

## ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ TOXICKÉHO INDOXYL SULFÁTU V BIOLOGICKÉ MATRICI

LENKA PORTYCHOVÁ<sup>a,b</sup>, KAROLÍNA ŠTOCHLOVÁ<sup>a</sup>, RADOMÍR HYŠPLER<sup>c</sup> a ZORA NÝVLTOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Výzkumný ústav organických syntéz, a.s., č.p. 296, 533 54 Rybitví, <sup>b</sup> Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, <sup>c</sup> Centrum pro výzkum a vývoj Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
lenka.portychova@vuos.com

Došlo 13.1.20, přijato 28.4.20.

Klíčová slova: indoxyl sulfát, HPLC, elektrochemická detekce, uremický toxin, moč, krevní sérum

### Úvod

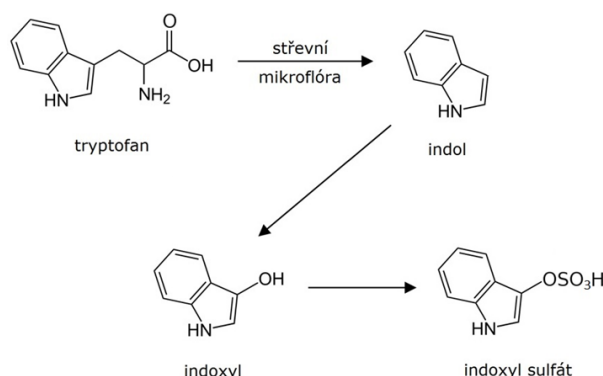
Sloučenina indoxyl sulfát (IS) je metabolitem tryptofanu, aminokyseliny nepostradatelné pro lidský organismus. Metabolismus tryptofanu v těle probíhá dvěma hlavními cestami. Jednou cestou vzniká meziprodukt kynurenin, který je dále metabolizován např. na aminokyselinu alanin, vitamin nikotinamid nebo na vybrané neurotransmitery – kyselinu kynureovou, kynuramin, chinolinát a další. Druhou cestou vzniká velmi důležitý neurotransmitter serotonin. Tryptofan přijatý stravou se ve střevě nedokáže dostatečně vstřebat, a je tudíž rozkládán střevními bakteriemi na indol, z něhož po hydroxylaci a sulfatizaci v játrech vzniká uremický toxin IS (obr. 1). Tato toxická látka je ve zdravém fungujícím organismu vychytávána ledvinami a odváděna z těla močí – mechanismem tubulární sekrece<sup>1–3</sup>.

Ve vzorcích moči nebo krve, resp. krevního séra, zdravých osob lze detekovat nízké hladiny IS – v moči většinou nejvýše 30 mg l<sup>-1</sup>, v séru je tato hodnota pětikrát až šestkrát nižší. Vyšší hladiny této látky jsou obvykle způsobeny střevní dysbiózou, mohou však značit i jiné komplikace, nádory tlustého střeva s poruchou pasáže nevyjímaje. Vyšší množství IS v krvi většinou souvisí se selháváním ledvin. Tento toxin je již několik let studován právě v souvislosti s chronickým onemocněním ledvin. IS podněcuje renální fibrotizaci, zmnožení vazivové tkáně. Pacienti s nefunkčními ledvinami vždy vykazují zvýšené hodnoty tohoto toxinu, 10–80krát vyšší oproti běžné koncentraci, jelikož klasickou dialýzou (hemodialýzou či peritoneální dialýzou) je obtížně odstranitelný kvůli jeho silné vaznosti k proteinům, zejména albuminu. Z důvodu vaznosti na bílkoviny lze množství IS v krvi částečně ovlivnit složením přijímané potravy. I osoby s plně funkčními led-

vinami vykazují vyšší hodnoty IS v krvi, obsahuje-li jejich strava více proteinů<sup>1–8</sup>.

