

Příloha 1.

STANOVENÍ KYSELINY MOČOVÉ V KREVNÍM SÉRU MEKC

Kyselina močová je konečným produktem metabolismu purinů, z čehož plyne diagnostický význam jejího stanovení v krevním séru. Pro stanovení kyseliny močové v krevním séru byla použita metoda kapilární zónové elektroforézy CZE, a to jedna z jejích modifikací - micelární elektrokinetická chromatografie. Vzorky krevního séra byly před vlastní analýzou deproteinovány.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

200 μ l krevního sera bylo smícháno se 400 μ l acetonitrilu, protřepáno a vyprecipitované bílkoviny byly odstraněny 10 minutovou centrifugací při 12 000 ot. za minutu a teplotě 4 °C. Získané supernatanty byly převedeny do vzorkových nádobek a přímo použity k analýze.

KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

Kapilární zónová elektroforéza byla prováděna na zařízení HP ^{3D} CE firmy Hewlett Packard. Toto zařízení je vybaveno spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem pro rozsah 190 - 600 nm, zdrojem napětí obojí polarity do 30 kV, autosamplerem pro 48 vzorků, temperací kapiláry i vzorkového prostoru, elektrokinetickým a hydrodynamickým tlakovým dávkováním a vyhodnocovací jednotkou vybavenou softwarem ChemStation na počítači VECTRA VL5.

Separace byly prováděny v 50 μ m křemenné kapiláře o délce 64.5 cm (efektivní délka 56 cm). Kapilára byla termostatována na 30 °C. Jako základní elektrolyt byl použit 20 mM fosfát 20 mM tetraboritan pH 8.8 obsahující 50 mM SDS a 5 % methanol. Pro zvýšení reprodukovatelnosti analýz byla kapilára promývána před každou sadou analýz 10 minut 0.1 M NaOH, 10 minut deionizovanou vodou a 15 minut základním elektrolytem, před každou analýzou pak byla promývána 1 minutu 0.1 M NaOH, 1 minutu deionizovanou vodou a 3 minuty základním elektrolytem, po analýze 1 minutu deionizovanou vodou. Vzorky byly uchovávány při pokojové teplotě a dávkovány tlakem 50 mbarů po dobu 6 sekund. Detekce byla prováděna při vlnové délce absorpčních maxim kyseliny močové 200 a 295nm. Separace probíhaly při konstantním napětí 28 kV pozitivní polaritě.

Všechny roztoky byly připravovány z 18 M Ω deionizované vody získané systémem Milli Q firmy Millipore, použité chemikálie byly p.a. čistoty firmy Sigma.

VYHODNOCENÍ ANALÝZ

Pro kvantitativní analýzu byla použita metoda vnějšího standardu. Zařízení bylo před každou sadou měření kalibrováno na dva standardy kyseliny močové 75 a 250 μM . Standardy byly připravovány identickým způsobem jako vzorky, t.j. ředěny acetonitrilem v poměru 1 : 2. Každý standard byl analyzován 3 x.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány 2x. Identifikace kyseliny močové byla prováděna na základě srovnání migračních časů standardů a na základě srovnání spekter analyzovaných látek a spektra standardu uloženého ve spektrální knihovně získané pomocí detektoru vybaveného diodovým polem.