým elektrickým nábojem částic, který závisí na chemickém složení částice a určuje její elektroforetickou mobilitu. Nejčastěji užívaným nosičem je agarosa, pořadí frakcí podle klesající mobility je HDL, VLDL, LDL, CM. Na polyakrylamidovém gelu je pořadí odlišné: HDL, LDL, VLDL, CM, tedy podle velikosti jednotlivých částic. Po rozdelení, fixaci a obarvení lipofilním barvivem se provádí kvantitativní vyhodnocení denzitometricky.

Ultracentrifugační (UC) metody jsou založeny na odlišné specifické hustotě částic, která je dána jejich chemickým složením. V gravitačním poli UC při různých hustotách prostředí částice sedimentují nebo flotují; rychlosť flotace je charakterizována tzv. flotační konstantou (S_f). Pro detailnější studie, např. analýzu subfrakcí jednotlivých lipoproteinů, se využívá analytická UC. Průběh dělení lipoproteinů je sledován pomocí změn indexu lomu, jehož záznam pak slouží k vyhodnocení.

Pro následné detailní analýzy je vhodné lipoproteiny separovat pomocí preparativní UC, a to buď sekvenční ultracentrifugací s postupným zvyšováním hustoty prostředí a separací flotující frakce, anebo přípravou hustotního gradientu a po ustavení rovnováhy rozřezáním zmraženého obsahu včetně kyvety.

Pro klinickou diagnostiku i základní výzkum má význam stanovení velikosti částic jednotlivých lipoproteinů, zejména atherogenního LDL. Tento problém lze řešit buď elektroforézou na gradientu akrylamidu (PAGE), která je velmi pracná i časově náročná, anebo gelovou filtrace⁵. Gelová filtrace je separační technika, která není chromatografií v pravém slova smyslu (nedochází k ustanování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází), ale touto technikou jsou separovány molekuly podle své velikosti. Jako hydrofilní stacionární fáze (SF) slouží silikagel nebo methakrylátové pryskyřice s definovanou velikostí pórů, dobrých výsledků bylo dosaženo i na Sepharose⁵. Separace probíhá za izokratických podmínek, jako mobilní fáze (MF) slouží fyziologický roztok, který může být pufrovaný fosfátem. Velké molekuly se nedostanou do pórů a jsou vyloučeny v nejkratším možném čase; nejmenší velikost molekuly, která nemůže vstoupit do pórů, určuje tzv. vylučovací limit kolony (vrchní limit). Menší molekuly, které vstoupí do pórů, jsou v nich zadržovány podle své velikosti. Nejmenší molekula, kterou lze ještě oddělit, určuje tzv. permeační limit kolony (spodní limit), menší molekuly se již pak nedělí. Separaci rozmezí kolony je určeno velikostmi separovatelných molekul, závisí na velikosti pórů, a v tomto rozmezí platí lineární závislost logaritmu relativní molekulové hmotnosti (velikosti molekuly či částice) na elučním objemu (čase). K detekci se využívá buď charakteristická vlnová délka pro bílkoviny v ultrafialové oblasti (280 nm) nebo na základě tzv. „post-column“ reakce cholesterolu s enzymatickým činidlem ve viditelné oblasti (600 nm).

19.2.2 Apolipoproteiny

Apolipoproteiny jsou strukturálními bílkovinami lipoproteinových částic, které váží lipidy v povrchovém polárním obalu lipoproteinů a umožňují tak vytvářet rozpustné polydispersní částice. V každé třídě lipoproteinů se vyskytuje několik apoproteinů, které jsou pro daný lipoprotein charakteristické. Jejich vzájemné poměry v rámci jednotlivých lipoproteinů se za různých patofyziologických stavů liší, a proto má jejich stanovení svůj nezastupitelný význam. Rutinní stanovení apo AI a apo B je v současné době prováděno imunoelektoforeticky, polymorfismy apo E elektroforézou na agarose nebo polyakrylamidu. Pro stanovení profilu apoproteinů v separovaných lipoproteinech lze využít několika technik kapalinové chromatografie s UV-detekcí (280 nm): SEC, chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC), iontovýměnné chromatografie a kombinace imunoafinitní chromatografie (IAC) s dalšími separačními technikami: SEC, UC, SDS-PAGE⁶.