Mnohé studie poukazují na to, že vyšší koncentrace IS v krvi mají mimo střevní dysbiózu a chronické onemocnění ledvin souvislost i s kardiovaskulárními nemocemi a srdečními příhodami, malabsorpčním syndromem (porucha trávení a vstřebávání základních živin), intolerancí glukosy, reakcí štěpu proti hostiteli po transplantaci krvetvorných kmenových buněk, poruchou kostního metabolismu, ale i s poruchami centrálního nervového systému, např. Parkinsonovou chorobou. IS navíc vyvolává oxidační stres a snižuje množství glutathionu, látky detoxifikující xenobiotika<sup>2,9–14</sup>. Je tedy nezbytné, zejména u rizikových pacientů, monitorovat množství IS v organismu.

Orientační stanovení IS v moči je běžně prováděno pomocí Obermeyerova testu, který cílí na odhalení střevní dysbiózy a toxémie. Analytická stanovení jsou optimálně prováděna rovněž ve vzorcích moči kvůli snadnosti odběru této biologické matrice. U pacientů, kteří už moč kvůli onemocnění ledvin neprodukují, je nutné k analýze IS odebrat krev. Po separaci látek obsažených v biologické matrici, obvykle pomocí HPLC, je dle literatury<sup>1,15–17</sup> IS možné stanovit s využitím spektrofotometrického detektoru, elektrochemického detektoru (ED), odpařovacího detektoru rozptylu světla (ELSD) či pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Mez detekce (*LOD*) IS se u spektrofotometrických detektorů a ELSD pohybuje na úrovni jednotek, případně desetin mg l<sup>-1</sup>, u ED na úrovni desetin až setin mg l<sup>-1</sup> a u MS ještě cca o řád níže. Na našem pracovišti jsme zvolili ED z důvodu jeho vysoké selektivity, dostačující citlivosti a současně nižších ekonomických nákladů v porovnání s MS. Použitou pracovní elektrodou ED byl porézní grafit. Elektrody s různými modifikacemi uhlíku (skelný uhlík, grafen, porézní grafit) jsou výrazně upřednostňovány pro stanovení IS i ostatními autory<sup>15,16,18,19</sup>.



Obr. 1. Metabolismus tryptofanu v trávicím traktu

## Experimentální část

### Přístrojové vybavení

V rámci popsaných experimentů byly využity analytické váhy XS205DU (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA), ultrazvuková lázeň Sonorex Super RK 510 (Bandelin Electronic, Berlín, Německo), systém na úpravu vody IWA 20iol (WATEK, Ledec nad Sázavou, ČR), pH metr WTW 538 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo) s elektrodou BlueLine 28 pH (Schott, Mainz, Německo) a chlazená centrifuga Sigma 3-16 KL (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Německo).

K separaci a následné detekci byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC) UltiMate 3000 Series s elektrochemickým detektorem (ED) ECD-3000RS s coulometrickým senzorem 6011RS (porézní grafitová pracovní elektroda; palladiová referenční elektroda) a detektorem diodového pole (DAD) DAD-3000RS (celá HPLC/ED-DAD sestava od Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### Používané chemikálie a standardy

Pro potřeby optimalizace a validace metod stanovení IS byla používána draselná sůl indoxyl sulfátu (čistota  $\geq 98\%$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a kreatinin (amid *N*-methylguanidinové kyseliny, čistota  $\geq 98\%$ ; Sigma-Aldrich). K přípravě vzorků a roztoků pro chromatografickou analýzu byl využíván methanol (čistota  $\geq 99,9\%$ ; Sigma-Aldrich), EDTA (čistota  $99\%$  p.a.; Sigma-Aldrich), dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (čistota  $99\%$  p.a.; Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (čistota  $98\%$  p.a.; Lach-Ner, Neratovice, ČR), kyselina octová (čistota  $99\%$  p.a.; Lach-Ner), monohydrát 1-oktansulfonátu sodného (čistota  $99\%$  p.a.; Sigma-Aldrich), kyselina pikrová (čistota  $\geq 98\%$ ; Sigma-Aldrich) a kyselina chloristá (čistota  $70\%$ ; Sigma-Aldrich).

### Stanovení indoxyl sulfátu v moči

#### Příprava roztoků

Kalibrační řada IS byla připravena fortifikací směsné moči kalibračními roztoky IS připravenými v  $0,2\text{ mol l}^{-1}$  kyselině octové v koncentračním rozmezí  $1\text{--}85\text{ mg l}^{-1}$ . Konečné výsledky stanovení IS ve vzorcích moči byly vztahovány na množství přítomného kreatininu. To bylo vypočteno pomocí kalibrační řady kreatininu v ultračisté vodě.

