

Screeningová metoda pro
simultánní stanovení
kyseliny močové a alantoinu
v krvi získané technikou
suché kapky

Roman Kandár, Michal Kopčil

VITATOX 2021

Univerzita Pardubice

antioxidační ochrana lidského těla

reaktivní formy kyslíku (ROS)

- volné radikály – $\cdot\text{OH}$; $\text{ROO}\cdot$; $\text{O}_2^{\cdot-}$
- neradikálové formy - H_2O_2 ; HClO

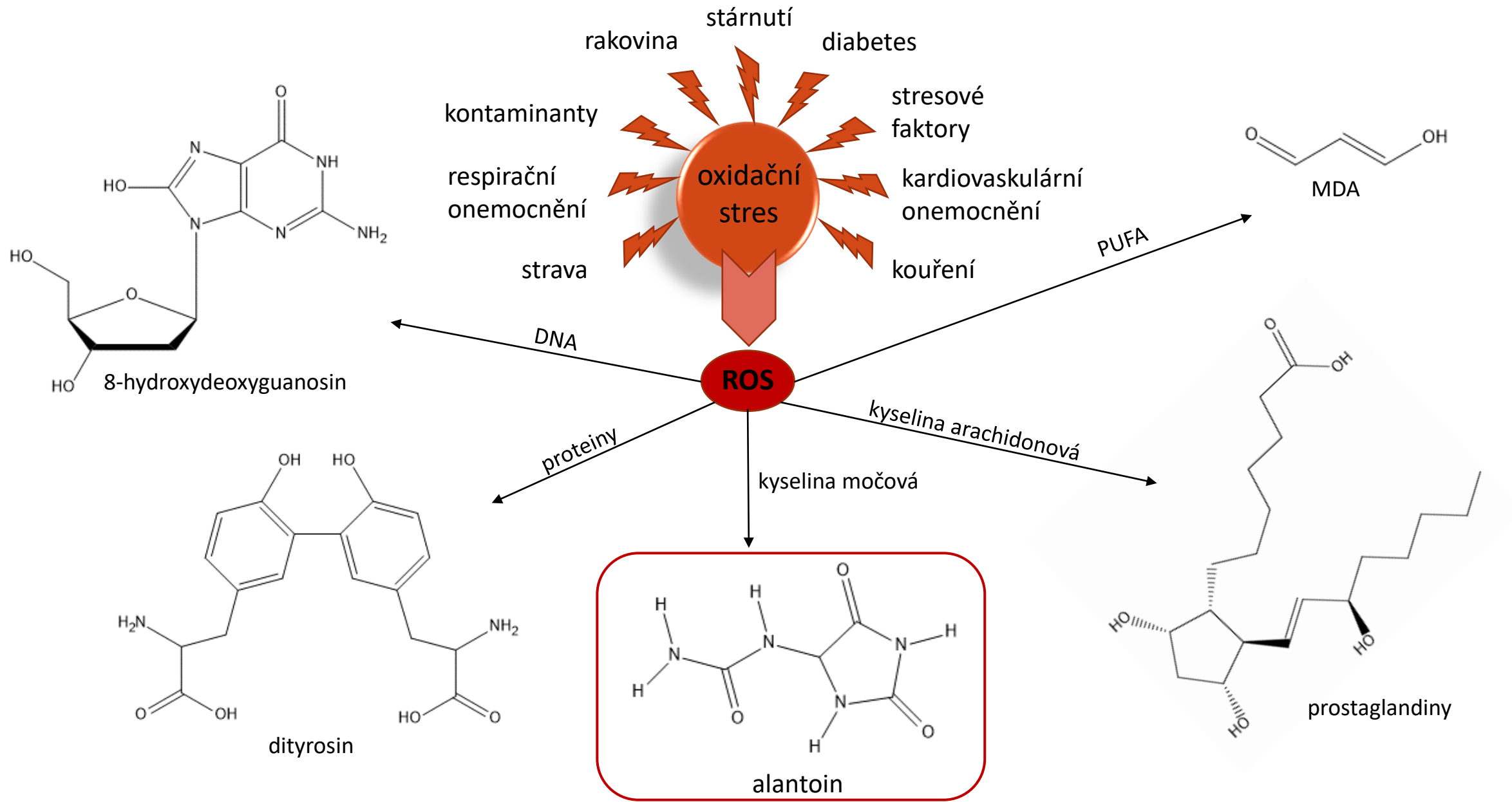
prospěšnost

X

škodlivost

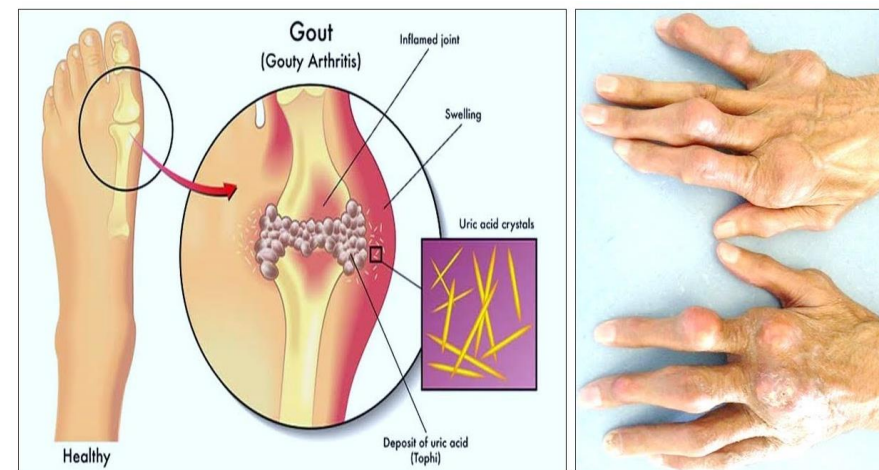
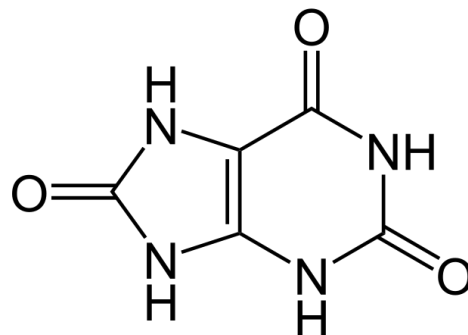
antioxidační ochrana

- enzymy:
 - superoxiddismutasa
 - glutathionperoxidasa
 - katalasa
- endogenní antioxidanty:
 - vysokomolekulární:
transferin, feritin, haptoglobin
 - nízkomolekulární:
kyselina močová, askorbát,
koenzym Q, tokoferol, bilirubin



kyselina močová

- referenční hodnoty:
 - muži 200 – 420 $\mu\text{mol/l}$
 - ženy 140 – 360 $\mu\text{mol/l}$
- konečný produkt metabolismu purinů u lidí
- hlavní antioxidant plazmy
- chronická hyperurikémie
 - dna, hypertenze, onemocnění ledvin



alantoin

- referenční hodnoty: do 2 $\mu\text{mol/l}$
- produkt oxidace kyseliny močové a konečný produkt metabolismu purinů
- ukazatel oxidačního stresu
- terapeutické účinky
 - zklidnění kožního podráždění
 - stimulace růstu zdravé tkáně
 - produkty pro regeneraci pokožky



stanovení alantoinu

původní metoda

- velký objem vzorku (300 μ l)
- složitá příprava vzorku
 - precipitace
 - SPE extrakce
 - převedení na glyoxylát
 - derivatizace DNPH
- LC
 - gradientová eluce (C18), 45 min
 - UV detekce
- pouze alantoin

nová metoda

- menší objem vzorku a jednodušší odběr
- jednodušší příprava vzorku
- rychlejší metoda
- simultánní stanovení kyseliny močové a alantoinu