19.2.3 Lipidy

Pro rutinní diagnostiku DLP slouží z lipidové složky stanovení TC, TG a HDL-C, hodnota LDL-C se většinou získává výpočtem z ostatních parametrů. Stanovení je automatizováno a využívá enzymatických reagenčních souprav a spektrofotometrické detekce. Princip stanovení TC spočívá v rozštěpení esterů cholesterolu (které představují cca 2/3 TC) cholesterolesterasou, následuje oxidační cholesteroloxidázu na cholestenon, při které vzniká peroxid vodíku; ten reaguje s fenolem a 4-aminoantipyrinem za katalytického působení peroxidasy na červeně zbarvený chinon, jehož koncentrace je stanovena spektrofotometricky (500 nm). Na stejném principu je založeno i stanovení HDL-C v supernatantu po předchozí precipitaci lipoproteinů obsahujících apo B (VLDL, LDL). Přímé stanovení HDL-C je založeno na faktu, že enzymy cholesterolesterasa i oxidasa reagují v pro-

středí polyethylenglykolu, dextransulfátu a Mg^{2+} rychleji s HDL-C než s LDL-C a VLDL-C. Pro určení koncentrace je nejčastěji používán tzv. Friedewaldův vzorec⁷, kterého lze použít pro séra s obsahem TG $\leq 4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ (všechny koncentrace jsou v mmol l^{-1}):

$$c(\text{LDL-C}) = c(\text{TC}) - [c(\text{TG}) : 2,2] - c(\text{HDL-C})$$

Stanovení TG se provádí rovněž enzymaticky, první reakcí je štěpení TG lipasou na glycerol a FA, druhou reakce s ATP glycerolkinasou na glycerol-3-fosfát a ADP. Podkladem pro spektrofotometrické stanovení je pak buď reakce glycerol-3-fosfátu s příslušnou dehydrogenasou a koenzymem NAD⁺ na dihydroxyacetonfosfát a stanovení přírůstku redukovaného NADH+H⁺ (340 nm), nebo oxidace glycerol-3-fosfátu oxidasou na dihydroxyacetonfosfát a H₂O₂, který reaguje s 4-aminofenazonem a 4-chlorofenolem za vzniku 4-(*p*-benzochinon-monoimino)-fenazonu (510 nm).

19.2.3.1 Stanovení jednotlivých lipidových tříd

Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin a alkoholů, sterolů či glycerolu. Pro analytické účely je výhodné jejich rozdělení podle chromatografického chování na silikagelu na nepolární (NL), které se pohybují v nepolární mobilní fázi (uhlovodík-diethylether-octová kyselina) a polární (PL), které se dělí v polární mobilní fázi (chloroform-methanol-voda, často s přidáním octové kyseliny nebo amoniaku). Podle zmíněného chromatografického chování řadíme mezi nepolární lipidy také volné mastné kyseliny, parciální glyceridy a volné steroly, přestože obsahují volnou (neesterifikovanou) funkční skupinu. Biologický výzkum vyžaduje, v závislosti na sledované problematice, abz byly analyzovány jak všechny zmíněné třídy NL i PL v intaktní podobě (stanoven obsah celé lipidové třídy), tak i jejich molekulární druhy. Pro stanovení jednotlivých NL a PL lze využít všechny techniky kapalinové chromatografie, pro stanovení molekulárních druhů kapalinovou i plynovou chromatografií.

Tenkovrstvá chromatografie s denzitometrickou detekcí

Tato metoda, využívající klasické tenké vrstvy silikagelu jako SF, je stále využívanou analytickou technikou vzhledem k nenáročnosti přístrojového vybavení a s fluorescenční detekcí je stále nejvýhodnější metodou i pro účely preparativní. Složení MF závisí na separovaných lipidech, jako příklad je uvedeno několik systémů⁸:

- Separace NL s MF hexan-diethylether-octová kyselina (80:20:1). PL zůstávají na startu. Pořadí eluce (klesající R_f) je: vosk, sterolester, glyceryletherdiester (GEDE), TG, mastná kyselina (FA), sterol, diglycerid, monoglycerid (MG), PL.
- Separace PL s MF chloroform-methanol-octová kyselina, voda (60:50:1:4). NL se pohybují s čelem. Pořadí eluce: NL, kardiolipin (CL), fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylserin (PS), fosfatidylcholin (PC), sfingomyelin (SM), lysofosfatidylcholin (LPC).
- Separace PL a MG s dvojím vyvíjením. První systém hexan-aceton (3:1) oddělí MG a další vyvíjení v systému chloroform-methanol-octová kyselina-voda (80:13:8:0,3) rozvine PL v pořadí: CL, fosfatidová kyselina PA), ceramid monohexosid (CM), fosfatidylglycerol (PG), PE.
- Separace PL a fosfátů PI v systému methanol-chloroform-30% amoniak-voda (48:40:5:10) v pořadí: PE, PC, PI, PI-monofosfát, PI-difosfát.

- Dvouozměrná separace NL a PL. Všechny třídy lipidů (včetně jednotlivých lysoforem) nelze rozdělit jednotlivým vyvíjením, maximální úspěšnosti bylo dosaženo vyvíjením ve dvou směrech. V prvním systému, chloroform-methanol-30% amoniak-voda (90:54:0,5:5,5), bylo dosaženo rozdělení skupin: NL, CL, FA + CM + PE + PC, PS + LPE, PI + SM, PA + PS + LPC, LPS + LPI. Nerozdělené skupiny byly pak separovány v druhém systému, chloroform-methanol-aceton-octová kyselina-voda (60:20:80:20:10), a to ve směru kolmém k prvnímu vyvíjení. Jednotlivé skupiny jsou takto separovány v uvedeném pořadí (klesající R_f).