Mobilní fáze (MF) používaná pro chromatografické stanovení byla složena z methanolu (MF B) a fosfátového pufru (MF A) obsahujícího  $7\text{ g}$  monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného,  $0,30\text{ g}$  iontově párového činidla monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a  $0,05\text{ g}$  EDTA v  $1000\text{ ml}$  vodného roztoku. Hodnota pH pufru byla upravena na  $7,3$  pomocí  $1\text{ mol l}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného.

#### Příprava vzorku moči k analýze (Jaffého reakce)

Pro vlastní analytické stanovení byly odebrány  $2\text{ ml}$  přefiltrované lidské moči (bez přídavku či s přídavkem IS), smíseny s  $1\text{ ml}$   $1\text{ mol l}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného a následně s  $1\text{ ml}$  nasyceného roztoku kyseliny pikrové. Po proběhnutí Jaffého reakce (cca  $10\text{ min}$ ) byl získaný červeně zbarvený roztok kreatinin-pikrátu obsahující též IS analyzován metodou HPLC/ED-DAD.

#### Analytické podmínky stanovení

Separace látek obsažených ve vzorcích moči byla prováděna na chromatografické koloně Zorbax SB-C18  $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$  (Agilent, Santa Clara, CA, USA), skrz kterou protékala MF ve složení  $95\%$  MF A a  $5\%$  MF B rychlostí  $0,4\text{ ml min}^{-1}$ . V rámci spektrofotometrické detekce byla sledována vlnová délka  $500\text{ nm}$  (pro stanovení kreatininu). Pro detekci IS bylo na porézní grafitovou pracovní elektrodu vloženo konstantní napětí  $+400\text{ mV}$  (vůči palladiové referenční elektrodě).

### Stanovení indoxyl sulfátu v krevním séru

#### Příprava roztoků

Kalibrační řada IS byla připravena fortifikací směsného séra kalibračními roztoky IS připravenými v ultračisté vodě v koncentračním rozmezí  $10\text{--}110\text{ mg l}^{-1}$ .

MF používaná pro chromatografické stanovení byla složena z methanolu (MF B) a fosfátového pufru (MF A) obsahujícího  $3,5\text{ g}$  monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného,  $0,15\text{ g}$  monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a  $0,03\text{ g}$  EDTA v  $1000\text{ ml}$  vodného roztoku.

#### Příprava vzorku krevního séra k analýze

K  $350\text{ }\mu\text{l}$  séra bylo přidáno  $350\text{ }\mu\text{l}$  ultračisté vody a  $700\text{ }\mu\text{l}$   $7\%$  kyseliny chloristé. Po pěti minutách byly vzorky na dalších deset minut umístěny do centrifugy chlazené na  $4\text{ }^\circ\text{C}$  s relativní centrifugační silou nastavenou na  $10\text{ }000\text{ g}$ . Získaný roztok oddělený od bílkovinné sraženiny byl analyzován metodou HPLC/ED.

#### Analytické podmínky stanovení

Separace látek obsažených ve vzorcích krevního séra byla prováděna na chromatografické koloně Kinetex XB-C18  $100\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$  s předkolonou HPLC C18  $4,6\text{ mm ID Column}$  (obě Phenomenex, Torrance, CA, USA), skrz kterou protékala MF ve složení  $85\%$  MF A a  $15\%$  MF B rychlostí  $0,3\text{ ml min}^{-1}$ . Na coulometrickou celu elektrochemického detektoru bylo vloženo napětí  $+400\text{ mV}$  (vůči palladiové referenční elektrodě).

