

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



**VÝVOJ BIOANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ
DIAGNOSTICKÝCH MARKERŮ A LÉČIV S VYUŽITÍM
CHROMATOGRAFICKÝCH TECHNIK**

Disertační práce

Kandidát: Mgr. Lenka Javorská

Školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Hradec Králové 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 27.7.2019

.....

Lenka Javorská

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky po celou dobu mého doktorského studia. Také děkuji za příležitost absolvovat zahraniční stáže a účastnit se prestižních mezinárodních vědeckých konferencí.

Velké poděkování patří mé školitelce specialistce doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D., bez jejíž velké podpory a motivace by tato disertační práce nevznikla. Děkuji jí nejen za odborný, ale i přátelský přístup, trpělivost, cenné a inspirativní rady při sepisování odborných výstupů i samotném vývoji chromatografických metod. Velmi si vážím toho, že mi umožnila podílet se na řadě výzkumných projektů, a také na řešení běžné provozní problematiky laboratoře, díky čemuž jsem mohla nasbírat velké množství cenných zkušeností.

Děkuji prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr. h.c, prof. MUDr. Luboši Sobotkovi, CSc. a prof. MUDr. Zdeňku Zadákovi, CSc. za možnost pracovat ve Výzkumné laboratoři a podílet se na řešení výzkumných projektů. Nesmírně si vážím spolupráce s doc. MUDr. RNDr. Milanem Kaškou, Ph.D., prof. MUDr. Lubošem Sobotkou, CSc., prof. MUDr. Bohuslavem Melicharem, Ph.D., MUDr. Tomášem Duškem, Ph.D. a MUDr. Janou Mergancovou, která mě velmi obohatila a umožnila proniknout do oblasti využití bioanalytických metod v klinickém výzkumu. Velmi děkuji doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D. za všechny její cenné rady, připomínky a zkušenosti, které mi předala v rámci svého působení ve Výzkumné laboratoři.

Poděkování patří také celému kolektivu Katedry analytické chemie a Výzkumné laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky za milý přístup, příjemné pracovní prostředí, podporu a ochotu poradit v každé situaci. Zejména bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Kučerové, RNDr. Barboře Červinkové, Ph.D., RNDr. Evě Kasalové, Ph.D., Mgr. Andree Vernerové, Mgr. Dorotě Turoňové za vytvoření veselé kamarádké atmosféry, obrovskou podporu nejen při studiu a příjemné chvíle, které jsme spolu strávily v laboratoři i mimo ni. Nesmím zapomenout na paní Ivetu Svobodovou, její laskavý přístup a velmi nápomocné rady při práci v laboratoři.

Také děkuji studentkám Mgr. Niké Hazukové a Mgr. Kateřině Kučerové, které se v rámci vypracování své diplomové práce podílely na vývoji prezentovaných metod.

Za finanční podporu děkuji grantovým projektům: AZV MZ ČR 18-03-00130, IGA MZ CR NT14265-3/2013, IGA MZ CR NT14089-3/2013, SVV 260 412, TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235, FAFIS CZ.1.07/2.2.00/28.0194, PRVOUK P37/12, MH CZ-DRO (UHHK, 00179906).

Na závěr musím vyjádřit obrovské poděkování celé mé rodině a partnerovi Richardovi, kteří mi byli nesmírnou oporou po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Lenka Javorská

Školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Název dizertační práce: Vývoj bioanalytických metod pro stanovení diagnostických markerů a léčiv s využitím chromatografických technik

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem a validací chromatografických metod pro stanovení glykopeptidového antibiotika vankomycinu, a látek souvisejících s metabolismem L-argininu v biologických tekutinách. Dále je v práci zkoumán potenciál neopterinu, kynureninu a tryptofanu jako biomarkerů imunitní odpovědi v reakci na operační zákrok a predikci pooperačních komplikací v souvislosti s onkologickými onemocněními.

V teoretické části jsou popsány vývojové trendy v oblasti instrumentace kapalinové chromatografie, stacionárních fází a extrakčních technik. Je zde diskutována problematika retence a separace polárních látek, biologické matrice a její úpravy před analýzou. Dále jsou v této části charakterizovány zvolené analyty v souvislosti s klinickým záměrem, pro který byly uvedené chromatografické metody cíleně vyvíjeny. Také je zde uveden přehled vybraných publikovaných metod pro jejich stanovení s využitím kapalinové chromatografie. Poslední část je zaměřena na validaci metod v bioanalýze.

V experimentální části je blíže uveden samotný vývoj, optimalizace a validace UHPLC-MS/MS metod určených pro aplikaci v následném klinickém výzkumu. Jako první je popsáno stanovení vankomycinu ve třech typech biologické matrice: séru, moči a pleurálním/peritoneálním výpotku s metodikou optimalizovanou pro využití pro velké série vzorků. Druhá metoda se zabývá analýzou L-argininu a dalších látek souvisejících s jeho metabolismem (L-ornitinem, L-citrulinem a agmatinem) v exsudátech získaných z chronických ran, které představují zajímavý, ale velmi komplikovaný biologický materiál. Dále jsou v experimentální části komentovány dvě vybrané biomedicínské

práce zabývající se stanovením zánětlivých biomarkerů imunitní odpovědi (neopterinu, kynureninu a tryptofanu), na kterých jsem během svého doktorského studia spolupracovala. Přehled dalších spoluprací a výstupů je uveden v závěru předkládané práce.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Lenka Javorská

Supervisor: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Consultant: assoc. prof. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Title of dissertation thesis: Development of bioanalytical methods for the determination of diagnostic markers and drugs using chromatographic techniques

The presented dissertation is focused on the development and validation of chromatographic method for the determination of glycopeptide antibiotic vancomycin, and L-arginine and its pathway related substances in biofluids. Furthermore, the potential of neopterin, kynurenine and tryptophan as biomarkers of immune response to surgical procedure and prediction of postoperative complications is investigated in connection with oncological diseases.

In the theoretical part trends in instrumentation, stationary phases and extraction techniques are described. The issues of separation and retention of polar compounds and biological matrix pretreatment before analysis are also discussed there. Next part deals with selected analytes and their application to the clinical purpose for which the chromatographic methods are developed. It also provides an overview of published methods for their determination using liquid chromatography. In the last part there is an overview of validation parameters applied in bioanalysis.

The experimental part is interested in the development, optimization and validation of UHPLC-MS/MS methods for application in subsequent clinical research. First, the determination of vancomycin in three matrices: serum, urine, and pleural/peritoneal effusion applicable to large sample series study is introduced. Second method is focused on the measurement of L-arginine and its pathway related substances (L-ornithine, L-citrulline, and agmatine) in exudates obtained from chronic wounds. It represents an interesting but very complicated biological matrix. The optimized method has been validated and introduced into the spectrum of the research laboratory

methods. In the last section of the experimental part two selected biomedical papers are discussed. Presented works dealing with the determination of biomarkers of the immune response (neopterin, kynurenine and tryptophan) in relation with oncological diseases. I was involved in these studies during my doctoral studies. An overview of other cooperation, publications, grant projects, posters and lectures are given at the last part of the dissertation.

OBSAH

1	ÚVOD	19
2	CÍL PRÁCE	21
3	TEORETICKÁ ČÁST	23
3.1	Chromatografické metody	23
3.1.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a její moderní trendy	23
3.1.1.1	Trendy v oblasti LC detektorů	24
3.1.1.2	Vývoj v oblasti stacionárních fází a současné moderní trendy	26
3.1.1.3	Povrchově porézní částice	28
3.1.1.4	Monolitické stacionární fáze	30
3.1.2	Vybrané stacionární fáze vhodné pro separaci polárních látek	33
3.1.2.1	Stacionární fáze tvořené alkylovými řetězci	33
3.1.2.2	Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)	36
3.1.2.3	Fluorované stacionární fáze	38
3.2	Cílové analyty	41
3.2.1	Vankomycin	41
3.2.1.1	Terapeutické monitorování vankomycinu	42
3.2.2	Stanovení vankomycinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v biologických tekutinách	43
3.2.3	L-arginin, L-ornitin, L-citrulin a agmatin	47
3.2.3.1	Souvislost L-argininu a jeho metabolických derivátů (L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu) s hojením ran	47
3.2.3.2	Chronická rána	49
3.2.4	Stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v biologické matrici	50
3.2.4.1	Reverzní chromatografie bez nutnosti derivatizace	51

3.2.4.2	Chromatografické metody v reverzní módu s derivatizací	52
3.2.4.3	Chromatografické metody v módu HILIC	53
3.2.4.4	Vícemodální a chirální chromatografie bez derivatizace	54
3.3	Vybrané biologické matrice používané k analýze	57
3.3.1	Krev	57
3.3.1.1	Plazma	58
3.3.1.2	Sérum	58
3.3.2	Komplikace při analýze krve.....	59
3.3.3	Moč	59
3.3.4	Peritoneální a pleurální tekutina	60
3.3.5	Exsudát z rány.....	60
3.4	Úprava biologických vzorků před analýzou	64
3.4.1	Centrifugace	65
3.4.2	Filtrace	66
3.4.3	Srážení proteinů (deproteinace)	67
3.4.4	Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, Liquid-Liquid Extraction).....	68
3.4.5	Extrakce na tuhou fázi (SPE, Solid Phase Extraction)	70
3.4.6	Online extrakční techniky	71
3.4.7	Extrakční techniky s vysokou selektivitou.....	72
3.4.8	Magnetické separační techniky.....	72
3.5	Validace metod v bioanalýze	75
3.5.1	Kontrolní materiál a standardní látky	76
3.5.2	Vybrané validační parametry	77
3.5.2.1	Selektivita (Selectivity)	77
3.5.2.2	Přenos (Carry-over)	77
3.5.2.3	Kalibrační křivka (Calibration Curve)	77

3.5.2.4	Přesnost (Accuracy).....	79
3.5.2.5	Preciznost (Precision).....	79
3.5.2.6	Matricový efekt (ME, Matrix Effect)	79
3.5.2.7	Stabilita	80
3.5.2.8	Test způsobilosti chromatografického systému	80
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	82
4.1	Stanovení vankomycinu v séru, moči a peritoneálním nebo pleurálním výpotku s využitím kapalinové chromatografie	82
4.1.1	Úvod do problematiky a cíl práce.....	82
4.1.2	Přístrojové vybavení, chemikálie a biologický materiál.....	84
4.1.2.1	Chromatografický systém.....	84
4.1.2.2	Laboratorní vybavení.....	85
4.1.2.3	Standardní látky a chemikálie	85
4.1.2.4	Příprava standardních roztoků	85
4.1.2.5	Biologické vzorky.....	85
4.1.3	Vývoj metody HPLC-UV.....	86
4.1.3.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	86
4.1.3.2	Úprava vzorku před analýzou	91
4.1.4	Vývoj metody UHPLC-MS/MS	92
4.1.4.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	92
4.1.4.2	Úprava vzorku před analýzou	92
4.1.5	Finální podmínky UHPLC-MS/MS metody	95
4.1.6	Validace metody	98
4.1.6.1	Vybrané parametry hodnocené v rámci validace metody	98
4.1.7	Aplikace metody na reálné vzorky	101
4.1.8	Závěr	103

4.2	Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro monitorování procesu hojení chronické rány pomocí metabolismu L-argininu s využitím UHPLC-MS/MS	104
4.2.1	Úvod do problematiky a cíl práce.....	104
4.2.2	Přístrojové vybavení, chemikálie a biologický materiál.....	105
4.2.2.1	Chromatografický systém.....	105
4.2.2.2	Laboratorní vybavení.....	105
4.2.2.3	Chemikálie	106
4.2.2.4	Příprava standardních roztoků	106
4.2.2.5	Biologické vzorky.....	106
4.2.3	Vývoj UHPLC-MS/MS metody	108
4.2.3.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	108
4.2.3.2	Vývoj extrakčního postupu	111
4.2.4	Finální podmínky	113
4.2.5	Validace metody.....	118
4.2.5.1	Vybrané parametry hodnocené v rámci validace metody	118
4.2.6	Aplikace metody na reálné vzorky	121
4.2.7	Závěr	122
4.3	Koncentrace neopterinu, kynureninu a tryptofanu v sekretech z ran u pacientů s rakovinou prsu a maligním melanomem	123
4.3.1	Úvod do problematiky	123
4.3.2	Metodika	124
4.3.3	Výsledky a diskuze	125
4.3.4	Závěr	125
4.4	Neopterin, kynurenin a tryptofan jako nové biomarkery pro časnou detekci rektálního anastomotického leaku.....	127
4.4.1	Úvod do problematiky	127

