

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**STANOVENÍ VYBRANÝCH OXOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH  
VZORCÍCH METODOU PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE  
S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**AUTOR PRÁCE:** Bc. Jana Břeňová

**VEDOUCÍ PRÁCE:** doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

**2017**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**DETERMINATION OF SELECTED KETO ACIDS  
IN BIOLOGICAL SAMPLES USING GAS  
CHROMATOGRAPHY WITH MASS SPECTROMETRY**  
THESIS

**AUTHOR:** Bc. Jana Břeňová  
**SUPERVISOR:** doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

**2017**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Břeňová**  
Osobní číslo: **C15611**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Stanovení vybraných oxokyselin v biologických vzorcích metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

Možnosti stanovení oxokyselin v biologických vzorcích

Derivatizace v plynové chromatografii, především pro účely hmotnostní detekce

Stabilita oxokyselin v biologických vzorcích

Experimentální část:

Příprava a zpracování biologických vzorků pro stanovení vybraných oxokyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Testování vhodných derivatizačních činidel pro stanovení oxokyselin metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Optimalizace separace vybraných oxokyselin plynovou chromatografií

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Původní práce v recenzovaných časopisech**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

**28. listopadu 2016**

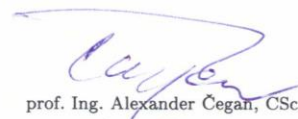
Termín odevzdání diplomové práce:

**12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Cegán, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9. 5. 2017

Jana Břeňová

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

Dále bych chtěla poděkovat své rodině za veškerou podporu během mého studia.

## ANOTACE

Stanovení 2-oxokyselin má klinický význam, protože 2-oxokyseliny jsou klíčovými meziprodukty v řadě hlavních biochemických cest. U pacientů s některými dědičnými metabolickými chorobami jsou hladiny 2-oxokyselin zvýšené, např. u fenylketonurie. Tato práce se zabývá zavedením metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení 2-oxokyselin v biologických vzorcích. Metoda dokáže simultánně stanovit sedm významných 2-oxokyselin (pyruvát, 2-oxoglutarát, fenylpyruvát, 2-oxoisovalerát, 2-oxoisokapronát, 2-oxo-3-methylvalerát, oxalacetát). Za účelem derivatizace oxoskupiny 2-oxokyselin byly testovány tři derivatizační činidla, 2,4-dinitrofenylhydrazin, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin a o-fenylendiamin, derivatizace karboxylové skupiny pak N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid v 1% trimethylchlorsilanu, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid v 1% trimethylchlorsilanu, směs methanolu a acetylchloridu a BF<sub>3</sub> v ethanolu. Pro separaci derivátů 2-oxokyselin byla použita kapilární kolona HP-5, kdy byly deriváty 2-oxokyselin separovány do 40 minut. Linearita byla dosažena v celém rozsahu testovaných koncentrací. Přesnost v sérii, vyjádřená variačním koeficientem, se u jednotlivých 2-oxokyselin výrazně lišila. Variační koeficient přesnosti stanovení pyruvátu a 2-oxoisokapronátu v plazmě byl do 7 %. Variační koeficient přesnosti stanovení dalších 2-oxokyselin byl i několikanásobně vyšší.

**Klíčová slova:** 2-oxokyseliny, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, derivatizační činidla

## ANNOTATION

Determination of 2-keto acids is of clinical importance because 2-keto acids are key intermediates in a number of major biochemical ways. In patients with some inherited metabolic diseases, levels of 2-keto acids are increased, e.g. phenylketonuria. This work deals with the development of a gas chromatography with mass spectrometry for the determination of 2-keto acids in biological samples. The method can simultaneously identify seven significant 2-keto acids (pyruvate, 2-oxoglutarate, phenylpyruvate, 2-oxoisovalerate, 2-oxoisocaproate, 2-oxo-3-methylvalerate, oxalacetate). Three derivatizing agents, 2,4-dinitrophenylhydrazine, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamide and o-phenylenediamine, for a derivatization of carbonyl groups of 2-keto acids were tested. Derivatizing agents N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane, a mixture of methanol and acetyl chloride and BF<sub>3</sub> with ethanol, for derivatization of the carboxyl group of 2-keto acids, were tested. The HP-5 capillary column was used to separate the 2-keto acid derivatives within 40 minutes. The linearity was reached throughout the range of tested concentrations. The intra-assay, expressed by the coefficient of variation, differed significantly for the individual 2-keto acids. The variation coefficients for pyruvate and 2-oxoisocaproate in plasma were up to 7%. The variation coefficients for the other 2-keto acids were even several times higher.

**Keywords:** 2-keto acids, gas chromatography with mass spectrometry, derivatizing agents



## SEZNAM ZKRATEK

2-OB	2-oxobutyrát
2-OG	2-oxoglutarát
2-OH	2-oxokapronát
5-SSA	kyselina 5-sulfosalicylová
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BCKA	oxokyseliny odvozené od aminokyselin s rozvětveným řetězcem
BSA	N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
DBS	suchá kapka krve
DDB	1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GTP	guanosintrifosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	vnitřní standard
KIC	2-oxoisokapronát
KIV	2-oxoisovalerát
KMV	2-oxo-3-methylvalerát
MeOH-AcCl	směs methanolu a acetylchloridu
MPA	kyselina metafosforečná
MS	hmotnostní spektrometrie (hmotnostní spektrometr)
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
MSUD	choroba javorového sirupu
NAD <sup>+</sup>	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADH+H <sup>+</sup>	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu
OA	oxalacetát
OPD	o-fenylendiamin
PC	papírová chromatografie

PCA	kyselina chloristá
PFBBr	2,3,4,5,6-pentafluorobenzylbromid
PFBHA	O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin
PDH	pyruvátdehydrogenasa
PhePYR	fenylpyruvát
PYR	pyruvát
TCA	kyselina trichloroctová
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS	trimethylsilyl-

# OBSAH

1 ÚVOD.....	16
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	17
2.1 CHARAKTERISTIKA STANOVOVANÝCH 2-OXOKYSELIN.....	17
2.1.1 Pyruvát.....	17
2.1.2 Oxalacetát.....	19
2.1.3 2-Oxoglutarát .....	21
2.1.4 Fenyropyruvát.....	22
2.1.5 Oxokyseliny odvozené od aminokyselin s rozvětveným řetězcem .....	23
2.1.6 2-Oxobutyrate .....	26
2.2 VYBRANÉ METABOLICKÉ PORUCHY SPOJENÉ S 2-OXOKYSELINAMI .....	28
2.2.1 Deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu .....	28
2.2.2 Laktátová acidosa .....	28
2.2.3 Deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu .....	29
2.2.4 Fenylyketonurie.....	29
2.2.5 Choroba javorového sirupu.....	30
2.2.6 Isovalerová acidemie.....	30
2.2.7 Hypervalinemie a hyperleucinemie-isoleucinemie .....	31
2.3 METODY STANOVENÍ 2-OXOKYSELIN .....	32
2.3.1 Papírová chromatografie .....	32
2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	32
2.3.3 Plynová chromatografie.....	33
2.3.3.1 Derivatizační činidla .....	34
2.3.3.2 Typy derivatizačních reakcí.....	34
2.3.3.3 Hmotnostní spektrometrie .....	40
2.4 STABILITA 2-OXOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH .....	41
2.3 REFERENČNÍ HODNOTY VYBRANÝCH 2-OXOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH.....	42
3 CÍL PRÁCE.....	43
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	44
4.1 MATERIÁL.....	44

4.1.1 Biologické vzorky.....	44
4.1.1.1 Plná krev .....	44
4.1.1.2 Plazma .....	44
4.1.2 Chemikálie .....	44
4.1.3 Pomůcky a přístroje.....	46
4.1.4 Pracovní roztoky.....	46
4.2 VÝBĚR VHODNÉHO DERIVATIZAČNÍHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI OXOSKUPINY 2-OXOKYSELIN.....	52
4.2.1 Derivatizace 2,4-dinitrofenylhydrazinem .....	52
4.2.1.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	52
4.2.1.2 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin a vzorky plné krve a plazmy.....	53
4.2.1.3 Standard pyruvátu .....	54
4.2.2 Derivatizace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem.....	55
4.2.2.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	55
4.2.2.2 Vzorky plné krve a plazmy .....	56
4.2.2.3 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	57
4.2.3 Derivatizace o-fenylendiaminem.....	58
4.2.3.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	58
4.3 VOLBA VHODNÉHO DERIVATIZAČNÍHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI KARBOXYLOVÉ SKUPINY 2-OXOKYSELIN .....	59
4.3.1 Derivatizace pentafluorobenzyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-penta- fluorobenzyl)hydroxylaminem methanolem s acetylchloridem .....	59
4.3.2 Derivatizace pentafluorobenzyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-penta- fluorobenzyl)hydroxylaminem] N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorosilanu.....	59
4.3.2.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	59
4.3.3 Derivatizace pentafluorobenzyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-penta- fluorobenzyl)hydroxylaminem] N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorosilanu.....	60
4.3.3.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	60
4.3.3.2 Vzorky plné krve a plazmy .....	60
4.3.4 Derivatizace pentafluorobenzyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-penta- fluorobenzyl)hydroxylaminem] BF <sub>3</sub> v ethanolu.....	60
4.3.4.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	60
4.4 OPTIMALIZACE PODMÍNEK DERIVATIZACE .....	62

4.4.1	Optimalizace koncentrace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu a teploty inkubace.....	62
4.4.1.1	Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	62
4.4.1.2	Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	62
4.4.1.3	Vzorek plné krve.....	63
4.4.2	Optimalizace množství N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu.....	63
4.4.2.1	Směsný roztok standardů 2-oxokyselin. ....	63
4.4.3	Optimalizace teploty inkubace při derivatizaci O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem a methanolem s acetylchloridem .....	64
4.4.3.1	Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	64
4.5	VOLBA VHODNÉHO EXTRAKČNÍHO ČINIDLA.....	65
4.5.1	Směsný roztok standardů 2-oxokyselin .....	65
4.6	VÝBĚR VHODNÉHO DEPRTEINAČNÍHO ROZTOKU .....	66
4.6.1	Směsný roztok standardů 2-oxokyselin a vzorky plazmy .....	66
4.7	ANALYTICKÉ PARAMETRY .....	67
4.7.1	Linearita .....	67
4.7.2	Přesnost v sérii.....	68
4.8	ZPRACOVÁNÍ VÝLEDKŮ.....	69
5	VÝSKEDKY A DISKUSE.....	70
5.1	VÝBĚR VHODNÉHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI OXOSKUPINY 2-OXOKYSELIN .....	70
5.2	VÝBĚR VHODNÉHO DERIVATIZAČNÍHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI KARBOXYLOVÉ SKUPINY PENTAFLUROBENZYLOXIMOVÝCH DERIVÁTŮ.....	73
5.3	OPTIMALIZACE PODMÍNEK DERIVATIZACE .....	74
5.3.1	Optimalizace vhodné koncentrace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu .....	74
5.3.2	Optimalizace teploty inkubace při derivatizaci 2-oxokyselin O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem .....	74
5.3.3	Optimalizace množství N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu.....	74
5.3.4	Optimalizace teploty inkubace při derivatizaci pentafluorobenzylloximů směsí methanolu a acetylchloridu.....	75
5.4	VOLBA VHODNÉHO EXTRAKČNÍHO ČINIDLA.....	76
5.5	VÝBĚR VHODNÉHO DEPRTEINAČNÍHO ROZTOKU .....	78

5.6 ANALYTICKÉ PARAMETRY .....	79
5.6.1 Kalibrace .....	79
5.6.2 Přesnost v sérii .....	80
6 ZÁVĚR .....	83
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	84
8 PŘÍLOHY .....	89

## SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Strukturní vzorec pyruvátu .....	17
Obrázek 2: Poslední krok glykolýzy. ....	18
Obrázek 3: Strukturní vzorec oxalacetátu. ....	19
Obrázek 4: Reakce acetyl-CoA s oxalacetátem za vzniku citrátu. ....	20
Obrázek 5: Dehydrogenace malátu za vzniku oxalacetátu. ....	20
Obrázek 6: Strukturní vzorec 2-oxoglutarátu .....	21
Obrázek 7: Přeměna aminoskupiny na močovinu. ....	21
Obrázek 8: Strukturní vzorec fenylpyruvátu. ....	22
Obrázek 9: Metabolismus fenylalaninu. ....	23
Obrázek 10: Strukturní vzorec 2-oxoisovalerátu (KIV), 2-oxoisokapronátu (KIC) a 2-oxo-3-methylvalerátu (KMV). ....	24
Obrázek 11: Metabolismus valinu, leucinu a isoleucinu .....	25
Obrázek 12: Strukturní vzorec 2-oxobutyátu .....	26
Obrázek 13: Katabolismus methioninu .....	27
Obrázek 14: Derivatizace oxoskupiny 2-oxokyselin 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH). ....	32
Obrázek 15: Reakce 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenu (DDB) s 2-oxokyselinou za vzniku fluorescenčního produktu 6,7-dimethoxy-2(1H)-chinoxalinu. ....	33
Obrázek 16: Reakce o-fenylendiaminu (OPD) s 2-oxokyselinou za vzniku fluoreskujícího derivátu. ....	33
Obrázek 17: Derivatizace karbonylové skupiny 2-oxokyseliny O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem (PFBHA). ....	35
Obrázek 18: Syn- a anti- isomery pentafluorobenzoyloximu. ....	36

Obrázek 19: Derivatizace karboxylové skupiny 2-oxokyseliny 2,3,4,5,6-pentafluorobenzylbromidem (PFBBR).....	36
Obrázek 20: Derivatizace 2-oxokyseliny BF <sub>3</sub> v methanolu za vzniku methylester derivátu. ....	37
Obrázek 21: Derivatizace karboxylové skupiny 2-oxokyseliny N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidem (BSA) za vzniku TMS-derivátu.....	38
Obrázek 22: Derivatizace 2-oxokyseliny N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA) za vzniku TMS-derivátu.....	39
Obrázek 23: Derivatizace 2-oxokyseliny N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidem (MSTFA) za vzniku TMS-derivátu.....	39
Obrázek 24: Polymerace kyseliny pyrohroznové na $\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -methyl-2-oxoglutarovou kyselinu. ....	41
Tabulka 1: Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin v plné krvi.....	42
Tabulka 2: Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin v plazmě.....	42
Tabulka 3: Příprava roztoku O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu o koncentracích asi 40, 20, 10, 5 a 1 mg/ml.....	50
Tabulka 4: Koncentrace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu a teplota inkubace.....	62
Tabulka 5: Množství O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu a teplota inkubace.....	63
Tabulka 6: Teplota inkubace při derivatizaci oxokyselin.....	64
Tabulka 7: Intenzita derivátů 2-oxokyselin ( $\times 10^6$ ) po derivatizaci O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem a N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorsilanu a o-fenylendiaminem a N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorsilanu. ....	71
Tabulka 8: Intenzity derivátů oxokyselin ( $\times 10^6$ ) po extrakci ethylacetátem, hexanem a diethyletherem.....	76
Tabulka 9: Parametry kalibračních křivek vybraných 2-oxokyselin (extrakce ethylacetátem).....	79
Tabulka 10: Parametry kalibračních křivek vybraných 2-oxokyselin (extrakce hexanem). ....	79
Tabulka 11: Parametry kalibračních křivek vybraných 2-oxokyselin. ....	80
Tabulka 12: Přesnost stanovení 2-oxokyselin ve vzorcích plazmy.....	80
Tabulka 13: Přesnost stanovení 2-oxokyselin ve vzorcích plné krve. ....	81

## 1 ÚVOD

2-Oxokyseliny mají důležitou úlohu v metabolismu aminokyselin, sacharidů a lipidů. Jejich stanovení v biologických vzorcích je významné pro diagnostiku některých metabolických poruch, mezi něž patří například choroba javorového sirupu, fenyلكetonurie a isovalerová acidemie. Výše jmenované metabolické poruchy jsou ze zákona povinně diagnostikovány v rámci novorozeneckém screeningu. Důvodem je, že včasná léčba zachraňuje novorozencům život. Klinickými příznaky těchto nemocí jsou ve většině případů mentální retardace a opožděný vývoj.

2-Oxokyseliny byly v minulosti stanovovány papírovou chromatografií, která se již v dnešní době nepoužívá. Často používanou metodou pro stanovení 2-oxokyselin v biologických vzorcích je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí, kdy derivatizací 2-oxokyselin *o*-fenylendiaminem vznikají vysoce fluoreskující deriváty. Nevýhodou tohoto činidla je vysoká karcinogenita a mutagenita. Další vhodnou metodou pro stanovení 2-oxokyselin je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, která byla použita i v této práci. Obecně je známo, že detekce hmotnostním spektrometrem je vysoce citlivá a selektivní.

Nevýhodou plynové chromatografie je, že analyt musí být dostatečně těkavý. Proto musí být polární látky vhodným postupem, derivatizací, převedeny na méně polární a dostatečně těkavé deriváty. Pro derivatizaci karbonylových skupin 2-oxokyselin se nejvíce používají 2,4-dinitrofenylhydrazin, *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin a *o*-fenylendiamin. Nevýhodou prvních dvou zmíněných derivatizačních činidel je tvorba isomerů daných derivátů 2-oxokyselin. Pro karboxylové skupiny 2-oxokyselin se nejčastěji používají silylační činidla, která však nejsou dostatečně selektivní.



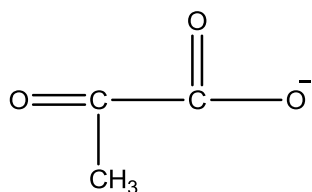
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 CHARAKTERISTIKA STANOVOVANÝCH 2-OXOKYSELIN

2-Oxokyseliny jsou důležitými meziprodukty v biosyntéze aminokyselin, karboxylových kyselin a sacharidů. Zvýšené hladiny některých 2-oxokyselin v séru a moči nacházíme u pacientů s dědičnými metabolickými poruchami, jako je choroba javorového sirupu, fenyلكetonurie, ale také u pacientů s poruchou pyruvátdehydrogenasového komplexu. Také u pacientů s mentální retardací je charakteristické abnormální vylučování 2-oxokyselin. Stanovení 2-oxokyselin je tak užitečné pro diagnostiku a léčbu těchto onemocnění [1–4].

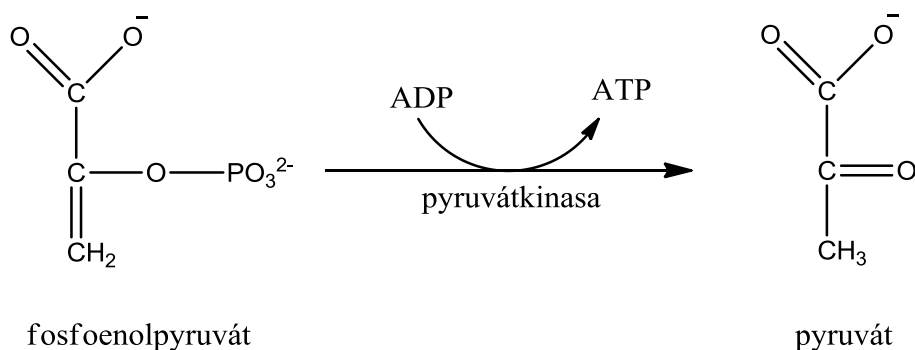
#### 2.1.1 Pyruvát

Pyruvát (PYR) je 2-oxokyselina s molární hmotností 88,06 g/mol. (Obrázek 1). Systematický název PYR je kyselina 2-oxopropanová.



**Obrázek 1:** Strukturní vzorec pyruvátu.

V cytosolu všech savčích buněk probíhá glykolýza, kdy z 1 molekuly glukosy vznikají 2 molekuly PYR. V posledním kroku glykolýzy je PYR tvořen z fosfoenlpyruvátu, za katalýzy pyruvátkinasy, kdy se přenáší makroergický fosfát fosfoenlpyruvátu na ADP za zisku ATP (Obrázek 2). Tato reakce je nevratná. Enzym pyruvátkinasa je aktivován fruktosa-1,6-bisfosfátem, insulinem a inhibován glukagonem, ATP, alaninem a adrenalinem. Tento enzym je závislý na iontech  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{K}^+$ .



**Obrázek 2:** Poslední krok glykolýzy.

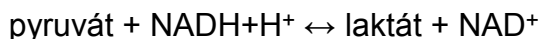
PYR se za fyziologických podmínek nehromadí, ale je transportován z cytoplazmy do matrix mitochondrií mechanismem symportu, při němž je kotransportován jeden proton. V matrix mitochondrií PYR podléhá oxidativní dekarboxylaci v tzv. pyruvátdehydrogenasovém komplexu a vzniká z něj acetylkoenzym A (acetyl-CoA, Rovnice 1). Kyselina octová (acetyl-CoA) je zcela oxidována v citrátovém cyklu za zisku 12 molekul ATP.

**Rovnice 1:** Pyruvátdehydrogenasový komplex.



Při anaerobní glykolýze je PYR redukován na laktát za katalýzy laktátdehydrogenasou (Rovnice 2). Tvorba laktátu umožňuje regeneraci  $\text{NADH} + \text{H}^+$  na  $\text{NAD}^+$ , a tak může pokračovat glykolýza i v nepřítomnosti kyslíku.