## Výsledky a diskuse

### Stanovení indoxyl sulfátu v moči

#### Zpracování vzorků

K analýze moči je obecně často používán její dvacetitýřhodinový sběr. Je-li sledovaná látka stanovována

v jednorázově odebraném vzorku moči, je vhodné výslednou koncentraci této látky vztáhnout na množství přítomného kreatininu z důvodu různé zředěnosti moči. Množství kreatininu v této biologické matrici je pro každého člověka specifické v závislosti na jeho zdravotním stavu, fyzické kondici a množství svalové hmoty. U jednotlivce tak změny v koncentraci kreatininu odráží zejména rozdílný příjem tekutin během dne, a tedy rozdílné zakonzentrování sloučenin přítomných ve vzorku moči.

Na základě našich poznatků je na rozdíl od IS možné stanovit množství kreatininu v moči jednoduše pomocí parametrů rovnice přímky změřené kalibrační řady standardu kreatininu v ultračisté vodě. Před analýzou byly tyto kalibrační roztoky i testované vzorky moči podrobeny snadno proveditelné a rychlé Jaffého reakci<sup>20</sup>, kdy kreatinin reaguje s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Vzniklý červeně zbarvený kreatinin-pikrát byl detekován spektrofotometricky.

Naproti tomu spektrofotometrické stanovení IS by bylo problematické z důvodu nutnosti přidavku vybraných činidel (Obermayerovo činidlo, thymol, *p*-dimethylaminobenzaldehyd a další)<sup>21</sup>, což by pravděpodobně ovlivnilo stanovení kreatinin-pikrátu. Proto byla použita elektrochemická detekce, pomocí které lze IS stanovovat přímo v neupravených vzorcích moči i ve vzorcích po Jaffého reakci.

#### Optimalizace HPLC/ED-DAD metody

V počátcích vývoje byla testována kolona Kinetex XB-C18 100 mm × 4,6 mm × 5 μm, která se nám již dříve osvědčila pro separaci složek v biologické matrici. První měření však ukázala, že by bylo vhodnější vyměnit ji za delší kolonu C18. Byla zvolena Zorbax SB-C18 s rozměry 250 mm × 4,6 mm × 5 μm.

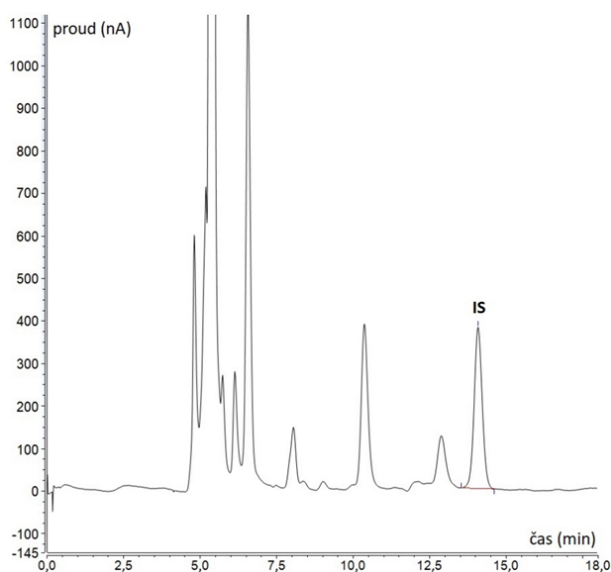
Dalším důležitým krokem bylo pro tuto kolonu a celý systém zvolit optimální složení MF. Pro ED je vhodné použít pufrované prostředí. Pro první pokusy byl zvolen běžně používaný fosfátový pufr složený z vodného roztoku monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, který se osvědčil. Hodnota pH pufru byla upravena na optimálních 7,3 pomocí hydroxidu sodného. Tato hodnota pH byla zvolena s ohledem na optimální odezvu a separaci IS. Při elektrochemické detekci je vhodné do MF přidat EDTA pro odstranění stop těžkých kovů a zvýšení citlivosti detekce. Další složkou MF je iontově párové činidlo. Díky podpoření tvorby iontových párů s nabitými analyty byla při separaci IS výrazně zvýšena selektivita. Poslední složkou je organická fáze, methanol. Množství methanolu a iontově párového činidla bylo společně s rychlostí průtoku MF kolonou sledováno a byl vyhodnocován vliv těchto změn na separaci IS.