4.4.2	Metodika	128
4.4.3	Výsledky a diskuze	129
4.4.4	Závěr	130
5	ZÁVĚR	131
6	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ	134
7	PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ, GRANTOVÝCH PROJEKTŮ A STÁŽÍ	136
7.1	Přednášky	136
7.2	Plakátová sdělení	137
7.3	Grantové projekty	139
7.4	Absolvované stáže	140
8	LITERATURA	141
9	PŘÍLOHY	160
9.1	Příloha I	162
9.2	Příloha II	170
9.3	Příloha III	186
9.4	Příloha IV	194
9.5	Příloha V	204
9.6	Příloha VI	212
9.7	Příloha VII	221
9.8	Příloha VIII	234

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	octová kyselina
ACN	acetonitril
AGM	agmatin
AmAc	octan amonný
AmFo	mravenčan amonný
ARG	L-arginin
BEH	<i>Bridge Ethyl Hybrid</i>
C18	octadecylsilikagel
CIT	L-citrulin
EMA	European Medicines Agency
ESI	Ionizace elektrosprejem (<i>Electrospray Ionization</i>)
EtOH	ethanol
FA	kyselina mravenčí
FDA	Food and Drug Administration
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra (<i>High Equivalent to a Theoretical Plate</i>)
HFBA	heptafluoromáselná kyselina
HFPA	heptafluoropropionová kyselina
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>)
HPLC	vysoko účinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí

IPA	propan-2-ol
IS	vnitřní standard
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LLOQ	spodní mez stanovitelnosti (<i>Lower Limit of Quantification</i>)
M	moč
ME	matricový efekt (<i>Matrix Effect</i>)
MeOH	methanol
MEPS	mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (<i>Microextraction by Packed Sorbent</i>)
MF	mobilní fáze
MM	mozkomíšní mok
MRM	monitorování více vybraných reakcí (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	hmotnostní spektrometr (<i>Mass Spectrometer</i>), hmotnostní spektrometrie (<i>Mass Spectrometry</i>)
ORN	L-ornitin
P	plazma
PA	propionová kyselina
PDA	detektor s diodovým polem (<i>Photodiode-array Detector</i>)
PEEK	polyether ether keton

PFP	pentafluorfenyl
PP	deproteinace, srážení proteinů (<i>Protein Precipitation</i>)
RAM	materiál s omezeným přístupem (<i>Restricted Access Material</i>)
RCF	relativní odstředivá síla (<i>Relative Centrifugal Force</i>)
RDS	relativní směrodatná odchylka
RE	výtěžnost (<i>Recovery</i>)
Ř	ředění
SF	stacionární fáze
SLE	extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází (<i>Supported Liquid Extraction</i>)
SPE	extrakce na tuhou fází (<i>Solid Phase Extraction</i>)
TFA	kyselina trifluoroctová
TIC	celkový iontový proud (<i>Total Ion Current</i>)
UFLC	registrovaná značka firmy Shimadzu (<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>)
UHPLC	ultra-vysoko účinná kapalinová chromatografie
UHPLC-MS/MS	spojení ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
ULOQ	horní mez stanovitelnosti (<i>Upper Limit of Quantification</i>)
UPLC	registrovaná značka firmy Waters (<i>Ultra performance liquid chromatography</i>)
UV	ultrafialový (<i>Ultraviolet</i>)

1 ÚVOD

Nedílnou součástí klinických studií představují laboratorní hodnoty získané pomocí bioanalytických metod. Pro dosažení kvalitních výsledků je nezbytné používat moderní validované metody, které zajistí přesné a spolehlivé stanovení cílových analytů. Hodnotící lékař (klinik) následně propojí naměřená data s klinickým stavem pacienta a vyhodnotí závěry studie.

Chromatografické metody patří mezi stále se rozšiřující techniky nejen ve výzkumných ale i rutinních biochemických laboratořích. Výhodou je jejich robustnost a vysoká spolehlivost, která je dosažena také díky chromatografické separaci na koloně, kde dochází k oddělení cílových analytů od balastních látek obsažených v biologické matrici. Pro následné stanovení lze využít celou škálu senzitivních detektorů založených na různém principu detekce. Riziko vydání nesprávných výsledků je zde tak v porovnání s imunochemickými metodami (například problematika tzv. zkřížených reakcí) výrazně sníženo.

Aplikace moderních směrů umožňuje vyvíjet stále rychlejší a senzitivnější metody. Významné vývojové trendy se promítají do všech oblastí instrumentace HPLC systémů a příslušenství. Kromě nejvíce rozšířené reverzní chromatografie, ve spojení nejčastěji s C18 kolonami, se začínají do popředí dostávat i jiné chemické modifikace stacionárních fází a chromatografické módy. Ty pak umožní lepší separaci a analýzu látek, pro které jsou klasické C18 stacionární fáze nedostačující (např. polární látky). Kromě plně porézních částic jsou často využívány povrchově porézní částice a monolitické kolony. I UHPLC systémy se stávají běžným vybavením laboratoří a jejich spojení s hmotnostními spektrometry je stále populárnější. Dostupnost široké škály komerčních produktů, i ve formě aplikačně specifických systémů nebo kompletních „kitů“ pro vybrané metody, umožňuje snadné rozšíření nejen do výzkumných laboratoří.

Významné pokroky jsou zaznamenávány také v oblasti úpravy vzorků před chromatografickou analýzou. Zejména pro bioanalytické metody je kladen důraz na spotřebu malých objemů vzorků a je preferováno využití biologických tekutin, které lze od pacientů získat neinvazivním způsobem (moč, exsudát z rány získaný stěrem nebo absorpcí, sliny, pot atd.). Cílem je vytvářet co nejmenší zátěž pro pacienta. Dále je zde

snaha o zmenšování spotřeby neekologických organických rozpouštědel. Proto jedním z moderních trendů je miniaturizace konvenčních metod. Pro extrakční metody cílené na zpracování velkých sérií vzorků je vyžadována jejich jednoduchost na provedení pro laboratorní personál a časová nenáročnost. Zvyšující se počet manuálně prováděných kroků navyšuje chybu výsledku stanovení. Z toho důvodu se významně rozvíjí i oblast automatizace extrakčních postupů a online stanovení. Tento přístup vede také ke snižování nutnosti kontaktu laboratorního personálu s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem. I přes rozvoj moderních trendů ve vlastní analytické metodě, preanalytická část tvoří stále velké procento času potřebného pro získání konečného laboratorního výsledku.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat dvě chromatografické metody určené pro následný klinický výzkum. První z metod byla zaměřena na stanovení antibiotika vankomycinu ve třech typech odlišné biologické matrice (séru, moči a peritoneálním/pleurálním výpotku). Podnět vznikl ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové v rámci řešení výzkumného projektu IGA Ministerstva zdravotnictví České republiky (NT14089-3/2013). Optimalizace celého procesu vývoje byla směřována pro uplatnění v měření velkých sérií klinických vzorků, kdy je vyžadována rychlá metoda vhodná nejlépe současně pro všechny tři uvedené matrice. Klíčový byl také jednoduchý a časově nenáročný postup pro úpravou vzorku před analýzou s malou spotřebou biologického materiálu. Cílem bylo vyvinutou metodu publikovat v časopise s IF, stejně jako přehledový článek zabývající se chromatografickým stanovením vankomycinu v biologické matrici.

Druhá chromatografická metoda byla vyvíjena s cílem zavedení vhodné metodiky pro sledování metabolismu aminokyseliny L-argininu v exsudátu získaného ze špatně se hojících ran pacientů. Pro optimalizaci procesu stanovení i extrakce zvolených analytů byly kladeny stejné nároky na rychlost a jednoduchost jako u předchozí metody. Podnět k zavedení metodiky do spektra vyšetření výzkumné laboratoře byl dán ve spolupráci s pracovištěm III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, které se dlouhodobě zabývá léčbou chronických ran. Tyto analyty (kromě agmatinu) jsou rutinně stanovovány v biochemických laboratořích v plazmě nebo v séru. Avšak jejich měření v exsudátu z rány by mělo představovat přesnější obraz metabolického procesu probíhajícího přímo v místě postižení.

Dalším významným úkolem bylo využití již zavedených metod ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (dříve Výzkumná laboratoř III. interní gerontometabolické kliniky) Fakultní nemocnice Hradec Králové pro řešení biomedicínských studií v rámci spoluprací s dalšími klinickými pracovišti. Konkrétně se jednalo o stanovení neopterinu, kynureninu a tryptofanu v séru, moči a sekretu

z pooperačních ran. Cílem bylo ověřit potenciál těchto látek jako biomarkerů v souvislosti s managementem onkologických onemocnění.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody tvoří nedílnou součást skupiny moderních separačních technik. Existuje celá škála jejich provedení, ale základní princip mají všechny přístupy společný. Obecně dochází k distribuci dělených složek směsi mezi dvě fáze, kdy jedna je pohyblivá (mobilní) a druhá nepohyblivá (stacionární). Důležitou podmínkou je, aby obě tyto fáze byly nemísitelné. V kapalinové chromatografii představuje mobilní fázi kapalina a stacionární fáze je tvořená tuhou látkou nebo případně kapalinou ukotvenou na tuhém nosiči. K dělení látek ze směsi poté dochází na základě adsorpce, elektrostatické interakce, afinitní interakce, rozdílné rozpustnosti nebo velikosti a tvaru molekul.

3.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a její moderní trendy

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) patří mezi velmi často využívané separační techniky. Slouží k oddělení jednotlivých složek směsi, jejich následné identifikaci a kvantifikaci. Své uplatnění nachází v širokém spektru aplikací, včetně rutinních klinických stanovení. Důvodem je dobrá opakovatelnost a robustnost metod vedoucí ke spolehlivým výsledkům.

Přístroj pracující v režimu HPLC se nazývá kapalinový chromatograf. Mobilní fáze je umístěna v zásobnících, ze kterých je do HPLC systému vedena pomocí vysokotlakého čerpadla. Před vstupem do přístroje dochází k jejímu odplynění v tzv. degasseru. Zbavení plynů vede ke stabilnímu průtoku mobilní fáze, zabránění vzniku nežádoucího šumu základní linie a tím větší citlivosti metody a reprodukovatelnosti retenčních časů. Pro vytvoření vícesložkové mobilní fáze lze využít směšovač, ve kterém jsou jednotlivé složky míseny v požadovaném poměru. Samotné dávkování vzorku do proudu mobilní fáze je prováděno nejčastěji pomocí autosamplerů (méně často je využíváno manuálních dávkovacích ventilů). Následná separace složek směsi poté probíhá na chromatografické koloně, která je ideálně umístěna v termostatovaném kolonovém prostoru. K detekci jednotlivých separovaných analytů se využívá celá řada různých detektorů napojených

na výstup z chromatografické kolony. Získaný signál z detektoru je následně zpracováván počítačem [1].

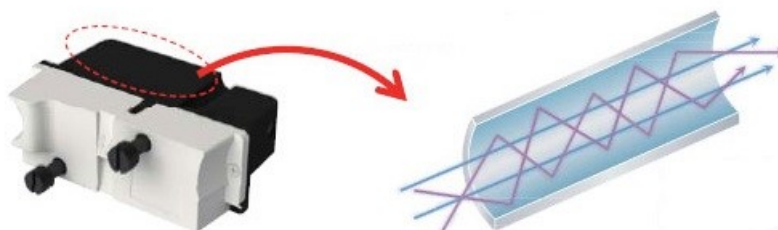
Instrumentace v kapalinové chromatografii, určená pro běžné použití v laboratořích, zaznamenala významný pokrok v roce 2004. V tomto roce byl firmou Waters (Milford, MA, USA) zaveden první komerčně dostupný chromatografický systém pod ochranou známkou Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) s názvem Acquity kompatibilní s tlakem až 1000 bar (klasické HPLC systémy jsou odolné do 400 barů). Obecně se tento přístup nazývá ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography). Pojem UHPLC byl poprvé použit Jorgensonem už v roce 1997. V tomto roce bylo jeho skupinou popsáno využití nano-kolon s neporézními částicemi na bázi silikagelu o průměru 1,0–1,5 μm na prototypu systému, který umožňoval pracovat při velmi vysokém tlaku (až 4100 bar). Nová instrumentace umožnila vyhovět nárokům na rychlejší analýzy se zachovanou nebo lepší účinností, rozlišením a citlivostí díky možnosti aplikace chromatografických kolon plněných částicemi menšími než 2 μm . Od roku 2004 řada firem uvedla celou škálu UHPLC systémů prvních i druhých generací, které zvládnou pracovat za tlaků vyšších než 400 barů. Každým rokem se na trh dostávají různá rozšíření stávajících produktů, jako například duální nebo bioinertní systémy. Začaly se objevovat i aplikačně specifické systémy určené pro konkrétní analýzy (například kanabinoidů) [2–4]. V dnešní době patří UHPLC systémy k běžnému modernímu vybavení laboratoří výzkumného, průmyslového i klinického zaměření.