**Rovnice 2:** Redukce pyruvátu na laktát.



PYR hraje také významnou úlohu v procesu glukoneogeneze. Tímto procesem se syntetizuje glukosa, pokud není dostatečný přísun sacharidů v potravě. PYR, vzniklý z alaninu za katalýzy alaninaminotransferasou nebo laktátu za katalýzy laktátdehydrogenasou, je v matrix mitochondrií, za katalýzy pyruvátkarboxylasou, v přítomnosti ATP, biotinu a  $\text{CO}_2$ , karboxylován na oxalacetát. Oxalacetát, buď ve formě malátu, nebo aspartátu, přechází do cytosolu, kde je syntetizován fosfoenolpyruvát za spotřeby makroergického fosfátu v podobě guanosintrifosfátu

(GTP) nebo inosin trifosfátu a uvolnění CO<sub>2</sub> (Rovnice 3). Další kroky jsou obrácené reakce glykolýzy, kromě 2 nevratných reakcí, katalyzovaných fosfatasy (fruktosa-1,6-bisfosfatasa, glukosa-6-fosfatasa).

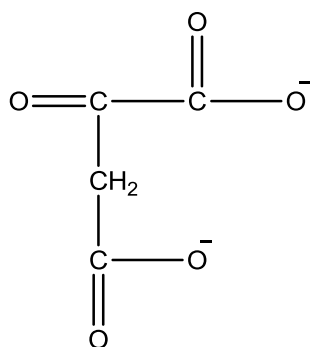
**Rovnice 3:** Dekarboxylace oxalacetátu.



Uhlíkaté kostry aminokyselin jsou odbourány na 7 konečných produktů, PYR, oxalacetát, 2-oxoglutarát, sukcinyl-CoA, fumarát, acetyl-CoA a acetoacetát. Při odbourání uhlíkatých řetězců glycinu, serinu, cysteinu, threoninu a tryptofanu vzniká PYR. Transaminací alaninu, za katalýzy alaninaminotransferasou, a deaminací serinu, za katalýzy serinhydratasou, taktéž vzniká PYR. Acetyl-CoA, vzniklý z PYR, je substrátem při syntéze mastných kyselin. Acetyl-CoA vzniká v mitochondriích, ovšem syntéza mastných kyselin probíhá v cytosolu, proto acetyl-CoA přechází do cytosolu ve formě citrátu, který vzniká reakcí acetyl-CoA s oxalacetátem

### 2.1.2 Oxalacetát

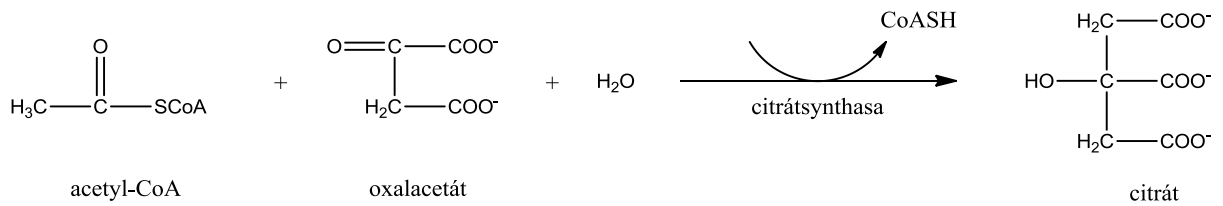
Oxalacetát (OA) je čtyřuhlíkatá dikarboxylová kyselina s molární hmotností 132,07 g/mol (Obrázek 3). Systematický název OA je kyselina 2-oxobutandiová.



**Obrázek 3:** Strukturní vzorec oxalacetátu.

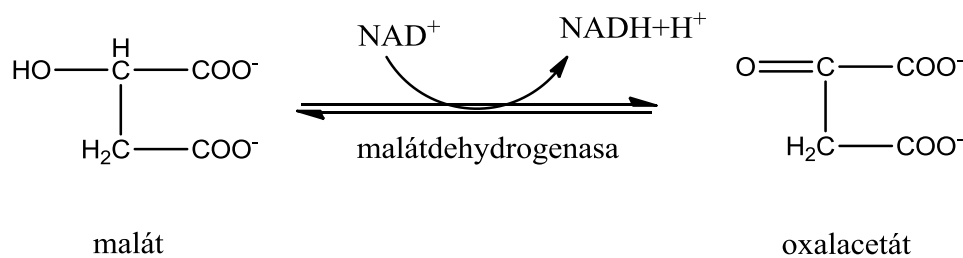
Jak již bylo zmíněno výše, OA se účastní procesu glukoneogeneze. Při odbourávání uhlíkatých koster aspartátu a asparaginu vzniká OA. V citrátovém cyklu acetyl-CoA, vzniklý například oxidací mastných kyselin nebo oxidativní

dekarboxylací PYR, reaguje s OA za vzniku citrátu. Tato nevratná reakce je katalyzována citrátsynthasou (Obrázek 4). Citrátsyntasa je inhibována ATP.



**Obrázek 4:** Reakce acetyl-CoA s oxalacetátem za vzniku citrátu.

Následuje řada reakcí, kdy se úplně oxiduje kyselina octová. V poslední reakci citrátového cyklu vzniká OA dehydrogenací malátu, za katalýzy malátdehydrogenasou a zisku  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (Obrázek 5). Vzniklý OA reaguje s dalším acetyl-CoA. K oxidaci velkého množství kyseliny octové (acetyl-CoA) je zapotřebí pouze malého množství OA, proto lze označit úlohu OA za katalytickou.



**Obrázek 5:** Dehydrogenace malátu za vzniku oxalacetátu.

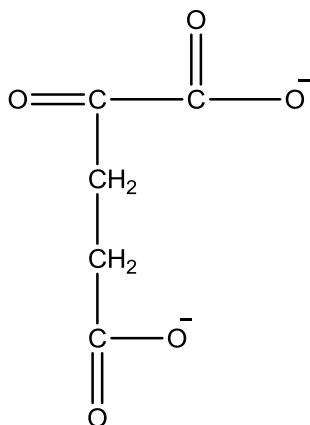
OA je důležitý pro syntézu mastných kyselin, protože acetyl-CoA přechází z mitochondrie do cytosolu ve formě citrátu. V cytosolu je citrát, za katalýzy citrátlyasy, přeměněn na acetyl-CoA a OA (Rovnice 4). Acetyl-CoA pak slouží jako prekurzor syntézy mastných kyselin. OA je, za katalýzy malátdehydrogenasou, redukován na malát, vznikající  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  je taktéž využit při syntéze mastných kyselin.

**Rovnice 4:** Vznik acetyl-CoA z citrátu v cytosolu.



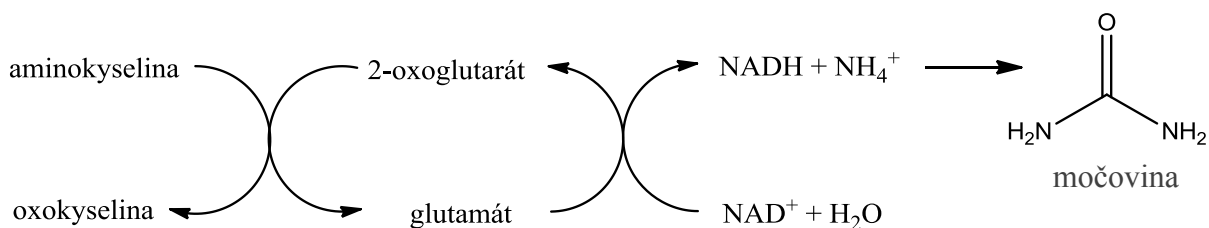
### 2.1.3 2-Oxoglutarát

2-Oxoglutarát (2-OG) je 2-oxokyselina s molární hmotností 146,11 g/mol a její systematický název je 2-oxopent-1,5-diová kyselina (Obrázek 6). 2-OG má významnou úlohu při odbourávání aminokyselin a účastní se citrátového cyklu.



**Obrázek 6:** Strukturní vzorec 2-oxoglutarátu.

Při transaminaci se, za katalýzy odpovídajících aminotransferas, přeneše aminoskupina z aminokyseliny na 2-oxokyselinu, kofaktorem je pyridoxalfosfát. Akceptorem aminoskupin většiny aminokyselin je 2-OG, kdy vzniká aminokyselina glutamát (Obrázek 7). Glutamát je následně, za katalýzy glutamátdehydrogenasou, regenerován zpět na 2-OG a uvolňuje se amoniak. Toxický amoniak je v ornithinovém cyklu přeměněn na močovinu. Uvolnění aminoskupiny ve formě amoniaku tak vyžaduje společnou činnost aminotransferasy a glutamátdehydrogenasy.



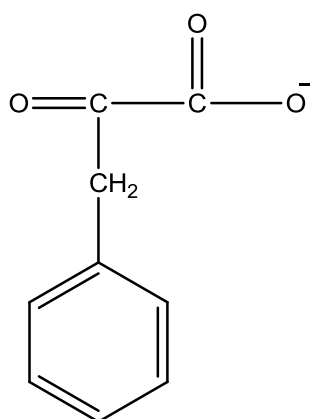
**Obrázek 7:** Přeměna aminoskupiny na močovinu.

Transaminace je reversibilní reakce a podílí se na katabolismu i biosyntéze aminokyselin. Glutamátdehydrogenasa je jediným enzymem v organismu, který

využívá kofaktor  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$ . Při oxidaci glutamátu na 2-OG, za současného uvolnění amoniaku, je využit kofaktor  $\text{NAD}^+$ , při redukci 2-OG na glutamát pak  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . 2-OG je také konečným produktem odbourávání uhlíkatých koster prolinu, argininu a histidinu.

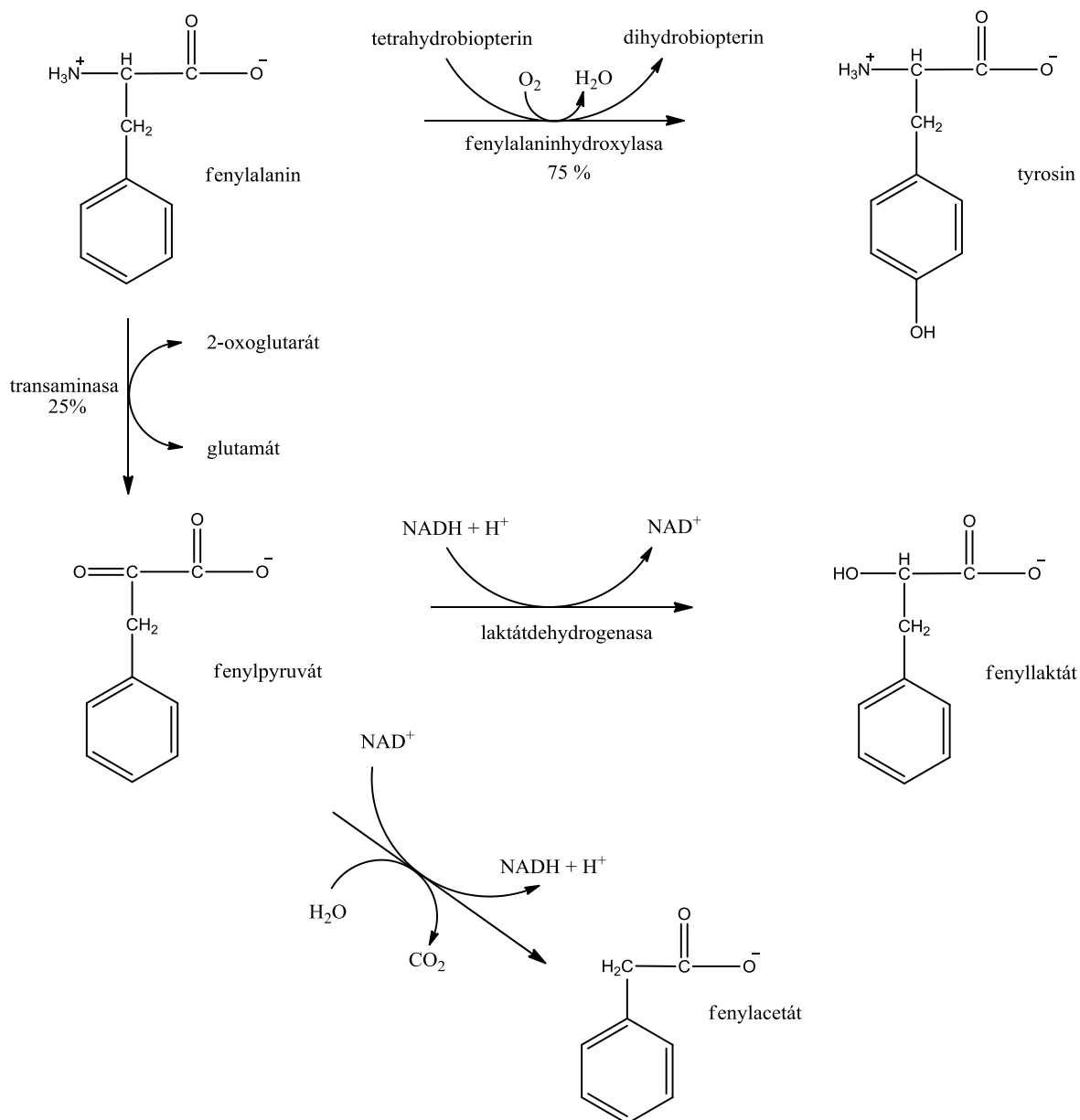
#### 2.1.4 Fenylpyruvát

Fenylpyruvát (PhePYR) je 2-oxokyselina s molární hmotností 164,16 g/mol a systematickým názvem 2-oxo-3-fenylpropanová kyselina (Obrázek 8). PhePYR má jemnou medovou vůni. Za fyziologických podmínek je hladina PhePYR v krvi a moči velmi nízká. Zvýšená hladina PhePYR v moči se vyskytuje u osob s fenylketonurií, která je způsobená defektem enzymu fenylalaninhydroxylasy.



**Obrázek 8:** Strukturní vzorec fenylpyruvátu.

Fenylalanin patří mezi esenciální aminokyseliny. Přibližně 3/4 přijatého fenylalaninu jsou nevratně hydroxylovány na tyrosin (hlavní katabolická cesta), za katalýzy fenylalaninhydroxylasou (Obrázek 9). Tento enzym se vyskytuje především v játrech. Uhlíkatá kostra tyrosinu se odbourává až na fumarát a acetoacetát, které se mohou zapojit do citrátového cyklu. Fenylalanin podléhá transaminaci za vzniku PhePYR (vedlejší katabolická cesta) pouze tehdy, je-li jeho koncentraci v krvi a tkáních vysoká. Důvodem je úplná nebo částečná deficeience fenylalaninhydroxylasy. Dále může být PhePYR redukován na fenyllaktát nebo oxidován na fenylacetát.

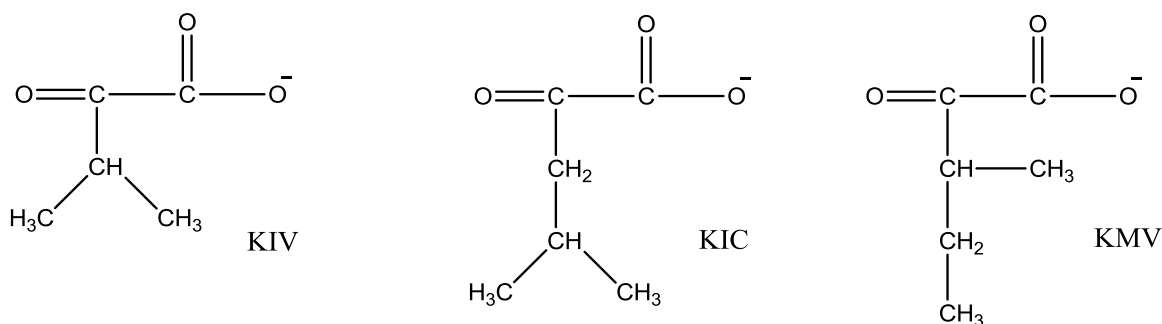


**Obrázek 9:** Metabolismus fenylalaninu.

### 2.1.5 Oxokyseliny odvozené od aminokyselin s rozvětveným řetězcem

Oxokyseliny odvozené od aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCKA), 2-oxoisovalerát (KIV), 2-oxoisokapronát (KIC), 2-oxo-3-methylvalerát (KMV), jsou výjimečné v tom, že procházejí játry nezměněné. Vychytávány jsou v mozku a svalch, kde jsou dále odbourávány. Hlavní funkcí BCKA je odstranění toxického amoniaku, především ze svalů. Hromadění amoniaku ve svalch způsobuje jeho únavu a také zpomaluje proteosyntézu. Nejúčinněji plní tuto funkci KIC, který tak udržuje množství amoniaku na bezpečné hladině.

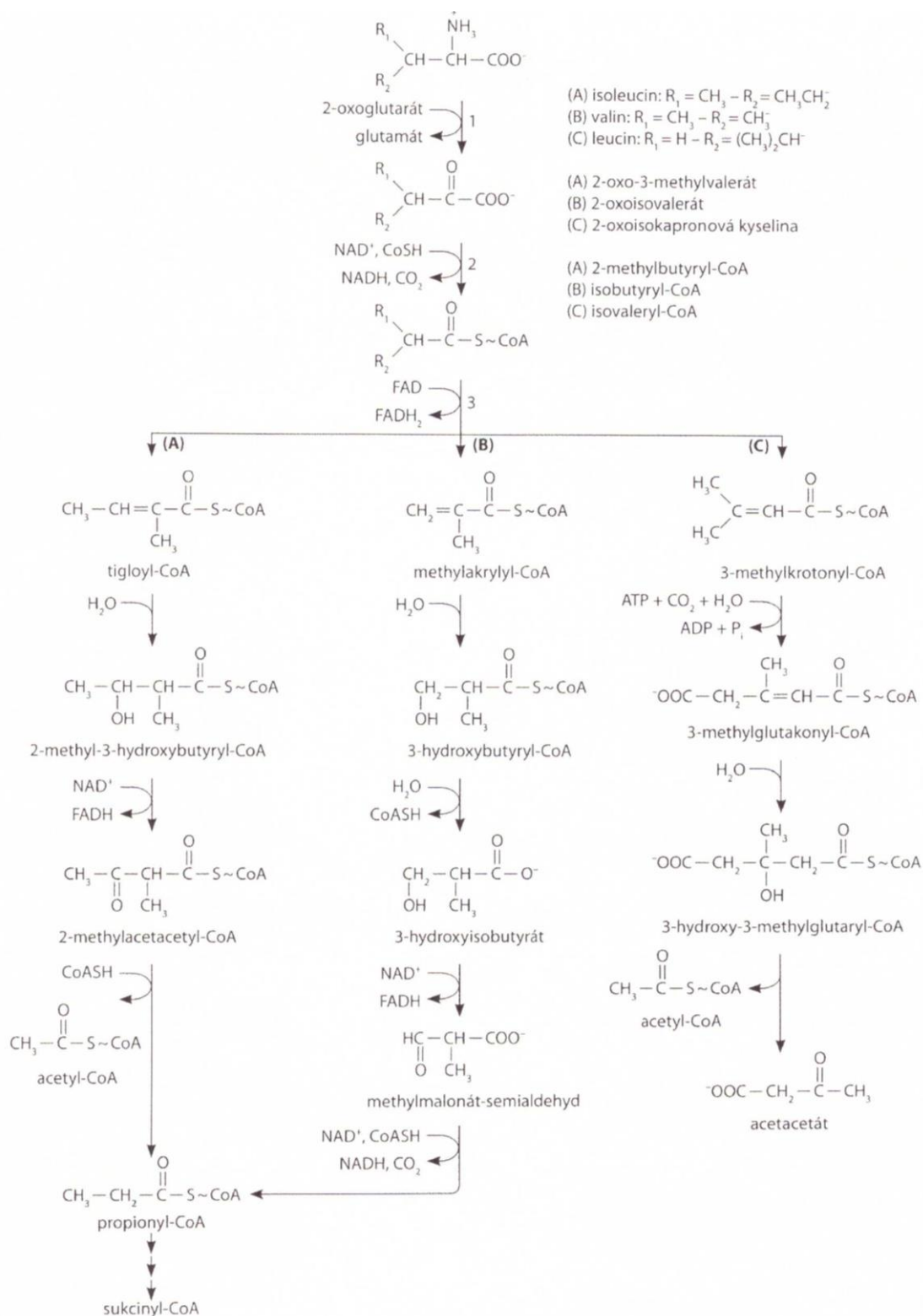
Systematickým názvem KIV je kyselina 2-oxo-3-methylbutanová s molární hmotností 116,15 g/mol, KIC 2-oxo-4-methylpentanová kyselina s molární hmotností 130,13 g/mol a KMV 2-oxo-3-methylpentanová kyselina s molární hmotností 130,13 g/mol (Obrázek 10).



**Obrázek 10:** Strukturální vzorec 2-oxoisovalerátu (KIV), 2-oxoisokapronátu (KIC) a 2-oxo-3-methylvalerátu (KMV).

První reakcí katabolismu valinu, leucinu a isoleucinu je reversibilní transaminace aminoskupiny na 2-oxoglutarát (kosubstrát) za vzniku glutamátu a 2-oxokyseliny, tj. KIV, KIC a KMV. Odpovídající transaminasy se vyskytují především ve svalech, ale také játrech. Jedna aminotransferasa je specifická pouze pro leucin, další dvě aminotransferasy jsou schopné katalyzovat transaminaci všech 3 rozvětvených aminokyselin. BCKA následně podléhají oxidativní dekarboxylaci za vzniku thioesteru acyl-CoA (Obrázek 11).