Výhodou použitého HPLC/ED-DAD systému je možnost spektrofotometrické i elektrochemické detekce sloučenin v jediné analýze vzorku moči. Pro detekci kreatininu, resp. kreatinin-pikrátu, ve vzorcích byla zvolena spektrofotometrie a optimální vlnovou délkou byla zvolena hodnota 500 nm na základě proměření celého spektra pomocí DAD. IS byl ve vzorcích detekován pomocí ED a optimální hodnota vloženého napětí na coulometrickou

celu byla stanovena voltametrií s lineárním nárůstem potenciálu na základě vyhodnocení voltametrické křivky IS (závislost proudu vyvolaného elektrochemickou přeměnou IS na elektrodě na potenciálu této elektrody) v rozmezí –300 až +600 mV na hodnotu +400 mV. Ukázka chromatogramu je uvedena na obr. 2. Je znázorněna eluční křivka IS, ostatní píky pocházejí pravděpodobně z matrice moči, nicméně nebyly blíže identifikovány.

#### Validace metody

Po dokončení optimalizace byla provedena validace metody stanovení IS v moči, přičemž každý výsledek byl vztážen k množství přítomného kreatininu. Opakovatelnost měření, opakovatelnost analytické metody i její správnost byly určovány pro fyziologickou i patologickou hladinu IS. Opakovatelnost měření je pro obě hladiny 4,9 %. Opakovatelnost metody je 8,0 % pro fyziologickou hladinu a 4,6 % pro patologickou. Správnost metody byla vyhodnocena na základě výtěžnosti ze vzorků připravených pro určení opakovatelnosti metody. Pro fyziologické koncentrace vycházela výtěžnost 101,5 %, pro patologické 99,7 %. Korelační koeficient linearity v analyzovaném koncentračním rozmezí 1–85 mg l<sup>-1</sup> je 0,9942 (rovnice vyjadřující vztah mezi poměrem ploch IS a kreatininu a poměrem koncentrací IS a kreatininu:  $A = 0,024 c + 0,151$ ). Hodnota LOD pro stanovení IS v moči je 0,014



Obr. 2. Chromatografický záznam stanovení indoxyl sulfátu (IS) v moči; kolona Zorbax SB-C18 250 mm × 4,6 mm × 5 μm (Agilent); mobilní fázi A (95 %) byl fosfátový pufr o pH 7,3 (obsahující v 1000 ml 7 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,30 g monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a 0,05 g EDTA), mobilní fázi B (5 %) byl methanol; průtok mobilní fáze 0,4 ml min<sup>-1</sup>; přístroj HPLC UltiMate 3000 Series (Thermo Fisher Scientific) s detektorem diodového pole DAD-3000RS a elektrochemickým detektorem ECD-3000RS obsahujícím celu 6011RS s vloženým napětím +400 mV (porézni grafitová pracovní elektroda; palladiová referenční elektroda)

$\text{mg l}^{-1}$  a hodnota meze stanovitelnosti ( $LOQ$ ) je  $0,021 \text{ mg l}^{-1}$ . Obě tyto hodnoty byly vypočteny z kalibrační přímky pomocí statistického programu QC Expert. Robustnost metody byla testována vůči čtyřem faktorům. Konkrétně vůči změně objemu dávkovaného množství vzorku, změně rychlosti průtoku MF, změně teploty na chromatografické koloně a změně detekčního potenciálu. Byla prokázána vysoká robustnost prezentované metody vůči všem testovaným faktorům. Popsaná validovaná metoda byla následně v našem výzkumném ústavu akreditována Českým institutem pro akreditaci (ČIA) pod názvem Stanovení močového indikatu a kreatininu pomocí UHPLC/ECD-DAD.

#### Analýza reálných vzorků

Vyvinutou metodou byly analyzovány vzorky ranní moči 19 zdravých dobrovolníků a byl sledován vztah mezi množstvím přijatých bílkovin ve stravě a hladinou IS v moči. Osoby s vyšším příjmem proteinů vylučovaly větší množství tohoto toxinu než osoby s nízkoproteinovou stravou.

Pro určení hladiny IS u pacientů s poškozenými ledvinami, kteří už nevylučují žádnou moč či minimální množství, bylo nutné vyvinout a validovat metodu stanovení IS v krvi, konkrétně krevním séru, které jsme měli k dispozici od pacientů docházejících na dialýzu do Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK).