Kapalinová chromatografie na normální fázi s detekcí rozptylu světla

Jako SF jsou využívány silikagel (-Si-OH), alumina (-Al-OH), aminopropyl ($-(CH_2)_3-NH_2$), kyano-propyl ($-(CH_2)_3-CN$) a diol ($-(CH_2)_3-O-CH_2-CHOH-CH_2OH$)⁹. Na rozdíl od RP-HPLC je MF méně polární než SF, a k interakci mezi solutem a SF dochází na polárnější straně molekuly (neesterifikovaná funkční skupina, polární „hlava“ fosfolipidu). Jednotlivé lipidové třídy jsou eluovány podle stoupající polarity – nepolární molekuly jsou zadržovány nejméně. Polarita MF v průběhu separace rovněž stoupá. Rozdělení komplexní směsi NL a PL bylo dosaženo postupným gradientem směsi hexan-tetrahydrofuran, chloroform-isopropylalkohol, isopropylalkohol-voda. Pořadí eluce je obdobné jako na tenké vrstvě: SE, TG, FS, FA, CM, CL, PE, PI, LPE, PS, PC, SM, LPC¹⁰. Systém detekce – ELSD (*evaporative light-scattering detector*), zvaný též „hmotový“ detektor, má před všemi ostatními detektory výhodu citlivosti a univerzálnosti. UV-detekce není vhodná, protože lipidy absorbují při nízkých vlnových délkách, kterými bývá detektor limitován, při refraktometrické detekci vadí gradient MF, fluorescenční detektor vyžaduje derivativaci, elektrochemická detekce je možná jen pro snadno oxidovatelné látky, u plamenoionizačního detektoru je třeba předem odstranit MF a není možné použití pufru¹¹.

19.2.3.2 Stanovení mastných kyselin

V přírodě se vyskytuje velké množství mastných kyselin (FA), jen v lidské plasmě jich bylo identifikováno okolo 60. Mají většinou rovný řetězec se sudým počtem atomů uhlku a dvojnými vazbami v pentadienovém uspořádání, převážně v konfiguraci *cis*; jsou obecně značeny CN:P *n-x*, kde CN je celkový počet atomů C, P je počet dvojních vazeb a *x* poloha první dvojné vazby od methylového konce. Pro různé metabolické studie jsou obvykle stanovovány pouze ty FA, které v metabolismu hrají významnou roli (v biochemických a biomedicinských studiích obvykle pouze sudé s CN 12 až 22). Analýza profilu FA v separovaných lipidových třídách po jejich hydrolyze a následné derivatizaci je nejčastějším stanovením v analýze lipidů, s využitím metod GLC nebo RP-HPLC. Pro GLC jsou FA převáděny nejčastěji na methylestery za alkalické či kyselé katalýzy (např. methoxid sodný, fluorid boritý, acetylchlorid, methylchloroformát, kyselina sírová); pro HPLC jsou derivatizovány chromofory pro detekci UV (např. fenacylbromid, 2-bromo-2'-acetonafton, 2-nitro-fenylhydrazin, dibromoacetofenon, 1-naftylamin) nebo fluorescenční (např. panacylbromid, 9-anthryl-diazomethan, 9-(2-hydroxyethyl)-karbazol, 9-bromomethylakridin, 3-bromoacetyl-7-methoxy-kumarin).

Pro stanovení GLC jsou používány kolony střední nebo vysoké polarity (délka 25-30 m, resp. 50-100 m). U středně polárních kolon je pořadí eluce určeno délkou řetězce a stoupajícím počtem dvojních vazeb ($RT_{FA\ 18:4n-3} < RT_{FA\ 20:0}$). Jejich poměrně vysoký teplotní limit umožňuje i eluci sterolů při analýze sterolesterů, nelze však oddělit izomery v konfiguraci *trans*. Ty mohou být analýzovány na velmi polárních kolonách, které mají nižší teplotní limit, *trans*-izomery jsou eluovány před příslušnými *cis*-izomery, pro stejné CN roste RT s počtem dvojních vazeb, ale pořadí eluce je ovlivněné ještě dalšími faktory ($RT_{FA\ 20:0} < RT_{FA\ 18:3\ n-3}$). Analýzy HPLC mohou být izokratické, nebo

gradientové, pro MF jsou používány směsi methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, octová kyselina. Pořadí eluce je výrazně odlišné – *cis*-izomery jsou eluovány před odpovídajícími izomery *trans*, při stejném CN jsou FA eluovány podle klesajícího počtu dvojných vazeb ($RT_{FA\ 20:5\ n-3} < RT_{FA\ 14:0}$).