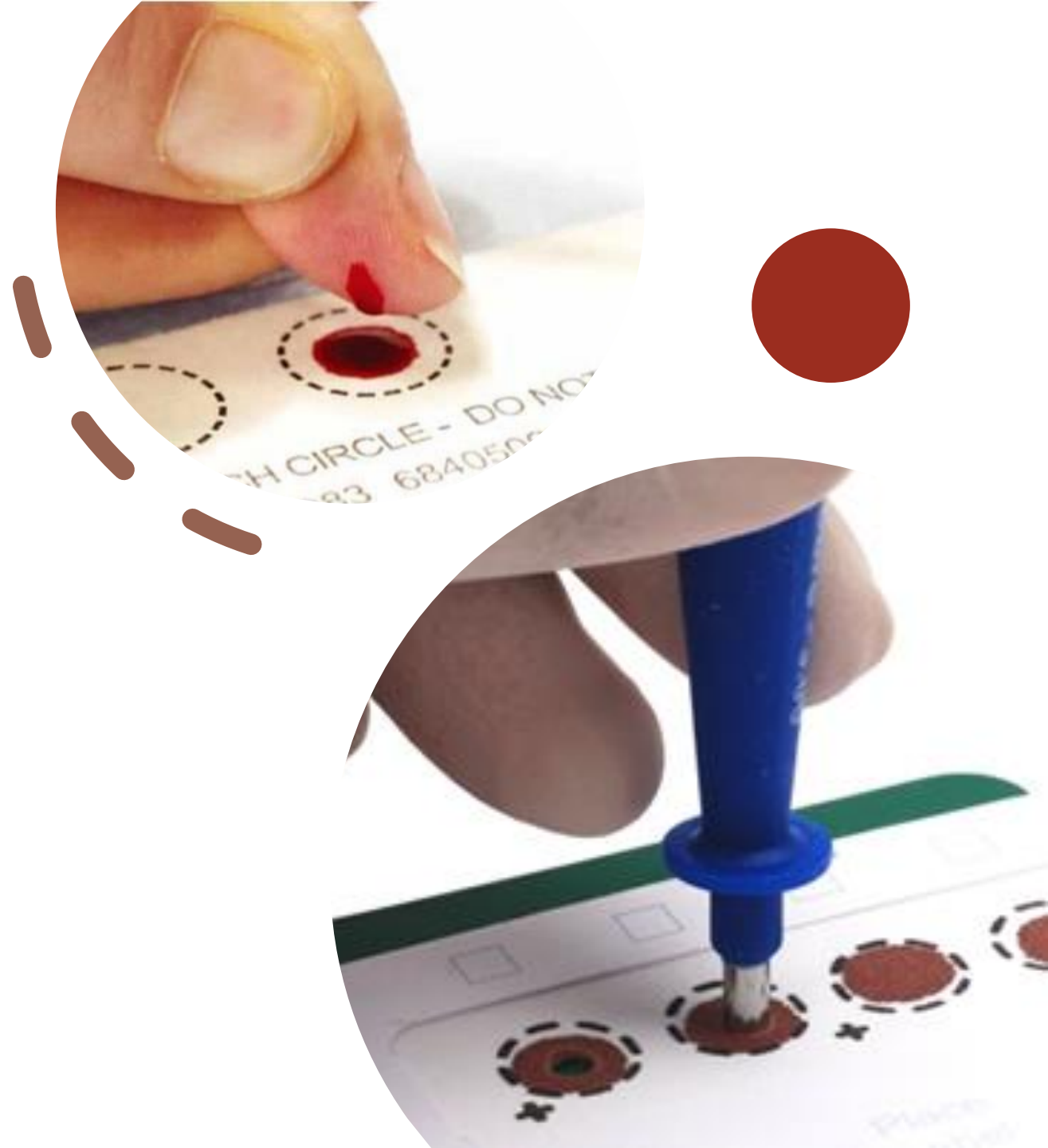
stanovení kyseliny močové

- rutinní stanovení v biochemických laboratořích
 - metoda s urikasou
 - sérum před plazmou – EDTA, citrát, oxalát inhibují urikasu
 - interference redukujících látek: glukosa, bilirubin, kyselina askorbová
- správnější a citlivější metody
 - LC s UV nebo MS detekcí
 - GC-MS s isotopovým zředováním



technika suché kapky

- 10 až 30 μl biologického materiálu (plná krev, plasma, sérum, moč, sliny, mateřské mléko)
- aplikátorem nebo přímo do předdefinovaných kruhů
- schnutí alespoň 3 hodiny
- vyražení terčíku
(6 mm v průměru \sim 10 μl krve)



suchá kapka krve

výhody

- rychlý a téměř neinvazivní odběr vzorku
- jednoduchý odběr vzorku, transport a uskladnění
- zvýšení stability analytů
- možnost automatizace

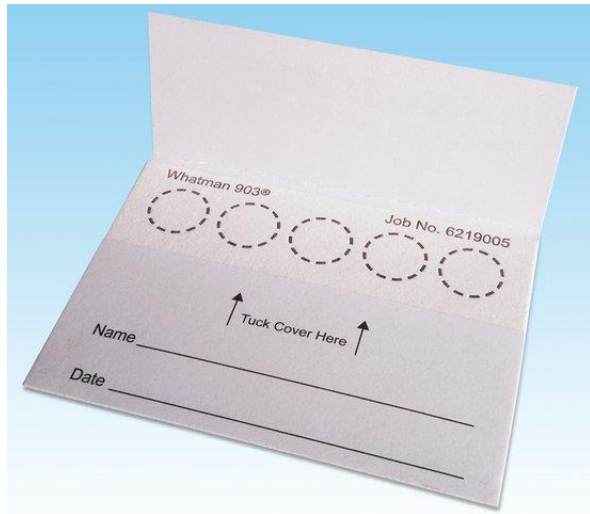
nevýhody

- malý objem → nízká koncentrace analytu
- limitovaný počet opakování analýzy
- hematokrit
- kalibrace, kontrolní materiál
- ...