#### Stanovení indoxyl sulfátu v krevním séru

##### Zpracování vzorků

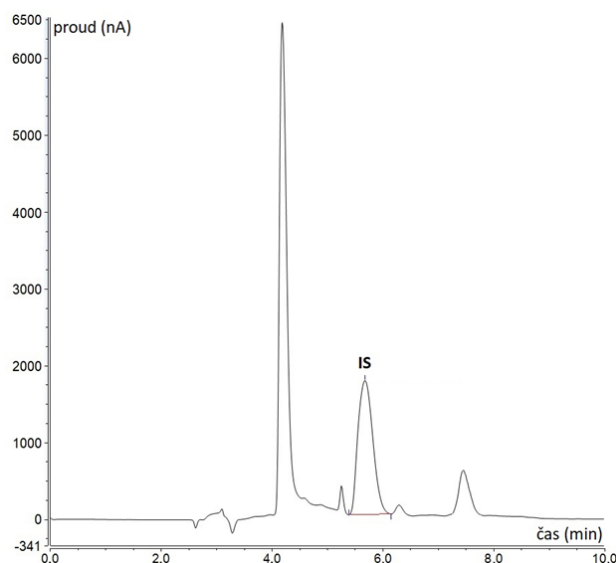
Ze vzorků krve, krevní plazmy či krevního séra je žádoucí před analýzou odstranit bílkoviny pro zvýšení selektivity i citlivosti a zároveň uvolnit IS z vazby na albumin. K tomuto účelu jsme zvolili roztok kyseliny chloristé a následnou centrifugaci.

##### Optimalizace HPLC/ED metody

Ke stanovení IS v krevním séru byla zvolena kolona Kinetex XB-C18  $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ . Při volbě vhodného složení MF jsme vycházeli z MF použité pro stanovení IS v moči, kterou jsme optimalizovali. Hodnotu pH pufru bylo vhodnější neupravovat a ponechat na 4,2. Koncentrace methanolu byla navýšena, množství iontové párové činidla naopak sníženo – viz kapitola Experimentální část. Ukázka chromatogramu je uvedena na obr. 3. Je znázorněna eluční křivka IS, ostatní píky pocházejí pravděpodobně z matrice séra, nicméně nebyly blíže identifikovány.

##### Validace metody

Po dokončení optimalizace byla provedena validace metody stanovení IS v krevním séru. Opakovatelnost měření je 2,4 % pro fyziologickou hladinu IS a 0,7 % pro patologickou. Opakovatelnost analytické metody je 1,8 % na fyziologické hladině, 0,7 % na patologické. Správnost metody byla vyhodnocena na základě výtěžnosti. Pro fyziologické koncentrace je 96,3 %, pro patologické 97,1 %. Průběh křivky kalibrační řady v séru v koncentračním rozmezí  $1\text{--}110 \text{ mg l}^{-1}$  nebyl lineární, nýbrž kvadratický



Obr. 3. Chromatografický záznam stanovení indoxyl sulfátu (IS) v krevním séru; kolona Kinetex XB-C18  $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$  s předkolonou HPLC C18  $4,6 \text{ mm ID Column}$  (Phenomenex); mobilní fáze A (85 %) byl fosfátový pufr o pH 4,2 (obsahující v 1000 ml 3,5 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, 0,15 g monohydrátu 1-oktansulfonátu sodného a 0,03 g EDTA), mobilní fáze B (15 %) byl methanol; průtok mobilní fáze  $0,3 \text{ ml min}^{-1}$ ; přístroj HPLC UltiMate 3000 Series (Thermo Fisher Scientific) s elektrochemickým detektorem ECD-3000RS obsahujícím celu 6011RS s vloženým napětím  $+400 \text{ mV}$  (porézni grafitová pracovní elektroda; palladiová referenční elektroda)

(rovnice  $A_{IS} (\text{nA min}) = -0,034 (c (\text{mg l}^{-1}))^2 + 9,498 c (\text{mg l}^{-1}) + 13,085$ ). Korelační koeficient v analyzovaném koncentračním rozmezí je 0,9993.  $LOD$  pro stanovení IS v séru je  $0,37 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $LOQ$  je  $0,56 \text{ mg l}^{-1}$  dle výpočtů programu QC Expert. Byla prokázána též vysoká robustnost metody stejným postupem jako pro metodu stanovení IS v moči. Popsaná validovaná metoda byla následně v našem výzkumném ústavu akreditována ČIA pod názvem Stanovení indikatu pomocí UHPLC/ECD-DAD.