UHPLC systém musí splňovat řadu nároků souvisejících nejen s vysokým tlakem (robustní čerpadlo, šroubení a další součásti vyrobené z vysoce odolných materiálů), ale i s rychlostí analýzy (rychlé a robustní dávkování vzorku o velmi malém objemu, vysoká frekvence sběru dat, minimální mimokolonové objemy atd.). Stacionární fáze určené pro UHPLC analýzy musí vykazovat vysokou mechanickou stabilitu [1, 2].

3.1.1.1 Trendy v oblasti LC detektorů

Moderní detektory určené pro UHPLC systém musí zajistit dostatečnou rychlost sběru dat s rychlou odezvou při zachování podmínky minimálního počtu 15–20 bodů na pík. Komerčně nabízené optické detektory (UV detektor, detektor s diodovým polem a

fluorescenční detektor) pro spojení s UHPLC nabízí rychlost sběru dat až 240 Hz [5]. Pro zabránění mimokolonové disperze a získání úzkých symetrických píků (13 sekundy) muselo dojít ke zmenšení objemu cely detektoru (z původních 8–15 μl u HPLC detektorů na 2 μl a méně) [6, 7]. Se zmenšením objemu souvisela i změna designu, protože jinak by zkrácení délky dráhy vedlo ke snížení intenzity signálu. Použití jiných materiálů pro povrch cely (např. Teflon AF, firma Waters, Milford, MA, USA) umožnilo zachování délky dráhy díky úplnému odrazu paprsku od vnitřní stěny. Aplikace nových trendů, například u PDA detektorů, výrazně snížila rozdíly v citlivosti v porovnání se standardními UV detektory, které dříve vykazovaly vyšší citlivost [4, 8, 9]. Například lze uvést PDA detektor firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko) SPD-M30A, kde byla použita speciální kapilární SR-cela (Sensitivity and Resolution Cell), která umožňuje výrazné zvýšení citlivosti díky nízkému objemu cely (1 μl) a snížené disperzi píku (Obr. 1). Detektor dosahuje hladiny šumu $0,4 \times 10^{-5}$ AU [9, 10]. Ještě nižší hladiny šumu ($0,15 \times 10^{-5}$ AU) je dosaženo detektorem od firmy Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1290 Infinity II Variable Wavelength Detektor [5].



Obr. 1: Ukázka průřezu SR-cely PDA detektoru SPD-M30A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
Převzato ze zdroje [10] a upraveno.

K inovacím dochází také v oblasti hmotnostní spektrometrie. Nové hmotnostní spektrometry nabízejí stále větší rozlišení, hmotnostní rozsah i rychlost skenování. Dnešní přístroje dosahují nízké časové prodlevy (dwell time) 0,8–5 ms (starší generace přístrojů 20–100 ms) se stále zachovanou dostatečnou citlivostí [11, 12]. Problémem zůstává poměrně vysoká cena a požadavky na odborné znalosti operátora. Lze ale uvést, že poptávka na trhu po systémech LC-MS stále roste. Důvodem může být to, že

zlepšování v technologii MS (hardware i software) umožňuje vyvíjet vysoce selektivní, citlivé, robustní a spolehlivé metody v různých odvětvích [3]. Mezi pravděpodobně nejčastěji rozšířené analyzátoři i v klinických laboratořích patří kvadrupól. Jednou z jeho výhod je jednoduchost a relativně nižší pořizovací cena. Novějším přístupem je tandemové uspořádání, kdy dochází ke spojení dvou a více hmotnostních analyzátorů. Velmi typickou je kombinace tří kvadrupólů nebo kombinace kvadrupólu a průletového analyzátoru. Tento směr se označuje jako tandemová hmotnostní spektrometrie v prostoru, protože k výběru prekurzorového iontu, jeho fragmentaci a analýze produktových iontů dochází v jiných oblastech. Dalším typem je tandemová hmotnostní spektrometrie v čase, kdy všechny tři kroky probíhají v jednom místě, ale jsou odděleny časem (např. 3D iontová past). Oba tyto přístupy umožňují fragmentační experimenty MS/MS a MSⁿ. Ve výsledném spektru jsou pak detekovány fragmentové ionty, které vznikly rozpadem vybraného prekurzorového iontu, což umožňuje přesnější a citlivější stanovení [13, 14]. Výhodu lze spatřit zejména v případě LC-MS analýzy velmi komplexních biologických materiálů, kdy často dochází ke koeluci analytu s další interferující látkou s velmi podobnou molekulovou hmotností a chromatografickým chováním.

Rostoucím trendem je využívání hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Zejména měření v tzv. full-scan módu umožní získat komplexní obraz o měřeném vzorku. Získaná data lze pak zpracovávat jak kvantitativním, tak kvalitativním přístupem (například cílená kvantifikace nebo necílená metabolomika) [15, 16].











3.1.1.2 Vývoj v oblasti stacionárních fází a současné moderní trendy

Klíčovou součástí kapalinové chromatografie představuje kolona plněná určitým typem sorbentu (stacionární fáze). Z historického hlediska prošly stacionární fáze řadou významných změn. Nejprve se jednalo o nepravidelné silikagelové nebo aluminiové porézní částice o velikosti větší než 100 μm. Problémem těchto částic byla nedostatečná chromatografická účinnost a pomalá separace. S velkým průlomem přišel v 60. letech profesor Csaba Horvát z Univerzity Yale, který přestavil částice tvořené sférickým pevným jádrem (skleněnou kuličkou o průměru 37–50 μm) potaženým vnější porézní vrstvou o tloušťce 1–2 μm. Toto provedení vedlo k lepší účinnosti kolony v porovnání

s velkými plně porézními částicemi, protože nedocházelo k difuzi analyzovaných molekul hluboko do pórů sorbentu. Avšak malý separační povrch limitoval kapacitu kolony pro vzorek. Se zmenšením částic bylo zapotřebí zavést vysokotlaká čerpadla, která umožnila průtok mobilní fáze sorbentem [17].

Díky vývoji nové technologie (nazývaná „slurry packing“) docházelo s postupem času ke zmenšování velikosti plně porézních částic a změně z nepravidelného na pravidelný sférický tvar. V roce 1973 byly na trh uvedeny široce používané plně porézní částice o průměru 10 μm s komerčním názvem $\mu\text{Bondapak}$ (Waters, Milford, MA, USA). Následně začaly být komerčně dostupné sférické porézní silikagelové částice s různou velikostí pórů a širokou škálou modifikací pro různé HPLC separační módy. Názorný chronologický přehled je uveden na Obr. 2, ze kterého je patrný trend postupného zmenšování velikosti částic, a s tím související nárůst separační účinnosti. Díky vyšší účinnosti mohly být používány kratší kolony, které umožnily dosahovat rychlejších analýz a současně snížily i nároky na tlakovou odolnost systému. Například pro částice o průměru 3,0–3,5 μm byly používány kolony o délce 15 cm namísto 25 cm pro částice o průměru 5 μm [17]. V dnešní době jsou běžně dostupné kolony o délce 100, 50, 20 mm i kratší. Se zkracováním kolon docházelo také ke zmenšování jejich vnitřního průměru. Zejména s nástupem MS techniky se staly populární kolony s vnitřním průměrem menším než 2,1 μm [17, 18].

K průlomů došlo v roce 2003, kdy firma Agilent Technologies představila kolonu Zorbax Rapid Resolution plněnou plně porézními 1,8 μm částicemi a odstartovala tak éru „sub-2- μm “. V současné době jsou komerčně dostupné kolony plněné plně porézními částicemi o nejmenším průměru 1,5 μm . Další zmenšování velikosti částic (pod 1 μm) vede k extrémnímu nárůstu tlaku v LC systému, což zatím není možné uplatnit pro rutinní použití. Trend stálého zmenšování byl zastíněn nástupem nové generace povrchově porézních částic [18].

Year of Acceptance	Particle Type	Most Popular Nominal Size	Plates/15 cm (Approximate)
1950s	 Irregularly shaped	100+ μm	200
1967	 Glass bead	50 μm (SPP)	1000
1972		10 μm	6000
1985		5 μm	12,000
1992		3–3.5 μm	22,000
1996*		1.5 μm (NP*)	30,000
1999		5.0 μm (SPP)	8000 [†]
2000		2.5 μm	25,000
2003		1.8 μm	32,500
2007–2008		2.7 μm (SPP)	32,000 [‡]

*NP = nonporous silica or resins
[†]300-Å pore for protein MW 5700
[‡]90–120 Å pore

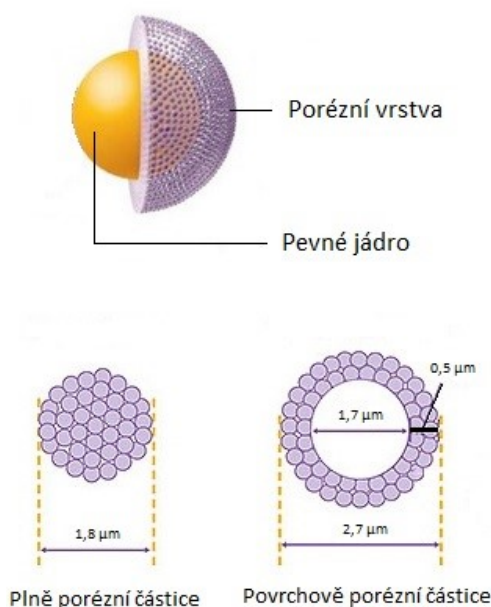
Obr. 2: Historický přehled vývoje částicových stacionárních fází.
Převzato ze zdroje [17].

3.1.1.3 Povrchově porézní částice

Jak již bylo uvedeno výše, první povrchově porézní částice byly popsány v 60. letech. Tento přístup byl později zdokonalen J.J. Kirklandem a v roce 2006 byly firmou Advanced Materials Technologies (Wilmington, DE, USA) uvedeny na trh povrchově porézní částice s komerčním názvem HALO. Jedná se o silikagelové částice tvořené pevným neporézním jádrem o průměru 1,7 μm pokrytém vrstvou porézního silikagelu o tloušťce 1,5 μm a velikostí pórů 90 Å. Celkový průměr částice je tedy 2,7 μm a porézní vrstva tak tvoří asi 75 % celkového objemu částice. Tím je stále zachován dostatečný separační povrch. Analyzované látky difundují pouze porézní vrstvou, dochází k menší axiální difuzi a ke snížení odporu proti převodu hmoty ve srovnání s plně porézními částicemi. Tato technologie umožňuje také užší distribuci velikosti částic a tím i lepší plnění kolon, což vede k omezení vířivé difuze. Díky tomuto provedení dosahují kolony plněné povrchově porézními částicemi vysoké účinnosti chromatografické separace a možnosti rychlých analýz. Částice o průměru 2,7 μm mohou tak v účinnosti

konkurovat plně porézním částicím menším než 2 μm . Jejich nespornou výhodou je, že mohou být používány v konvenčních HPLC systémech (do 400 barů), protože dosahují daleko nižšího zpětného tlaku [1, 19, 20]. Ukázka struktury povrchově porézní částice je uvedena na Obr. 3.