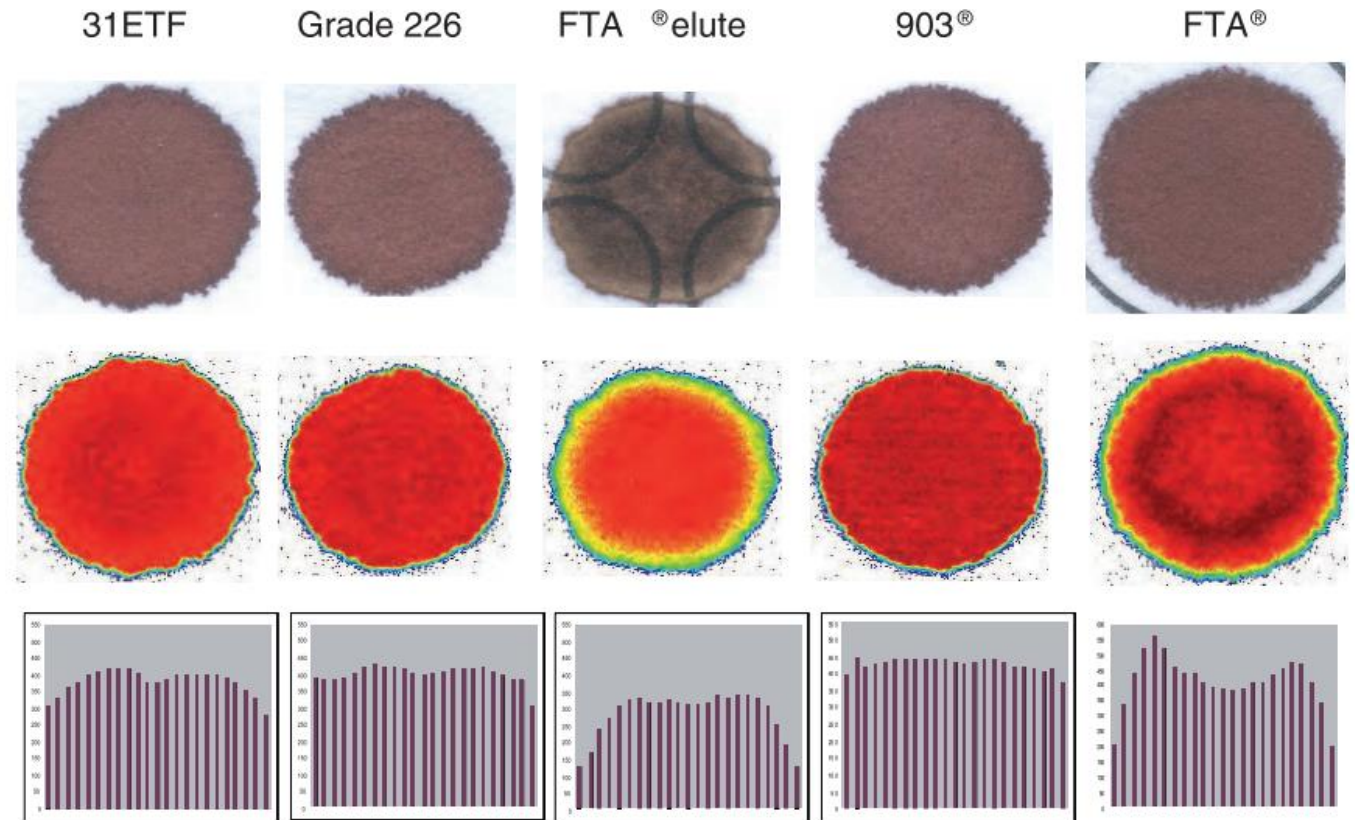
Whatman 903

- plná krev
- novorozenecký screening



Whatman FTA

- plná krev nebo homogenát tkáně
- nukleové kyseliny
 - lýza buňky, denaturace proteinů, ochrana nukleových kyselin před oxidací a UV zářením



Ren X. Bioanalysis 2010, 2: 1469-1475.



problémy

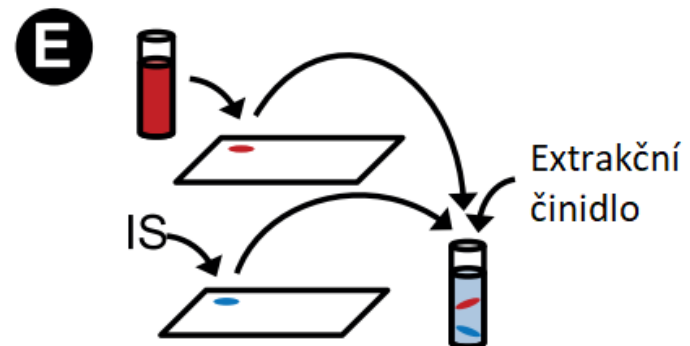
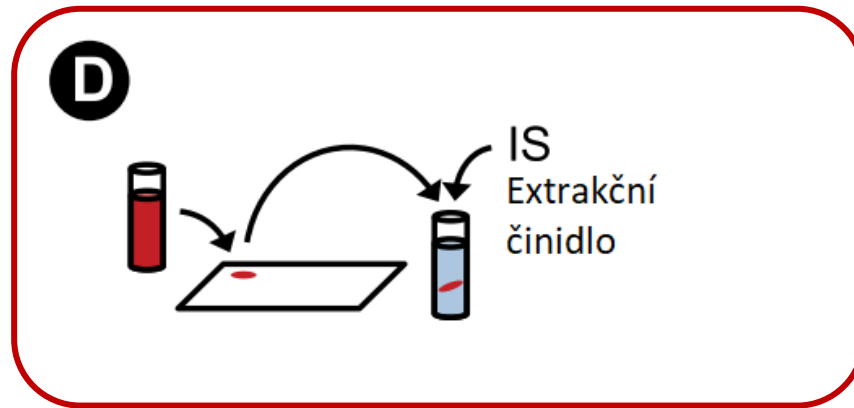
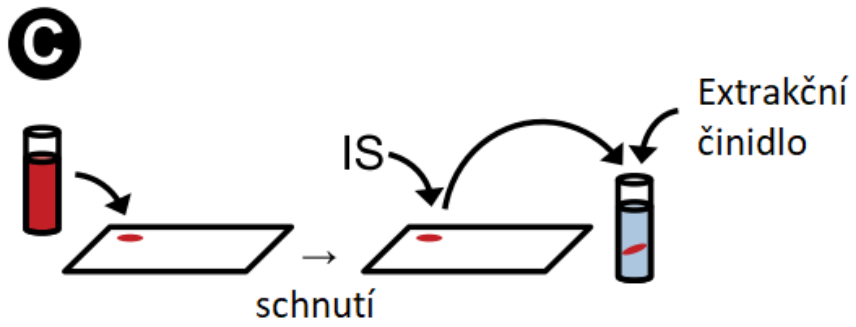
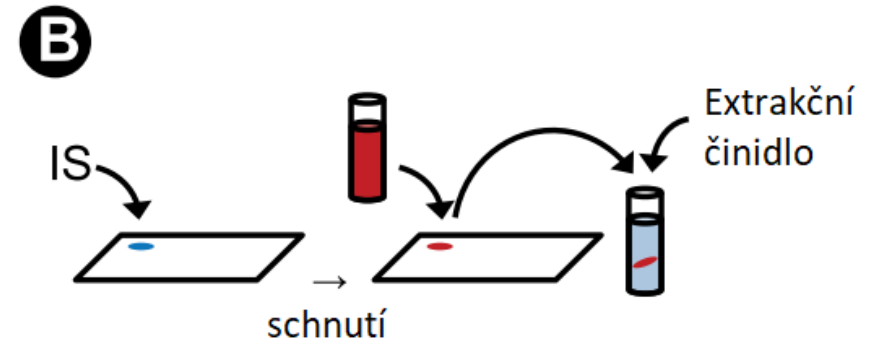
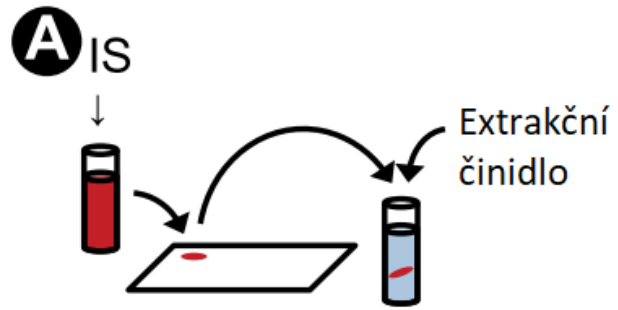
malý objem vzorku