##### Analýza reálných vzorků

Popsanou HPLC/ED metodou byly analyzovány směsné vzorky séra zdravých osob a vzorky séra dvanácti pacientů FN HK odebrané před dialýzou a následně po ní. Ve vzorcích zdravých osob bylo stanoveno množství IS  $2,38 \pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$ . Koncentrace ve vzorcích od pacientů jsou uvedeny v tab. I. Dialyzovaní pacienti mají natrvalo zavedený tepennožilní zkrat či katetr, díky čemuž není odebrání jejich krve problematické. Odběr před dialýzou je pacientům prováděn standardně, aby mohla být tato léčebná metoda dle vybraných faktorů v krvi správně nastavena. Po dialýze byla krev odebrána znovu z důvodu vyhodnocení účinnosti zvoleného nastavení léčebné metody. Ve většině případů nedošlo ke snížení koncentrace toxinu IS ani na polovinu, v některých zůstala koncentrace stejná či

Tabulka I

Koncentrace indoxyl sulfátu v krevním séru stanovená u vybraných pacientů před a po dialýze pomocí vyvinuté metody na přístroji HPLC/ED

Pacient č.	Před dialýzou [mg l <sup>-1</sup> ]	Po dialýze [mg l <sup>-1</sup> ]	Pacient č.	Před dialýzou [mg l <sup>-1</sup> ]	Po dialýze [mg l <sup>-1</sup> ]
1	58,9±0,5	45,7±0,4	7	42,2±0,2	36,6±0,2
	53,4±0,4	29,2±0,1		33,2±0,2	58,2±0,3
	37,5±0,4	38,2±0,4		28,1±0,1	26,1±0,3
	53,2±0,3	34,1±0,5		57,6±0,7	23,0±0,1
2	43,9±0,5	29,4±0,2	8	28,1±0,4	10,3±0,1
	36,0±0,3	37,2±0,3		33,3±0,5	33,6±0,3
	42,3±0,4	38,1±0,3		35,4±0,4	27,4±0,1
	46,2±0,6	17,9±0,1		49,1±0,2	26,5±0,1
3	82,9±0,7	44,7±0,6	9	35,5±0,5	61,7±0,4
	61,7±0,5	55,2±0,4		26,4±0,5	30,4±0,2
	69,2±0,9	49,4±0,7		25,0±0,3	23,4±0,3
	79,9±0,7	42,2±0,6		30,3±0,1	20,6±0,4
4	34,6±0,2	24,1±0,3	10	95,0±0,7	22,8±0,5
	29,4±0,1	25,5±0,2		91,3±1,1	99,4±1,4
	26,9±0,3	21,8±0,1		87,4±1,0	75,1±0,9
	45,7±0,5	24,4±0,2		90,4±0,6	57,2±0,3
5	48,9±0,3	13,7±0,3	11	55,8±0,7	11,6±0,1
	47,7±0,3	50,5±0,4		40,1±0,6	32,9±0,4
	43,1±0,2	30,1±0,1		34,0±0,3	24,8±0,5
	59,3±0,5	37,9±0,3		44,4±0,3	19,7±0,1
6	52,8±0,4	50,5±0,4	12	34,9±0,6	32,2±0,2
	49,9±0,2	55,1±0,3		33,4±0,2	33,6±0,1
	44,9±0,4	41,9±0,2		36,2±0,3	29,9±0,4
	57,6±0,3	35,3±0,1		34,1±0,3	24,5±0,3

byla dokonce ještě vyšší po dialýze než před ní z důvodu zvýšení koncentrace bílkovin ve vzorku oddialyzovaným nadbytečné vody z těla pacientů.