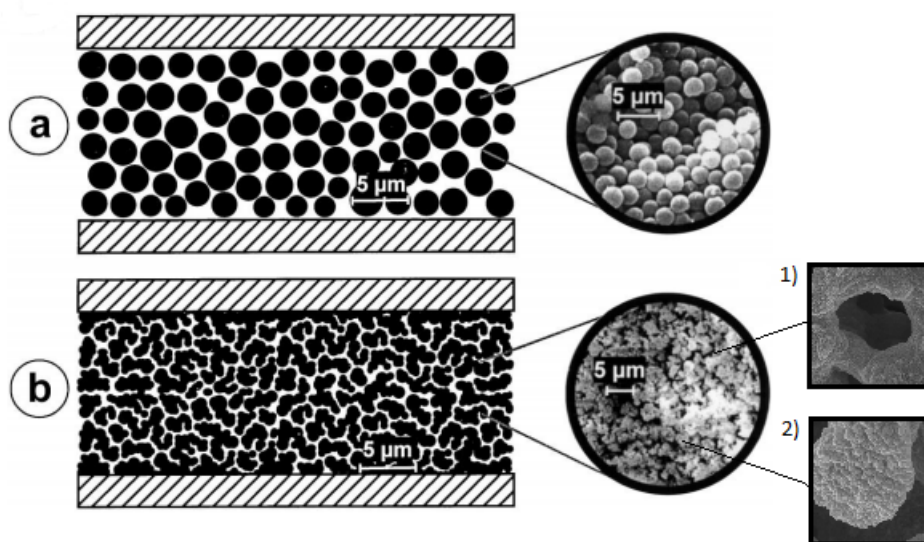
Tato technologie se stala velmi populární a v dnešní době nabízí kolony plněné povrchově porézními částicemi řada firem. Hlavními trendy v této oblasti jsou expanze ve velikosti částic i samotných pórů, chemická modifikace povrchu a aplikace na širokou škálu analytů, nejen malých molekul, pro které byly původně určeny. V současné době jsou komerčně dostupné částice o průměru 1,3–5 μm s rozdílnou tloušťkou porézní vrstvy 0,15–0,5 μm a velikostí pórů 80–400 Å. Větší částice (4–5 μm) generují menší tlak než ty o průměru 2,7 μm a jsou s oblibou používány pro přenos metod z klasických 5 μm plně porézních částic. I tyto větší částice dosahují v porovnání lepší účinnosti. V nabídce je široká škála modifikací povrchu umožňujících dosáhnout vysoce selektivní separace. Nověji se objevují například pH stabilnější C18 silikagelové částice (pro rozsah pH 1–12) nebo polárně modifikované C18 silikagelové částice, které lze uplatnit i použití 100% vodné mobilní fáze [20–23].



Obr. 3: Struktura povrchově porézní a plně porézní částice.
Převzato ze zdroje [24] a upraveno.

3.1.1.4 Monolitické stacionární fáze

Alternativou ke stacionárním fázím tvořeným částicemi jsou kolony plněné jedním kusem porézního materiálu, který zcela vyplňuje jejich vnitřní prostor. Struktura tohoto pórovitého materiálu představuje kontinuální síť polymeru nebo silikagelu obsahující bimodální strukturu pórů. Makropóry představují velké póry o průměru více než 50 nm (nejčastěji 1–2 μm), které v separačním médiu umožňují vysoký průtok mobilní fáze za nízkého protitlaku. Dochází tak k rychlému převodu hmoty mezi mobilní a stacionární fází. Naopak mezopóry jsou malé póry (2–50 nm), které vytvářejí jemnou porézní strukturu, a poskytují tak dostatečně velký separační povrch. Tato struktura je typická zejména pro monolity na bázi oxidu křemičitého. Polymerní monolity mezopóry obsahovat nemusí. Hlavní předností tohoto provedení jsou lepší hydrodynamické vlastnosti ve srovnání s klasickým částicovými kolonami. Jejich provoz je možný při zhruba 5x vyšších průtokových rychlostech než konvenční kolony plněné 5 μm sorbentem [25, 26]. Podle chemické povahy jsou monolity polymerní nebo anorganické. Názorná ukázka rozdílné struktury monolitické a částicové stacionární fáze je uvedena na Obr. 4.



Obr. 4: Ukázka struktury částicové (a) a monolitické (b) stacionární fáze. Detail monolitické stacionární zobrazuje strukturu makropórů (1) a mezopórů (2). Převzato ze zdroje [27, 28] a upraveno.

Monolity na bázi organického polymeru

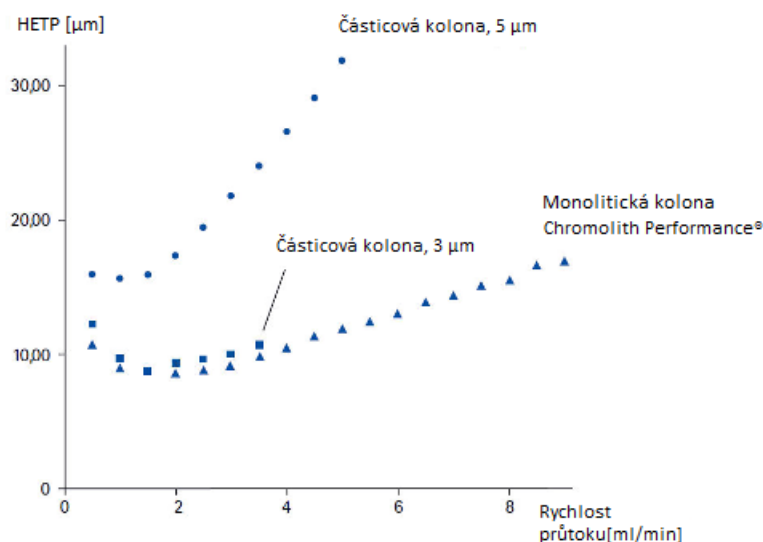
První rigidní makroporézní polymerní monolitické kolony byly připraveny začátkem 90. let prof. Švecem a kol. [27]. Obecně lze jejich přípravu provádět *in situ* polymerací směsi zvolených monomerů, radikálového iniciátoru, síťovacího činidla a porogenu přímo v prázdné chromatografické koloně. Polymerace probíhá v uzavřené koloně za kontrolované teploty. Následně jsou koncová těsnění nahrazena HPLC koncovkami a po zapojení kolony do HPLC systému dojde k vymytí nezreagovaných látek. Polymerace může být provedena i v kapiláře. Volba funkčních skupin monolitických kolon připravených přímou polymerací závisí na výběru monomerů (např. styren, akrylamid, akrylát, methakrylát) nebo lze připravit monolit s reaktivními skupinami a vzniklý polymer následně modifikovat. Dalším typem přípravy je roubování monolitů s využitím UV záření [22, 26]. Složením polymerizační směsi lze ovlivnit strukturu a velikost pórů monolitu, účinnost separace i biokompatibilitu [1].

Původní aplikace polymerních monolitů byla určena pro makromolekuly. Proto se často uplatňují v oblasti proteomických analýz, hlavně v podobě kapilárních kolon. V poslední době se začíná tento formát stacionární fáze aplikovat i pro malé molekuly [26–28]. Výhoda spočívá ve stabilitě v širokém rozmezí pH, vysoké kapacitě pro vzorek a možnosti použití vysokých průtoků mobilní fáze. Ovšem pouze omezené množství produktů je komerčně dostupných [17].

Monolity na bázi silikagelu

První anorganické monolity na bázi silikagelu vyvinuli Nakanishi, Tanaka a Soga na začátku 90. let v Kjótském technologickém institutu v Japonsku [17, 25]. Komerčně byly poprvé představeny na konferenci HPLC 1998 firmou EMD Millipore (dceřiná společnost společnosti Merck KGaA, Německo) a následně na Pittcon v roce 2000 jako SilicaRod monolitické kolony [17, 25]. Později byl tento název změněn na Chromolith® a přetrvává do současné doby. Další firmou nabízející tento typ kolon (v licenci od firmy Merck) je firma Phenomenex (Torrance, CA, USA) pod obchodní značkou Onyx. V roce 2011 představila firma Merck monolit druhé generace pod názvem Chromolith® HighResolution. Od první generace se liší ve velikosti makropórů (1,15 μm místo

původních 2 μm). Mezopóry mají velikost 15 nm (místo 13 nm, 130 Å) a specifický povrch 250 m^2/g . Také silikagelová struktura tohoto monolitu je více homogenní. Ve srovnání s první generací dosahuje druhá generace vyšší účinnosti separace. Vysoká separační účinnost této stacionární fáze byla prokázána i v práci Kučerová a kol. (2013) [28], kde bylo dosaženo lepších chromatografických parametrů pro vybrané analyty (retinol a alfa-tokoferol) ve srovnání s kolonami plněnými plně porézními částicemi menšími než 2 μm a povrchově porézními částicemi 2,6 a 1,7 μm . Nevýhodou ovšem je, že firma nabízí tuto kolonu pouze ve variantě C18 o rozměrech 50 \times 4,6 mm, 100 \times 4,6 mm a 150 \times 4,6 mm [29]. Na Obr. 5 je uvedeno porovnání účinnosti částicových kolon s monolitickou kolonou pomocí van Deemterových křivek. Je patrné, že účinnost monolitu Chromolith Performance® (od firmy Merck) je obdobná jako u kolon plněných částicemi o velikosti 3 μm . Navíc dovoluje aplikaci vyšších průtokových rychlostí mobilní fáze se zachováním vysoké účinnosti i v porovnání s 5 μm částicemi.



Obr. 5: Porovnání účinnosti částicových kolon s monolitickou kolonou pomocí van Deemterových křivek. Převzato ze zdroje [30] a upraveno.

Silikagelové monolitické kolony jsou připravovány technikou sol-gel, kdy dochází k hydrolytické iniciované polymeraci tetraalkoxysilanů (nejčastěji tetramethoxysilanu nebo např. tetraethoxysilanu, methyltrimethoxysilanu) ve vodném roztoku kyseliny octové v přítomnosti ve vodě rozpustného organického polymeru – porogenu, např.

polyethylenglykolu. Monolity na bázi silikagelu nelze připravovat přímo *in situ* jako organické monolity, protože během procesu přípravy dochází k jeho značnému smrštění. Z toho důvodu je příprava dvoukroková. V prvním kroku je monolit připraven ve vhodné formě, a až potom je vpraven do pouzdra ze smrštivého materiálu PEEK (polyether ether keton)). Tento jev způsobuje značné omezení z hlediska přípravy dlouhých kolon a je velmi obtížné připravit monolitické tyčky delší než 150 mm, aniž by nedošlo k ohybu. Problematičtější je i příprava kolon s průměrem menším než 3 μm . Ovšem výhodou této technologie je, že lze připravit monolity s přesně definovanou strukturou [25]. Hotové silikagelové monolity mohou být snadno modifikovány funkčními skupinami. Komerčně dostupné jsou modifikace C18, C8, amino, kyano, fenyl a diol [29, 31]. Na rozdíl od polymerních monolitů jsou běžně používané i pro separaci malých molekul. Monolitické kolony nacházejí své uplatnění zejména v oblastech, kde je potřeba provádět rychlé a robustní analýzy [1, 26, 32]. Vykazují dlouhou životnost v kombinaci s analýzou biologického materiálu, což je klíčové zejména v rutinních laboratořích, kde je předpoklad měření velkých sérií vzorků [28].

3.1.2 Vybrané stacionární fáze vhodné pro separaci polárních látek

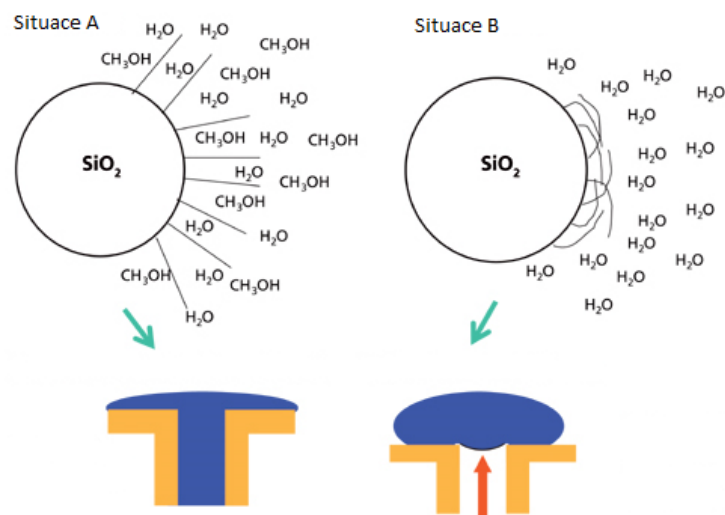
Moderní trendy v kapalinové chromatografii se promítají také do oblasti chemismu stacionárních fází a technologii částic. Na trhu existuje spousta firem nabízejících celou škálu stacionárních fází pro různé separační módy. Pro zachování konkurenceschopnosti přicházejí výrobci stále s novými produkty nebo vylepšeními stávajících produktů.