malá rozpustnost KM

polarita analytů

ISTD

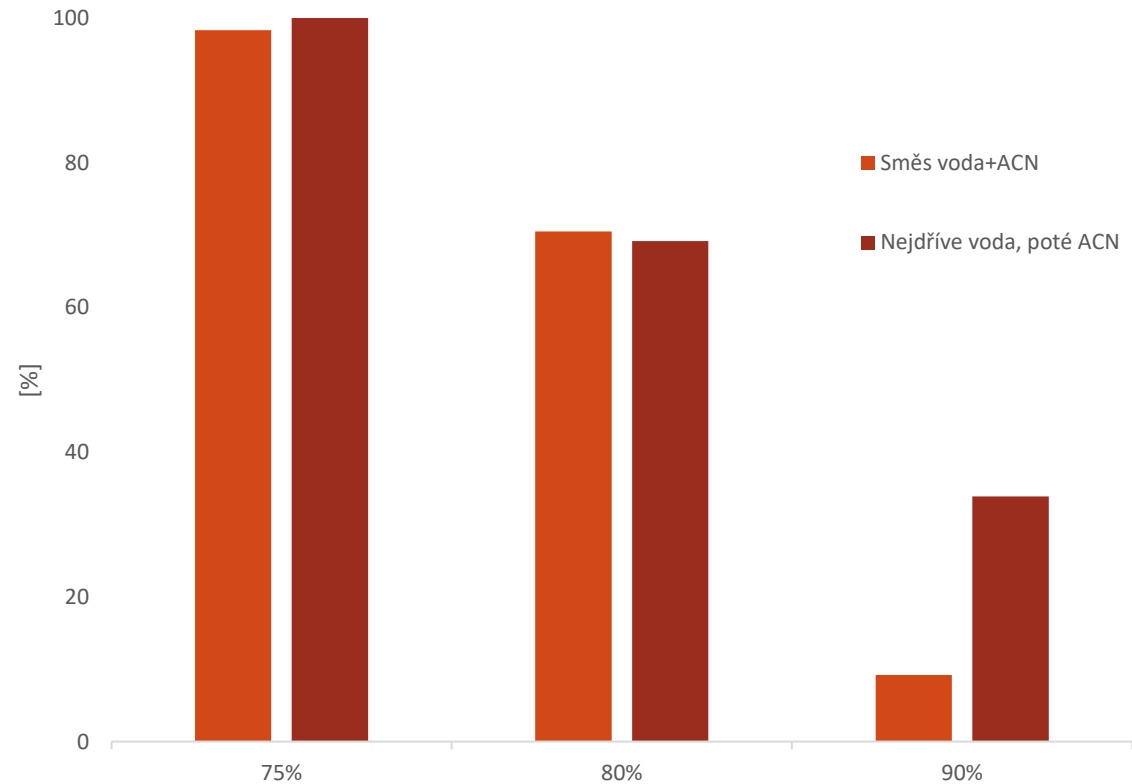
extrakce



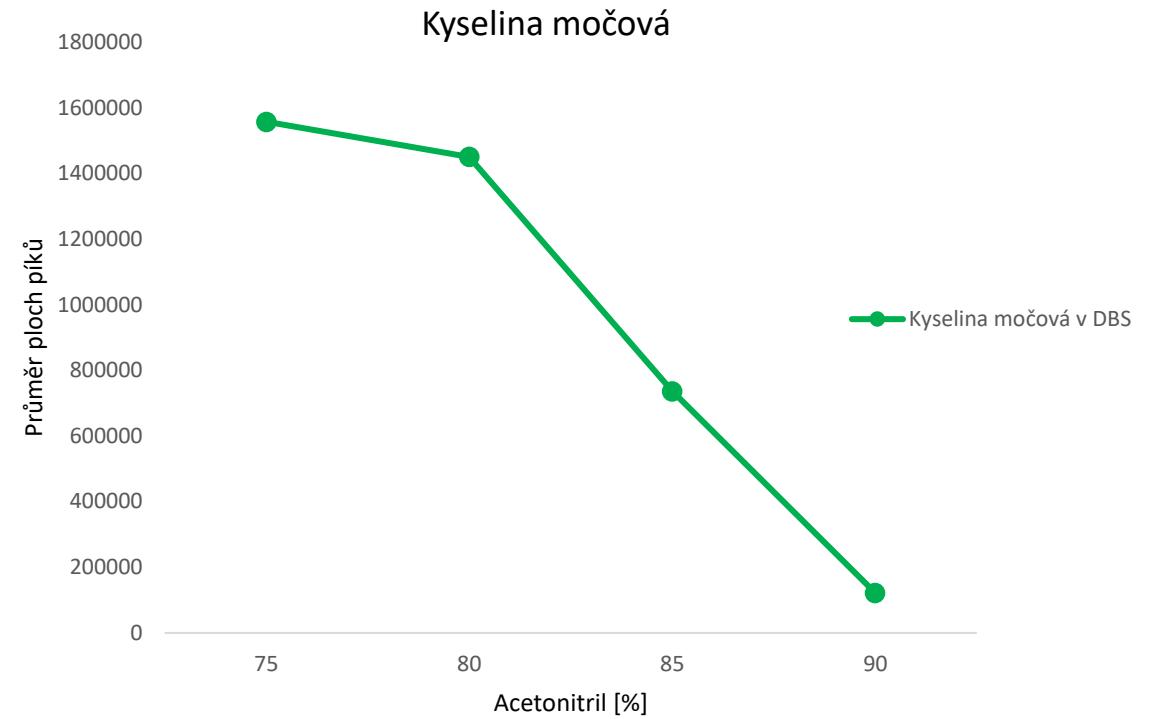
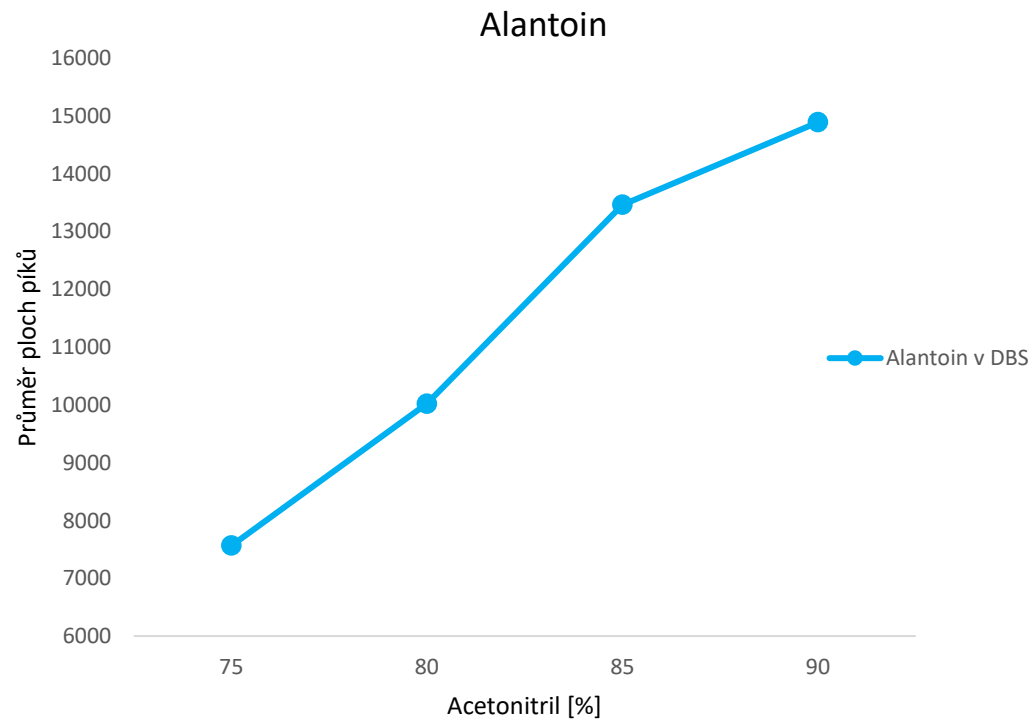
příprava vzorku