## Závěr

V rámci předložené studie byly validovány a následně akreditovány metody stanovení indoxyl sulfátu v moči a krevním séru. Moč je před analýzou upravena rychlou Jaffého reakcí, ze séra jsou odstraněny bílkoviny jednoduchým postupem precipitace. Pomocí validovaných metod lze v obou biologických matricích stanovit hladinu IS v relativně krátkém čase s dostačující přesností i správností, a sledovat tak změny koncentrace tohoto toxinu v lidském organismu. Díky tomu je možné nadále hledat způsoby, jak z těla účinně odstranit tento nebezpečný toxin, který způsobuje vážné zdravotní komplikace a zhoršuje zdravotní stav pacientů.

## LITERATURA

- Filik H., Kilcan D.: *J. Anal. Chem.* 69, 255 (2014).
- Niwa T.: *Nagoya J. Med. Sci.* 72, 1 (2010).
- Matouš B.: *Základy lékařské chemie a biochemie*. Galén, Praha 2010.
- Leong S. C., Sirich T. L.: *Toxins* 8, 358 (2016).
- Hyšpler R., Tichá A., Šafránek R., Moučka P., Nývltová Z., Štochlová K., Dusilová-Sulková S., Zadák Z.: *Dis. Markers* 2018, 3985861.
- Marzocco S., Dal Piaz F., Di Micco L., Torraca S., Sirico M. L., Tartaglia D., Autore G., Di Iorio B.: *Blood Purif.* 35, 196 (2013).
- Niwa T., v knize: *Uremic Toxins* (Niwa T., ed.), kap. 4, str. 53. J. Wiley, Hoboken 2012.
- Makrlíková A., Berek J., Vyskočil V., Navrátil T.: *Chem. Listy* 112, 605 (2018).
- Yoshikawa D., Ishii H., Suzuki S., Takeshita K., Kumagai S., Hayashi M., Niwa T., Izawa H., Murohara T.: *Circ. J.* 78, 2477 (2014).

10. Zhang L. S., Davies S. S.: *Genome Med.* 8, 46 (2016).
11. Cassani E. a 10 spoluautorů: *Parkinsonism Relat. Disord.* 21, 389 (2015).
12. Poesen R., Meijers B., Evenepoel P.: *Sem. Dialysis* 26, 323 (2013).
13. Hou Y. C., Lu C. L., Lu K. C.: *Nephrology* 23, 88 (2018).
14. Akiyama K., Kimura T., Shiizaki K.: *Int. J. Endocrinol.* 2018, 6.
15. Vaarmann A., Kask A., Mäeorg U.: *J. Chromatogr. B* 769, 145 (2002).
16. Filik H., Avan A. A., Aydar S.: *Curr. Pharm. Anal.* 12, 36 (2016).
17. Dvořák P., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 113, 703 (2019).
18. Xu H., Wang D., Zhang W., Zhu W., Yamamoto K., Jin L.: *Anal. Chim. Acta* 577, 207 (2006).
19. Bergerová M., Libánský M., Dejmková H.: *Curr. Anal. Chem.* 14, 530 (2018).
20. Jaffe M.: *Z. Physiol. Chem.* 10, 391 (1886).
21. Davidsohn I., Henry J. B.: *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, str. 76. W. B. Saunders, Philadelphia 1963.

**L. Portyachová<sup>a,b</sup>, K. Štochlová<sup>a</sup>, R. Hyšpler<sup>c</sup>, and Z. Nývltová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Research Institute of Organic Synthesis, Rybitví*, <sup>b</sup> *Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*, <sup>c</sup> *Department of Research and Development of University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove*): **Electrochemical Determination of Toxic Indoxyl Sulfate in Biological Matrix**

The study is focused on optimization and validation of methods for determination of toxic indoxyl sulfate in human urine and blood serum. Samples were analyzed using HPLC/ED-DAD system after the biological matrix had been pretreated. Validated methods were successfully tested on samples from healthy people as well as from dialyzed patients. The aim was to monitor both indoxyl sulfate levels and impact of various methods for elimination of this toxin from patients with renal disease.

Keywords: indoxyl sulfate, HPLC, electrochemical detection, uremic toxin, urine, blood serum