3.1.2.1 Stacionární fáze tvořené alkylovými řetězci

Obecně platí, že při vývoji chromatografické metody v reverzním módu je kolonou první volby převážně stacionární fáze tvořená alkylovými řetězci C18. Důvodem jsou jednoduché a snadno předvídatelné interakce této stacionární fáze se separovanými analyty. Problém může nastat v případě polárních analytů. Retence těchto látek na klasické reverzní C18 stacionární fázi je velmi nízká a často dochází k jejich eluci v mrtvém objemu. Pro zvýšení retence je zapotřebí potlačit jejich ionizaci a

snížit objemový podíl organické složky v mobilní fázi. Často je potřeba přistoupit k mobilní fázi tvořené pouze vodnou složkou. Bohužel klasické C18 stacionární fáze nejsou vhodné pro použití se 100% vodnou mobilní fází a dochází k postupnému nebo i náhlému poklesu retence. Metody se stávají neopakovatelnými a zhorší se tvar píků. O principu vzniku tohoto jevu se vedou stále diskuze [1, 33].

Jednou z teorií je vznik hydrofóbního kolapsu C18 stacionární fáze. Názorně je tento stav vyobrazen na Obr. 6. V případě, kdy je použita mobilní fáze tvořená pouze organickým rozpouštědlem (methanol, acetonitril atd.) nebo určitým objemovým podílem organické složky v kombinaci s vodou, jsou C18 alkylové řetězce (nebo i jiné hydrofobní řetězce) solvatovány touto mobilní fází a jsou v napřímené poloze. To umožňuje interakci s analyty. Pokud je mobilní fáze 100% vodná nebo pouze s velmi malým objemovým podílem organického rozpouštědla, dochází díky velkému rozdílu v polaritě ke složení C18 řetězců k sobě. Tím je znemožněna interakce s analyty [1, 33, 34]. Ze spodní části Obr. 6 je patrný jev, který zřejmě nastává uvnitř pórů stacionární fáze. Pokud je mobilní fáze tvořená organickým rozpouštědlem samotným nebo s vodnou složkou, dochází k naplnění pórů mobilní fází a solvataci funkčních skupin. Když je mobilní fáze 100% vodná nebo s velmi malým podílem organického rozpouštědla nastává tendence „vypudit“ vodu z pórů. To je popisováno jako „dewetting“ fenomén [34].



Obr. 6: Ukázka odlišného chování alkylové stacionární fáze při použití vodně-organické mobilní fáze (situace A) a 100% vodné mobilní fáze (situace B). Vznik fázového kolapsu (přesněji „dewetting“ fenoménu) při situaci B. Převzato ze zdroje [34] a upraveno.

K tomuto jevu nemusí docházet okamžitě, ale až po několika kolonových objemech, kdy řetězce přestanou být solvatovány organickým rozpouštědlem. Jelikož k zadržování látek dochází zejména v pórech, zůstanou analyty v podstatě nezadržené. S „dewetting“ fenoménem se lze setkat hlavně u stacionárních fází, které jsou velmi hydrofobní, tzn. mají velmi hustě navázané alkylové řetězce a jen velmi málo volných silanolových skupin [34]. K zabránění vzniku tohoto fenoménu musí tyto stacionární fáze obsahovat určité rysy:

A) dlouhé alkylové řetězce

Stacionární fáze s dlouhými alkylovými řetězci (např. C30) jsou odolnější proti „dewetting“ fenoménu. Díky sterickým požadavkům zde zůstávají volné silanolové skupiny, které pak interagují s vodou a umožňují solvaci povrchu [34].

B) *krátké alkylové řetězce bez pokrytí volných silanolových skupin (bez „endcappingu“)*

Volné silanolové skupiny umožňují interakci s polárními analyty, a také interagují s vodou. Nejmenší riziko kolapsu („dewettingu“) stacionární fáze je pak u např. C4 alkylových řetězců [1].

C) *velký průměr pórů*

Velký průměr póru silikagelových částic (např. 150 Å, 300 Å) snižuje riziko hydrofóbního kolapsu stacionární fáze pravděpodobně z důvodu nižšího pokrytí alkylových řetězců [1] nebo také proto, že póry jsou dostatečně široké, aby nedocházelo k „vypuzení“ vody [33, 34]. Bidlingmeyer a kol. (2004) uvedli, že při použití C18 stacionární fáze s velikostí pórů 150 Å nedošlo ke ztrátě retence v porovnání s 80 Å [33, 35].

D) *polárně „endcappované“ stacionární fáze*

„Endcapping“ polární nebo hydrofilní funkční skupinou (např. diol) vede k lepší smáčivosti stacionární fáze, a umožní tak i lepší interakci analytu s alkylovým řetězcem (např. C18). Výrobci tento typ stacionární fáze označují často jako Aqua nebo Hydro [1, 34].

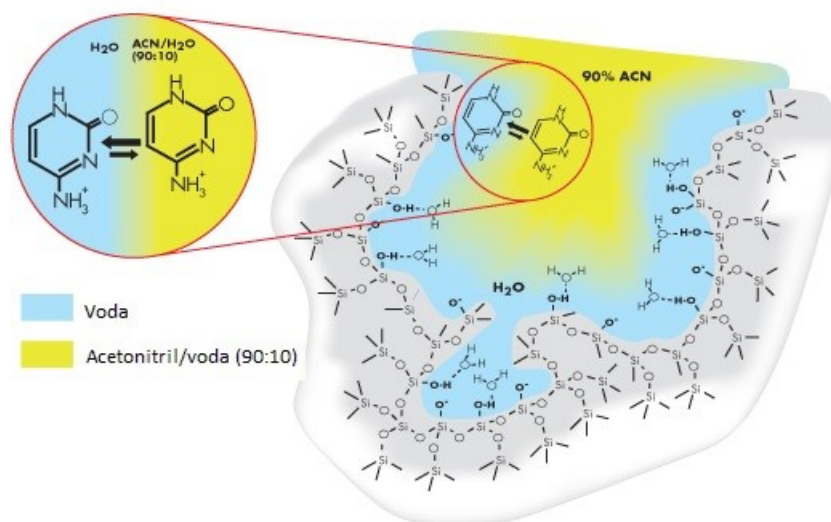
E) *stacionární fáze s vloženou polární funkční skupinou*

Populární se stávají stacionární fáze, které mají polární funkční skupinu (např. amid, amin, ether nebo močovinu) včleněnou do alifatického řetězce v blízkosti povrchu částice. Tato funkční skupina umožňuje solvataci povrchu, a navíc stíní volné silanolové skupiny, čímž brání jejich nežádoucím interakcím s analytem [1].

3.1.2.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

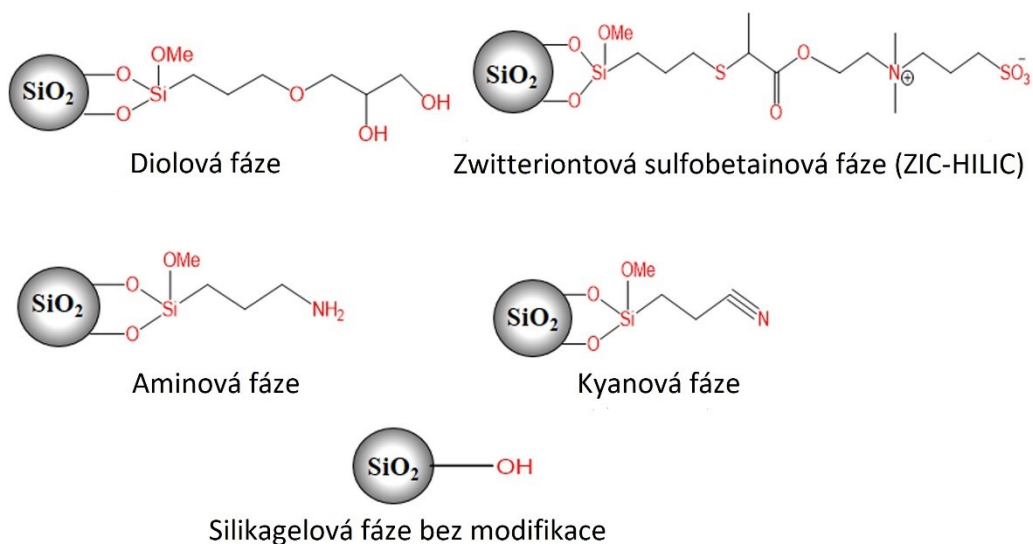
Velmi dobrou retenci i vysoce polárních látek poskytuje hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, Hydrophilic Interaction Chromatography). Tento chromatografický přístup byl poprvé použit Alpertem v roce 1990 [36]. Avšak stále se vedou dohady o mechanismu separace. Obecně HILIC využívá polární stacionární fáze v kombinaci s vodně-organickou mobilní fází. Často se jedná o acetonitril (50–99 %) s vodou nebo pufrem. Navrhovaným mechanismem separace analytů je, že dochází

k jejich rozdělování mezi hydrofobní část mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvu (tvořenou vodnou složkou), která je imobilizována na povrch polární stacionární fáze. Vytváří se tak difuzní vodná vrstva s koncentračním gradientem vody směrem do mobilní fáze [1, 37]. K separaci látek se uplatňují specifické i nespecifické interakce se stacionární fází i vodnou vrstvou na jejím povrchu. Lze uvést mechanismy jako je například rozdělování, adsorpce, vznik vodíkových vazeb, van der Waalsovy síly a elektrostatické interakce se stacionární fází i vodnou vrstvou na jejím povrchu [38, 39]. Tento princip je názorně uveden na Obr. 7.



Obr. 7: Princip HILIC. Převzato ze zdroje [40] a upraveno.

Stacionární fáze vhodné pro použití v módu HILIC mají polární charakter. Mezi oblíbené patří kolony plněné nemodifikovaným silikagelem. Dále jsou komerčně dostupné různé modifikace silikagelu, například aminopropylými, amidovými, nitrilovými, diolovými, karbamátovými, polyethylenglykolovými a dalšími polárními funkčními skupinami. Podle modifikací je pak možné tyto stacionární fáze dělit na neutrální, nabitě a zwitterionty. Lze použít materiály hybridní nebo polymerní. Využívají se také kolony ve formátu monolitů na bázi silikagelu nebo organických polymerů [38, 40]. Příklady některých modifikací uvádí Obr. 8.



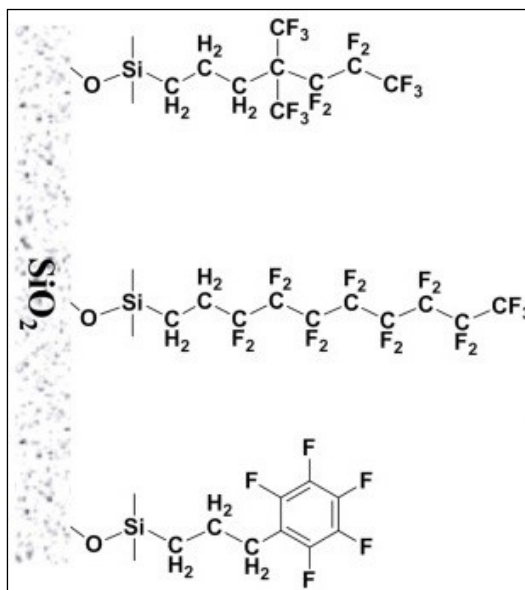
Obr. 8: Vybrané modifikace silikagelu používané pro HILIC.
Převzato ze zdroje [41] a upraveno.

V dnešní době HILIC zaznamenává poměrného vzestupu, což dokazuje i velký počet nově vyvinutých kolon uváděných na trh. To vede také k rozšiřování spektra aplikací. Z počátku se tento přístup uplatňoval zejména k separaci aminokyselin, sacharidů a peptidů [38]. Velkou výhodou použití HILIC módu pro separaci polárních látek lze najít v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Mobilní fáze, která je zde tvořená velkým podílem organické složky je dobře kompatibilní s ionizací elektrosprejem. HILIC poskytuje také větší variabilitu ve složení mobilní fáze pro separaci polárních látek v porovnání se stacionárními fázemi tvořenými alkylovými řetězci (např. C18), kde lze často pro dostatečnou retenci použít pouze 100% vodnou mobilní fázi. Ovšem jsou zde i určité nevýhody, které stále spoustu běžných uživatelů HPLC odrážejí od jejich použití. Jedná se například o požadavek pro rozpouštědlo vzorku, které by mělo být nejlépe shodné s mobilní fází. Dále pak možnost dávkovat pouze malé objemy vzorku a dlouhá ekvilibrace kolony [1, 38, 40].