Obě metody, GLC i HPLC, mají své specifické výhody i nevýhody. Pro GLC je nastrikované množství v řádu ng až μ g, pro HPLC μ g až mg. Plyn představuje ekologickou a dokonale reprodukovatelnou mobilní fázi oproti organickým rozpouštědlům. Nástřik za studena přímo na kolonu (*cold on-column*) v GLC nezpůsobuje ztráty těkavějších složek ve srovnání s nástřikem do vyhřívaného injektoru. Díky moderním aparaturám je zajištěna dobrá reprodukovatelnost teplotního programu při GLC, stejně jako reprodukovatelnost gradientu mobilní fáze u HPLC. Při chromatografickém procesu dochází u obou metod ke kontaminaci SF jednak rozkladnými produkty vzorku, jednak samotnou MF, což vede ke změnám v dělení i kvantitativní odezvě jednotlivých složek. U GLC lze problém řešit použitím předkolony, která je v průběhu životnosti měněna, případně odříznutím části kolony s viditelnými depozity. U HPLC lze rovněž po určité době vyměňovat předkolony, pak následuje částečná výměna náplně kolony. U obou metod platí, že linearitu kalibrační závislosti odezvy detektoru na nastrikovaném množství jednotlivých složek je třeba pro každý systém individuálně určit a v průběhu životnosti kolony kontrolovat. Obsah složek bývá většinou stanovován jako molární zlomek, méně často je určován absolutně metodou vnitřního standardu¹².

Literatura

1. A.M. Gotto, Jr., H.J. Pownall: Manual of lipid disorders. 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, p. 482
2. R. Češka a kol.: Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidémií. Praha: Triton, 2005, 342
3. S.B. Hachem, Q.A.D. Mooradian: Drug 66, 2006, 1449-1469.
4. H. Vaverková, V. Soška, H. Rosolová, R. Češka, R. Cífková, T. Freiberger, J. Piťha, R. Poledne, T. Štulc, Z. Urbanová, M. Vráblík: Vnitř. Lék. 53, 2007, 181 – 197.
5. R. M. Carroll, L. L. Rudel: J. Lipid Res. 24, 1983, 200-207.
6. H. Campos, D. Perlov, C. Khoo, F. M. Sacks: J. Lipid Res. 42, 2001, 1239-49
7. W.T. Friedewald, R.I. Levy, D.S. Fredrickson: Clin. Chem. 18, 1972, 499–502
8. I.J. Cartwright: Methods Mol. Biol. 19, 1993, 153-67
9. U. D. Neue: HPLC Columns: Theory, Technology and Practice, pp. 164-182, Wiley VCH, New York 1997.
10. W. W. Christie: J. Lipid Res. 26, 1985, 507-12
11. R. A. Moreau: The evaporative light-scattering detector as a tool for the analysis of lipids by HPLC, in HPLC of Acyl Lipids, pp. 97-100, HNB Publishing, New York 2005.
12. E. Tvrzická, M. Vecka, B. Staňková, A. Žák: Anal. Chim. Acta 465, 2002, 337-350.

20. PROBLEMATIKA IMUNOANALYTICKÝCH METOD (ANALYTIKA HORMONŮ A NÁDOROVÝCH MARKERŮ)

Ing. Drahomíra Springer

Všeobecná fakultní nemocnice v Praze 2

springer@vfn.cz

20.1 Úvod

Hormony jsou ve srovnání s většinou ostatních analytů běžných v klinické biochemii přítomny v tělních tekutinách, především v krvi, ve velmi nízkých koncentracích. Obsah nízkomolekulárních hormonů obvykle bývá řádu pmol až nmol v litru, peptidy dosahují řádu ng až μ g v litru. Vzhledem k omezené citlivosti spektrofotometrických metod používaných v klinické biochemii nebylo proto dlouho možné hormony stanovit. S rozvojem chromatografie a její separační účinnosti se podařilo v 60. letech 20. století zavést některá stanovení hormonů a jejich metabolitů. V kombinaci s hmotovou spektrometrií (GC-MS) jsou tyto dodnes metody využívány ve výzkumu a jako referenční metoda pro konečný důkaz přítomnosti látky (hormonu) ve zkoumaném materiálu.

Zásadní změnu přineslo zavedení imunoanalytických metod, které využívají jako činidel specifických protilátek vůči stanovovaným látkám, takže v současnosti při stanovení hormonů všech typů tyto metody dominují. Jsou založené na specifické reakci antigen-protilátku a ke konečné detekci používají rozdílné technologie. Metodiky můžeme dělit podle systému uspořádání reakce nebo podle používaného značení a způsobu měření odpovídajícího signálu.

20.2 Imunoanalytická stanovení

20.2.1 Dělení imunoanalytických metod podle principu

Rozlišujeme dvě skupiny stanovení:

- kompetitivní stanovení, při kterém antigen ze vzorku soutěží se stejným, ale značeným antigenem ze soupravy o omezené množství protilátky; původní koncentrace stanovovaného analytu je nepřímo závislá na výšce signálu, pro tyto metody je typická levá kalibrační křivka podle Obr. 20.1;
- nekompetitivní stanovení (sendvičové), při kterém je antigen ze vzorku vychytáván mezi dvě protilátky, které se vyskytují v reakční směsi v přebytku; původní koncentrace stanovovaného antiguenu je přímo úměrná velikosti měřeného signálu, kalibrační křivka má typický průběh uvedený vpravo.