- vyražení terčíku + ISTD
- extrakce
 - směs vody a ACN
- ultrazvuk
- LC-MS

Relativní výtěžnost KM

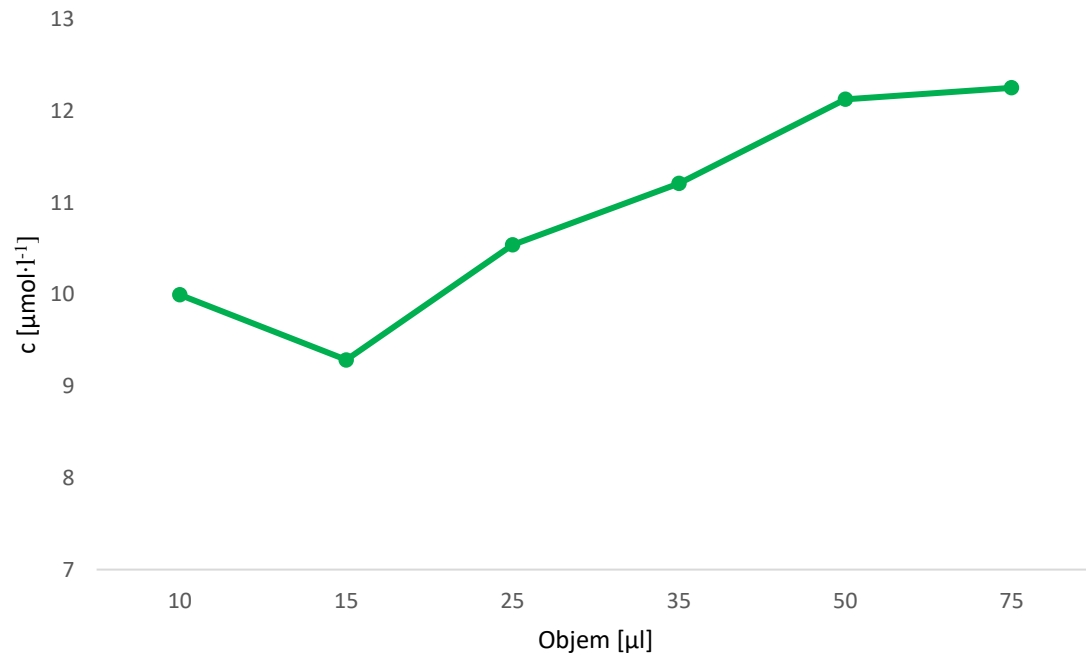


příprava vzorku



příprava vzorku

Závislost koncentrace alantoinu na objemu nakapané krve



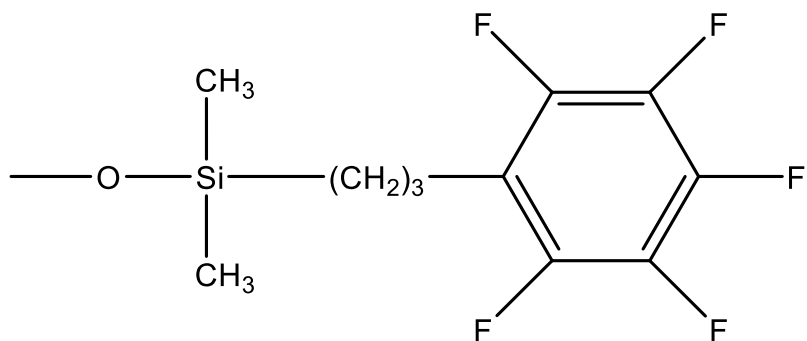
Závislost koncentrace kyseliny močové na objemu nakapané krve



kapalinová chromatografie

LC-20 (Shimadzu)

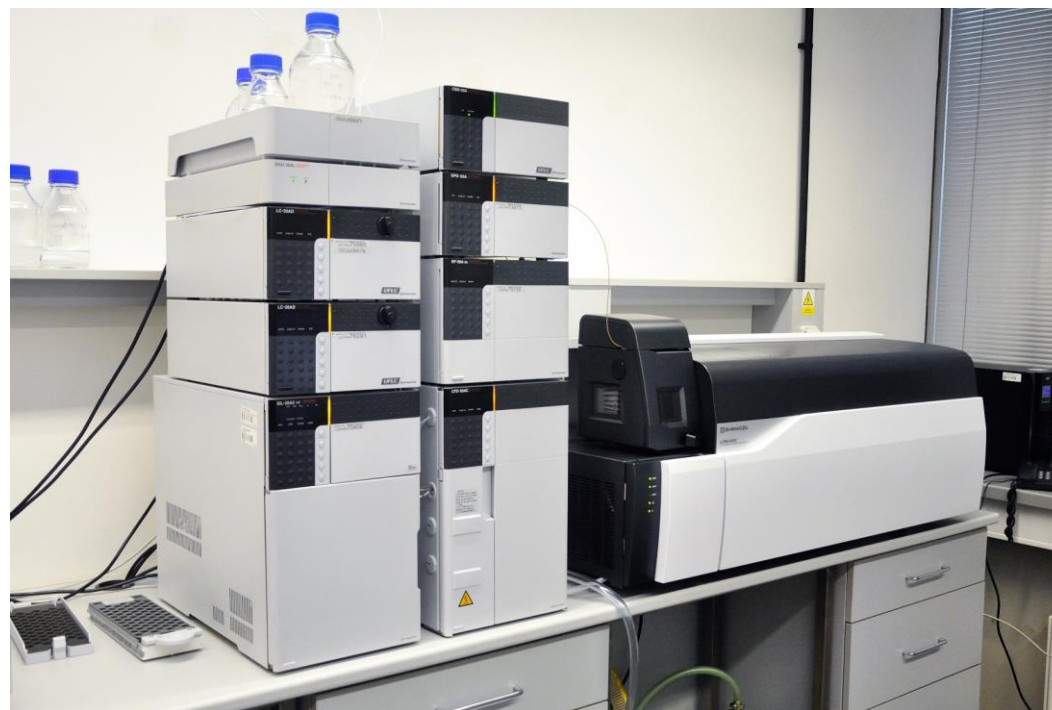
- kolona: Discovery HS-F5
3 μm , 2,1 x 150 mm, 37°C
- isokratická eluce:
10% ACN ve vodě + 0,1% FA
- průtok: 0,2 ml/min
- doba analýzy: 3 min