3.1.2.3 Fluorované stacionární fáze

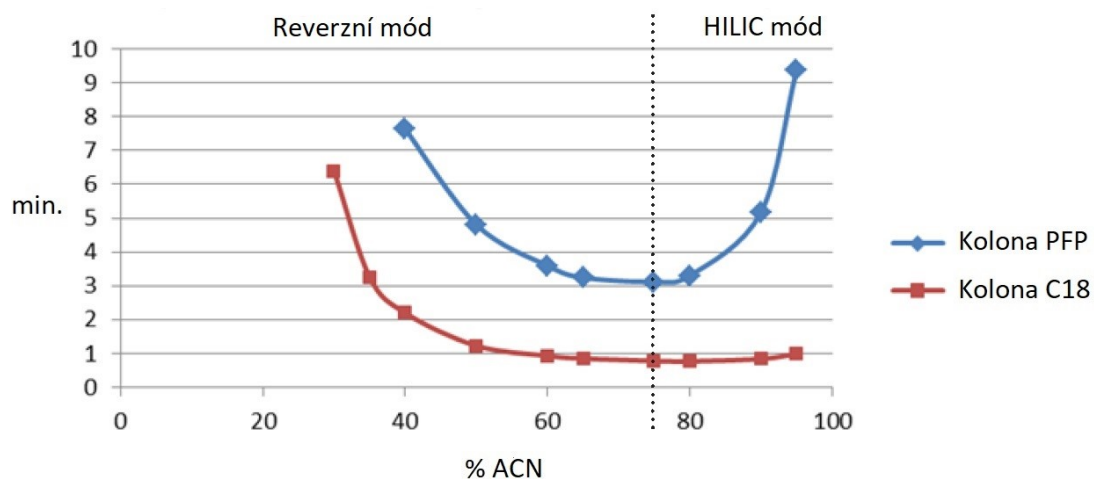
Stacionární fáze na bázi fluoru představují vhodnou alternativu v případech, kdy retence a separace polárních látek na klasických alkylových fázích (např. C18, C8) je nedostatečná. Fluorované stacionární fáze poskytují odlišnou selektivitu, díky přítomnosti atomů fluoru. Separční mechanismy jsou stále studovány. Kromě

hydrofobních interakcí se uplatňují také například dipól-dipól a iontově výměnné interakce. Dochází i k interakcím mezi fluory fluorovaných analytů a fluory stacionární fáze, což vede k lepší retenci a separaci těchto látek ve srovnání s klasickými alkylovými fázemi. Dostupné jsou dva typy silikagelových fluorovaných stacionárních fází: na bázi alkylu a fenylu (Obr. 9). Fenylová funkční skupina může být k silikagelu připojena různě dlouhými nefluorovanými alkylovými řetězci [42, 43].



Obr. 9: Fluorované stacionární fáze.
Převzato ze zdroje [44] a upraveno.

V současné době mají největší uplatnění pentafluorfenylové stacionární fáze (PFP, F5) (Obr. 9, spodní část). Fenylová funkční skupina poskytuje navíc π - π interakce výhodné pro separaci aromatických látek. Navíc tato modifikace umožňuje lepší selektivitu pro strukturální a geometrické izomery díky rigiditě fluorfenylového ligandu. V závislosti na složení mobilní fáze vykazuje tento typ stacionární fáze bimodální retenční mechanismy a lze ji uplatnit pro separaci v reverzním i normálním chromatografickém módu. Některé látky tak v závislosti na složení mobilní fáze vykazují tzv. „U“ retenční profil (Obr. 10). Je odolná proti „dewetting“ fenoménu a její použití je možné i při pouze vodných mobilních fázích. Řada aplikací poukazuje také na možnost využití v HILIC módu [43].



Obr. 10: Ukázka "U" retenčního profilu imipraminu na PFP koloně. Porovnání s C18 stacionární fází, která toto chování nevykazuje. Převzato ze zdroje [45] a upraveno.

Pentafluorfenylové stacionární fáze jsou výhodné například pro separace polárních halogenových a aromatických sloučenin i polárních bazických analytů (například aminosloučenin) a své uplatnění nacházejí v řadě odvětví [42–44].

3.2 Cílové analyty

3.2.1 Vankomycin

Vankomycin představuje tricyklické glykopeptidové baktericidní antibiotikum, které je produkované určitými kmeny mikroorganismu *Amycolatopsis orientalis*. Je účinný proti gram pozitivním bakteriím, jako například *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* a *Clostridium difficile*. Vankomycin je indikován k léčbě závažných a/nebo rezistentních stafylokokových, streptokokových a enterokokových infekcí. Nebo může být podáván u pacientů s alergií na penicilin. Nezastupitelné místo má při terapii meticilin-rezistentních stafylokokových infekcí (MRSA), jako například při sepsi, pneumonii, infekční endokarditidě, infekcích měkkých tkání a kůže či osteomyelitidě. Ovšem díky vzestupu používání vankomycinu v posledních 20 letech, jako antibiotika první volby pro terapii invazivních stavů způsobených právě MRSA, došlo k rozvoji vzniku rezistencí [46–49].

Mechanismus účinku vankomycinu je zprostředkován inhibicí syntézy buněčné stěny bakterií pomocí vysokoafinitní vazby na D-alanyl-D-alanin prekurzorové jednotky. Navíc narušuje integritu bakteriální buněčné membrány, což vede k depolarizaci, permeabilizaci a rychlé buněčné smrti [50].

Z farmakokinetického-farmakodynamického hlediska je účinnost vankomycinu závislá na koncentraci i čase. Jeho antimikrobiální aktivita není závislá na absolutní koncentraci dosažené po podání, ale na velikosti poměru plochy pod křivkou koncentrace antibiotika v časovém horizontu 0–24 hodin (AUC) a minimální inhibiční koncentraci (MIC) [50, 51]. Za doporučenou hodnotu je považován index $AUC_{0-24}/MIC \geq 400$ [47, 51].

Celková biologická dostupnost vankomycinu po perorálním podání je velmi nízká (neabsorbuje ze zažívacího traktu), a proto je využíván k terapii lokálních střevních onemocnění. Pro léčbu systémové infekce se uplatňuje intravenózní podání, kde by délka trvání infuze měla trvat alespoň 1–2 hodiny (zejména u vyšších dávek) [51, 52]. Po intravenózním podání je vankomycin rozsáhle distribuován a ve většině tělních

kompartmentů dosahuje terapeutických hladin. Inhibičních koncentrací je tak dosaženo v peritoneálním a pleurálním výpotku, ascitu, synoviální tekutině, moči atd. Pouze přestup přes hematoencefalitickou bariéru je za fyziologického stavu velmi nízký. Může se zvyšovat v případě zanícených mozkových blan. Přibližně 80–90 % vankomycinu se z těla eliminuje glomerulární filtrací v metabolicky nezměněné formě s poločasem 4–6 hodin u pacientů s normální renální funkcí. V případě renální insuficience může být tato doba prodloužena až na 7 dní [50, 53].

3.2.1.1 Terapeutické monitorování vankomycinu

Vankomycin, stejně jako některá další glykopeptidová a aminoglykosidová antibiotika, patří do skupiny léčiv s úzkým terapeutickým indexem. U těchto látek je doporučováno monitorování hladin v biologických tekutinách během léčby. Příliš nízká dávka může vést k nedostatečnému antimikrobiálnímu účinku, a s tím souvisejícím zvýšeným rizikem vzniku rezistence. Naopak vysoká hladina může způsobovat nefrotoxicitu, případně ototoxicitu, zejména pokud je vankomycin podáván v kombinaci s dalšími nefrotoxickými léčivými (např. aminoglykosidy) [47, 54].

Pro úpravu dávkování je uváděna celá řada různých doporučení. Avšak z důvodu široké intraindividuální a interindividuální variability farmakokinetiky vankomycinu je doporučováno terapeutické monitorování hladin u každého pacienta. Pouze tak může být dosaženo optimálních terapeutických hladin i například u pacientů s variabilními nebo měnícími se eliminačními schopnostmi. Zohlednit je třeba zvláštní patologické stavy, jako například sepse, popáleniny, obezita, endokarditida, cystická fibróza nebo oblast geriatrické a pediatické [47, 55, 56].

Pro terapeutické monitorování hladiny vankomycinu je doporučováno sledovat údolní oblast koncentrace. Stanovení tzv. „peakové“ (horní) koncentrace má pouze malý význam. Monitorování by mělo být prováděno v ustáleném stavu, tj. před podáním čtvrté dávky. O optimálních sérových hladinách vankomycinu se vedou stále diskuze. Dříve byla doporučována hladina 5–10 mg/l (3,5–6,9 μmol/l) z důvodu obavy z nefrotoxicity. Avšak novější data ukázala, že nefrotoxicita je při monoterapii vankomycinem výjimečná. Také údolní koncentrace 5–10 mg/l by mohla být nedostatečná pro terapii a vést k vyššímu riziku vzniku rezistence. Proto je nyní při

podávání více denních dávek doporučována vyšší údolní koncentrace a to 10–15 mg/l (7,0–10,4 $\mu\text{mol/l}$). A v případě invazivních infekcí nebo méně citlivých patogenů až 15–20 mg/l (10,4–14,0 $\mu\text{mol/l}$) [47, 49, 51, 54]. Stanovení jsou prováděna v séru nebo plazmě.

3.2.2 Stanovení vankomycinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v biologických tekutinách

Pro terapeutické monitorování hladin vankomycinu jsou používány imunochemické metody a kapalinová chromatografie. Imunochemické metody jsou stále velmi rozšířené v rutinních biochemických laboratořích. Důvodem je jednoduchost jejich provedení, komerční dostupnost kitů nebo automatických analyzátorů. Avšak hlavní nevýhodou je riziko vzniku tzv. zkřížených reakcí s látkami strukturou podobnými vankomycinu. Jedná se například o produkty vzniklé při degradaci nebo výrobním procesu. Lze uvést, že v poslední době většina publikovaných metod pro stanovení vankomycinu využívá kapalinovou chromatografii. Ty jsou v porovnání s imunochemickými metodami více selektivnější a dovolují stanovovat i velmi nízké koncentrace analytů s vysokou precizností a spolehlivostí v rozdílných biologických matricích [57–59]. Přehled vybraných publikovaných metod je uveden v Tab. 1, Tab. 2 a v přehledovém článku Javorská a kol. (2016) [59].

Vankomycin vykazuje absorpční maximum zejména při 200 nm a dále pak 280 nm. Avšak metody využívající UV detekci v oblasti 200 nm se mohou potýkat s problémem vyššího rizika interferencí pocházejících z matrice vzorku, a navíc je tato vlnová délka blízká hodnotě „cut off“ některých rozpouštědel používaných v kapalinové chromatografii (např. acetonitril „cut off“ 190 nm). Z toho důvodu byla častěji aplikována UV detekce při vyšší vlnové délce nebo v oblasti druhého absorpčního maxima vankomycinu (280 nm) [60–65]. Dále byly publikovány LC-MS/MS metody, které v porovnání s UV detekcí poskytují často vyšší citlivost. Pro korekci matricových efektů a zvýšení přesnosti stanovení jsou doporučovány izotopicky značené vnitřní standardy. Avšak v případě vankomycinu je dostupnost tohoto typu standardu problematická. Proto řada autorů použila strukturně podobné látky. Například König a

kol. (2013) použili vankomycin-glycin, který si sami syntetizovali [66]. Dále byl uveden vankomycinu-des-leucin [57], aminopterin [67], teikoplanin [68], polymyxin B [69] atd.

Pro chromatografickou separaci vankomycinu v biologických tekutinách je nejčastěji využíván reverzní chromatografický mód v kombinaci s C18 stacionární fází [59, 61, 65, 70–73], méně často HILIC chromatografie [57, 74]. Složení mobilní fáze vyplývá z typu detekce. Pro UV detekci v kombinaci s C18 stacionární fází byly používány zejména fosfátové pufrы o pH v rozsahu 2,8–7 mísené s acetonitrilem [62, 64, 70, 75]. Pro MS detekci bylo časté složení mobilní fáze z 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitrilu [57, 65–69].