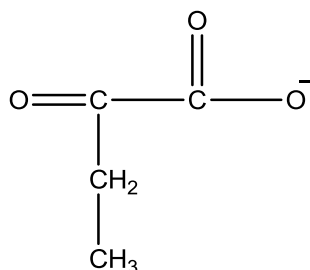


**Obrázek 11:** Metabolismus valinu, leucinu a isoleucinu. Degradace aminokyselin s rozvětveným řetězcem: (A) isoleucinu, (B) valinu a (C) leucinu. Prvních tří reakcí se účastní stejné enzymy: 1. aminotransferasa aminokyselin s rozvětveným řetězcem, 2. 2-oxoisovalerátdehydrogenasa a 3. acyl-CoA-dehydrogenasa oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem [4].

V dalších reakcích je valin metabolizován na propionyl-CoA, isoleucin na propionyl-CoA a acetyl-CoA, a leucin na acetoacetát a acetyl-CoA. Propionyl-CoA je dále přeměněn na sukcinyl-CoA.

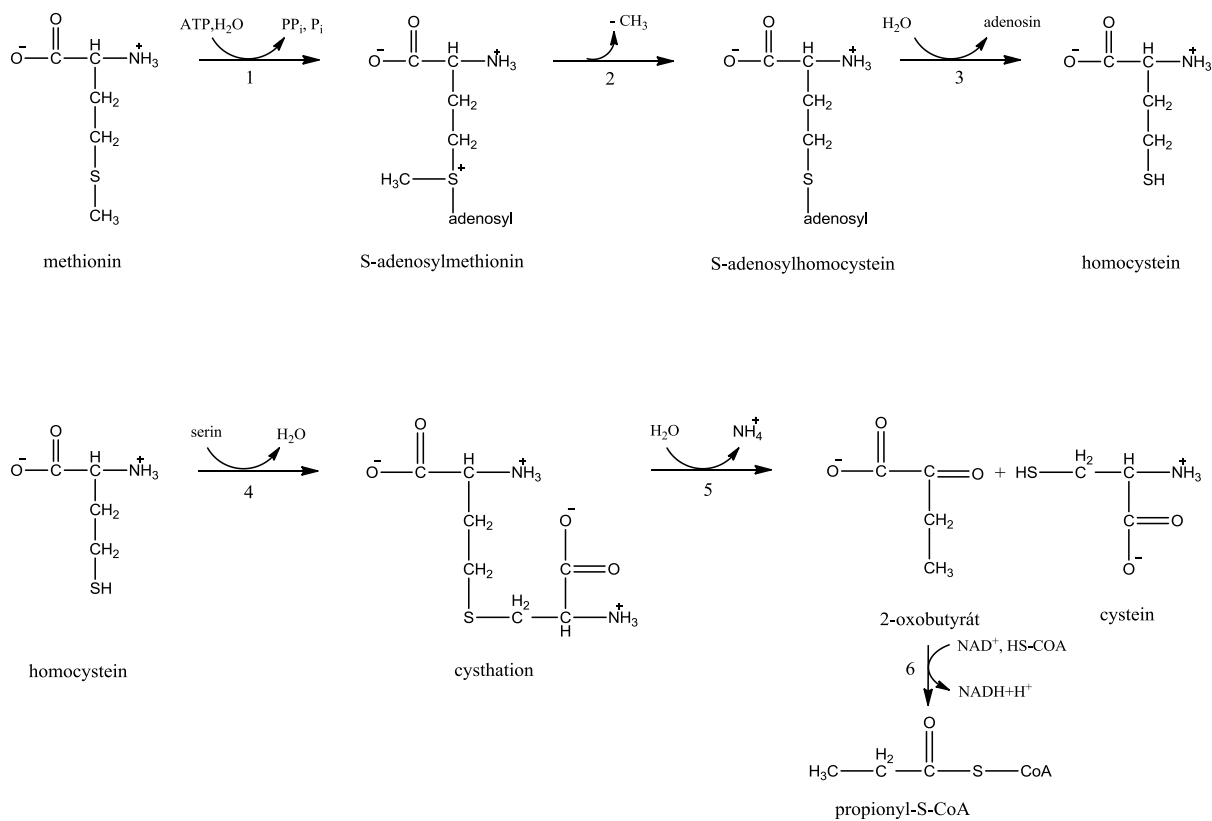
### 2.1.6 2-Oxobutyřát

2-Oxobutyřát (2-OB) má systematický název 2-oxobutanová kyselina s molární hmotností 102,09 g/mol. Strukturní vzorec je uveden na obrázku 12.



**Obrázek 12:** Strukturní vzorec 2-oxobutyřátu.

2-OB je meziproduktem při katabolismu methioninu (Obrázek 13). V dalších reakcích je dekarboxylován za vzniku propionyl-CoA, který je poté přeměněn na sukcinyl-CoA. V případě potřeby energie je homocystein metabolizován na 2-OB, sirovodík a amoniak. 2-OB je také jedním z produktů degradace threoninu.



**Obrázek 13:** Katabolismus methioninu: 1. methioninadenosyltransferasa, 2. S-adenosylmethionin dependentní methyltransferasy, 3. S-adenosylhomocystein-hydroxylasa, 4. cystathioninsynthasa, 5. cystathionin-γ-lyasa, 6. dehydrogenasa 2-oxokyselín.

## **2.2 VYBRANÉ METABOLICKÉ PORUCHY SPOJENÉ S 2-OXOKYSELINAMI**

Porucha metabolismu PYR způsobuje mírné až závažné onemocnění, v závislosti na postižení enzymů, které regulují metabolismus. Nejvíce jsou postiženy tkáně s vysokými nároky na energii. Porucha metabolismu PYR vede například k laktátové acidose. Mezi poruchu metabolismu 2-OG lze zařadit deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu. Fenylketonurie je metabolická porucha související s PhePYR [5, 6].

### **2.2.1 Deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu**

Deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu je charakterizován sníženou aktivitou pyruvátdehydrogenasy (PDH). Deficit PDH je způsoben mutací ve všech čtyřech podjednotkách tohoto enzymu. Závažnost se liší v závislosti na dané mutaci. Mezi příznaky deficitu PDH patří psychomotorická retardace, opožděný vývoj, snížená schopnost chápání informací a udržení pozornosti (tzv. kognitivní schopnosti). Tyto příznaky ukazují, že nervový systém je velmi citlivý na odchylky v metabolismu PYR, jelikož je závislý na metabolismu sacharidů. Většina pacientů umírá již v mladém věku [6–8].

### **2.2.2 Laktátová acidosa**

Laktátová acidosa je metabolická acidosa způsobená nadprodukcí nebo nedostatečným využitím laktátu, který se tak hromadí v těle. Laktát je konečným produktem anaerobní glykolysy. Z buněk se laktát uvolňuje do krevního oběhu a je vylučován játry, kde je z něj glukoneogenesí syntetizována glukosa. Při snížené aktivitě PDH se PYR hromadí v buňce a je redukován na laktát, který se uvolňuje do krevního oběhu. Laktátová acidosa nemusí u pacienta nutně způsobit acidemii, závisí to na hladině laktátu v krvi [5, 6, 9, 10].

### 2.2.3 Deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu

2-oxoglutarátdehydrogenasový komplex katalyzuje oxidaci 2-OG na sukcinyl-CoA. Jedná se o autosomálně recesivní dědičné onemocnění. Molekulární podklad postižení tohoto komplexu není dodnes zcela objasněn. Při tomto onemocnění je zvýšená hladina 2-OG v moči. Mírně až středně zvýšená hladina 2-OG v moči je běžná a nelze jí považovat za specifický ukazatel pro deficit 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu. Nedostatek 2-oxoglutarátdehydrogenasového komplexu se projevuje opožděným vývojem, hypotonií a méně často také křečemi. Tyto projevy se vyskytují již v novorozeneckém věku nebo časném dětství [11–13].

### 2.2.4 Fenyلكetonurie

Fenyلكetonurie (PKU) je geneticky podmíněná metabolická porucha, která je způsobená defektem enzymu fenylalaninhydroxylasy. Tento enzym katalyzuje hydroxylaci fenylalaninu na tyrosin. Při PKU je aktivita fenylalaninhydroxylasy buď snižena, nebo úplně chybí. Z tohoto důvodu se fenylalanin hromadí v krvi, a poté, co překročí hraniční hodnotu, asi 1 mmol/l, je metabolizován na PhePYR. PhePYR se společně s metabolity fenyllaktátem a fenylacetátem vylučuje močí [4, 5, 16].

PKU se projevuje mentální retardací, záchvaty, psychózami a ekzémy. Fenylacetát způsobuje zápach moči a potu po myšince. Jak již bylo zmíněno, za fyziologických podmínek jsou hladiny PhePYR v krvi a moči velmi nízké. Léčba dětí s PKU spočívá v kontrolované stravě omezené na fenylalanin, a tak lze předejít mentální retardaci a neurologickým symptomům. V šesti letech může být dieta ukončena, jelikož fenylalanin a jeho deriváty v tomto věku již nepoškozují mozek. PKU je v ČR postiženo asi 1 dítě na 10000 narozených dětí. Vyšetření novorozenců na PKU je společně s chorobou javorového sirupu, isovalerovou acidemii a dalšími vrozenými chorobami ze zákona povinné. U předčasně narozených dětí může být hladina fenylalaninu zvýšená z důvodu nedostatečné produkce enzymů, které se podílejí na katabolismu fenylalaninu [4, 5, 14–16].

### **2.2.5 Choroba javorového sirupu**

Choroba javorového sirupu (MSUD), také leucinoso, je ketonurie s výskytem BCKA. Vyskytuje se u 5–10 dětí z milionu novorozenců. Jedná se o autosomálně recesivní dědičnou poruchu. Problém je v multienzymovém komplexu oxidační dekarboxylace 2-oxokyselin, kdy ani jedna BCKA (KIV, KIC, KMV) se nedekarboxyluje. Aktivita dekarboxylasy 2-oxokyselin je buď snižená, nebo úplně chybí. V důsledku malé renální clearance se BCKA hromadí především v plazmě, moči, likvoru a tkáních. 2-Hydroxykyseliny s rozvětveným řetězcem, vzniklé redukcí 2-oxokyselin, se v malém množství také vylučují močí [4, 5, 16–19].

Klinické příznaky MSUD se projevují několik dní po narození. Jedná se o velmi těžkou metabolickou poruchou, která často končí smrtí novorozenců. Děti, které přežívají s MSUD, trpí poruchou duševního vývoje. Mezi prvotní příznaky MSUD patří zvracení, rostoucí apatie a úbytek na váze. Dále se objevují svalové křeče a poruchy dýchání. Od šestého dne života lze pozorovat charakteristický zápach moči připomínající vůni javorového sirupu nebo karamelu. Tento zápach je způsoben KMV, který se tvoří při transaminaci isoleucinu [4, 5, 16–20].

Léčba MSUD spočívá v kontrole stravy, ve které je obsah aminokyselin s rozvětveným řetězcem uzpůsoben metabolickým potřebám. Úplné omezení těchto aminokyselin ve stravě vede k zhoršení stavu. Včasná léčba, zahájená v prvním týdnu života, zachraňuje novorozencům život [4, 5, 11].

Jedním typem MSUD je intermitentní MSUD s mírným průběhem. Tento typ se vyskytuje až po kojeneckém věku a příznaky se vyskytují příležitostně. Jedná se o méně závažnou strukturní modifikaci dekarboxylasy, kdy nemocní mají sniženou, avšak zachovanou schopnost katabolismu valinu, leucinu a isoleucinu. Druhým typem MSUD je forma závislá na thiaminu. Jestliže existuje zbytková aktivita dekarboxylasy, tak lze podáním vysokých dávek thiaminu dosáhnout normalizace klinických a biochemických příznaků [4, 5, 17–19].

### **2.2.6 Isovalerová acidemie**

U isovalerové acidemie, též isovalerátemii, se vyskytuje defekt enzymu isovaleryl-CoA-dehydrogenasy katabolizující leucin. Hromadí se isovaleryl-CoA, který je hydrolyzován na isovalerát. V plazmě, moči a likvoru jsou zvýšené hladiny

isovalerátu. Isovalerát je též vylučován potem. Hlavním příznakem tohoto onemocnění je sýrový zápach dechu, moči a potu. Dalšími projevy je zvracení a metabolická acidosa. Po požití velkého množství bílkovin padá postižený do kómatu [4, 5, 21].

### **2.2.7 Hypervalinemie a hyperleucinemie-isoleucinemie**

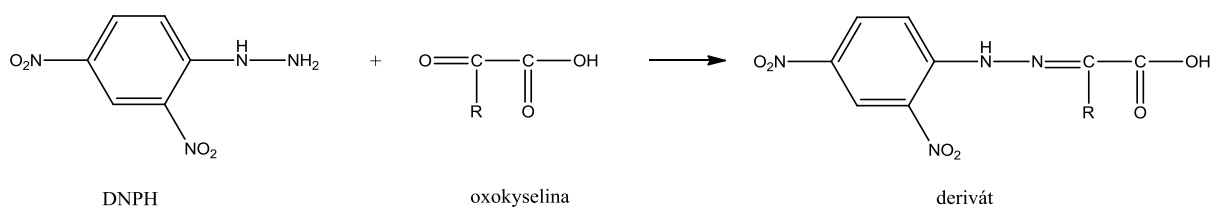
Hypervalinemie je vzácná metabolická porucha transaminace valinu na 2-oxoisovalerát. Transaminace leucinu a isoleucinu probíhá normálně. Koncentrace valinu je tedy v plazmě zvýšená. Hyperleucinemie-isoleucinemie je primární metabolická porucha transaminace leucinu a isoleucinu. Transaminace valinu probíhá normálně. Podání koenzymu pyridoxalfosfátu nemá žádný vliv na tyto poruchy [4, 5, 22, 23].

Klinický obraz u dětí, trpící těmito poruchami metabolismu, není charakteristický. Postižení trpí poruchami růstu, zvracením, mimovolným kmitavým pohybem očí a také duševní poruchou. U hyperleucinemie-isoleucinemie se mimo to vyskytují degenerativní změny sítnice a hluchota. Dosud není objasněna souvislost těchto klinických příznaků s touto metabolickou poruchou [4, 5, 22].

## 2.3 METODY STANOVENÍ 2-OXOKYSELIN

### 2.3.1 Papírová chromatografie

Jednou z nejstarších metod, kterou lze stanovit 2-oxokyseliny je papírová chromatografie (PC). V dnešní době se již pro stanovení 2-oxokyselin nepoužívá. Chromatografický papír slouží jako nosič a mobilní fází je např. voda přítomná na papíře. V jedné studii byla PC využita pro separaci 2,4-dinitrofenylhydrazonových derivátů 2-oxokyselin (Obrázek 14). Ukázalo se, že použití derivatizačního činidla 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) není pro stanovení 2-oxokyselin zcela vhodné [24–28].



**Obrázek 14:** Derivatizace oxoskupiny 2-oxokyselin 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH).

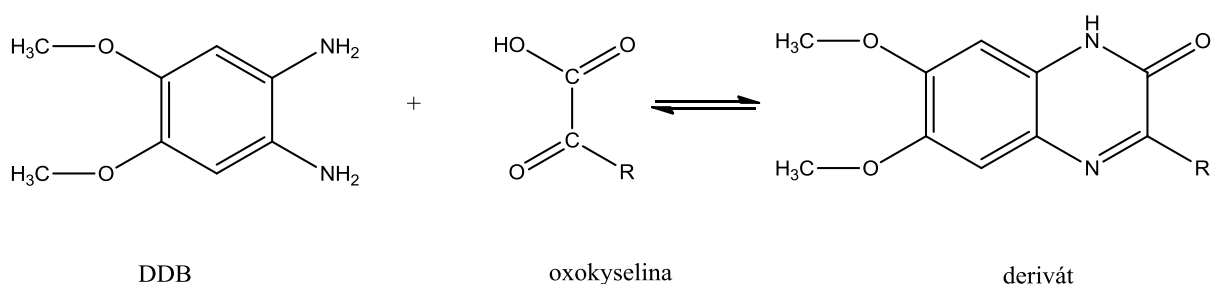
V další studii byl jako derivatizační činidlo použit 1,2-diamino-4-nitrobenzen, a to pro analýzu 2-oxokyselin v plné krvi a moči. Toto činidlo bylo pro 2-oxokyseliny více specifické než DNPH a tvořily se stabilnější nitrochinoxalinové deriváty, které mohou být separovány PC. Nevýhodou této metody byly nestálé retardační faktory nitrochinoxalinových derivátů při opakovaných měření. Tyto odchylky byly pravděpodobně z důvodů změny teploty a složení mobilní fáze. Výhodou PC je jednoduchost provedení analýzy, nevýhodou je dlouhá doba analýzy [24–26].

### 2.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

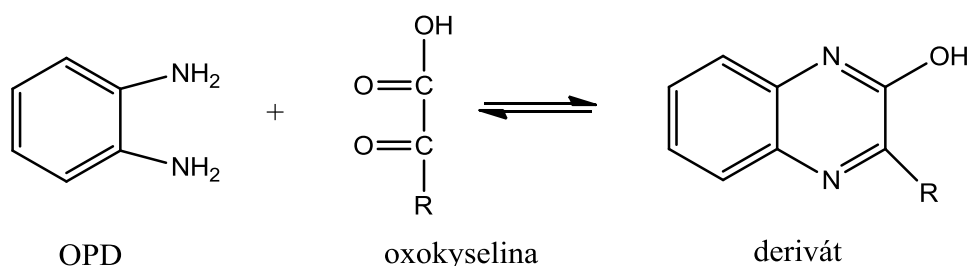
Mnoho studií používá pro stanovení 2-oxokyselin metodu vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou nebo fluorescenční detekcí. Metoda slouží ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení 2-oxokyselin v plazmě, séru i moči. Spektrofotometrická detekce je málo citlivá, proto je zapotřebí většího množství vzorku (více než 200 μl). Nevýhodou je také komplikovaná příprava vzorku [29, 30].



Pro metodu HPLC s fluorescenční detekcí se obvykle jako derivatizační činidla používají *o*-fenylendiamin (OPD) a 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen (DDB). DDB reaguje v kyselém prostředí s 2-oxokyselinami za vzniku vysoce fluoreskujících produktů (Obrázek 15). Tyto deriváty jsou separovány na reverzní fázi během 14 minut za použití isokratické eluce. Metody využívající DDB jsou mnohem citlivější než ty s OPD. Reakce 2-oxokyseliny s OPD je znázorněna na obrázku 16. Výhodou metod HPLC s fluorescenční detekcí je jednoduchost, rychlost, reprodukovatelnost a vysoká citlivost, dále pak méně komplikovaná příprava vzorku. [20, 26, 29–32].



**Obrázek 15:** Reakce 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzenu (DDB) s 2-oxokyselinou za vzniku fluorescenčního produktu 6,7-dimethoxy-2(1H)-chinoxalinu.



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

### 2.3.3 Plynová chromatografie

Obecně je derivatizace cílená přeměna analytu na produkt, derivát. Modifikace probíhá reakcí reaktivní funkční skupiny analytu s vhodným činidlem. Chemicko-fyzikální vlastnosti tohoto derivátu jsou podobné nebo úplně odlišné od nemodifikovaného analytu, ale nikdy nejsou stejné. Důvod derivatizace sloučeniny spočívá v tom, že samotná sloučenina by nemohla být analyzována danou metodou. Mezi další důvody patří zlepšení detekovatelnosti a účinnosti analýzy. Pro analýzu

metodou plynové chromatografie (GC) musí být analyt dostatečně těkavý, aby mohl být eluován při dané teplotě bez tepelného rozkladu a bez molekulárního přeskupení. Pro srovnání, u kapalinové chromatografie musí být analyt rozpustný v mobilní fázi [33, 34].

#### 2.3.3.1 Derivatizační činidla

Derivatizační činidlo je látka, která se používá k modifikaci analytu na derivát, který má vhodné vlastnosti pro analýzu. Derivatizační činidlo by mělo splňovat tyto kritéria:

- mělo by produkovat více než 95 % kompletních derivátů,
- nemělo by dojít k žádné přestavbě, strukturní změně sloučeniny během tvorby derivátu,
- měl by být tvořen produkt, který neinteraguje s GC kolonou,
- měl by být tvořen produkt, který je stabilní v závislosti na čase [33].

#### 2.3.3.2 Typy derivatizačních reakcí

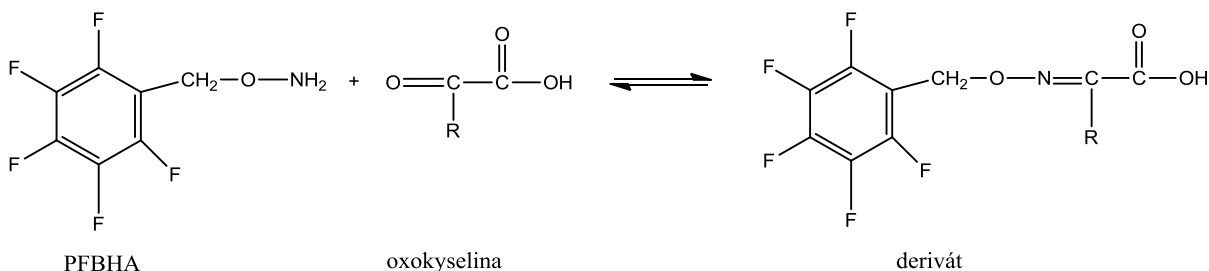
Derivatizační reakce pro plynovou chromatografii se dělí do třech hlavních skupin. První skupinou jsou alkylace, kde obecným postupem je esterifikace. Druhou skupinou jsou acylace a třetí skupinou silylace. Těmito postupy se vysoce polární látky (organické kyseliny, amidy, polyhydroxysloučeniny, aminokyseliny) stanou dostatečně těkavé, a tím vhodné pro GC analýzu [33–35].