Obr. 20.1

20.2.2 Používané protilátky

Specificita a senzitivita imunochemických vyšetření jsou dány hlavně používanou protilátkou, jejím typem a čistotou. Používány jsou protilátky monoklonální nebo polyklonální. **Monoklonální protilátka** je produkovaná hybridomy, které se připravují fúzí imunizovaných slezinných buněk s nádorovými a které po čištění a selekcii produkují jen jeden typ protilátky. Příprava je drahá, ale s monoklonální protilátkou se dosahuje vyšší specificity a lze ji produkovat kontinuálně. Současný rozvoj molekulárně biologických metod nabízí výrobu monoklonálních protilátek technikami genového inženýrství, kdy se gen pro příslušnou protilátku vnese do genomu vhodného hostitele (např. kvasinek), kde se exprimuje.

Polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířete, jsou vždy směsi protilátek, jsou schopné rozeznat i izoformy antigenu a mají proto vyšší citlivost. Nevýhodou je závislost na imunizovaném zvířeti, někdy je získání protilátky neopakovatelné.

20.2.3 Separace komplexu

Stanovení a detekci je možné provádět u imunochemických metod buď přímo v reakční směsi – **homogenní imunoanalýza**, nebo po specifické separaci vytvořeného imunokomplexu – **heterogenní imunoanalýza**.

Homogenní imunoanalýzu lze použít u metod, kdy navázání protilátky ovlivní značku, např. FPIA (fluorescenční polarizační imunoanalýza) využívá zpomalené rotace imunokomplexu v rovině polarizovaného světla. Separace imunokomplexů u heterogenních metod je možná mnoha způsoby: precipitačně (PEG u radioimunoanalýzy), odsáváním zbytku reakční směsi u pevně zakotvené protilátky (ELISA), magneticky, případně adhezí použitých částic vázaných na protilátku.

20.2.4 Detekce

Pro výslednou senzitivitu stanovení je podstatný kromě kvality použité protilátky i způsob detekce. Právě podle používané značky a způsobu měření signálu se imunoanalytické metody dělí nejčastěji a to na radioimunoanalýzu, enzymoimunoanalýzu, fluoroimunoanalýzu a luminiscenční imunoanalýzu. Navíc existuje řada dalších metodik, které jsou vázány většinou na výrobce a celý systém analyzátoru a reagencí a které se stále vyvíjejí.

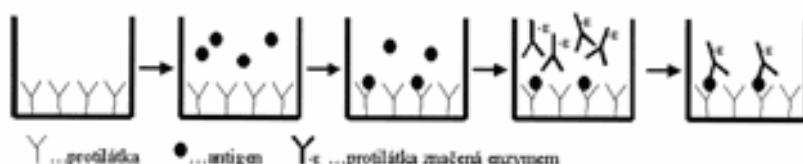
20.2.4.1 Radioimunoanalyza

Je velmi dlouho používanou metodou, která svou citlivostí stále často předčí mnohé automatizované moderní imunoanalýzy. Jako nejčastější značka je používán ^{125}I . Je to γ -zářič, poločas rozpadu je 60 dní. U některých souprav se užívá ^3H -, což je β -zářič, který má ale poločas rozpadu přes 12 let a jeho detekce je obtížnější.

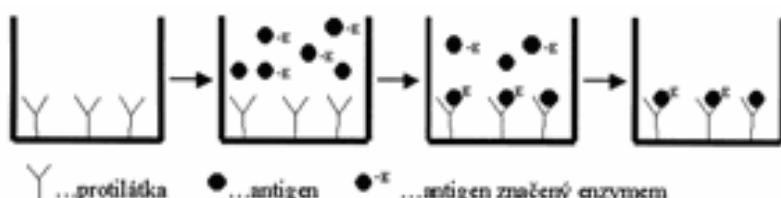
Radioimunoanalyza je dostupná jak v kompetitivním uspořádání RIA, tak v sendvičovém IRMA. Je to metodika náročná na ruční práci a zkušenosť laborantek, ale také je třeba zohlednit i veškeré problémy a povinnosti plynoucí z práce s radioaktivitou. Její nespornou výhodou je cena, která je u českých souprav většinou příznivá, a nenáročnost na složitá zařízení. Nabídka souprav pro vyšetření je široká, lze tak stanovovat i poměrně vzácné analyty, které nejsou v nabídce pro automatické analyzátory.

20.2.4.2 Enzymoimunoanalýza

Jako značka je využíván enzym. V heterogenní enzymoimunoanalýze jsou to nejčastěji peroxidasa, ALP a β -galaktozidasa. Měření signálu je závislé na produktu konečné enzymatické reakce. Nejčastěji jsou to barevné produkty, ale používá se i měření fluorescence nebo chemiluminiscence. Nejčastěji používaným pevným nosičem v enzymoimunoanalýze jsou mikrotitrační destičky (8×12 jamek). Oblíbené a velmi snadno proveditelné stanovení nenáročné na používanou techniku je známé pod názvem ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). I zde je možné použít oba typy uspořádání, a to jak kompetitivní, tak sendvičové – viz Obr. 20.2.