hmotnostní spektrometrie

LCMS 8045 (Shimadzu)

- negativní mód
- ESI (-3000 V, 300 °C)

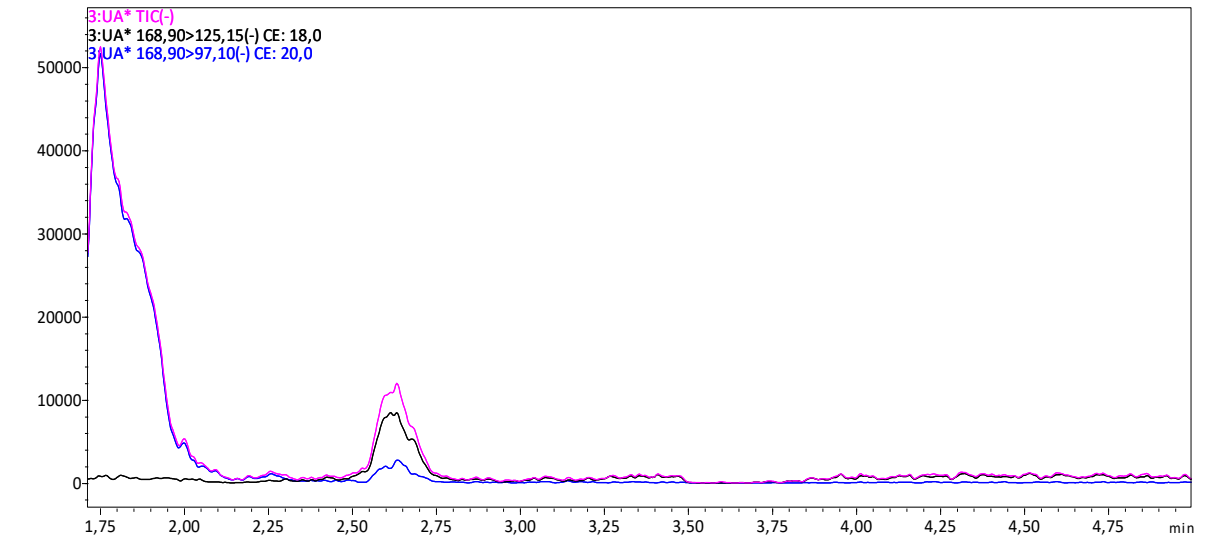
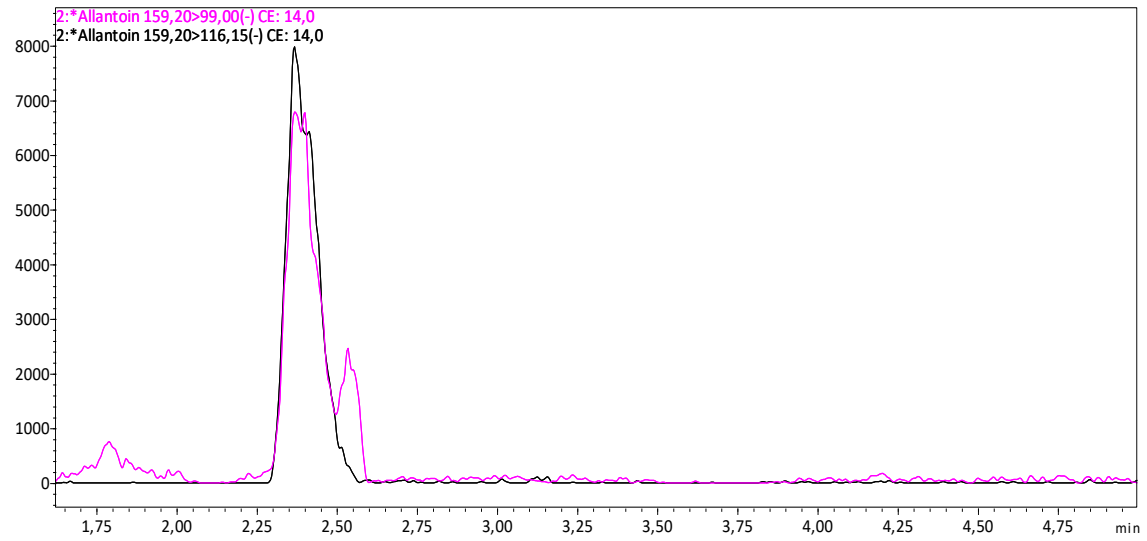
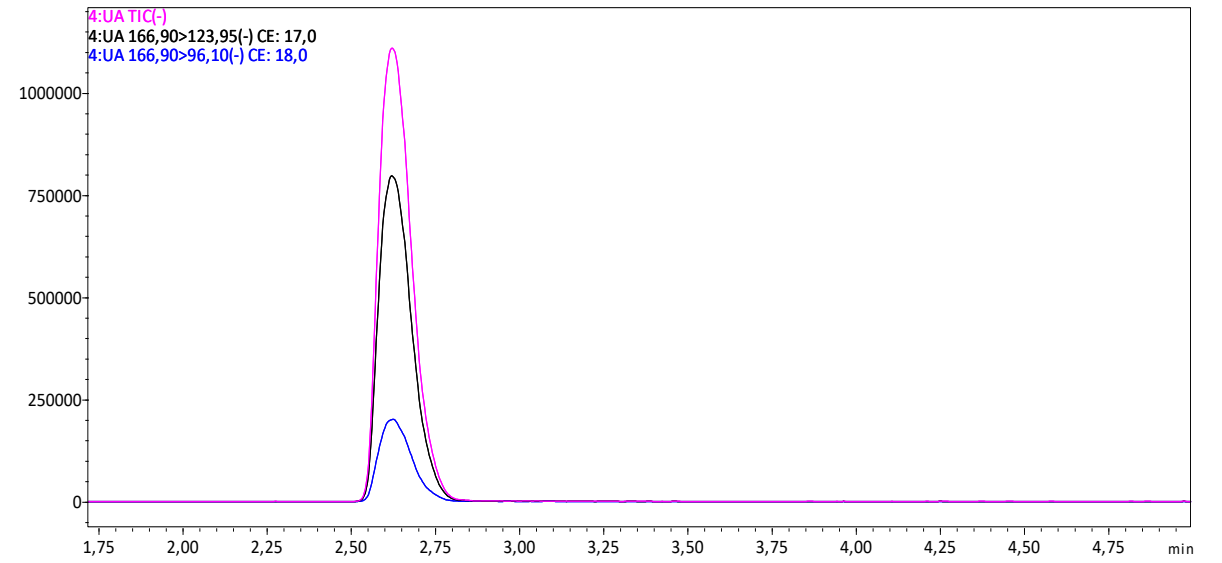
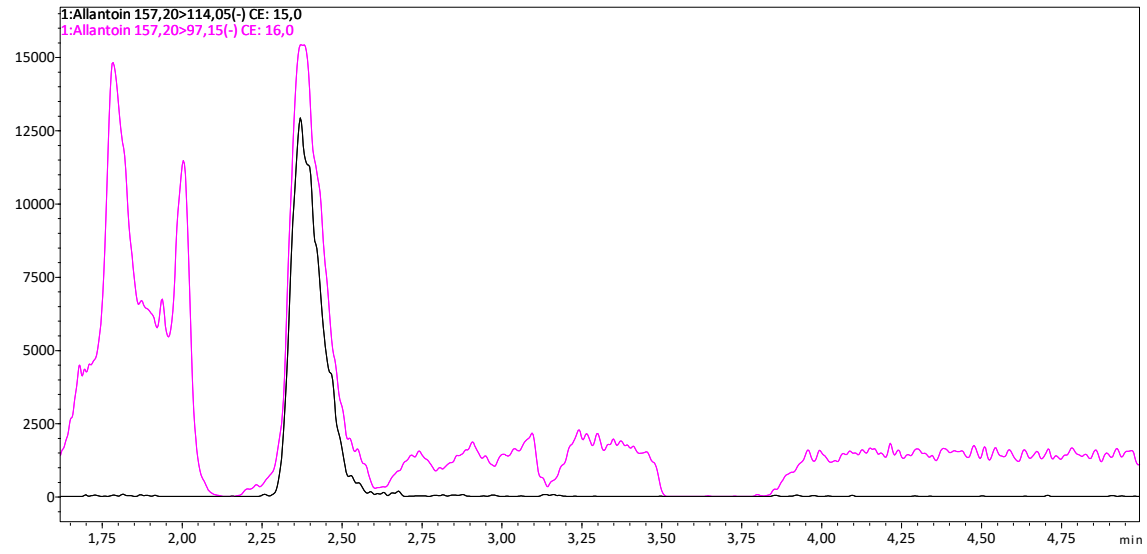