#### **Alkylace**

Principem alkylace je esterifikace, kdy kyselina reaguje s alkoholem za vzniku esteru. Obecně platí, že produkty alkylace jsou méně polární než výchozí látky, protože aktivní vodík je nahrazen alkylovou skupinou. Když klesá kyselost aktivního vodíku, tak síla alkylačního činidla vzroste. Hlavní použití je při derivatizaci organických kyselin. Alkylační reakce mohou být také použity pro derivatizaci etherů, thioetherů a thioesterů. K alkylačním činidlům patří například O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin, 2,3,4,5,6-pentafluorobenzylbromid, fluorid boritý v methanolu nebo butanolu, benzylbromid a další [33–37].

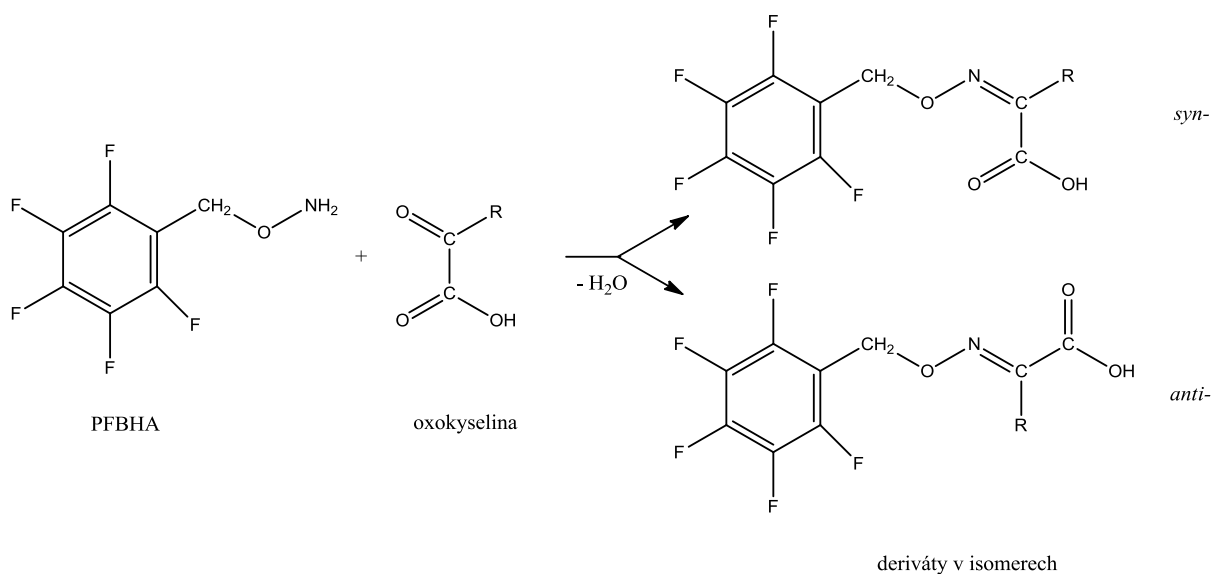
### O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin

O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin (PFBHA) je bílá krystalická látka s molární hmotností 249,57 g/mol a sumárním vzorcem  $C_7H_4F_5NO \cdot HCl$ . PFBHA je činidlo užívané v plynové chromatografii pro derivatizaci sloučenin obsahující karbonylovou skupinu (menší aldehydy a ketony; Obrázek 17). Vzniklé deriváty jsou pentafluorobenzoyloximy [33, 38, 39].



**Obrázek 17:** Derivatizace karbonylové skupiny 2-oxokyseliny O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem (PFBHA).

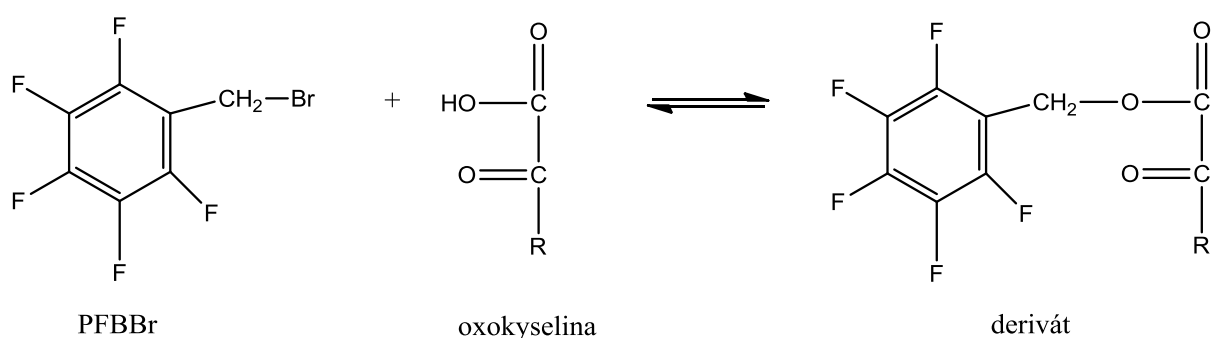
Během derivatizace PFBHA se tvoří dva pentafluorobenzoyloximy, stereoisomery *syn*- a *anti*- (Obrázek 18), což komplikuje vyhodnocení výsledků. Vznik stereoisomerů je i při derivatizaci DNPH. *Syn*-isomer eluuje obvykle dříve než *anti*-isomer. U KIV a KMV je to obráceně, pravděpodobně ze sterických důvodů methylové skupiny na 3. uhlíku. Použití PFBHA v GC má své výhody; reakce probíhá v slabě kyselém prostředí (pH 2-5), při laboratorní teplotě a relativně rychle. Deriváty se snadno extrahují organickými rozpouštědly. Výsledné deriváty jsou v organickém rozpouštědle vysoce stabilní a dostatečně těkavé. Pentafluorobenzoyloximy jsou dobře detekovatelné detektorem elektronového záchytu. Za konstantních reakčních podmínek je poměr obou isomerů relativně stejný [40, 41].



**Obrázek 18:** *Syn- a anti- isomery pentafluorobenzoyloximu.*

### 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid

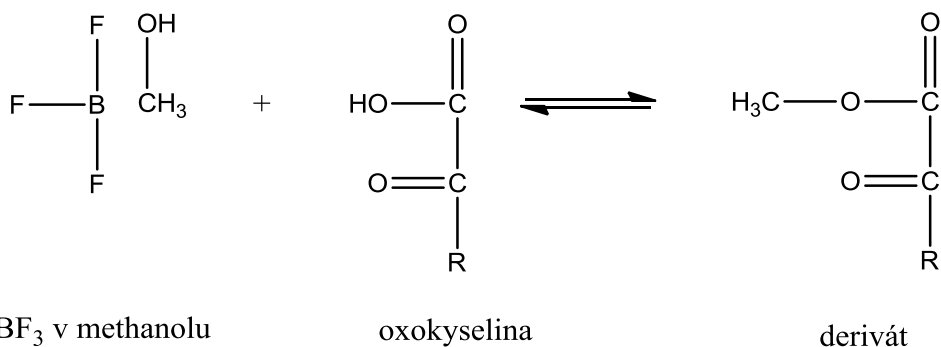
2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid (PFBBr; Obrázek 19) slouží pro derivatizaci karboxylových kyselin, thiolů a fenolových skupin u metod plynové chromatografie s hmotností detekcí (GC-MS) a GC s detekcí elektronového záchytu. Reakce s fenoly je poměrně rychlá (okolo 20 min) a jednoduchá, ale není vhodná pro isomery dichlorfenolu. Toto derivatizační činidlo je také vhodné pro derivatizaci dusitanů a dusičnanů stanovovaných v různých biologických vzorcích metodou GC-MS [34, 42].



**Obrázek 19:** *Derivatizace karboxylové skupiny 2-oxokyseliny 2,3,4,5,6-pentafluorobenzylbromidem (PFBBr).*

## Fluorid boritý

Fluorid boritý je štiplavý bezbarvý plyn s molární hmotností 67,81 g/mol, prudce reagující s vodou.  $\text{BF}_3$  je činidlo, které je vhodné pro derivatizaci organických kyselin (Obrázek 20). Tvoří se methyl-, ethyl- či butylestery, v závislosti na tom, zda je  $\text{BF}_3$  v methanolu, ethanolu nebo butanolu. Toto derivatizační činidlo je nestabilní, reaguje totiž s atmosférickým kyslíkem. Z tohoto důvodu by měl být roztok uchováván v chladničce za nepřístupu vzduchu a používán jen několik měsíců, případně před uzavřením lahve by měl být roztok probublán inertním plynem [33, 35, 39].



**Obrázek 20:** Derivatizace 2-oxokyseliny  $\text{BF}_3$  v methanolu za vzniku methylesterderivátu.

## **Silylace**

Silylace je zavedení silylové skupiny do molekuly, obvykle náhradou za aktivní vodík. Nejčastěji jsou používány trimethylsilyl- (TMS) deriváty, dále mohou být použity dimethylsilyl-, *t*-butyldimethylsilyl- a chloromethyldimethylsilyl-deriváty. Pro zavedení TMS skupiny do molekuly analytu existují různá derivatizační činidla, která se liší ve své reaktivitě a selektivitě. Nahrazení aktivního vodíku (z -OH, -COOH, -NH, -NH<sub>2</sub> a -SH skupiny) za silylovou skupinu snižuje polaritu sloučeniny. Silyl-deriváty jsou více těkavé a stabilnější, díky čemuž se v chromatogramu získá úzký a symetrický pík. Snadnost tvorby TMS-derivátů různých funkčních skupin klesá v tomto pořadí: alkoholový hydroxyl, fenolický hydroxyl, karboxylový hydroxyl, amin a amid [33–35].

Silylační činidla a silyl-deriváty jsou obecně citlivé na vlhkost (hydrolyticky nestálé), proto je nutné, aby byl vzorek s rozpouštědlem důkladně odpařen do sucha. Rychlost hydrolyzy se však pro různá silylační činidla a jejich deriváty liší, a proto v některých případech je možné připravit deriváty i v přítomnosti malého množství vlhkosti. *t*-Butyldimethylsilyl-deriváty mají vyšší hydrolytickou stabilitu než

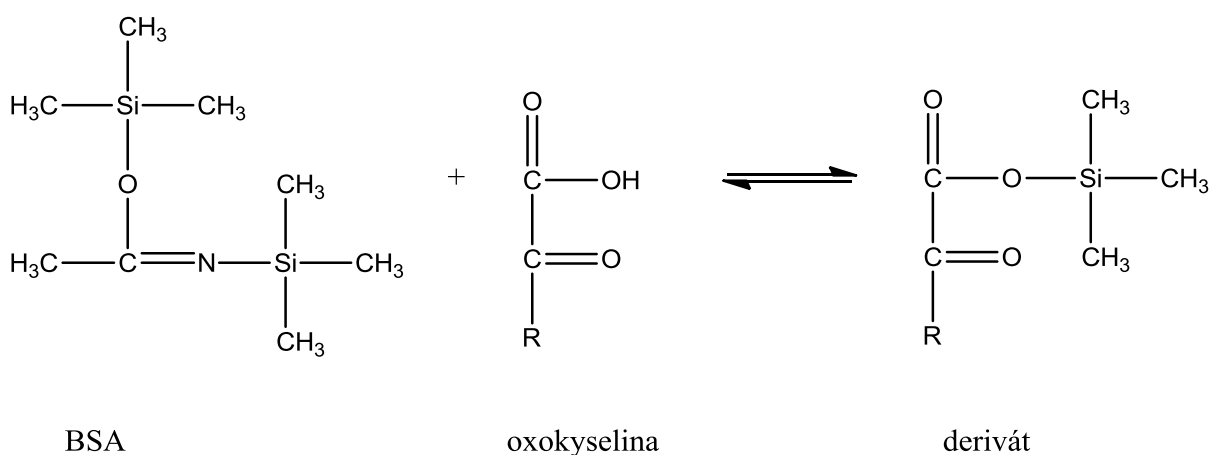
TMS-deriváty. Mají charakteristické fragmenty, kterých se s výhodou využívá při analýze metodami GC-MS [33–35].

Silylační činidla jsou kompatibilní s většinou detektorů, ale pokud jsou v přebytku, mohou způsobit potíže při použití plamenově ionizačního detektoru. Reaktivita těchto činidel je také ovlivněna přidáním katalyzátoru, například pyridinu nebo trimethylchlorsilanu (TMCS), které reaktivitu obecně zvyšují [33, 35].

Dalšími používanými silylačními činidly jsou N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) a N-methyl-N(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA). Konkrétně tyto tři silylační činidla se často používají společně s TMCS (1-10% roztok), který slouží jako katalyzátor [33, 34].

### N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid

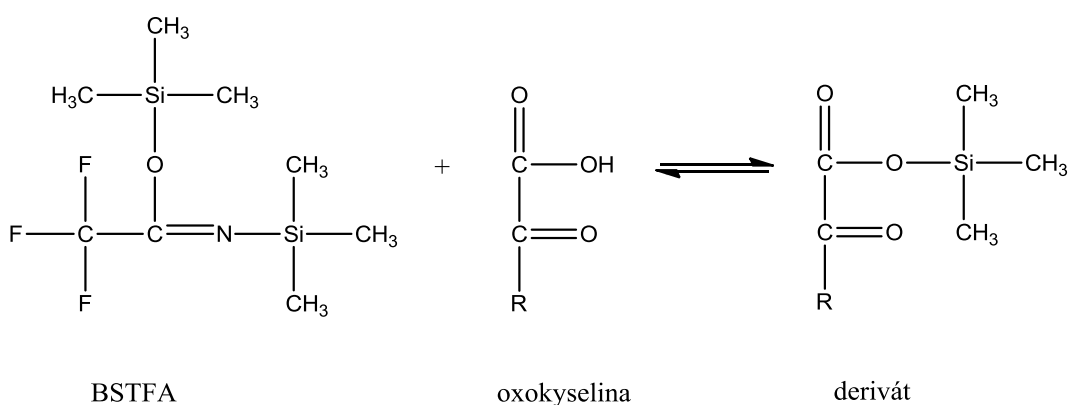
N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) je jedním z široce používaných silylačních činidel, protože acetamid je dobře odstupující skupinou. Proto je velmi účinný a je ho potřeba pouze v malém množství. BSA reaguje za mírných reakčních podmínek a vytváří stabilní TMS-deriváty (Obrázek 21). V případě aminokyselin vytváří N- i O-TMS-deriváty, hydroxylové sloučeniny tvoří TMS-ethery, organické kyseliny TMS-estery a aromatické amidy N-TMS-deriváty [33, 34].



**Obrázek 21:** Derivatizace karboxylové skupiny 2-oxokyseliny N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidem (BSA) za vzniku TMS-derivátu.

### N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

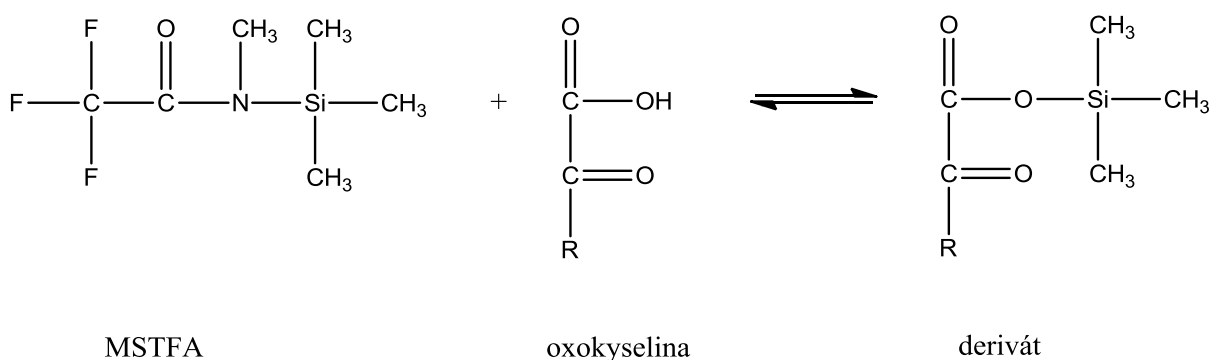
N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) je dalším významným silylačním činidlem (Obrázek 22). BSTFA reaguje rychleji a lépe než BSA díky trifluoroacetylové skupině. BSTFA tvoří stabilní, vysoce těkavé TMS-deriváty, které jsou dobře separovány GC. Přidání TMCS, tj. BSTFA + 1% až 10% TMCS, katalyzuje reakci a tato směs je vhodná pro derivatizaci amidů mastných kyselin a dalších sloučenin, které jsou obtížně derivatizovány jinými silylačními činidly [33–35].



**Obrázek 22:** Derivatizace 2-oxokyseliny N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA) za vzniku TMS-derivátu.

### N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) je derivatizační činidlo srovnatelné s BSA a BSTFA (Obrázek 23) [33, 34].



**Obrázek 23:** Derivatizace 2-oxokyseliny N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (MSTFA) za vzniku TMS-derivátu.

## Acylace

Acylace je typ derivatizace, ve které je acylová skupina zavedena do molekuly organické sloučeniny. Sloučeniny, které obsahují aktivní vodík (-OH, -SH a -NH) mohou být převedeny na estery, thioestery a amidy. Acylace zvyšuje stabilitu analytu tím, že chrání reaktivní skupiny. Další výhodou je, že acylací jsou vytvořeny těkavé látky z vysoce polárních sloučenin, jako jsou sacharidy a aminokyseliny, které jsou za normálních okolností netěkavé a tepelně nestabilní. Acylderiváty mají navíc tendenci vytvářet fragmenty, které poskytují užitečné informace o struktuře těchto látek, proto jsou acylderiváty užitečné při MS detekci. Nevýhodou je, že při přípravě acylderivátů vznikají interferující produkty. Acylační činidla jsou citlivá na vlhkost. Mezi acylační činidla patří například 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol, který je vhodný pro metody GC-MS a také GC s detektorem elektronového záhytu [33, 34].

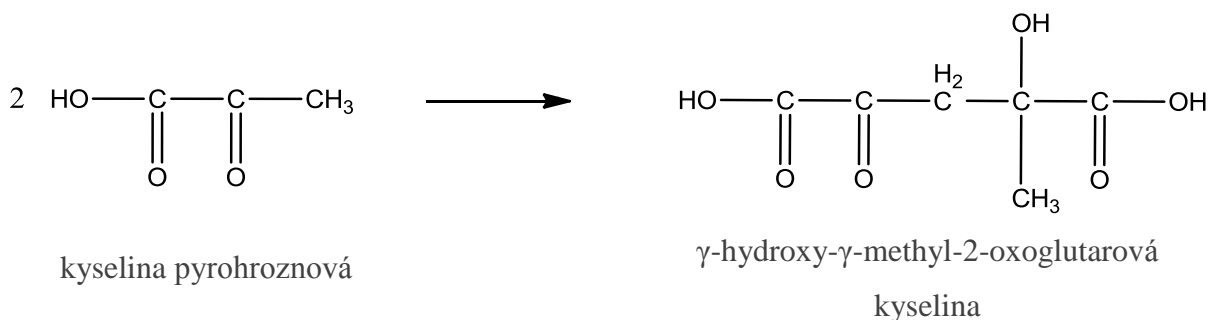
### 2.3.3.3 Hmotnostní spektrometrie

K detekci 2-oxokyselin u GC lze použít plamenově ionizační detektor, v dnešní době je však často nahrazen MS. MS je iontově-optické zařízení, které ionizačními technikami fragmentuje molekuly na ionty, poté je separuje dle podílu hmotnosti iontu a náboje ( $m/z$ ) a následně měří jejich intenzitu. Intenzita odezvy je úměrná koncentraci látky. Výhodou MS je kvalitativní i kvantitativní analýza, dále spotřeba malého množství stanovovaného vzorku a vysoká citlivost analýzy. Existují tři hlavní nedostatky MS. První nevýhodou je, že MS detekce vyžaduje těkavé, hydrolyticky a tepelně stabilní organické sloučeniny. Druhá podstatná nevýhoda MS u GC se týká elektronové ionizace, kdy není získána dostatečná informace pro určení struktury některých organických sloučenin. Třetím omezením je poměrně nízká horní hranice molární hmotnosti stanovovaných látek (asi 10 kDa). Nevýhodou je i to, že se jedná o destruktivní detektor [37].



## 2.4 STABILITA 2-OXOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

Některé 2-oxokyseliny jsou jako volné kyseliny nestabilní a mají sklon k dekarboxylaci a polymeraci. Většina z nich jsou stabilní ve formě solí, nejčastěji jako soli sodíku a barya. Obecně platí, že 2-oxokyseliny jsou relativně stabilní v neutrálním roztoku a mohou být skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez velkého rozkladu. Existují ovšem i výjimky. Kyselina pyrohroznová snadno polymerizuje při uchování ve vodném prostředí na  $\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -methyl-2-oxoglutarovou kyselinu (Obrázek 24). Polymerace této kyseliny nastává i při skladování v mrazáku. V neutrálním prostředí již při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  oxalacetát snadno podléhá  $\beta$ -dekarboxylaci na pyruvát s poločasem rozpadu 30 až 60 minut. V silně kyselém prostředí je oxalacetát relativně stabilní [43, 44].