Nekompetitivní (sendvičová) enzymová imunoanalýza



Kompetitivní enzymová imunoanalýza

Obr. 20.2: Uspořádání enzymové imunoanalýzy

Metodika EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) je určena převážně pro stanovení léků. Jedná se o kompetitivní homogenní enzymoimunoanalýzu, kdy analyt soutěží se stejným analytem–antigenem z diagnostické soupravy značeným glukosa-6-fosfátdehydrogenasou (G6PDH) o protilátku. Vazbou na protilátku klesne aktivita enzymu. Aktivní enzym konvertuje NAD na NADH, což umožňuje spektrofotometrickou detekci. Původní koncentrace analytu ve vzorku odpovídá nepřímo aktivitě enzymu.

20.2.4.3 Fluroimunoanalýza

Používá ke značení fluorofory, měří se fluorescence. Je známo několik uspořádání, které užívají firmy v různých uzavřených systémech:

DELFIA (Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay), protilátky jsou značeny cheláty Eu nebo Sm. Slabá fluorescence je zesílena uvolněním iontů do prostředí, životnost fluorescence je mnohatisíkrát delší než u běžné fluorescence, což se užívá k měření.

FPIA (fluorescenční polarizační imunoanalýza), homogenní kompetitivní metoda, užívá se ke stanovení léků. Ke značení se užívá fluorescein, měří se fluorescence emitovaná v rovině polarizovaného světla. Velikost signálu je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu.

Mezi fluroimunoanalýzu patří i metoda MEIA, která užívá ke značení ALP a jako substrát 4-methyl-umbelliferylfosfát. Po separaci imunochemického komplexu pomocí specifických mikro-

částic se při enzymatické reakci uvolní 4-methyl-umbelliferol, jehož fluorescence se měří. Tato metodika je využívána imunochemickým analyzátorem a umožnuje vyšetřovat i poměrně velké soubory pacientů v krátkém časovém intervalu.

20.2.4.4 Luminiscenční imunoanalýza

Luminiscence je využívána jako neradioaktivní varianta v mnoha analytických systémech a to i pro svou vysokou citlivost. Luminofory používané ke značení nemají interference v biologickém materiálu a jsou poměrně stabilní. Jednou z nejčastěji používaných chemiluminiscenčních značek je akridiniový ester. Ten se v alkalické prostředí působením peroxidu vodíku rozpadá, přičemž se uvolní světelné kvantum. Signál je zesílen a převeden na původní koncentraci analytu ve vzorku.

Další často užívanou metodou je elektrochemiluminiscence: Podle uspořádání metody, kompetitivního nebo sendvičového, jsou protilátka nebo antigen biotinylovány. Další specifická protilátka je značená rutheniovým komplexem (Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)komplex, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$). Obě protilátky reagují se vzorkem za tvorby sendvičového komplexu. Po přidání mikročástic, které jsou potažené streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi interakcí biotinu a streptavidinu. Mikročástice se zachycují magnetickým polem na povrchu elektrody. Přídá se substrát TPA (Tripropylamin). Přivedením napětí na elektrody vzniká elektroluminiscenční emise – rutheniový komplex uvolní na elektrodě elektron za vzniku kationtu $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$. Ruthéniový marker se po luminiscenční reakci regeneruje.

Tyto metodiky jsou používány v imunochemických chemiluminiscenčních analyzátorech. Vždy jde o samostatnou jednotku, která zahrnuje dávkování vzorků i reagencií, inkubaci, detekci a automatické vyhodnocení výsledků. Analyzátor bývá určen k nepřetržitému provozu, reagencie uložené uvnitř mají vlastní chlazený prostor. Výrobce dodává veškeré pomocné roztoky, kalibrátory i spotřební materiál, jde o uzavřený analytický systém. Postup stanovení je obdobný jako u ostatních automatických analyzátorů a platí zde stejná pravidla. Velké analyzáitory s chemiluminiscenční detekcí jsou vhodné pro laboratoře, ve kterých se analyzují větší počty vzorků, protože vzhledem k vyšší ceně vyšetření na analyzátoru by se náklady na jedno stanovení při malém počtu analýz neúměrně zvýšily. Zavedení nové metody na velký analyzátor je pro výrobní firmu náročné na čas i finance a trvá vždy několik let, což je zřetelná nevýhoda oproti metodám RIA nebo ELISA, které jsou vyvíjeny mnohem rychleji. Obsluha analyzátoru je náročná na zkušenosť, i když nevyžaduje tolik ruční práce jako ostatní metodiky.