Stanovení hladin vankomycinu bylo nejčastěji prováděno v séru [66, 68, 75–79], plazmě [57, 62, 63, 65, 75, 78, 80–82] a moči [63, 68]. Dále pak byly publikovány například stanovení v cerebrospinální tekutině [80], bronchoalveolární laváži [70] a tkáních [62, 67, 83]. Úprava vzorku před analýzou byla často provedena pomocí jednoduché deproteinace. Používanými deproteinačními činidly byly organická rozpouštědla jako acetonitril [57, 60, 69, 70], kyselina trichloroctová (5–35%) samotná [66, 81, 84] nebo v kombinaci s methanolem [85], kyselina chloristá s methanolem [62] nebo trifluoroctová kyselina s methanolem [86]. Také byla využívána extrakce na tuhou fázi a to především ve spojení s UV detekcí [63, 77, 83]. Volný vankomycin byl extrahován pomocí ultrafiltrace [64, 76, 82, 87, 88]. Zajímavým přístupem publikovaným Andrigueti a kol. (2019) bylo použití objemového absorpčního mikrovzorkování (z angl. VAMS, Volumetric Absorptive Microsampling). Tento přístup měl řešit problém s nedostupností terapeutického monitorování vankomycinu v některých lokalitách, kde by transport séra nebo plazmy do specializované laboratoře mohl být problematický. Vzorek plazmy byl po centrifugaci plné krve odebrán pomocí VAMS odběrového systému, který po zaschnutí umožnil transport s ověřenou stabilitou vankomycinu a kreatininu až dva týdny při 45 °C. K následné extrakci byl použit roztok methanolu a vody (1 : 1 v/v) s 0,1% kyselinou mravenčí. Koncentrace obou látek po extrakci z VAMS se lišily od hodnot získaných z plazmy, která byla extrahována přímo a proto byla nutná korekce výsledků pomocí přepočítávacího faktoru [65].

Tab. 1: Přehled vybraných publikovaných chromatografických metod pro stanovení vankomycinu v biologických tekutinách

Analyt	IS	Matrice	Kolona	Mobilní fáze	Detekce	t _R (min.)	Lin. rozsah (mg/l)	Ref.
Vankomycin	<i>p</i> -aminobenzoová kyselina	Sérum	ACQUITY BEH C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 μm)	A: 0,005 mol/l PF (KH ₂ PO ₄) pH 2,5 B: ACN gradient, 0,3 ml/min	UV 230 nm	2,6	1,0–100	[60]
Vankomycin	Kofein	Plazma	Spherisorb C18 ODS (150 × 4,6 mm, 5 μm)	A: 0,05 mol/l PF (NH ₄ H ₂ PO ₄) B: ACN izokrat, A : B 89 : 11, 1,2 ml/min 20 °C	UV 240 nm	8,5	1,0–80	[70]
Vankomycin	Kofein	Bronchoalveolární laváž	Spherisorb C18 ODS (150 × 4,6 mm, 5 μm)	A: 0,05 mol/l PF (NH ₄ H ₂ PO ₄) pH 5,5 B: ACN izokrat, A : B 89 : 11, 1,2 ml/min 20 °C	UV 198 nm	14,4	0,1–10	[70]
Vankomycin	Zidovudin	Plazma	Supelcosil C18 (150 × 4,6mm, 2,7μm)	A: 20 mmol/l octan amonný pH 4 B: MeOH izokrat, A : B 88 : 12, 1,5 ml/min 50 °C	UV 240 nm	4,0	1–100	[72]
Vankomycin	Vankomycin-des-leucin	Plazma	Acquity UPLC BEH HILIC (100 × 2,1 mm, 1,7 μm)	A: ACN B: 0,1% FA v H ₂ O gradient 0,45 ml/min 50 °C	ESI-MS/MS	2,7	0,3–100	[57]
Vankomycin Kreatinin	Kreatinin-d3	Plazma	Accucore C18 (100 × 2,1 mm, 2,6 μm)	A: 0,1% FA v H ₂ O B: 0,1% FA v ACN gradient, 0,4 ml/min 40 °C	ESI-MS/MS	3,9	1–100	[65]
Vankomycin	Aminopterin	Plazma, kostní a tuková tkáň	Luna C18 (50 × 2 mm, 5 μm)	A: 0,05% FA v H ₂ O B: MeOH gradient, 0,3 ml/min	ESI-MS/MS	2,4	0,05–50	[67]
Vankomycin Teikoplanin Daptomycin Kolistin	Polymyxin B	Plazma	Kinetex C18 (50 × 2,1 mm, 2,6 μm)	A: 0,1% FA v H ₂ O B: 0,1% FA v ACN gradient, 0,3 ml/min 40 °C	ESI-MS/MS	1,6	0,5–100	[69]

IS vnitřní standard, PF fosfátový pufr, ACN acetonitril, FA kyselina mravenčí, MeOH methanol, ESI-MS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, t_R retenční čas

Tab. 2: Přehled vybraných publikovaných metod pro úpravu vzorku před analýzou vankomycinu

Analyt	Matrice, objem vzorku	Technika	Výtěžnost	Detekce	Ref.
Vankomycin	Sérum, 200 μ l	PP: ACN	62,9 % (CV 5,6 %)	UV	[60]
Vankomycin a další léčiva	Plazma, 1000 μ l Moč, 1000 μ l	SPE: Narc-2 eluce MeOH	85 % plazma 89 % moč	UV	[63]
Vankomycin	Plazma, sérum, bronchoalveolární laváž, 200 μ l	PP: ACN	85–90 %	UV	[70]
Vankomycin	Plazma, 50 μ l	PP: ACN a následné zakoncentrování	95–109 %	UV	[72]
Vankomycin	Sérum, 500 μ l	SPE: Oasis [®] MCX eluce: MeOH s 5% NH ₃	98,2–103,9 %	UV	[76]
Vankomycin volný	Plazma, 500 μ l	UF: Amicon Centrifree Micropartition 10 kDA	97,7–104,1 %	UV	[88]
Vankomycin	Plazma, 40 μ l	PP: ACN	106,3 % (CV 4,8 %)	MS/MS	[57]
Vankomycin	Sérum, 75 μ l	PP + UF: Amicon Ultra-0,5 ml 10k	99–104 %	MS/MS	[66]
Vankomycin	Plazma, 50 μ l	PP: MeOH	\pm 100 %	MS/MS	[67]
Vankomycin a další léčiva	Plazma, 100 μ l	PP: ACN	70–110 %	MS/MS	[69]
Vankomycin a další léčiva	Plazma, 50 μ l	PP: ACN a následné ředění	77–80 %	MS/MS	[73]
Vankomycin Polymyxiny	Plazma, 50 μ l	PP: 30% TCA	96–101 %	MS/MS	[81]

PP deproteinace, UF ultrafiltrace, SPE extrakce na tuhou fázi, ACN acetonitril, MeOH methanol, TCA trichloroctová kyselina

3.2.3 L-arginin, L-ornitin, L-citrulin a agmatin

L-arginin (2-amino-5-guanidinovalerová kyselina) je α -L-aminokyselina s bazickou guanidinovou skupinou v postranním řetězci, která vzniká v ledvinách z L-citrulinu. V játrech probíhá syntéza L-argininu prostřednictvím močovinového cyklu, ale z důvodu vysoké aktivity enzymu arginasa bývá rychle rozštěpen na L-ornitin a močovinu. L-ornitin ((S)-2,5-diaminopentanová kyselina) představuje bazickou α -L-aminokyselinu se dvěma aminoskupinami. Na rozdíl od L-argininu se nejedná o aminokyselinu využívanou pro stavbu proteinů. L-citrulin (2-amino-5-(karbamoylamino)pentanová kyselina) je L-alfa-aminokyselina, která vzniká z L-ornitinu a karbamoylfosfátu v močovinovém cyklu. Také se nejedná o proteinogenní aminokyselinu, ale často se vyskytuje v proteinech jako součást posttranslačních modifikací. Agmatin (4-aminobutyl guanidin) patří do skupiny primárních aminů. Vzniká dekarboxylací L-argininu působením mitochondriálního enzymu arginin dekarboxylasa [89–93]. Struktury jednotlivých látek a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v kap. 4.2.1.

3.2.3.1 Souvislost L-argininu a jeho metabolických derivátů (L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu) s hojením ran

Hojení ran je komplexní proces, který může být ovlivněný řadou faktorů. Tyto faktory lze rozdělit jako lokální, tj. tkáňová perfuze, oxygenace, infekce, bolestivost atd. nebo systémové jako je například věk, výživa, kouření a přítomnost dalších nemocí [94].

Aminokyselina L-arginin je významně zapojena do řady biochemických a metabolických procesů. Představuje významný mediátor procesu hojení rány. Je prekurzorem pro oxid dusnatý (NO), prolin, hydroxyprolin a polyaminy, stimuluje sekreci růstového hormonu a inzulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1). Významně tak ovlivňuje všechny fáze procesu hojení [95–97].

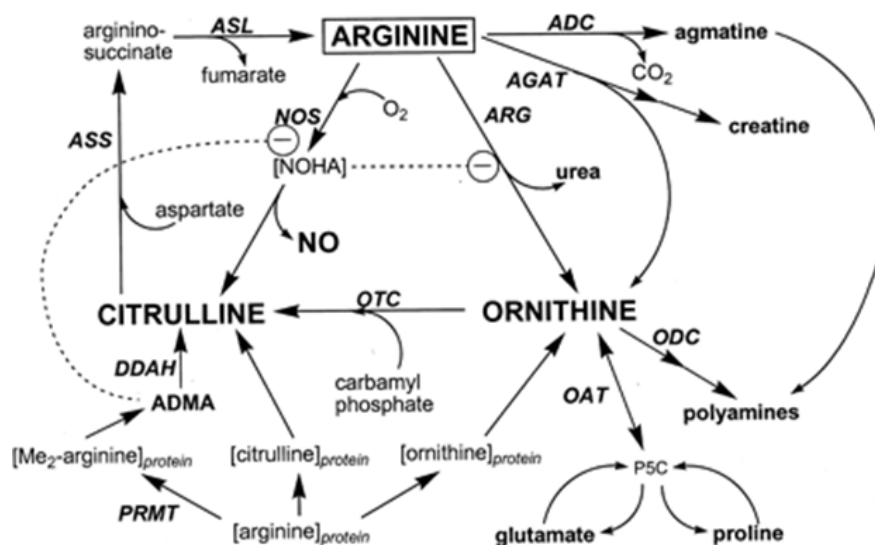
V organismu se uplatňují tři katabolické dráhy L-argininu. Jednou z nich je metabolická dráha, kdy pomocí syntasy oxidu dusnatého (NOS) vzniká NO. U savců existují tři izoformy NOS: neuronální NOS (nNOS/NOS1), endoteliální NOS (eNOS/NOS3)

a indukovatelná NOS (iNOS). Hlavním zdrojem NO v ranách je iNOS. Nejvyšší hladina NOS se objevuje během 24 až 72 hodin od poranění [92, 93, 95, 97]. Tato reakce uvolňuje také L-citrulin, který může být následně recyklován na L-arginin [97]. NO je signální molekula, která se uplatňuje mimo jiné při imunitní reakci, angiogenezi, tvorbě granulační tkáně a epitelizaci, což jsou zásadní procesy doprovázející hojení rány [96]. Bylo prokázáno, že NO hraje důležitou roli v regulaci průtoku krve cévami, a tím i krevního tlaku. Je syntetizován v endoteliálních buňkách, ze kterých následně difunduje a vyvolává relaxaci v sousedních svalových buňkách vedoucí k dilataci cév [98].

Ve druhé dráze hraje roli enzym arginasa a dochází k produkci L-ornitinu a následně prolinu, který je hlavní komponentou kolagenu [95]. L-ornitin je prekurzorem putrescinu a dalších polyaminů, které jsou potřebné pro replikaci DNA a dalších buněčných procesů [92]. Tato dráha se začíná uplatňovat později, a to zhruba 72 hodin od poranění. Podporuje replikaci fibroblastů a tvorbu kolagenu [89, 95].

Nejpozději objevenou dráhou je cesta dekarboxylace L-argininu enzymem arginin dekarboxylasou za vzniku biogenního aminu agmatinu. U savců byl objeven teprve v roce 1994, kdy byl izolován z mozkové tkáně. V nízkých koncentracích (pmol/l–nmol/l) se vyskytuje v mnoha orgánech [93]. V lidském organismu je agmatin významným neurotransmiterem s afinitou, například k α 2-adrenoreceptorům a imidazolinovým receptorům [93, 99]. Hraje důležitou roli v regulaci buněčné produkce NO, kde působí jako slabý kompetitivní inhibitor izoform NOS. Podporuje vazodilataci a snížení krevního tlaku. Reguluje syntézu polyaminů, kdy prostřednictvím indukce antizymu ornitin dekarboxylasy inhibuje ornitin dekarboxylasu podílející se na jejich syntéze. Také indukuje spermidin/spermin acetyltransferasu [97, 99, 100].