**Obrázek 24:** Polymerace kyseliny pyrohroznové na  $\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -methyl-2-oxoglutarovou kyselinu.

Stabilita 2-oxokyselin byla sledována v plasmě a moči. Hladiny 2-oxokyselin mohou rychle klesat v důsledku jejich hydrolýzy nebo oxidace. 2-Oxokyseliny mohou být také degradovány enzymy, které produkují bakterie, to se týká vzorků moče. Při stanovení 2-oxokyselin v neutrofilních granulocytech se zjistilo, že je-li vzorek uchováván při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jsou 2-oxokyseliny stabilní maximálně po dobu 2 týdnů. Pro dlouhodobější uchování vzorků (několik měsíců) je nutná lyofilizace. [44, 45].

## 2.5 REFERENČNÍ HODNOTY VYBRANÝCH 2-OXOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin v plné krvi a plazmě jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2.

**Tabulka 1:** Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin v plné krvi [2].

2-oxokyselina	koncentrace v plné krvi [ $\mu\text{mol/l}$ ]
2-oxo-3-methylvalerát	22,7 $\pm$ 4,6
2-oxobutyrate	3,3 $\pm$ 3,0
2-oxoglutarát	8,9 $\pm$ 2,7
2-oxoisokapronát	33,5 $\pm$ 8,2
2-oxoisovalerát	11,0 $\pm$ 1,7
fenylpyruvát	0,5 $\pm$ 0,1
pyruvát	34,5 $\pm$ 25,2

**Tabulka 2:** Referenční hodnoty vybraných 2-oxokyselin v plazmě [2].

2-oxokyselina	koncentrace v plazmě [ $\mu\text{mol/l}$ ]
2-oxo-3-methylvalerát	26,2 $\pm$ 8,5
2-oxobutyrate	2,3 $\pm$ 2,1
2-oxoglutarát	6,0 $\pm$ 2,9
2-oxoisokapronát	38,8 $\pm$ 15,8
2-oxoisovalerát	14,6 $\pm$ 5,6
fenylpyruvát	0,7 $\pm$ 0,1
pyruvát	58,8 $\pm$ 28,6

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem práce je zavedení metody pro stanovení vybraných 2-oxokyselin v biologických vzorcích metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a validace přípravy vzorků.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 Biologické vzorky

##### 4.1.1.1 Plná krev

Plná krev byla odebrána od dobrovolníků z Katedry biologických a biochemických věd do 9ml odběrových zkumavek s antikoagulačním činidlem EDTA (Vacuette, č. 455036, Geiner Labortechnik, Německo). Vzorky plné krve byly uchovávány v mrazáku při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Doba skladování nepřesáhla 2 měsíce.

##### 4.1.1.2 Plazma

Vzorky plné krve byly centrifugovány 10 minut při  $1700\text{ x g}$ . Odebraná plazma byla uchovávána v mrazáku při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Doba skladování nepřesáhla 2 měsíce.

#### 4.1.2 Chemikálie

10% fluorid boritý v ethanolu ( $\text{BF}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

2,4-dinitrofenylhydrazin ( $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_4$ , Mr 198,14) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Acetonitril ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ , Mr 41,05) (Merck KGaA, Německo)

Acetylchlorid ( $\text{ClC}_2\text{H}_3\text{O}$ , Mr 78,50) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ , Mr 74,12) (Merck KGaA, Německo)

Deionizovaná voda ( $\text{H}_2\text{O}$ , Mr 18,00;  $G = 0,055\text{ }\mu\text{S}$ )

Diethylether ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ , Mr 74,12) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Mr 84,93) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , Mr 46,07) (Merck KGaA, Německo)

Ethylacetát ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ , Mr 88,11) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Hexan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , Mr 86,18) (Merck KGaA, Německo)

Chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ , Mr 58,44) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

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

Kyselina 2-oxoglutarová, sodná sůl ( $C_5H_5NaO_5$ , Mr 168,08) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

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

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

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

Kyselina 4-hydroxyfenylpyrohroznová ( $C_9H_8O_3$ , Mr 180,16) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

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

Kyselina 5-sulfosalicylová, dihydrát ( $C_7H_6O_6S \cdot 2 H_2O$ , Mr 254,20) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina fenylpyrohroznová, sodná sůl ( $C_9H_7NaO_3$ , Mr 186,14) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

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

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

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

Kyselina oxalocetová, sodná sůl ( $C_4H_4O_5$ , Mr 132,07) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina pyrohroznová, sodná sůl ( $C_3H_3NaO_3$ , Mr 110,04) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina trichloroacetová ( $Cl_3C_2HO_2$ , Mr 163,39) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Methanol ( $CH_4O$ , Mr 32,04) (Merck KGaA, Německo)

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid v 1% trimethylchlorosilanu ( $C_7H_{18}F_3NOSi_2$ , Mr 257,40) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid v 1% trimethylchlorosilanu ( $C_6H_{12}F_3NOSi$ , Mr 199,25) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminhydrochlorid ( $C_7H_4F_5NO \cdot HCl$ , Mr 249,57) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

o-fenylendiamin, dihydrochlorid ( $C_6H_8N_2 \cdot 2 HCl$ , Mr 181,10) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Uhličitan draselný ( $K_2CO_3$ , Mr 138,21) p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

#### 4.1.3 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy Adventurer™ Pro (Ohaus, Švýcarsko)

Automatické pipety (Biohit, Finsko)

Centrifuga Sorvall TC 6 (Du Pont, USA)

Digitální předvážky Adventurer™ Pro (Ohaus, Švýcarsko)

Hlubokomrazicí box MDF-U3086S (Sanyo Electric, Japonsko)

Kolona HP-5, max. teplota 350 °C, délka 30,0 m, průměr 0,32 mm,  $d_f$  0,25  $\mu$ m (Agilent, USA)

Kombinovaná chladnička s mrazničkou Santo 70 (AEG, Švýcarsko)

Multidávkoč (Eppendorf, Německo)

Nástavec odpařovací Reacti-Vap 9-Po TS 18825 (Thermo Scientific, USA)

Odběrové zkumavky Vacuette  $K_3EDTA$ , 9 ml, č. 455036 (Geiner Labortechnik, Rakousko)

Odstředivka Jouan MR 23i (Jouan SA, Francie)

Odstředivka MiniSpin (Eppendorf, Německo)

Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem QP2010 a autosamplerem AOC-20s (Shimadzu, Japonsko)

Polypropylenové zkumavky, 1,5 ml (Fisher Scientific, ČR)

Skleněné vialky se šroubovacím a krimpovacím víčkem (Fisher Scientific, ČR)

Termoblok pro zkumavky Reacti-Therm TS 18822 (Thermo Scientific, USA)

Termoblok pro zkumavky SBH 130D (Stuart, Velká Británie)

Třepačka s nástavcem pro 1,5ml zkumavky (Heidolph RELAX top, Německo)

Univerzální indikátorový papírek (Fisher Scientific, ČR)

Zkumavky Pyrex, 10ml, č. 6226022, (SciLabware, Velká Británie)

#### 4.1.4 Pracovní roztoky

Příprava roztoku asi 1mmol/l HCl pro přípravu a ředění standardů 2-oxokyselin

Roztok byl připraven zředěním 21  $\mu$ l asi 12,05mol/l HCl deionizovanou vodou na objem 250 ml. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Zásobní roztok oxalacetátu (asi 5 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0066 g OA v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

Zásobní roztok pyruvátu (asi 5 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0057 g PYR v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

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

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0082 g 2-OG v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

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

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0064 g 2-OB v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

Zásobní roztok fenylpyruvátu (asi 5 mmol/l)

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0091 g PhePYR v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

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

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0068 g KIC v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

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

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0073 g KMV v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

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

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 0,0031 g KIV v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

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

Navážka 0,0064 g 2-OH byla rozpuštěna v 10 ml 1mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchován v mrazáku při -80 °C.

Příprava roztoku 2-oxohexanové kyseliny (vnitřní standard) o koncentraci asi 20  $\mu\text{mol/l}$

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 20  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku 2-OH a 480  $\mu\text{l}$  1mmol/l HCl. Do další 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 20  $\mu\text{l}$  takto připraveného roztoku 2-OH a 180  $\mu\text{l}$  1mmol/l HCl. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Příprava roztoku 2-oxohexanové kyseliny (vnitřní standard) o koncentraci asi 2,5 mmol/l (asi 100  $\mu\text{mol/l}$ )

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku 2-OH a 500  $\mu\text{l}$  1mmol/l HCl (20  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku 2-OH a 980  $\mu\text{l}$  deionizované vody). Roztoky byly připravovány denně čerstvé.

Pracovní roztoky jednotlivých 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu\text{mol/l}$

Zásobní roztoky standardů 2-oxokyselin byly naředěny 1mmol/l HCl následujícím způsobem. Do 1,5ml PP zkumavek bylo pipetováno 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku 2-oxokyseliny a 450  $\mu\text{l}$  1mmol/l HCl. Jen v případě KIV bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku a 400  $\mu\text{l}$  1mmol/l. Takto byly připraveny roztoky standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu\text{mol/l}$ . Roztoky byly připravovány denně čerstvé.

Příprava směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu\text{mol/l}$

Směsný roztok standardů 2-oxokyselin byl připraven smísením 200  $\mu\text{l}$  zásobních roztoků OA, PYR, 2-OG, 2-OB, PhePYR, KIC, KMV, 400  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku KIV a 200  $\mu\text{l}$  1mmol/l HCl nebo smísením 1 ml zásobních roztoků PYR, PhePYR, KIC, KIV, KMV, 2-OB a 2-OG v deionizované vodě. Roztoky byly připravovány denně čerstvé.

Příprava směsného roztoku standardů 2-oxokyselin, včetně vnitřního standardu, o koncentraci asi 500  $\mu\text{mol/l}$  (asi 100  $\mu\text{mol/l}$ )

Do 1,5ml PP zkumavek bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$  (40  $\mu\text{l}$ ) zásobních roztoků PYR, OA, KIC, KMV, 2-OB, 2-OG, 2-OH, PhePYR, 200  $\mu\text{l}$  (80  $\mu\text{l}$ ) zásobního roztoku KIV (a 1,65 ml 1mmol/l HCl). Roztoky byly připravovány denně čerstvé.

Příprava asi 15% kyseliny chloristé pro přípravu roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu

Do 10ml odměrné baňky bylo pipetováno 1,76 ml 85%  $\text{HClO}_4$  a objem byl doplněn deionizovanou vodou. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.



Příprava roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu o koncentraci asi 50 mmol/l

Navážka 0,0500 g DNPH byla rozpuštěna v 5 ml 15% HClO<sub>4</sub>. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu o koncentraci asi 5 mmol/l (asi 0,5 mmol/l)

Roztok DNPH byl připraven smísením 100 µl 50mmol/l DNPH s 900 µl 15% HClO<sub>4</sub> (100 µl 5mmol/l DNPH s 900 µl 15% HClO<sub>4</sub>). Roztoky byly připravovány denně čerstvé.

Příprava směsi methanolu a acetylchloridu v poměru 12,5:1 (v/v)

Směs byla připravena smísením 2,5 ml methanolu s 200 µl acetylchloridu. Směs byla uchovávána v chladničce při 4°C.

Příprava asi 6% roztoku K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Navážka 0,60 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> byla rozpuštěna v 9,4 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava asi 10mmol/l HCl pro přípravu roztoku O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu

Roztok byl připraven zředěním 83 µl asi 12,05mol/l HCl deionizovanou vodou na objem 100 ml. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava roztoku O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu o koncentraci asi 50 mg/ml (nebo asi 5 mg/ml)

Navážka 500 mg PFBHA (nebo 50 mg PFBHA) byla rozpuštěna v 10 ml 10mmol/l HCl (deionizované vody). Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava roztoku O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu o koncentracích asi 50, 40, 20, 10, 5 a 1 mg/ml

Jednotlivé roztoky PFBHA byly připraveny naředěním roztoku PFBHA o koncentraci 50 mg/ml 10mmol/l HCl (Tabulka 3). Roztoky byly připravovány denně čerstvé.

**Tabulka 3:** Příprava roztoku O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu o koncentracích asi 40, 20, 10, 5 a 1 mg/ml.

<b>koncentrace PFBHA [mg/ml]</b>	<b>PFBHA (50 mg/ml) [μl]</b>	<b>10mmol/l HCl [μl]</b>
40	400	100
20	200	300
10	100	400
5	50	450
1	10	490

Příprava roztoku O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu o koncentraci asi 2,77 mg/ml (asi 1 mg/ml)

Navážka 0,083 g PFBHA byla rozpuštěna v 30 ml 1mmol/l HCl (0,0043 g PFBHA byla rozpuštěna v 4,3 ml 10mmol/l HCl, případně v 1mmol/l HCl). Roztoky byly uchovávány v mrazáku při -80 °C.

Příprava asi 2mol/l HCl pro přípravu roztoku o-fenylendiaminu

Roztok 2mol/l HCl byl připraven smísením 600 μl asi 12,05mol/l HCl s 3 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava roztoku o-fenylendiaminu o koncentraci asi 25 mmol/l

Navážka 0,0140 g OPD byla rozpuštěna v 3 ml 2mol/l HCl. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava asi 20% kyseliny metafosforečné

Navážka 0,20 g kyseliny metafosforečné byla rozpuštěna v 0,8 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava asi 10% kyseliny trichloroctové

Navážka 0,50 g kyseliny trichloroctové byla rozpuštěna v 4,5 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

Příprava asi 10% kyseliny 5-sulfosalicylové

Navážka 0,50 g kyseliny 5-sulfosalicylové byla rozpuštěna v 4,5 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

#### Příprava asi 10% kyseliny metafosforečné

Navážka 0,50 g kyseliny metafosforečné byla rozpuštěna v 4,5 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

#### Příprava asi 1mol/l kyseliny chloristé

K 4570  $\mu$ l deionizované vody bylo opatrně pipetováno 430  $\mu$ l koncentrované kyseliny chloristé (85%). Roztok byl uchováván v chladničce při 4 °C.

#### Příprava roztoku HCl o koncentraci asi 7,43 mol/l (asi 2,35 mol/l) pro úpravu pH

Do 10ml skleněné zkumavky s uzávěrem bylo pipetováno 310  $\mu$ l asi 12,05mol/l HCl a 190  $\mu$ l deionizované vody (98  $\mu$ l asi 12,05mol/l HCl a 400  $\mu$ l deionizované vody). Roztoky byly uchovávány v chladničce při 4 °C.

#### Příprava roztoku HCl o koncentraci asi 0,74 mol/l (asi 0,24 mol/l) pro úpravu pH

Do 10ml skleněné zkumavky s uzávěrem bylo odpipetováno 40  $\mu$ l 7,43mol/l HCl (2,35mol/l HCl) a 360  $\mu$ l deionizované vody. Roztoky byly uchovávány v chladničce při 4 °C.

#### Příprava asi 0,02mol/l HCl pro úpravu pH

Do 10ml skleněné zkumavky s uzávěrem bylo pipetováno 165  $\mu$ l asi 12,05mol/l HCl a 835  $\mu$ l deionizované vody. Do další 10ml skleněné zkumavky s uzávěrem bylo pipetováno 50  $\mu$ l takto připraveného roztoku HCl a 4950  $\mu$ l deionizované vody. Roztok by uchováván v chladničce při 4 °C.

## 4.2 VÝBĚR VHODNÉHO DERIVATIZAČNÍHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI OXOSKUPINY 2-OXOKYSELIN

### 4.2.1 Derivatizace 2,4-dinitrofenylhydrazinem

#### 4.2.1.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Do skleněné vialky bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$  směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 100  $\mu\text{mol/l}$  a 100  $\mu\text{l}$  0,5mmol/l DNPH v 15%  $\text{HClO}_4$ . Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 30 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly deriváty 2-oxokyselin extrahovány ethylacetátem. K směsi byl přidán 1 ml ethylacetátu, obsah vialky intenzivně třepán 5 min na třepačce při 1400 rpm a centrifugován 5 min při 1000 x g. Do čisté skleněné vialky byla převedena organická vrstva ethylacetátu. Extrakce byla provedena celkem 2x. Spojené organické vrstvy ethylacetátu byly při laboratorní teplotě odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo přidáno 160  $\mu\text{l}$  10%  $\text{BF}_3$  v ethanolu. Směs byla inkubována 1 hod při 70  $^\circ\text{C}$ . Po inkubaci byla směs ochlazená a bylo k ní pipetováno 160  $\mu\text{l}$  6%  $\text{K}_2\text{CO}_3$  za účelem neutralizace. Směs byla třepána 5 min při 1400 rpm a deriváty extrahovány hexanem. K směsi byl pipetován 1 ml hexanu, obsah třepán 5 min na třepačce při 1400 rpm a 5 min centrifugován při 1000 x g. Do prázdné skleněné vialky byla převedena hexanová vrstva. Extrakce byla provedena celkem 2x. Spojené organické vrstvy hexanu byly při laboratorní teplotě odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 200  $\mu\text{l}$  dichlormethanu a po rozpuštění (5 min) byla směs převedena do skleněného insertu krimpovací vialky.

#### GC parametry

Teplotní gradient:

změna [ $^\circ\text{C}/\text{min}$ ]	teplota [ $^\circ\text{C}$ ]	čas [min]
0	75	0
10	280	5

Doba analýzy: 25,5 min

Teplota nástřiku: 250  $^\circ\text{C}$

Průtok mobilní fáze (He): 1,54 ml/min

Lineární rychlost: 45,6 cm/s

Objem dávkovaného vzorku: 1 µl

Split mód: 10

#### MS parametry

Teplota iontového zdroje: 200 °C

Teplota interface: 250 °C

Start monitorování MS: 4 min

Konec monitorování MS: 25,0 min

Sken od m/z: 35

Sken do m/z: 415

Rychlost skenování: 2000

#### 4.2.1.2 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin a vzorky plné krve a plazmy

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 200 µl směsného roztoku standardů 2-oxokyselin (plné krve nebo plazmy) a 25 µl roztoku 2-OH (IS) o koncentraci asi 500 µmol/l. Po promíchání směsi na vortexu bylo přidáno 200 µl 10% kyseliny 5-sulfosalicylové (5-SSA). Po promíchání a inkubaci (5 min, -20 °C) byla směs centrifugována 5 min při 12225 x g. Do připravené 1,5ml PP zkumavky bylo přeneseno 200 µl supernatantu a pipetováno 200 µl roztoku DNPH o koncentraci 5 mmol/l. Směs byla inkubována 1 hod při 60 °C. Deriváty byly extrahovány do hexanu, prvně 1 ml, podruhé 500 µl. Směs byla 5 min třepána na třepačce a 3 min centrifugována při 12225 x g. Organická fáze byla převedena do připravené 1,5ml PP zkumavky. Prvně bylo odtáženo 800 µl, podruhé 500 µl. Spojené organické vrstvy byly při laboratorní teplotě odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo pipetováno 200 µl acetonitrilu a 20 µl BSTFA v 1% TMCS. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla směs převedena do skleněného insertu šroubovací vialky.

### GC parametry

Teplotní gradient:

změna [°C/min]	teplota [°C]	čas [min]
0	130	2
3	220	0
20	280	5

Doba analýzy: 41,5 min

Teplota nástřiku: 250 °C

Průtok mobilní fáze (He): 1,54 ml/min

Lineární rychlost: 45,6 cm/s

Objem dávkovaného vzorku: 1 µl

Split mód: 10

### MS parametry

Teplota iontového zdroje: 200 °C

Teplota interface: 300 °C

Start monitorování MS: 4 min

Konec monitorování MS: 40,0 min

Sken od m/z: 40

Sken do m/z: 500

Rychlost skenování: 2000

#### 4.2.1.3 Standard pyruvátu

Do 10ml pyrexové zkumavky bylo pipetováno 500 µl roztoku standardu pyruvátu o koncentraci asi 500 µmol/l (rozpuštěný v 1 mmol/l HCl) a 500 µl roztoku DNPH o koncentraci 0,5 mmol/l nebo 5 mmol/l nebo 50 mmol/l. Obsah zkumavky byl inkubován 30 min při 60 °C a poté byly deriváty extrahovány hexanem (2x 2,5 ml). Směs byla třepána na třepačce 5 min při 1400 rpm a centrifugována 5 min při 1000 x g. Organická vrstva hexanu byla odtáhnuta do připravené pyrexové zkumavky. Spojené hexanové vrstvy byly při 60 °C odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo přidáno 500 µl směsi methanolu a acetylchloridu (12,5:1, v/v).

Směs byla inkubována 1 hod při 100 °C. Po ochlazení směsi bylo pipetováno 500 µl 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> za účelem neutralizace. Směs byla třepána na třepačce 5 min při 1400 rpm. Deriváty byly extrahovány hexanem (2x 2,5 ml). Směs byla třepána 5 min při 1400 rpm a centrifugována 5 min při 1000 x g. Do připravené 10ml pyrexové zkumavky byly převedeny hexanové vrstvy, které byly odpařeny při 60 °C do sucha v atmosféře dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 200 µl dichlormethanu a po rozpuštění (5 min) byla směs převedena do insertů krimpovacích vialek. Podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.1.1.