20.2.4.5 Další příklady. TRACE – Time Resolved Amplified Cryptate Emission

Jedná se o homogenní imunoanalýzu, která využívá kryptáty, sloučeniny, které fluorofor (Eu^+) váží v trisdipyridinové „kleci“. Kryptátem je značen antigen nebo protilátka, podle stanovené látky. Na druhou protilátku je vázán fluorofor, který je excitován při odlišné vlnové délce než Eu, je to pigment z červených řas. Po inkubaci je imunokomplex excitován laserem při 337 nm. Amplifikovaná energie přenesená z kryptátu (donor) na fluorofor (akceptor) je detekována jako prodloužený signál při 665 nm. Díky časově posunutému čtení neruší fluorescence příměsi ze vzorku. Akceptor nevázán v imunokomplexu není excitován a tudíž neruší při konečném čtení. Metoda je v užívaném uzavřeném systému mimořádně přesná a výsledky mají vysokou reprodukovatelnost v sérii i v čase.

20.3 Analýza

20.3.1 Preanalytické vlivy

Pro stanovení hormonů, nádorových markerů a dalších analytů stanovených imunoanalýzou platí v podstatě stejná či podobná analytická pravidla jako u jiných metod v klinické biochemii. Přesto je vhodné upozornit na některé odlišnosti, dané jednak speciálními preanalytickými požadavky na pacienta z pohledu endokrinologie, jako je způsob odběru vzorku, jeho zpracování, transport a uchovávání, jednak požadavky na kvalitu vlastní analýzy. Jedná se o stanovení většinou řádově nižších koncentrací analytů než v klinické biochemii, navíc rozmanité chemické podstaty. To vše ovlivňuje i referenční hodnoty, které se často mohou lišit s ohledem na použitou metodiku či analyzátor, a proto bává doporučováno, aby si laboratoř stanovila svá vlastní referenční rozmezí..

Z preanalytických vlivů týkajících se pacienta mají v endokrinologii mimořádný význam věk, pohlaví, existence biorytmů, v některých případech stres. Výsledek analýzy mohou ovlivnit i další skutečnosti, jako předchozí zátěž, dieta, alkohol, kouření a další návykové látky, léky apod.

20.3.1.1 Věk

Změny hladin hormonů s věkem jsou dobře známy především u sexuálních a příslušných hypofyzárních hormonů, kde jsou řídícími humorálními faktory somatosexuálního vývoje. Proto je nutné uvádět referenční hodnoty vybraných hormonů v závislosti na věku tak, aby zachytily zejména zlomová období života u obou pohlaví: narození, dospívání, dospělý věk až po menopauzu u žen a stáří. S věkem se mění i hladiny některých diagnosticky významných metabolitů hormonů (např. dehydroepiandrosteronu a jeho sulfátu DHEA-S nebo 17alfa-hydroxyprogesteronu) a nádorových markerů (např. vyšší PSA u starších mužů bez souvislosti s karcinomem prostaty). Významně vyšší hladiny v dětství jsou charakteristické pro růstový hormon, ale i pro jím řízené růstové faktory, především pro insulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) a jeho vazebné proteiny. S věkem se mění i hladiny řady dalších hormonů, zejména v souvislosti s nárůstem degenerativních změn ve stáří. K řádovým změnám hladin hormonů pak dochází v těhotenství.

X.3.1.2 Pohlaví

Hladiny řady hormonů se výrazně liší podle pohlaví. Platí to nejen pro sexuální hormony, jejich prekurzory a metabolity, ale např. i pro prolaktin a pro některé ukazatele funkce štítné žlázy (volný thyroxin). Změny hladin hormonů s věkem, zmíněné v předchozím odstavci, se u mužů a žen liší.

X.3.1.3 Biorytmy

Pro řadu hormonů jsou příznačné rytmické změny hladin během dne (cirkadiální rytmus, diurnální profily), odrázející změny v jejich tvorbě a sekreci. Zdůrazněme na tomto místě rozdíl mezi tvorbou, danou biosyntetickou aktivitou příslušného enzymového vybavení, a sekrecí, danou vyplavením hormonů ze sekrečních granulí na příslušný podnět. Díky etážovému systému řízení a zpětnovazebným mechanismům biorytmy hormonů jednotlivých endokrinních os spolu úzce korelují. Nejvýraznější diurnální rytmus vykazuje kortisol a v menší míře jeho prekurzory a metabolity a příslušný řídící hormon – adrenokortikotropin (ACTH). I u prolaktinu a TSH se hladina mění během 24 h. Dobře známým příkladem změn během noci a dne v závislosti na fotoperiodě je biorytmus melatoninu a změny hladin růstového hormonu v noci a ve dne. Diurnální výkyvy existují i u mužských

a ženských sexuálních hormonů a gonadotropinů a v menší míře u příslušných transportních proteinů. Pro nádorové markery není žádná diurnální variabilita popisována.