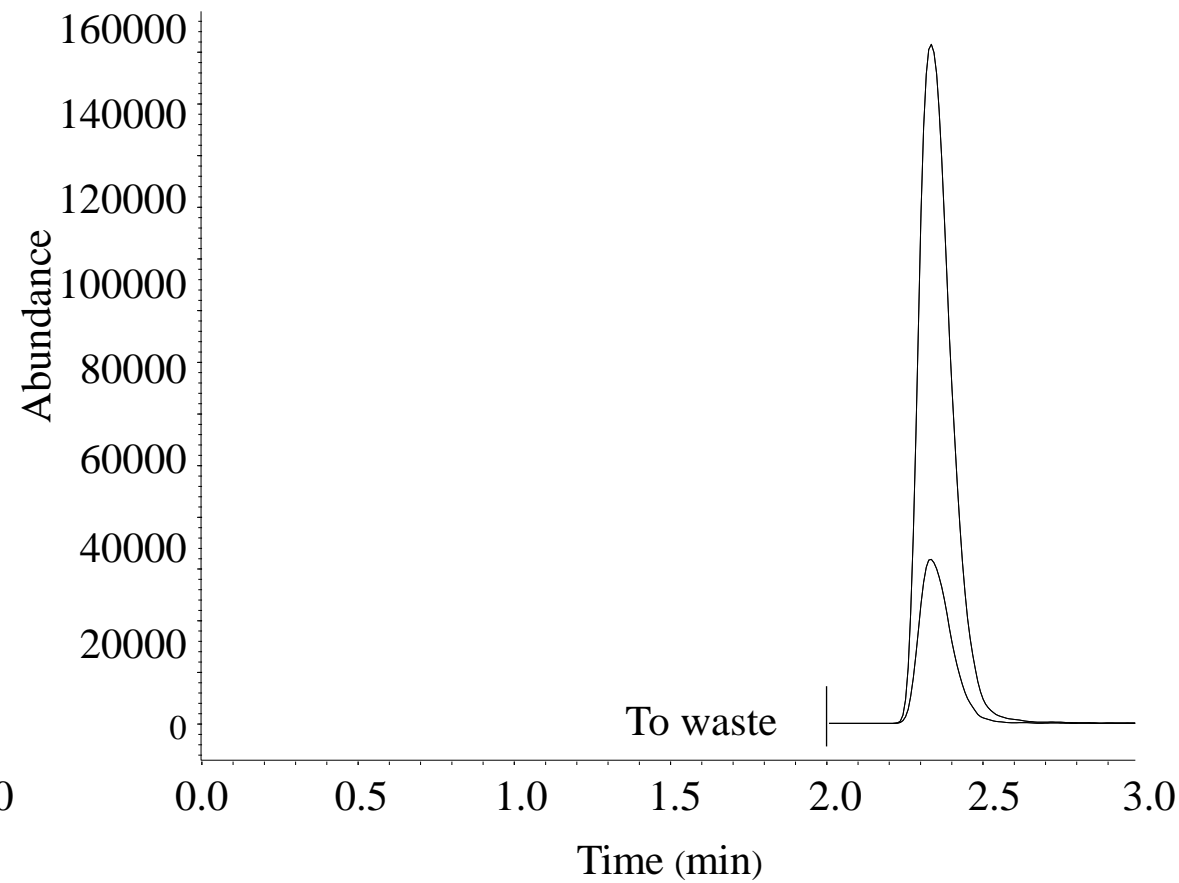
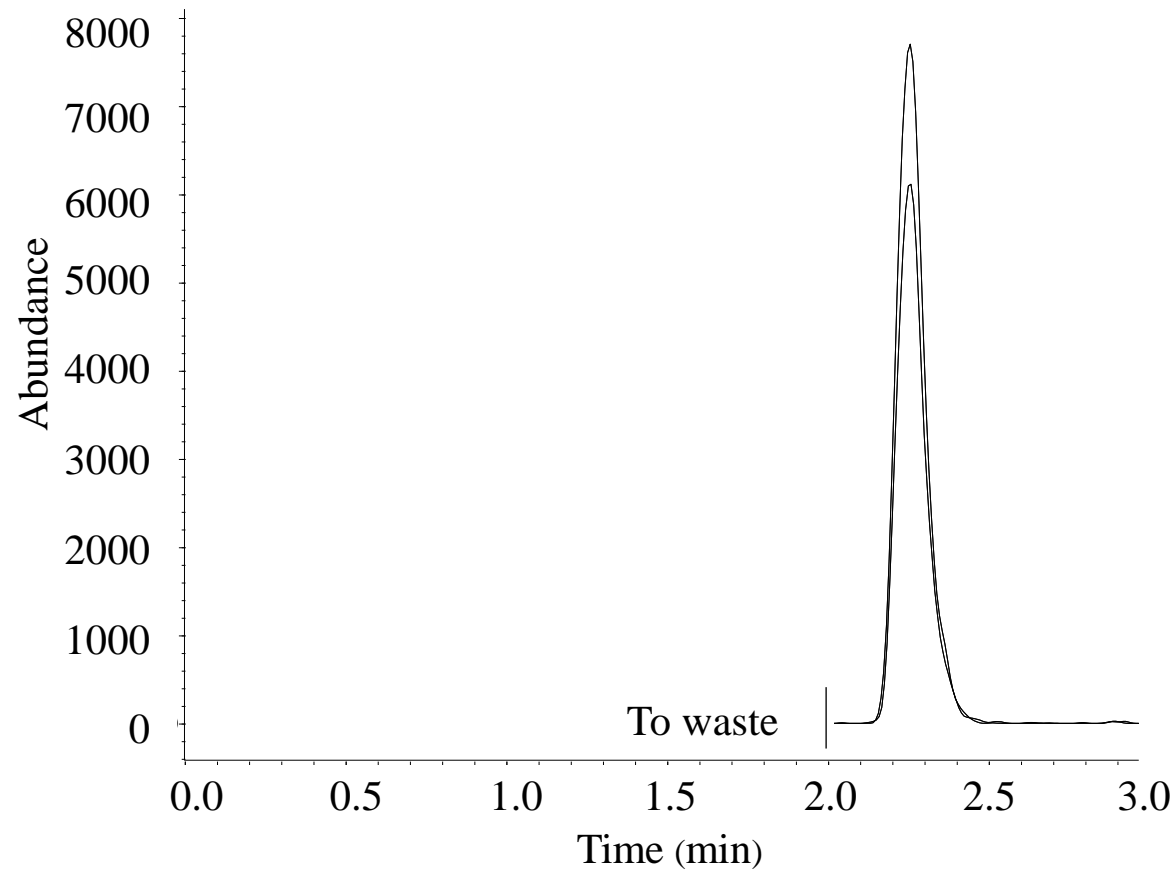
hmotnostní spektrometrie