#### **4.2.2 Derivatizace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem**

##### 4.2.2.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Do 10ml pyrexové zkumavky bylo pipetováno 200 µl směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500 µmol/l a 200 µl roztoku PFBHA o koncentraci asi 5 mg/ml. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a inkubován 1 hod při 37 °C. Po inkubaci byl obsah zkumavky ochlazen a k směsi byly přidány asi 0,2 g NaCl. Následovala extrakce, kdy byly k směsi pipetovány 2 ml ethylacetátu. Směs byla třepána 10 min na třepačce při 1400 rpm a centrifugována 5 min při 1000 x g. Do čisté 10ml pyrexové zkumavky byla převedena organická vrstva ethylacetátu. Extrakce byla provedena celkem 2x. Spojené organické vrstvy ethylacetátu byly při 37 °C odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo přidáno 500 µl směsi methanolu a acetylchloridu (12,5:1, v/v) a obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. Směs byla inkubována 1 hod při 70 °C. Po inkubaci bylo k směsi pipetováno 500 µl 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> za účelem neutralizace. Směs byla třepána na třepačce 5 min při 1400 rpm. Poté byla provedena extrakce derivátů 2 ml hexanu. Směs byla třepána 10 min na třepačce při 1400 rpm, následně centrifugována 5 min při 1000 x g. Do čisté 10ml pyrexové zkumavky byla převedena organická vrstva hexanu. Extrakce byla provedena celkem 2x. Spojené organické vrstvy hexanu byly odpařeny při 60 °C do sucha v atmosféře dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 200 µl hexanu. Směs byla promíchána na vortexu a po rozpuštění (5 minut) převedena do skleněného insertu krimpovací vialky.

### GC parametry

Teplotní gradient:

změna [°C/min]	teplota [°C]	čas [min]
0	100	1
2	150	0
5	200	0
10	280	5

Doba analýzy: 49,0 min

Teplota nástřiku: 300 °C

Průtok mobilní fáze (He): 1,54 ml/min

Lineární rychlost: 45,6 cm/s

Objem dávkovaného vzorku: 1 µl

Splít mód: 10

### MS parametry

Teplota iontového zdroje: 200 °C

Teplota interface: 300 °C

Start monitorování MS: 3 min

Konec monitorování MS: 40,0 min

Sken od m/z: 40

Sken do m/z: 450

Rychlost skenování: 3333

#### 4.2.2.2 Vzorky plné krve a plazmy

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 200 µl vzorku plné krve (plazmy) a 200 µl 20% kyseliny metafosforečné (MPA). Směs byla inkubována 5 min při -20 °C, promíchána na vortexu a centrifugována 5 min při 12225 x g. Do čisté 10ml pyrexové zkumavky bylo opatrně pipetováno 200 µl supernatantu a 200 µl PFBHA o koncentraci 5 mg/ml. Směs byla promíchána na vortexu a 1 hod inkubována při 37 °C. Další postup a podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v případě derivatizace směsného roztoku standardů 2-oxokyselin (kapitola 4.2.2.1).



#### 4.2.2.3 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 200 µl směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500 µmol/l a 200 µl roztoku PFBHA o koncentraci asi 1 mg/ml. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a inkubován 30 min při 37 °C. Po inkubaci bylo k směsi přidáno asi 0,1 g NaCl. Následně byly deriváty extrahovány ethylacetátem (2x 0,5 ml). Směs byla 5 min třepána na třepačce při 1400 rpm a 5 min centrifugována při 12225 x g. Organická fáze byla převedena do připravené 1,5ml PP zkumavky. Prvně bylo odtaženo 300 µl, podruhé 500 µl. Spojené organické vrstvy byly při laboratorní teplotě odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo pipetováno 50 µl hexanu, 50 µl ethylacetátu a 10 µl MSTFA v 1% TMCS. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a poté inkubován 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla směs převedena do skleněného insertu krimpovací vialky.

#### GC parametry

Teplotní gradient:

změna [°C/min]	teplota [°C]	čas [min]
0	75	1
10	280	5

Doba analýzy: 26,5 min

Teplota nástřiku: 300 °C

Průtok mobilní fáze (He): 1,54 ml/min

Lineární rychlost: 45,6 cm/s

Objem dávkovaného vzorku: 1 µl

Splít mód: 10

#### MS parametry

Teplota iontového zdroje: 200 °C

Teplota interface: 300 °C

Start monitorování MS: 3 min

Konec monitorování MS: 26,0 min

Sken od m/z: 10

Sken do m/z: 650

Rychlost skenování: 3333

#### **4.2.3 Derivatizace o-fenylendiaminem**

##### **4.2.3.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin**

Do 10ml pyrexové zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l a 200  $\mu$ l 25mmol/l OPD. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 30 min při 50 °C. Po inkubaci byl obsah zkumavky ochlazen a k směsi přidány asi 0,2 g NaCl. Následně byla provedena extrakce ethylacetátem, kdy k směsi byly pipetovány 2 ml ethylacetátu. Směs byla 10 min třepána na třepačce při 1400 rpm a poté 5 min centrifugována při 1000 x g. Organická vrstva ethylacetátu byla převedena do čisté pyrexové zkumavky. Extrakce byla provedena celkem 2x. Spojené organické vrstvy ethylacetátu byly při 37 °C odpařeny v atmosféře dusíku. K odparku bylo přidáno 40  $\mu$ l hexanu, 40  $\mu$ l ethylacetátu a 20  $\mu$ l MSTFA v 1% TMCS. Obsah zkumavky byl inkubován 15 min při laboratorní teplotě a směs převedena do skleněného insertu krimpovací vialky. Podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.2.3.

### **4.3 VOLBA VHODNÉHO DERIVATIZAČNÍHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI KARBOXYLOVÉ SKUPINY 2-OXOKYSELIN**

#### **4.3.1 Derivatizace pentafluorobenzoyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem methanolem s acetylchloridem**

Postup je uveden v kapitole 4.2.2.1.

#### **4.3.2 Derivatizace pentafluorobenzoyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem] N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorosilanu**

##### **4.3.2.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin**

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l a 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 1 mg/ml. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a inkubován 30 min při 37 °C. Po inkubaci bylo k směsi přidáno asi 0,1 g NaCl. Následně byla provedena extrakce ethylacetátem. K směsi bylo pipetováno 500  $\mu$ l ethylacetátu, obsah zkumavky byl 5 min třepán na vortexu a 5 min centrifugován při 12225 x g. Extrakce byla provedena celkem 2x. Organické fáze byly převedeny do připravených 1,5ml PP zkumavek. Poprvé bylo odtaženo 300  $\mu$ l organické vrstvy, podruhé 500  $\mu$ l. Spojené organické vrstvy byly při laboratorní teplotě odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo přidáno 200  $\mu$ l hexanu a 20  $\mu$ l MSTFA v 1% TMCS. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 15 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla směs převedena do skleněných insertů krimpovacích vialek. Podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.2.3.

### **4.3.3 Derivatizace pentafluorobenzoyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem] N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorosilanu**

#### 4.3.3.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l a 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 1 mg/ml. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a inkubován 30 min při 37 °C. Další postup je stejný jako v kapitole 4.3.2.1, jen derivatizace byla provedena BSTFA v 1% TMCS. Podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.2.3.

#### 4.3.3.2 Vzorky plné krve a plazmy

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu$ l plné krve (plazmy), 50  $\mu$ l roztoku 2-OH (IS) o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l a obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. Poté bylo pipetováno 200  $\mu$ l 10% kyseliny 5-SSA, obsah zkumavky byl promíchán na vortexu, inkubován 5 min při -20 °C a centrifugován 5 min při 12225 x g. Do čisté 1,5ml PP zkumavky bylo opatrně převedeno 200  $\mu$ l supernatantu. Další postup byl stejný jako v případě směsného roztoku standardů 2-oxokyselin. Podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.2.3.

### **4.3.4 Derivatizace pentafluorobenzoyloximů [derivatizace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem] BF<sub>3</sub> v ethanolu**

#### 4.3.4.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Do 10ml pyrexové zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l, 50  $\mu$ l 2-OH (IS) o koncentraci asi 2,5 mmol/l a 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 5 mg/ml. Obsah zkumavky byl inkubován 10 min při 37 °C. Po inkubaci byly ke směsi přidány asi 0,2 g NaCl a provedena dvojnásobná extrakce ethylacetátem (2x 1 ml). Obsah zkumavky byl třepán 10 min při 1400 rpm a poté 5 min centrifugován při 1000 x g. Organická vrstva byla převedena do čisté 10ml pyrexové zkumavky. Spojené organické vrstvy byly při 37 °C odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo pipetováno 200  $\mu$ l

$\text{BF}_3$  v ethanolu a směs byla inkubována 1 hod při  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byla provedena dvojnásobná extrakce hexanem (2x 1 ml). Následující postup byl stejný jako v kapitole 4.2.1.1, jen spojené organické vrstvy byly odpařeny při  $60\text{ }^\circ\text{C}$  a odparek byl rozpuštěn v hexanu. Podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.2.1.

## 4.4 OPTIMALIZACE PODMÍNEK DERIVATIZACE

### 4.4.1 Optimalizace koncentrace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu a teploty inkubace

#### 4.4.1.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Celkem do 12 10ml pyrexových zkumavek bylo postupně pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l a 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o různé koncentraci (Tabulka 4). Směs byla 1 hod inkubována při 37 nebo 50 °C. Další postup a podmínky GC-MS analýzy byly jako v kapitole 4.2.2.1.

**Tabulka 4:** Koncentrace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu a teplota inkubace.

c (PFBHA) [mg/ml]	teplota inkubace [°C]
50	37
50	50
40	37
40	50
20	37
20	50
10	37
10	50
5	37
5	50
1	37
1	50

#### 4.4.1.2 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Celkem do 9 10ml pyrexových zkumavek bylo pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 100  $\mu$ mol/l a různý objem roztoku PFBHA o koncentraci 5 mg/ml (Tabulka 5). Směs byla inkubována 1 hod při 37 nebo 50 nebo 70 °C. Další postup a podmínky GC-MS analýzy byly jako v kapitole 4.2.2.1.

**Tabulka 5:** Množství O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminu a teplota inkubace.

5mg/ml PFBHA [ $\mu$ l]	teplota inkubace [ $^{\circ}$ C]
200	37
200	50
200	70
400	37
400	50
400	70
600	37
600	50
600	70

#### 4.4.1.3 Vzorek plné krve

Do čisté jednorázové 15ml PP zkumavky bylo pipetováno 1,3 ml vzorku plné krve a 1,3 ml roztoku 20% MPA. Směs byla 5 minut inkubována při  $-20^{\circ}\text{C}$ , promíchána na vortexu a centrifugována 10 min při  $1700 \times g$ . Celkem do třech 10ml pyrexových zkumavek bylo pipetováno 150  $\mu$ l supernatantu a 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 5 mg/ml. Směs byla inkubována 1 hod při 37 nebo 50 nebo  $70^{\circ}\text{C}$ . Do jiných třech 10ml pyrexových zkumavek bylo pipetováno 150  $\mu$ l supernatantu a 400  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 5 mg/ml. Směs byla inkubována 1 hod při 37 nebo 50 nebo  $70^{\circ}\text{C}$ . Do dalších třech 10ml pyrexových zkumavek bylo pipetováno 150  $\mu$ l supernatantu a 600  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 5 mg/ml. Směs byla inkubována 1 hod při 37 nebo 50 nebo  $70^{\circ}\text{C}$ . Další postup a podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.2.1.

#### 4.4.2 Optimalizace množství N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu

##### 4.4.2.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin.

Do 1,5ml PP zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l a 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 5 mg/ml. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 30 min při  $37^{\circ}\text{C}$ . Další postup byl jako v kapitole 4.3.2.1, jen s tím rozdílem, že k odparku bylo přidáno

200 µl acetonitrilu a 10 (20, 30, 40, 50) µl MSTFA v 1% TMCS nebo BSTFA v 1% TMCS. Podmínky GC-MS analýzy byly stejné jako v kapitole 4.2.2.3.

#### 4.4.3 Optimalizace teploty inkubace při derivatizaci O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem a methanolem s acetylchloridem

##### 4.4.3.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin

Celkem do 4 10ml pyrexových zkumavek bylo pipetováno 200 µl směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500 µmol/l a 200 µl roztoku PFBHA o koncentraci asi 5 mg/ml. Směs byla inkubována 1 hod při laboratorní teplotě nebo 37 °C (Tabulka 6). Po inkubaci byl obsah zkumavky ochlazen a k směsi přidány asi 0,2 g NaCl. Následovala dvojnásobná extrakce ethylacetátem (2x 2 ml). Obsah zkumavky byl třepán 10 min při 1400 rpm a 5 min centrifugován při 1000 x g. Organické vrstvy byly převedeny do čisté 10ml pyrexové zkumavky a při 37 °C odpařeny do sucha v atmosféře dusíku. K odparku bylo pipetováno 500 µl směsi MeOH-AcCl (12,5:1, v/v) a směs inkubována 1 hod při 70 nebo 100 °C (Tabulka 6). Další postup a podmínky GC-MS analýzy byly jako v kapitole 4.2.2.1.

**Tabulka 6:** Teplota inkubace při derivatizaci 2-oxokyselin.

teplota při derivatizaci PFBHA [°C]	teplota při derivatizaci směsi MeOH-AcCl (12,5:1, v/v) [°C]
laboratorní teplota	70
laboratorní teplota	100
37	70
37	100



## **4.5 VOLBA VHODNÉHO EXTRAČNÍHO ČINIDLA**

### **4.5.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin**

Celkem do 8 1,5ml PP zkumavek bylo pipetováno 200  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l a 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 2,77 mg/ml. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 30 min při 37 °C. Následně byla provedena extrakce ethylacetátem, diethyletherem a hexanem (2x 0,5 ml). Před extrakcí ethylacetátem bylo k směsi přidáno asi 0,1 g NaCl. Podmínky extrakce a následující postup byl stejný jako v kapitole 4.3.2.1, jen derivatizace byla provedena 10  $\mu$ l MSTFA v 1% TMCS. Podmínky GC-MS analýzy byly jako v kapitole 4.2.2.3.

## 4.6 VÝBĚR VHODNÉHO DEPROTEINAČNÍHO ROZTOKU

### 4.6.1 Směsný roztok standardů 2-oxokyselin a vzorky plazmy

Celkem do 6 1,5ml PP zkumavek bylo pipetováno 100  $\mu$ l směsného roztoku standardů 2-oxokyselin o koncentraci asi 200  $\mu$ mol/l (plazma) a 25  $\mu$ l roztoku 2-OH (IS) o koncentraci asi 500  $\mu$ mol/l. Po promíchání bylo k směsi pipetováno 200  $\mu$ l 10% 5-SSA, nebo 10% MPA nebo 1mol/l kyseliny chloristé (PCA). Směs byla promíchána na vortexu (směs plazmy a deproteinačního činidla byla inkubována 5 min při -20 °C a odstředěna 5 min při 12225 x g). Do připravených 1,5ml PP zkumavek bylo přeneseno 200  $\mu$ l směsi (supernatantu) a přidáno 200  $\mu$ l roztoku PFBHA o koncentraci asi 2,77 mg/ml. Směs byla inkubována 30 min při 37 °C. Po inkubaci byl obsah zkumavky ochlazen a k směsi bylo přidáno asi 0,1 g NaCl. Následovala dvojnásobná extrakce ethylacetátem (2x 0,5 ml). Obsah zkumavky byl třepán 10 min při 1400 rpm a 5 min centrifugován při 1000 x g. Spojené organické vrstvy byly při 37 °C odpařeny do sucha v atmosféře dusíku a dále bylo postupováno výše uvedeným způsobem (kapitola 4.2.1.2). Podmínky GC-MS analýzy byly jako v kapitole 4.2.2.3.

## 4.7 ANALYTICKÉ PARAMETRY

### 4.7.1 Linearita

Linearita kalibračního vztahu je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci analytu v daném rozmezí. Lineární rozsah odezvy je interval mezi nejnižší a nejvyšší hladinou stanovované látky, v němž je látka stanovována s určitou přesností, správností a linearitou. Testuje se minimálně pět různých koncentrací standardní látky.

Pro verifikaci linearity zaváděné metody byla použita metoda kalibrační křivky. K jejímu sestrojení bylo připraveno, ředěním zásobních roztoků 2-oxokyselin 1mmol/l HCl (deionizovanou vodou), šest standardních roztoků o přesně známých koncentracích. Roztoky byly zpracovány postupem uvedeným v kapitole 4.3.2.1 (extrakce ethylacetátem nebo hexanem). Rovnice kalibrační křivky byla získána proložením závislosti poměru ploch píků ( $A_{oxo}/A_{is}$ ) na koncentraci standardů metodou nejmenších čtverců.

2-OB	$c = 0-245 \mu\text{mol/l}$
2-OG	$c = 0-247 \mu\text{mol/l}$
KIC	$c = 0-249 \mu\text{mol/l}$
KIV	$c = 0-194 \mu\text{mol/l}$
KMV	$c = 0-232 \mu\text{mol/l}$
PhePYR	$c = 0-216 \mu\text{mol/l}$
PYR	$c = 0-211 \mu\text{mol/l}$

Pro kvantifikaci 2-oxokyselin v plné krvi a plazmě byla použita metoda kalibrační křivky. K jejímu sestrojení bylo připraveno, ředěním zásobních roztoků 2-oxokyselin deionizovanou vodou, šest standardních roztoků o přesně známých koncentracích. K roztokům standardů byla přidána 5-SSA v poměru 1:1. Dále byla směs zpracována postupem uvedeným v kapitole 4.7.1. Rovnice kalibrační křivky byla získána proložením závislosti poměru ploch píků ( $A_{oxo}/A_{is}$ ) na koncentraci standardů metodou nejmenších čtverců.

2-OB	c = 0–142 μmol/l
2-OG	c = 0–138 μmol/l
KIC	c = 0–559 μmol/l
KIV	c = 0–258 μmol/l
KMV	c = 0–571 μmol/l
PhePYR	c = 0–28 μmol/l
PYR	c = 0–2816 μmol/l

#### 4.7.2 Přesnost v sérii

Přesnost analytické metody je mírou shody mezi jednotlivými hodnotami, které jsou měřeny při stejných analytických podmínkách opakovaně s homogenním vzorkem. Je obvykle uváděna jako odhad směrodatné odchylky nebo relativní směrodatné odchylky. Opakovatelnost je typ přesnosti vztahující se k měřením provedeným za podmínek opakovatelnosti, tj. stejná metoda, stejný materiál, stejný pracovník, stejná laboratoř, krátký časový úsek. Reprodukovatelnost je typ přesnosti vztahující se k měřením provedených za podmínek reprodukovatelnosti, tj. stejná metoda, jiný pracovník, jiná laboratoř, jiné zařízení, dlouhý časový interval. Jako míra přesnosti byl použit variační koeficient (CV).

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

$$CV (\%) = \frac{STD}{AVG} \cdot 100$$

kde *SD* je směrodatná odchylka, *x<sub>i</sub>* je koncentrace vždy jednoho ze vzorků v sérii, *AVG* je aritmetický průměr a *n* je počet vzorků v sérii.

Přesnost stanovení pro jednotlivé 2-oxokyseliny byla určena analýzou šesti (sedmi) nezávisle připravených vzorků stejné plazmy (plné krve) získané od dobrovolných dárců krve. Vzorky byly analyzovány během jednoho dne postupem uvedeným v kapitole 4.7.1 (deproteinace 5-SSA).

#### **4.8 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Pro zpracování získaných dat byl použit program MS Excel a program GCMS Postrun Analysis, verze 4.20 (Shimadzu, Japonsko).

## 5 VÝSKEDKY A DISKUSE

2-Oxokyseliny mají významnou úlohu v metabolismu aminokyselin, sacharidů a lipidů. Zvýšené hladiny některých 2-oxokyselin mohou vést k mnohým metabolickým poruchám. Jednou z nejvážnějších je choroba javorového sirupu, dále pak fenylketonurie a deficit pyruvátdehydrogenasového komplexu.

Pro stanovení vybraných 2-oxokyselin jsme použili metodu GC-MS. Pro GC analýzu je zapotřebí, aby analyt byl dostatečně těkavý a mohl být eluován při dané teplotě bez tepelného rozkladu. Díky karbonylové a karboxylové skupině jsou 2-oxokyseliny velmi polární. Proto je nutná derivatizace. Pro účely GC se jako derivatizační činidla nejčastěji používají PFBHA, OPD a DNPH [1, 27, 33, 34, 36, 41, 49], proto i my jsme je při zavádění metody testovali.