X.3.2 Odběr krve

POžadavky na odběr krve a její zpracování se pro stanovení většiny hormonů neliší od požadavků na většinu analytů v klinické biochemii. Způsob a s ohledem na diurnální změny i doba odběru by měly být standardizovány. Sérum či plazma, pokud nejsou zpracovány do 48 hodin, by měly být skladovány při -20°C . U peptidových hormonů se nedoporučuje opakované zmrazování vzorku. Výjimkou jsou některé hormony, při jejichž vyšetřování je nutno zajistit speciální podmínky při odběru a zpracování vzorku, jako např. odběr krve do ledové tríště ke stanovení ACTH, či pro stanovení plazmatické reninové aktivity. Tyto požadavky jsou obvykle přesně definovány v příbalovém letáku reagenční soupravy u jednotlivých hormonů. Některé hormony citlivě reagují na volumetrické změny a záleží zde na poloze odběru – obecně nižší hodnoty získáváme při odběru vleže než v sedě. Typickým příkladem je aldosteron.

Pro nádorové markery existuje také několik preanalytických doporučení. Vzorek krve ke stanovení NSE musí být transportován do laboratoře při 4°C nejpozději do 1 hodiny po odběru, je třeba zabránit hemolýze, která zvyšuje hladiny NSE. Rychlou sepraci séra vyžaduje i vyšetření PSA, pro které platí i omezení jakékoliv manipulace s prostatou před odběrem, včetně jízdy na kole. Sliny a pot některých lidí obsahují vysoké koncentrace CA 19-9 a SCC a při manipulaci se vzorkem je třeba se vyvarovat kontaminace (např. kýchání, práce bez rukavic).

20.4 Interpretace nálezů

Výsledky vyšetření hladin hormonů, nádorových a kardiálních markerů, vitaminů či léků slouží lékaři přímo k orientaci a k hodnocení stavu pacienta. U mnoha látek je však ještě důležitější dynamika jednotlivých vyšetření.

Hormony: Hladina některých hormonů (LH, FSH, progesteron, estradiol) je závislá u žen na fázi menstruačního cyklu. Denní kolísání hladiny kortizolu by mělo být zohledněno různými referenčními mezemi pro ranní a odpolední odběr. Většina hormonů se dnes stanovuje v séru nebo v plazmě, některé i ve slinách, plodové vodě a v likvoru. Spektrum hormonů stanovovaných v moči je poměrně malé. Na některých pracovištích se ještě stanovují celkové 17-oxosteroidy a 17-hydroxysteroidy. Dále se běžně stanovuje volný močový kortisol, rutinně se v moči stanovují také katecholaminy a jejich metabolity. Speciální pracoviště stanovují spektrum steroidních metabolitů plynovou chromatografií.

Nádorové markery: Chemická charakteristika látek používaných jako nádorové markery je velmi různorodá, nejčastěji se jedná o proteiny, glykoproteiny, glykolipidy a muciny. Řada z nich má enzymovou nebo endokrinní aktivitu. Tyto látky jsou nacházené v tkáni nádoru, nebo v krevním séru či jiných biologických tekutinách pacienta s neoplastickým onemocněním, jejichž přítomnost může poskytnout informaci o vlastnostech a chování nádoru. Umožňuje to jejich využití v diagnostice a vyhledávání maligních onemocnění a zejména pak při stanovení prognózy a při monitorování pacientů v průběhu léčby. Pozitivní či negativní nález nádorových markerů může být v některých případech i součástí klasifikace nádoru. Mají být využívány ke sledování terapie, jediné vyšetření většinou nemá valný význam. Právě u nádorového markeru je sledování dynamiky nezbytné. Mnohdy i pomalé zvyšování hladiny v rámci referenčního rozmezí může signalizovat návrat choroby a nao-

pak stabilní hladina na hraně referenčních mezí může být v pořádku. Jako screeningové vyšetření se provádí pouze stanovení PSA (event. PSA/FPSA) při podezření na karcinom prostaty u mužů mladších než 70 let.

Kardiální markery: Užívají se pro diagnostiku náhlých srdečních příhod. Je třeba dobře posoudit vhodnost vyšetření vzhledem k době, která uplynula od začátku bolestí. Myoglobin je časným markerem infarktu myokardu, troponin I dosahuje nejvyšší hladiny až po 12-15 hodinách, ale přetrvává minimálně 4 dny.

Vitaminy: Hladina vitaminů se stanovuje pro kontrolu funkce metabolismu nebo správné léčby. Významné může být i předávkování některým steroidním vitamínem nebo porucha vstřebávání z potravy např. u vitaminu B12.

Literatura:

1. Jacobs D., Kasten B. Demott W.: Laboratory Test Handbook, 3.vydání 1990
2. Jialal I., Winter W., Chan D.: Handbook of Diagnostic Endocrinology, 1999
3. Káš J. a kol: Laboratorní cvičení z biochemie, Nakladatelství Olomouc s.r.o., Olomouc 2000
4. Štern P., Kocna P.: Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, 2004
5. Wheeler M.J., Hutchinson J.S.M.:Hormone Assays in Biological Fluids, 2006, Humana Press, New Jersey
6. Wu J.: Quantitative Immunoassay, 2000, AACC