- optimalizace MRM přechodů

analyt	prekurzor [m/z]	produkt [m/z]	kolizní energie [V]
alantoin	157	114	15
		97,1	16
alantoin* (IS)	159,2	116	14
		99	14
kyselina močová	166,9	123,9	17
		96,1	18
kyselina močová* (IS)	168,9	125,1	18
		97,1	20

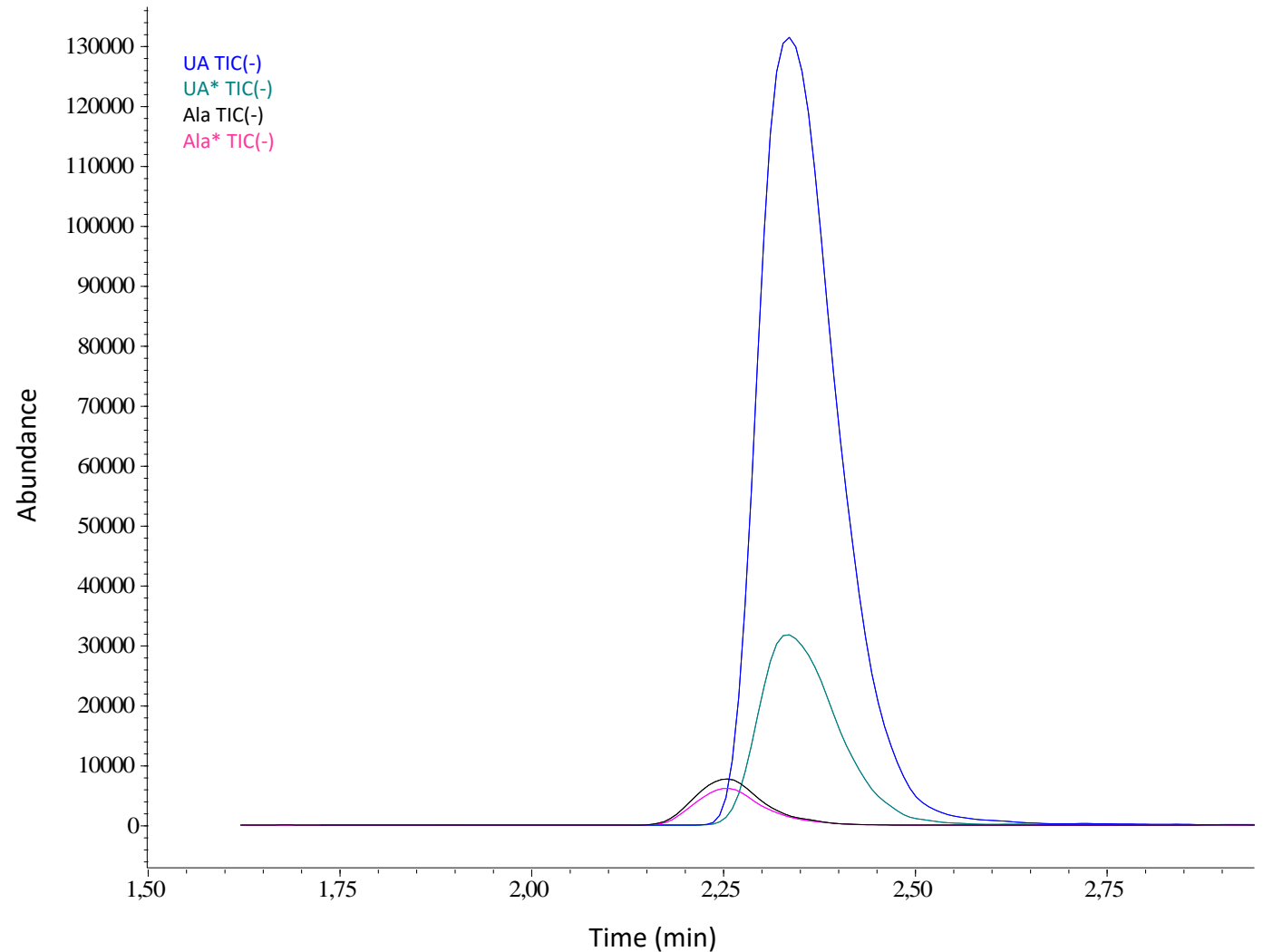
problém u reálného vzorku – interference matrice





optimalizace LC

- test 2 různých kolon
 - **Discovery HS-F5**
 - Ascentis C18
- test různých průtoků
 - 0,25; **0,20**; 0,15 ml/min
- složení mobilní fáze
(pH, druh rozpouštědla)
 - tvar píků, S/N
 - lineární odezva
 - reprodukovatelnost



cíle do budoucna

- validace metody
- porovnání výsledků s jinou nezávislou metodou
- aplikace metody do klinických studií





děkuji za pozornost