### 5.1 VÝBĚR VHODNÉHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI OXOSKUPINY 2-OXOKYSELIN

V úvodu práce jsme se zaměřili na DNPH, kdy jsme testovali různé koncentrace DNPH v reakční směsi. Teplotu inkubace jsme zvolili na základě literárních údajů [27, 28]. Vzniklé 2,4-dinitrofenylhydrazony jsme extrahovali z vodného prostředí do organického rozpouštědla. V literatuře se nejčastěji uvádí ethylacetát. Navíc jsme také testovali extrakci hexanem. 2,4-Dinitrofenylhydrazony jsme následně derivatizovali  $\text{BF}_3$  v ethanolu, nebo směsí methanolu a acetylchloridu, nebo BSTFA v 1% TMCS. Při analýzách standardů 2-oxokyselin, vzorků lidské plazmy a plné krve jsme prakticky nedetegovali žádné deriváty 2-oxokyselin (Příloha 1). Chromatogramy standardních roztoků i vzorků plazmy a plné krve jsou prakticky identické, což naznačuje, že se nejedná o deriváty 2-oxokyselin, ale nečistoty, pocházející z roztoku DNPH. Také hmotnostní spektra nepoukazují na deriváty 2-oxokyselin. Důkazem, že se jedná o nečistoty pocházející z DNPH, je fakt, že při zvyšující se koncentraci DNPH se také zvyšuje intenzita píků nečistot. Allen a kol. poukazují na to, že komerčně dodávaný DNPH není čistý, a že je nutné ho před použitím purifikovat [46]. González a kol. stanovovali metodou GC-MS 2-oxokyseliny jako DNPH-methylestery. 2,4-Dinitrofenylhydrazony extrahovali do ethylacetátu, a poté je převedli na methylestery. Deriváty proprali směsí chloroformu s vodou (4:1, v/v).

a rekrystalizovali z benzenu nebo ethylacetátu [27]. Korchazhkina a kol. poukazují na výhodu použití DNPH, protože je vysoce reaktivní, proto derivatizace nevyžaduje použití vysoké teploty [47]. Za nevýhodu použití DNPH lze považovat to, že vznikají *syn*- a *anti*-isomery 2,4-dinitrofenylhydrazonů, což komplikuje vyhodnocení dat [27].

Dále jsme testovali OPD, chromatogram je uveden v příloze 2. OPD je často využíván pro derivatizaci 2-oxokyselin ve spojení s HPLC a fluorescenční detekcí, jelikož chinoxalinolové deriváty silně fluoreskují. HPLC analýza je tak velmi citlivá a selektivní [29–31]. Využití OPD pro GC není výjimkou [1, 36]. Pro derivatizaci jsme připravili roztok OPD v 2mol/l HCl. Olson a kol. uvádějí, že OPD je lépe rozpustný v 2mol/l než v 3mol/l HCl [20]. Při derivatizaci DNPH nebo PFBHA vzniká derivát s volnou karboxylovou skupinou, proto je možná následná derivatizace směsí methanolu a acetylchloridu či BF<sub>3</sub> v ethanolu, případně silylačními činidly. V případě derivatizace OPD vzniká derivát s volnou hydroxylovou skupinou, proto je možné použít pouze silylační činidla. Získané výsledky při derivatizaci OPD byly daleko lepší než při derivatizaci DNPH. Tabulka 7 ukazuje porovnání derivatizace OPD a PFBHA.

**Tabulka 7:** Intenzita derivátů 2-oxokyselin ( $\times 10^6$ ) po derivatizaci O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem a N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorosilanu a o-fenylendiaminem a N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorsilanu.

2-oxokyselina	PFBHA	OPD
PYR	3,515	1,426
KIV	2,880	0,719
2-OB	3,416	1,422
KMV	4,802	4,402
KIC	1,068	1,730
2-OH	3,363	2,154
OA	7,524	1,140
2-OG	8,620	5,375
4-hydroxy-fenylpyruvát	N.D.	N.D.
PhePYR	6,496	1,214

Velkou výhodou derivatizace OPD je, že se netvoří *syn*- a *anti*-isomery, což usnadňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu [1]. Nevýhodou OPD je jeho vysoká karcinogenita, mutagenita a toxicita pro reprodukci [48]. To je důvod, proč jsme, i přes uspokojivé výsledky, od jeho použití ustoupili a dali přednost PFBHA.

Třetím derivatizačním činidlem, které jsme testovali, je PFBHA. Derivatizace PFBHA, stejně jako OPD, vede k tvorbě stabilních produktů [1, 40]. Kobayashi a kol. uvádějí, že pentafluorobenzoyloximy jsou dobře detekovatelné detektorem elektronového záchytu [40]. Výhodou použití PFBHA také je, že reakce probíhá v slabě kyselém prostředí (pH 2–5) a při laboratorní teplotě. Další výhodou použití PFBHA je, že pentafluorobenzoyloximy jsou mnohem více těkavé než 2,4-dinitrofenylhydrazony. Nevýhodou derivatizace PFBHA je, stejně jako při použití DNPH, tvorba *syn*- a *anti*-isomerů pentafluorobenzoyloximů, což ztěžuje kvalitativní i kvantitativní analýzu [27, 40]. I přes tuto nevýhodu bylo použití PFBHA nejvíce přijatelné, proto další optimalizace byly uskutečněny pro derivatizaci PFBHA.



## 5.2 VÝBĚR VHODNÉHO DERIVATIZAČNÍHO ČINIDLA PRO DERIVATIZACI KARBOXYLOVÉ SKUPINY PENTAFLUOROBENZYLOXIMOVÝCH DERIVÁTŮ

Testovali jsme různá derivatizační činidla pro derivatizaci karboxylové skupiny pentafluorobenzoyloximových derivátů, vzniklých derivatizací 2-oxokyselin PFBHA. Zjistili jsme, že není významný rozdíl v intenzitách derivátů 2-oxokyselin, použijeme-li MSTFA v 1% TMCS nebo BSTFA v 1% TMCS (Příloha 3). Tato derivatizační činidla se nejvíce používají [40, 49, 50]. Intenzity derivátů 2-oxokyselin, derivatizovaných PFBHA a směsí methanolu a acetylchloridu (Příloha 4) nebo  $\text{BF}_3$  v ethanolu, jsou srovnatelné a jsou daleko vyšší v porovnání s intenzitami pentafluorobenzoyloxim-silyl derivátů. Nevýhodou je, že derivatizace směsí methanolu a acetylchloridu nebo  $\text{BF}_3$  v ethanolu je časově náročná. Nevýhodou použití silylačních činidel je, že reagují s celou řadou látek, které mají ve své molekule  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}$ ,  $-\text{NH}_2$  a  $-\text{SH}$  skupinu, což komplikuje analýzu 2-oxokyselin v biologických vzorcích. Další nevýhodou silylačních činidel je citlivost na vlhkost [33, 34].

## **5.3 OPTIMALIZACE PODMÍNEK DERIVATIZACE**

### **5.3.1 Optimalizace vhodné koncentrace O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylaminu**

Prvně jsme optimalizovali vhodnou koncentraci PFBHA, kdy derivatizace probíhala při 37 nebo 50 °C, tedy optimalizovali jsme současně také teplotu inkubace. Následně jsme provedli derivatizaci směsí methanolu a acetylchloridu. Intenzity derivátů 2-oxokyselin byly o něco nižší, byla-li reakční směs inkubována při 50 °C. Nejvyšší intenzita píků derivátů 2-oxokyselin byla dosažena při derivatizaci PFBHA o koncentraci 40 mg/ml. Při derivatizaci PFBHA o koncentraci 5 mg/ml měly píky derivátů dostatečně vysokou intenzitu, proto jsme zvolili pro následné analýzy tuto koncentraci.

### **5.3.2 Optimalizace teploty inkubace při derivatizaci 2-oxokyselin O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem**

2-Oxokyseliny jsme derivatizovali PFBHA při různých teplotách (laboratorní teplota, 37 a 50 °C). Nejlepších výsledků jsme dosáhli při teplotě 37 °C. Kobayashi a kol. uvádějí, že výtěžnost metody se výrazně neliší při teplotě 20 a 60 °C. Testovali jsme také dobu inkubace a naše výsledky byly shodné s těmi publikovanými, tedy že třicetiminutová inkubace je dostatečná. Kobayashi a kol. nezaznamenali významný rozdíl ve výtěžnosti, když reakční směs inkubovali po dobu 30 až 120 min [40].

### **5.3.3 Optimalizace množství N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu v 1% trimethylchlorosilanu**

Optimálním množstvím komerčně dodávaného roztoku MSTFA v 1% TMCS bylo 20 µl. Při použití většího objemu k přidávanému odparku (30 µl a více) se intenzita píků derivátů 2-oxokyselin prakticky nezvyšovala. Stejně výsledky jsme dosáhli také se směsí BSTFA v 1% TMCS.

#### **5.3.4 Optimalizace teploty inkubace při derivatizaci pentafluorobenzoyloximů směsí methanolu a acetylchloridu**

Nejvyšší intenzity píků, které odpovídají derivátům 2-oxokyselin, byly zaznamenány při derivatizaci, která byla provedena při 100 °C po dobu 1 hodiny. Kobayashi a kol. uvádějí, že u derivatizace při 70 °C byly intenzity deriváty 2-oxokyselin významně nižší oproti 100 °C [27].

## 5.4 VOLBA VHODNÉHO EXTRAČNÍHO ČINIDLA

Testovali jsme různá extrakční činidla. Po derivatizaci PFBHA jsme pentafluorobenzyloximové deriváty extrahovali ethylacetátem, hexanem a diethyletherem (Tabulka 8).

**Tabulka 8:** Intenzity derivátů 2-oxokyselin ( $\times 10^6$ ) po extrakci ethylacetátem, hexanem a diethyletherem.

2-oxokyselina	ethylacetát	hexan	diethylether
PYR	2,695	2,572	0,600
KIV	1,720	1,096	0,707
2-OB	1,720	1,897	0,430
KMV	1,521	1,412	0,578
KIC	1,221	1,665	0,243
2-OH	1,717	2,213	0,289
2-OG	4,229	N.D.	N.D.

Výhodou použití diethyletheru bylo jeho rychlé odpaření, nevýhodou pak, že v chromatogramu se vyskytovaly píky neidentifikovatelných nečistot. Díky tomu nebyly identifikovány některé deriváty 2-oxokyselin (Tabulka 8). V příloze 5 je znázorněn chromatogram nulového standardu, kde jsou patrné interferující píky neidentifikovatelných látek, které znesnadňují odečet píků odpovídající derivátů některých 2-oxokyselin.

Nevýhodou použití ethylacetátu je, že v oblasti, kde eluuje derivát 4-hydroxyfenylpyruvátu, eluuje celá řada neznámých interferujících látek, které zřejmě pocházejí z ethylacetátu. Další nevýhodou je, že odpaření ethylacetátu je časově náročné v porovnání s odpařením hexanu. Extrakce do hexanu je nevýhodná v tom, že se prakticky neextrahuje derivát 2-OG.

Před extrakcí ethylacetátem je k vzorkům přidán NaCl. Mezi faktory ovlivňující extrakci patří vliv pH a iontové síly. Vliv iontové síly obecně roste s polaritou sloučeniny. S rostoucím obsahem NaCl vzrůstá výtěžek extrakce, ovšem jen do určité koncentrace, pak naopak klesá[51]. To se ukázalo jako velký problém, výtěžnosti extrakce byly proměnlivé a nereprodukovatelné. Lze totiž obecně těžko zajistit optimální koncentraci NaCl pro vzorky s odlišnými koncentracemi 2-oxokyselin. To bylo prokázáno u přesnosti, kdy se hodnoty variačních koeficientů mezi jednotlivými 2-oxokyselinami značně liší.

Nevýhodou použití nepolárních rozpouštědel, nemísitelných s vodou, je, že jsou nevhodné pro extrakci vysoce polárních látek. Více polární rozpouštědla, jako je např. acetonitril, jsou mísitelná s vodou, a proto nemohou být pro extrakci použity. Přidáním anorganické soli k směsi vody a organického rozpouštědla mísitelného s vodou, dochází k tzv. vysolení, které umožňuje oddělení rozpouštědla od směsi a vytvoří se tak dvoufázový systém. Různé soli o různých koncentracích vytvoří různé stupně fázové separace. Přidáním anorganické soli k směsi vody a rozpouštědla nemísitelného s vodou se extrakce významně zlepší. [51].

## 5.5 VÝBĚR VHODNÉHO DEPROTEINAČNÍHO ROZTOKU

Pro precipitaci proteinů ve vzorcích plazmy a plné krve byla testována tři deproteinační činidla (5-SSA, MPA a PCA). V literatuře je nejčastěji zmiňována deproteinace 5-SSA [52, 53]. Při deproteinaci PCA byl v chromatogramech zaznamenán vysoký šum, a tak některé deriváty 2-oxokyselin nebylo možné vůbec detegovat. Při deproteinaci MPA byly intenzity píků derivátů 2-oxokyselin srovnatelné s intenzitami píků, které byly zaznamenány při deproteinaci 5-SSA, avšak i zde byly deriváty některých 2-oxokyselin nedostatečně separovány. Proto nejvhodnějším deproteinačním činidlem byla zvolena 5-SSA. Při DBS technice není nutné precipitovat proteiny, k vyseknutému terčíku se zaschlou krví se rovnou přidává derivatizační činidlo.

## 5.6 ANALYTICKÉ PARAMETRY

### 5.6.1 Kalibrace

Linearita byla zjišťována analýzou standardů s koncentracemi rovnoměrně pokrývajících deklarovaný rozsah. Linearita byla testována analýzou šesti standardů o různých koncentracích jednotlivých 2-oxokyselin.

Pro verifikaci zaváděné metody byla použita metoda kalibrační křivky. Kalibrační závislosti poměru plochy píku jednotlivé 2-oxokyseliny k vnitřnímu standardu jsou uvedeny v tabulkách 9 a 10. Linearita byla dosažena v celém rozsahu použitých koncentrací.

**Tabulka 9:** Parametry kalibračních křivek vybraných 2-oxokyselin (extrakce ethylacetátem).

2-oxokyselina	k	Q	R <sup>2</sup>
PYR	0,0130	-0,0622	0,9932
2-OB 1	0,0002	-0,0011	0,9945
KIV 1	0,0041	-0,0042	0,9989
2-OB 2	0,0104	-0,0103	0,9939
KIV 2	0,0039	-0,0061	0,9934
KMV 1	0,0065	-0,0476	0,9872
KMV 2	0,0010	-0,0087	0,9918
KIC 1	0,0020	0,0023	0,9959
KIC 2	0,0071	-0,0296	0,9980
2-OG	0,0071	-0,0510	0,9911

**Tabulka 10:** Parametry kalibračních křivek vybraných 2-oxokyselin (extrakce hexanem).

2-oxokyselina	k	Q	R <sup>2</sup>
PYR	0,0050	-0,0663	0,9934
KIV 1	0,0024	-0,0129	0,9966
2-OB	0,0038	-0,0048	0,9971
KIV 2	0,0003	0,0002	0,9952
KMV 1	0,0036	-0,0227	0,9978
KMV 2	0,0018	-0,0151	0,9975
KIC 1	0,0004	-0,0044	0,9966
KIC 2	0,0032	-0,0395	0,9975
PhePYR 1	0,0031	-0,0518	0,9894
PhePYR 2	0,0083	-0,1135	0,9965

Pro kvantitativní stanovení 2-oxokyselin v plazmě a plné krvi byla sestavená kalibrační křivka tak, aby lineární oblast křivky pokrývala koncentrace 2-oxokyselin obsažených v plazmě i v plné krvi. Kalibrační závislosti poměru plochy píku jednotlivé 2-oxokyseliny k vnitřnímu standardu jsou uvedeny v tabulce 11. Linearita byla dosažena v celém rozsahu použitých koncentrací.

**Tabulka 11:** Parametry kalibračních křivek vybraných 2-oxokyselin.

2-oxokyselina	k	Q	R <sup>2</sup>
PYR	0,2941	-0,9292	0,9985
KIV	0,1903	-0,0636	0,9894
2-OB	0,1374	-0,0459	0,9963
KMV	0,2357	-0,4625	0,9912
KIC	0,1176	-0,1810	0,9983
2-OG	0,0648	0,0014	0,9998

Jako vnitřní standard jsme zvolili 2-OH. Má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako stanovované 2-oxokyseliny a prakticky se nevyskytuje v lidské krvi. Tento IS je také nejčastěji zmiňován v publikacích zabývajících se stanovením 2-oxokyselin [1, 36, 49]. Hoffmann a kol. testovali 2-OH a trikarbamovou kyselinou jako IS. Uvádějí, že vhodnější je 2-OH [41].

### 5.6.2 Přesnost v sérii

Přesnost stanovení vybraných 2-oxokyselin ve vzorcích plazmy a plné krve metodou GC-MS je uvedena v tabulce 12 a 13.

**Tabulka 12:** Přesnost stanovení 2-oxokyselin ve vzorcích plazmy.

2-oxokyselina	AVG [ $\mu\text{mol/l}$ ]	SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
PYR	97,62	6,53	6,69
KIV	20,81	5,62	27,02
2-OB	2,23	0,37	16,54
KMV	28,73	5,73	19,95
KIC	26,46	1,37	5,16
2-OG	4,14	1,70	41,03



**Tabulka 13:** Přesnost stanovení 2-oxokyselin ve vzorcích plné krve.

2-oxokyselina	AVG [ $\mu\text{mol/l}$ ]	SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	CV [%]
PYR	72,55	11,81	16,27
KIV	25,38	9,40	37,03
2-OB	2,87	12,71	49,11
KMV	31,57	8,51	26,96
KIC	24,28	2,10	8,67
2-OG	4,01	1,18	29,52

Variační koeficienty přesnosti v sérii jsou vysoké, zvláště u některých 2-oxokyselin. Příčin může být více, jednou z nich je zřejmě nereprodukovatelná extrakce ethylacetátem, jak již bylo zmíněno v kapitole 5.4. Možným řešením by mohlo být přidávání nasyceného roztoku NaCl, což je přesnější, než přibližná navážka pevného NaCl. I tak je nutné pomyslet na to, že vzorky plazmy a plné krve mají různé koncentrace stanovovaných 2-oxokyselin a interferujících látek extrahujících se z vodného roztoku do ethylacetátu.

Cílem této práce bylo zavést metodu GC-MS pro stanovení 2-oxokyselin v lidské plazmě a plné krvi. Publikací zabývajících se stanovením 2-oxokyselin metodou GC-MS není mnoho a jsou spíše staršího data. Důvodem může být komplikovaná příprava vzorku, zahrnující nejčastěji 2 derivatizace a několik extrakčních kroků. Proto byly více publikovány metody kapalinové chromatografie s fluorescenční či hmotnostní detekcí. Příprava vzorku je mnohem jednodušší, kdy je často použita jen jedna derivatizace bez nutnosti následné extrakce [29, 30, 32, 52]. Na našem pracovišti, již před 10 lety, byla pro stanovení 2-oxokyselin zavedena metoda HPLC s fluorescenční detekcí [54]. Metoda byla dostatečně citlivá a selektivní, ovšem zabývala se pouze stanovením BCKA. Proto cílem této práce bylo rozšířit počet stanovovaných 2-oxokyselin a využít hmotnostní detektor jako nástroj pro vyhledávání dalších, minoritních 2-oxokyselin

Referenční hodnoty 2-oxokyselin v plazmě a plné krvi se mezi jednotlivými studii mírně liší. Tyto rozdíly jsou dány použitím různých analytických metod a přípravou vzorku. Pailla a kol. uvádějí, že s rostoucím věkem se hladiny KIV, KIC a KMV významně snižují. Důvodem může být pokles svalové hmoty během stárnutí [52]. Z 2-oxokyselin, které jsme stanovovali v plazmě a plné krvi, byl PYR v nejvyšší koncentraci, a naopak PhePYR v nejnižší. Dokonce v některých vzorcích plazmy a plné krve nebyl dokonce detegován, což může být reálné, protože fenylalanin se

hlavní katabolickou cestou hydroxyluje na tyrosin. PhePYR vzniká při transaminaci fenylalaninu, což je alternativní katabolická cesta odbourávání fenylalaninu.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zavést metodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vybraných 2-oxokyselin v biologických vzorcích. Hlavní náplní této práce byla vhodná příprava vzorků pro analýzu plynovou chromatografií a optimalizace separace derivátů vybraných 2-oxokyselin.

Nejvhodnějším derivatizačním činidlem pro derivatizaci oxoskupin 2-oxokyselin, i přes nevýhodu tvorby *syn*- a *anti*-isomerů derivátů, byl O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamin. Optimální koncentrace byla 5 mg/ml a teplota inkubace 37 °C. Pro derivatizaci karboxylové skupiny 2-oxokyselin byly nejvýhodnější silylační činidla, jelikož derivatizace je jednoduchá a rychlá. Naproti tomu derivatizace směsí methanolu a acetylchloridu či fluoridem boritým v 10% ethanolu je časově náročná.

Linearita metody pro všechny stanovované 2-oxokyseliny byla zachována v celém rozsahu testovaných koncentrací, avšak přesnost v sérii byla nedostatečná. Problém je zřejmě v extrakci derivátů 2-oxokyselin ethylacetátem, kdy se přidává k vzorkům chlorid sodný za účelem zlepšení extrakce derivátů, ovšem ta je díky tomu velmi variabilní.

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, zavedena na tomto pracovišti před několika lety, je více citlivá i selektivní, avšak byla zaměřena pouze na stanovení 2-oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem. To byl hlavní důvod, proč zavést metodu plynové chromatografii s hmotnostní detekcí, protože hmotnostním detektorem, na rozdíl od fluorescenčního, můžeme na základě hmotnostních spekter určit další 2-oxokyseliny, které se ve vzorcích lidské plazmy či plné krve nacházejí.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. LANGENBECK U., MÖHRING H. U., DIECKMAN P.: Gas chromatography of  $\alpha$ -keto acids as their o-trimethylsilyl quinoxalinol derivatives. *Journal of Chromatography A*, 115, 1975, 65–70.
2. The human metabolome database [online]. [cit. 2017-03-10]. Dostupné z <http://www.hmdb.ca/>.
3. FENDT S. M., BELL E. L., KEIBLER M. A. a kol.: Reductive glutamine metabolism is a function of the  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nature communications*, 14, 2013, 408–414.
4. KARLSON P., GEROK W., GROSS W.: Pathobiochemie. Praha: *Academia*, 1987, 47–121.
5. MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A. a kol.: Harperova biochemie. Praha: *H&H*, 2002, ISBN 80-7319-013-3, 160–353.
6. LAWRENCE R. G., SEAN C. T., ERIC B. T.: Regulation of pyruvate metabolism and human dinase. *Cellular and molecular life science*, 71, 2014, 2577–2604.
7. PATEL K. P., O'BRIEN T. W., SUBRAMONY S. H. a kol.: The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. *Mol Genet Metab*, 105, 2012, 34–43.
8. IMBARD A., BOUTRON A., VEQUAUD C. a kol.: Molecular characterization of 82 patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Mol Genet Metab*, 104, 2011, 507–516.
9. GUNNERSON K. J.: Lactic acidosis. *Medscape*, 16, 2011, 1–9.
10. MIZOCK B. A., FALK J. L.: Lactic acidosis in critical illness. *Crit Care Med*, 20, 1992, 80–93.
11. FERNANDES J., SAUDUBRAY J. M., BERGHE G. a kol.: Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch. Praha: *Triton*, 2008, ISBN 978-80-7387-096-6, 150–158.
12. DUNCKELMANN R. J., EBINGER F., SCHULZE A. a kol.: 2-Ketoglutarate dehydrogenase deficiency with intermittent 2-ketoglutaric aciduria. *Neuropediatrics*, 31, 2000, 35–38.

13. Online Mendelian Inheritance in Man [online]. [cit. 2017-03-31]. Dostupné z <https://www.omim.org/>.
14. PATEL M. S., GROVER W. D., AUERBACH V. H.: Pyruvate metabolism by homogenates of human brain: effects of phenylpyruvate and implications for the etiology of the mental retardation in phenylketonuria. *Journal of Neurochemistry*, 20, 1973, 289–296.
15. HONZÍK T.: Klinické příznaky dědičných metabolických poruch u dětí. *Pediatric pro praxi*, 12, 2011, 314–319.
16. MATOUŠ B. a kol.: Základy lékařské chemie a biochemie. Praha: Galén, 2010, ISBN 978-80-7262-702-8, 114–221.
17. VAN DER KNAAP M. S., VALK J.: Maple syrup urine disease. *Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders*, 40, 2005, 311–320.
18. STRAUSS K. A., PUFFENBERGER E. G., MORTON D. H.: Maple syrup urine disease, 18, 2013, 1–53.
19. CHUANG D.T., SHIH V. E.: Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 24, 2001, 1971–2006.
20. OLSON K. C., CHEN G., LYNCH C. J.: Quantification of branched-chain ketoacid in tissue by ultra fast liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 439, 2013, 116–122.
21. VOCKLEY J., ENSENAUER R.: Isovaleric acidemia: New aspects of genetic and phenotypic heterogeneity. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 142C, 2006, 95–103.
22. WANG X. L. a kol.: Hypervalinemia and hyperleucine-isoleucinemia caused by mutations in the branched-chain-amino-acid aminotransferase gene. *Journal of inherited metabolic disease*, 38, 2015, 855–861.
23. BROSNAN J. T., BROSNAN M. E.: Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *The Journal of nutrition*, 136, 2006, 207–211.
24. TAYLOR K. W., SMITH M. J. H.: 1:2-Diamino-4-nitrobenzene as a reagent for the detection and determination of alpha-keto acids in blood and urine. *Analyst*, 80, 1955, 607–613.
25. CAVALLINI D., FRONTALI N.: Quantitative determination of keto-acids by paper partition chromatography. *Biochemica et Biophysica Acta*, 13, 1954, 439–445 (abstrakt).

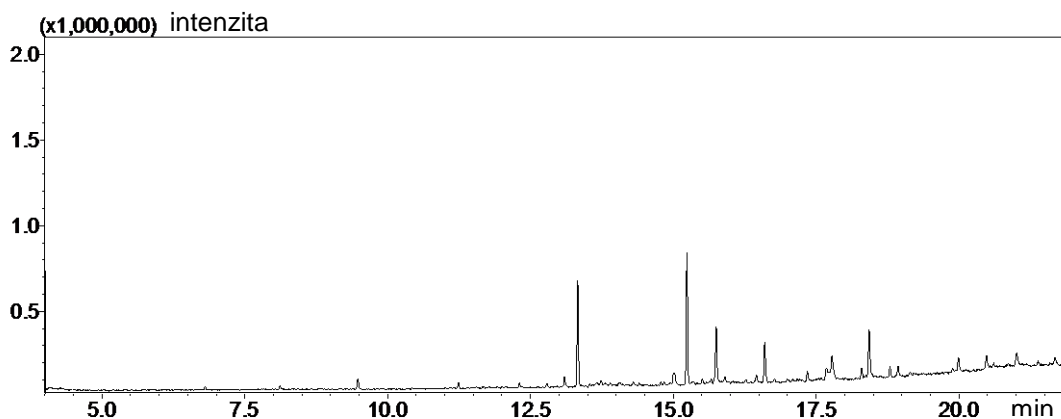
26. MAHAR K. P., ABBASI K. U., KHUHAWAR M. Y. a kol.: HPLC determination of  $\alpha$ -keto acids in human serum and urine after derivatization with 4-nitro-1,2-phenylenediamine. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.*, 14, 2013, 16–25.
27. GONZÁLEZ N. R., NEGÓN-MENDOZA A., ALBARRÁN G.: Analysis of keto acids as their methyl esters of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 587, 1991, 247–254.
28. KALLIO H.: Gas-liquid chromatographic analysis of 2,4-dinitrophenylhydrazones of keto acid methyl esters. *Journal of Chromatography B*, 76, 1973, 229–232.
29. HYASHI T., TODORIKI H., NARUSE H., TSUCHIYA H.: High-performance liquid chromatographic determination of  $\alpha$ -keto acids in plasma with fluorometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 273, 1983, 245–252.
30. HARA S., TAKEMORI Y., YAMAGUCHI M., NAKAMURA M.: Determination of  $\alpha$ -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 344, 1985, 33–39.
31. HAYASHI T., TODORIKI H., NARUSE H.: High-performance liquid chromatographic determination of  $\alpha$ -keto acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 224, 1981, 197–204.
32. WANG Z.J., ZAITSU K., OHKURA Y.: High-performance liquid chromatographic determination of  $\alpha$ -keto acids in human serum and urine using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a precolumn fluorescence derivatization reagent. *Journal of Chromatography*, 430, 1988, 223–331.
33. ORATA F.: Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *InTech*, 5, 2012, 83–108.
34. Reagents, Solvents and Accessories, *Thermo Scientific* [online]. [cit. 2017-02-27]. Dostupné z <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BR-20535-GC-LC-MS-Reagents-Solvents-Accessories-BR20535-EN.pdf>.
35. HALKET J. M., ZAIKIN V. G.: Derivatization in mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 9, 2003, 1–21.

36. WOOLF L. L., HABINOFF C., PERRY A.: Estimation of branched-chain  $\alpha$ -keto acids in blood by gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 231, 1982, 237–245.
37. MATSUKAWA T., HASEGAWA H., SHINOHARA Y. a kol.: Gas chromatographic–mass spectrometric determination of 2  $\alpha$ -ketoisocaproic acid and [ $^3$ H]  $\alpha$ -ketoisocaproic acid in plasma 7 after derivatization with N-phenyl-1,2-phenylenediamine. *Journal of Chromatography B*, 751, 2001, 213–220.
38. DETTMER-WILDE K., ENGEWALD W.: Practical gas chromatography. *Springer*, 2014, ISBN 9783642546396, 619.
39. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2017-02-27]. Dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com>.
40. KOBAYASHI K., FUKUI E., TANAKA M. a kol.: Gas chromatographic analysis of  $\alpha$ -keto acids in aqueous solutions theo-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) oximes of their methyl esters. *Journal of Chromatography*, 202, 1980, 93–98.
41. HOFFMANN G., SWEETMAN L.: O-(2,3,4,5,6-Pentafluorovenzyl) oxime-trimethylsilyl ester derivatives for quantitative gas chromatography and gas chromatographic-mass spectrometric studies of aldehydes, ketones and oxoacid. *Journal of Chromatography*, 421, 1987, 336–343.
42. SCHWARZ A., MODUN A., HEUSSER K. a kol.: Stable-isotope dilution GC-MS approach for nitrite quantification in human whole blood, erythrocytes, and plasma using pentafluorobenzyl bromide derivatization: Nitrite distribution in human blood. *Journal of Chromatography B*, 879, 2011, 1485–1495.
43. COOPER A. J. L., GINOS J. Z., MEISTER A.: Synthesis and properties of the  $\alpha$ -keto acids. *Chem. Rev.*, 83, 1983, 321–358.
44. TOKISHI H., HIRONORI T., HIROSHI N.: The stabilization of  $\alpha$ -keto acids in biological samples using hydrazide gel column treatment. *Clinica Chemica Acta*, 132, 1983, 321–325 (abstrakt).
45. FUCHS M., ENGEL J., CAMPOS M. a kol.: Intracellular alpha-keto acid quantification by fluorescence HPLC. *Amino Acids*, 36, 2009, 1–11 (abstrakt).
46. ALLEN C. F. H., RICHMOND J. H.: Some limitations of 2,4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for carbonyl groups. *The Journal of Organic Chemistry*, 02, 1937, 222–226.

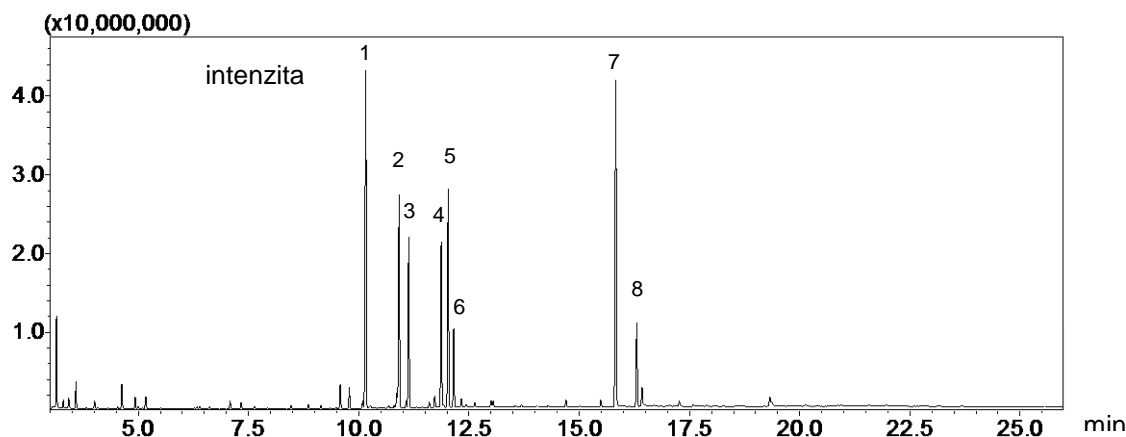
47. KORCHAZHKINA O., EXLEY C., SPENCERS.A.: Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography B*, 744, 2003, 353–362.
48. AppliChem [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z <https://www.applichem.com/home/>.
49. LEE S. H., KIM S. O., CHUNG B. C.: Gas chromatographic–mass spectrometric determination of urinary oxoacids using O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oxime-trimethylsilylester derivatization and cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, 719, 1998, 1–7.
50. MAMER O. A., MONTGOMERY J. A., TAGUCHI V. Y.: Origin of the two peaks for 2-keto-3-methylvaleric acid produced by the oximation of the keto acids occurring in maple syrup urine disease. *Journal of chromatography*, 182, 1980, 221–225.
51. MAJORS R. E.: Salting-out Liquid-Liquid Extraction. *LCGC*, 27, 2009, 526–533.
52. PAILLA K., BLONDE-CYNOBER F., AUSSEL C. a kol.: Branched-chain keto acids and pyruvate in blood: measurement by HPLC with fluorimetric detection and changes in older subjects. *Clinical Chemistry*, 46, 2000, 848–853.
53. QUERESHI G. A.: High performance liquid chromatographic methods with fluorescence detection for the determination of branched-chain amino acids and their alpha-keto analogues in plasma sample of healthy subject and ureamic patients. *Journal of chromatography*, 400, 1987, 91–99.
54. JIROŠOVÁ J.: Stanovení oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. Pardubice, 2008, Diplomová práce (Mgr.), Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd.



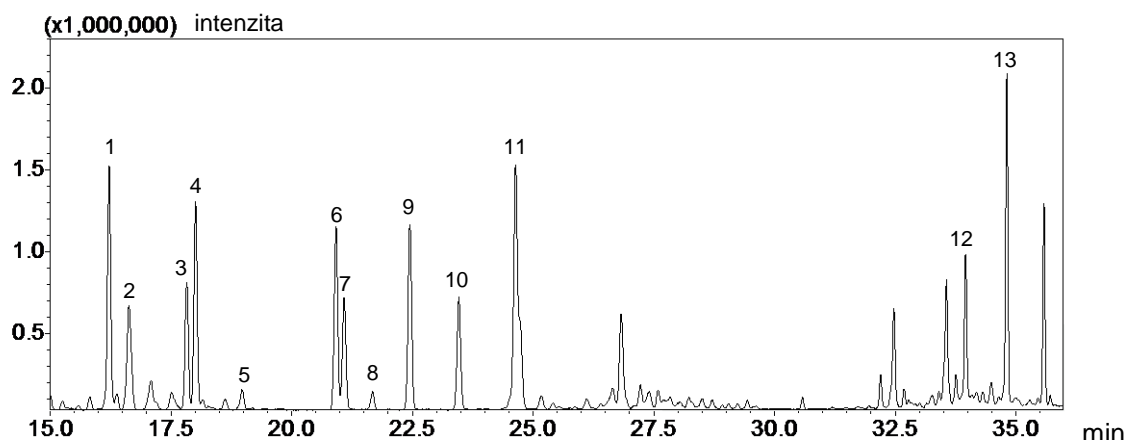
## 8 PŘÍLOHY



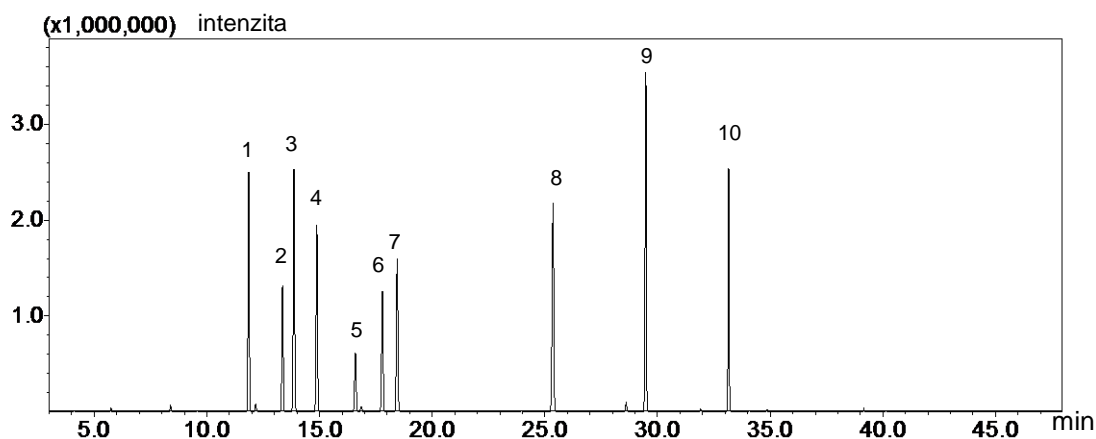
**Příloha 1:** Chromatografický záznam standardu pyruvátu po derivatizaci 50mmol/l 2,4-dinitrofenylhydrazinem a směsí methanolu s acetylchloridem. GC-MS podmínky: kolona HP-5 30,0 m, 0,32 mm,  $d_f$  0,25  $\mu$ m (Agilent, USA), teplota nástřiku 250°C, průtok mobilní fáze (He) 1,54 ml/min, lineární rychlost 45,6 cm/s, teplota iontového zdroje 200°C, teplota interface 250°C, sken od m/z 35 do m/z 415, rychlost skenování 2000.



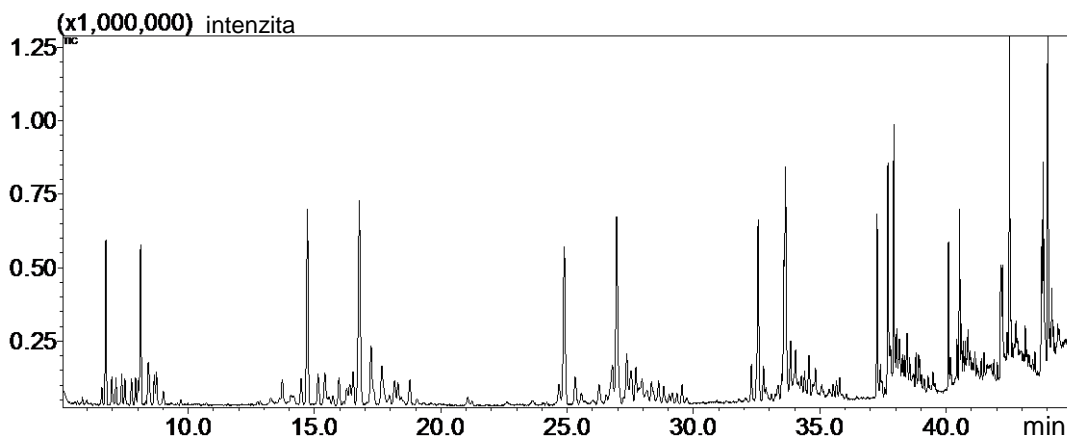
**Příloha 2:** Chromatografický záznam směsného roztoku standardů 2-oxokyselin po derivatizaci o-fenylendiaminem a N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem v 1% trimethylchlorosilanu. Píky: 1, derivát pyruvátu (10,16 min), 2, derivát 2-oxobutyrátu (10,91 min), 3, derivát 2-oxoisovalerátu (11,13 min), 4, derivát 2-oxo-3-methylvalerátu (11,87 min), 5, derivát 2-oxoisokapronátu (12,03 min), 6, derivát oxalacetátu (12,16 min), 7, derivát 2-oxoglutarátu (15,83 min), 8, derivát fenylypyruvátu (16,30 min). GC-MS podmínky: kolona HP-5 30,0 m, 0,32 mm,  $d_f$  0,25  $\mu$ m (Agilent, USA), teplota nástřiku 300 °C, průtok mobilní fáze (He) 1,39 ml/min, lineární rychlost 45,6 cm/s, teplota iontového zdroje 200°C, teplota interface 300°C, start monitorování MS 3 min, konec monitorování MS 25 min, sken od m/z 10 do m/z 650, rychlost skenování 3333.



**Příloha 3:** Chromatografický záznam směsného roztoku standardů 2-oxokyselin (standard S6) po derivatizaci *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem a *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidem. Píky: 1, derivát pyruvátu (16,23 min), 2, první isomer derivátu 2-oxobutyrátu (16,68 min), 3, první isomer derivátu 2-oxoisovalerátu (17,83 min), 4, druhý isomer derivátu 2-oxobutyrátu (18,01 min), 5, druhý isomer derivátu 2-oxoisovalerátu (18,98 min), 6, první isomer derivátu 2-oxo-3-methylvalerátu (20,92 min), 7, druhý isomer derivátu 2-oxo-3-methylvalerátu (21,09 min), 8, první isomer derivátu 2-oxoisokapronátu (21,67 min), 9, druhý isomer derivátu 2-oxoisokapronátu (22,44 min), 10, první isomer derivátu 2-oxokapronátu (23,46 min), 11, druhý isomer derivátu 2-oxokapronátu (24,63 min), 12, derivát 2-oxoglutarátu (34,42 min), 13, derivát fenyropyruvátu (34,81 min). GC-MS podmínky: viz příloha 2, jen SIM mód (*m/z* 73 a 181).



**Příloha 4:** Chromatografický záznam směsného roztoku standardů 2-oxokyselin (standard S6) po derivatizaci O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem a methanolem s acetylchloridem. Píky: 1, derivát pyruvátu (11,78 min), 2, první isomer derivátu 2-oxoisovalerátu (13,28 min), 3, derivát 2-oxobutyrátu (13,79 min), 4, druhý isomer derivátu 2-oxoisovalerátu (14,80 min), 5, první isomer derivátu 2-oxo-3-methylvalerátu (16,50 min), 6, druhý isomer derivátu 2-oxo-3-methylvalerátu (17,71 min), 7, derivát 2-oxoisokapronátu (18,37 min), 8, derivát oxalacetátu (25,30 min), 9, derivát 2-oxoglutarátu (29,44 min), 10, derivát fenylpyruvátu (33,12 min). GC-MS podmínky: viz příloha 2, jen SIM mód ( $m/z$  73 a 181).



**Příloha 5:** Chromatografický záznam nulového standardu po derivatizaci O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminem a N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem a extrakci derivátu do diethyletheru. Chromatografické podmínky: viz příloha 2, jen sken  $m/z$  od 10 do  $m/z$  650.