Degradaci agmatinu katalyzuje enzym agmatinasa za vzniku močoviny a polyaminu putrescinu nebo je oxidován diamin oxidasou (metabolická cesta syntézy γ -aminomáselné kyseliny) [93]. Vzhledem k poměrně nedávnému objevu agmatinu v lidském organismu (1994) není stále ještě objasněna jeho úplná role v různých orgánových systémech. Schéma metabolismu L-argininu je uvedeno na Obr. 11.



Obr. 11: Schéma metabolismu L-argininu. Převzato ze zdroje [101].

3.2.3.2 Chronická rána

Proces hojení rány se obecně skládá z několika se překrývajících fází: hemostáza, zánět, proliferace a maturace. Hojení chronické rány vykazuje určité odchylky od hojení fyziologického a je významně delší. Fyziologický proces je v jednom nebo několika místech narušen (často stagnuje v určité fázi hojení), neprobíhá v daném časovém sledu a rámci, případně se formuje méněcenná tkáň [92, 94, 102–104].

Za chronickou ránu je považováno kožní poškození, které i přes adekvátní léčbu přetrvává déle než 6 týdnů nebo často se opakující kožní defekt [104]. Mezi tyto rány se řadí například dekubity, bércové vředy, diabetické defekty, rozpadlé operační rány, chronické póurazové rány, eventuálně i rozpadající se nádory na povrchu těla (Obr. 12.) Chronické rány se vyskytují napříč věkovými kategoriemi, často ale představují zdravotní problém spojený zejména v souvislosti se stářím. Otevřená rána je místem možného vstupu mikroorganismů do těla a může vést k rozvoji dalších infekčních komplikací. Bolest a sekrece z rány, má signifikantní dopad na kvalitu života nemocného [102]. Léčba chronických ran je komplikovaná, protože chronické rány jsou často doprovázeny přidruženými nemocemi, jako ischemie, diabetes či bakteriální kolonizace. Pacienti s chronickými ranami představují velký problém ve zdravotnictví. Dlouhodobé hospitalizace vytváří vysoké náklady a snižují kvalitu života pacienta. Proto je důležité

získávání nových informací v oblasti hojení chronických ran a metod vhodných pro jejich monitorování [94, 95, 104].



Obr. 12: Chronické rány
Laskavě poskytnuto prof. MUDr. Lubošem Sobotkou, CSc.

3.2.4 Stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v biologické matrici

V klinické praxi patří stanovení aminokyselin a jejich metabolitů v různých biologických matricích k rutinně využívaným vyšetřením. Jakožto prediktivní markery řady zdravotních stavů jsou stále i v popředí zájmu klinického výzkumu.

Kapalinová chromatografie patří mezi velmi rozšířené techniky kvantitativního stanovení aminokyselin a jejich metabolitů. Jedná se o senzitivní metodu s vysokým rozlišením umožňující dosáhnout krátkých časů analýz. Nicméně, pouze několik aminokyselin je možné detekovat přímo konvenčními detektory používanými ve spojení s HPLC (UV/VIS spektrofotometry, fluorimetry nebo elektrochemické detektory). U ostatních aminokyselin je nutné zahrnout krok derivatizace. V současné době se výrazně do popředí dostává stanovení aminokyselin pomocí hmotnostní spektrometrie (často ve spojení s LC nebo GC). Příkladem využití této techniky v rutinní praxi může být neonatální screening vrozených metabolických poruch [105].

Pro stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v biologickém materiálu byla publikována řada metod. V Tab. 3 je uveden přehled vybraných metod zaměřených na kapalinovou chromatografii bez derivatizace. Hlavním problémem při analýze těchto látek je jejich vysoká polarita, a s tím související problém s retencí

v reverzním chromatografickém módu. Tab. 4 uvádí přehled vybraných přístupů bez derivatizace pro extrakci uvedených látek v biologických tekutinách. Žádná z těchto metod se nezabývala analýzou všech čtyř uvedených cílových analytů v exsudátu z chronických ran současně.

3.2.4.1 Reverzní chromatografie bez nutnosti derivatizace

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, retence a separace námi vybrané skupiny polárních analytů bez derivatizace v reverzním módu není jednoduchá. Pro dostatečné zadržení látek polárního charakteru v reverzním módu, zejména při aplikaci C18 stacionární fáze, je vyžadována převážně vodná mobilní fáze. Ta ovšem není zcela kompatibilní s klasickou C18 stacionární fází. Jedním z řešení je možnost, kterou publikovali Andrade a kol. (2015). Pro separaci L-argininu a jeho methylovaných derivátů použili stacionární fázi C18 (Nucleosil C18, Teknokroma, Barcelona, Španělsko) v kombinaci s izokratickou elucí 0,2% trifluoroctové kyseliny ve vodě. Avšak mezi nástřiky byl vložen proplach kolony 90% acetonitrilem [106].

Dále jsou využívány C18 stacionární fáze s určitými modifikacemi, které umožňují kompatibilitu se 100% vodnými mobilními fázemi. Příkladem takové metody je práce publikovaná Wang a kol. (2010), kdy pro separaci L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a dalších látek byla využita izokratická eluce 100% vodnou mobilní fází obsahující 0,03% kyselinu trifluoroctovou v kombinaci s kolonou Atlantis dC18 (Waters, USA) [107]. Tato kolona obsahuje difunkčně vázanou C18 funkční skupinu, což umožňuje stabilitu ve 100% vodném prostředí. Dále byla C18 stacionární fáze použita v metodách s mobilní fází tvořenou různými podíly vodné a organické složky. V případě námi zvolených analytů vede toto složení mobilní fáze k jejich velmi nízké retenci a eluci analytu dochází často v mrtvém objemu, což je patrné i z některých publikovaných prací [108, 109]. Liu a kol. (2013) vyvinuli metodu, kdy pro separaci polyaminového metabolomu (včetně látek našeho zájmu: L-arginin, L-ornitin a agmatin, kromě L-citrulinu) byla použita gradientová eluce mobilní fází tvořenou 0,05% kyselinou heptafluormáseľnou (HFBA) ve vodě (A složka) a stejnou koncentrací této kyseliny v methanolu (B složka). Zvýšená retence látek byla zapříčiněna použitím HFBA, která se zde uplatnila jako ion-párové činidlo [110].

Dalším typem stacionárních fází využívaných v reverzním módu pro separaci nederivatizovaných aminokyselin jsou fenylové stacionární fáze. Pro dostatečnou retenci polárních analytů bylo nutné použít mobilní fáze tvořené převážně vodnou složkou [111, 112]. Příkladem je metoda pro stanovení L-argininu a dalších látek v plazmě, publikovaná Midttun a kol. (2013), kdy mobilní fáze byla tvořena 2,5 % methanolu v 150 mmol/l kyselině octové (pH 5,2). Izokratickou elucí bylo dosaženo retenčního času L-argininu 1,7 min. při délce a průměru kolony 150 × 4,6 mm, 3 μm velikosti částic a průtoku 1,2 ml/min [111].

3.2.4.2 Chromatografické metody v reverzní módu s derivatizací

Jedním z řešení problému separace polárních látek na C18 stacionární fázi představuje technika předkolonové derivatizace. Pomocí chemické reakce je možné snížit polaritu daných analytů a vnesením chromoforu umožnit UV nebo fluorescenční detekci. Častým derivatizačním činidlem využívaným v HPLC-FD metodách pro stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu je *o*-ftaldialdehyd [113–116]. Dále je oblíbenou reakcí butylace, kdy jsou aminokyselin převedeny na butylestery daných aminokyselin [115]. Dalším používaným derivatizačním činidlem je 9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid nebo 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonyl chlorid (dansyl chlorid). Dansyl chlorid je vhodný pro derivatizaci aminů a byl využitý v HPLC-FD metodě publikované Feng a kol. (1997) pro stanovení agmatinu a dalších látek v plazmě a mozkové tkáni [115]. Debats a kol. (2006) aplikovali pro stanovení L-argininu, L-ornitinu a L-citrulinu v exsudátu z ran HPLC-FD metodu původně vyvinutou pro měření těchto látek v plazmě [117]. Metoda byla publikována van Eijk a kol. (1993) a pro separaci těchto analytů v plazmě byla použita C18 stacionární fáze po derivatizaci *o*-ftaldialdehydem [118]. Chromatografický záznam a validační parametry pro metodu aplikovanou na exsudát z ran nebyly v publikaci Debats a kol. (2006) uvedeny [117]. Vložení kroku předkolonové derivatizace do metody sebou přináší řadu nevýhod, zejména pokud je prováděna off-line. Jedná se o experimentálně a často i časově náročnou proceduru. Derivatizační reakci je nutné optimalizovat tak, aby probíhala kvantitativně, byla selektivní, nadbytek derivatizačního činidla byl dobře separovaný od cílových analytů, výsledný derivát byl dostatečně stabilní atd. [1]. Při vývoji metod

určených pro rutinní použití s velkými sériemi vzorků je proto lepší volit metody bez derivatizace.

3.2.4.3 Chromatografické metody v módu HILIC

Z charakteru těchto látek se pro jejich separaci jeví nejvhodněji hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). Zatím nebyla publikovaná práce, která by se zabývala analýzou všech čtyř námi zvolených analytů v jedné metodě s využitím HILIC. Nejčastěji analyzovanou látkou je L-arginin v kombinaci s dalšími látkami. Jako stacionární fáze v HILIC módu byl nejčastěji využíván nemodifikovaný silikagel nebo modifikovaný funkčními skupinami (např. amid, amin).

Organickou složku mobilní fáze představoval nejčastěji acetonitril. Jednalo se buď o samotný acetonitril [119, 120], nebo častěji s přídavkem další látek. Například byla využita kyselina mravenčí [121], trifluoroctová kyselina v kombinaci s octovou kyselinou [122, 123] nebo mravenčan amonný v 85% acetonitrilu s přídavkem kyseliny mravenčí [124]. Dále také směs acetonitrilu s methanolem a kyselinou mravenčí [125].

Vodnou složku mobilní fáze tvořila často voda s přídavkem kyselin o různé koncentraci: kyselina mravenčí [125], kyselina trifluoroctová [119] nebo kyselina trifluoroctová v kombinaci s kyselinou octovou [122, 123], případně s kyselinou propionovou [126]. Dále také těkavé pufrý jako mravenčan amonný s přídavkem kyseliny mravenčí [121, 124] nebo octan amonný s hydroxidem amonným [120]. K eluci analytů docházelo při izokratickém i gradientovém módu. Ve spojení s HILIC chromatografií byla využívána především hmotnostně spektrometrická detekce [127].

Stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu bylo prováděno nejčastěji v plazmě [107, 110, 119, 121–125, 128] a moči [110, 123, 128, 129], dále pak v mozkomíšním moku [126], buněčných kulturách [123], tkáních [128]. Jako jednoznačnou metodou volby pro úpravu biologického materiálu před analýzou se podle doposud publikovaných metod jevila deproteinace [120, 121, 124, 127]. Nejčastěji používaným precipitačním činidlem byl acetonitril. Dále pak kombinace deproteinace a následného odpaření [107, 110]. Dalším přístupem byla ultrafiltrace [106].

3.2.4.4 Vícemodální a chirální chromatografie bez derivatizace

Gosetti a kol. (2013) ve své práci využili vícemodální chromatografii v reverzním módu za použití slabého měniče kationtů pro separaci nederivatizovaných biogenních aminů (včetně agmatinu) v moči. Mobilní fáze byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí ve směsi metanolu a vody (20 : 80 v/v) jako složka A a 2,0% kyseliny mravenčí také ve stejné směsi (složka B). Při pH gradientové eluci, průtoku 0,4 ml/min a parametrech kolony 150 × 2,1 mm, 3 μm velikost částic bylo dosaženo retenčního času agmatinu 8,2 min. Vzorek sbírané moči byl nejprve naředěn 5,56% kyselinou trichloroctovou a po centrifugaci byl supernatant dále ředěn 1 : 10 (v/v) 0,5 mmol/l octanem amoným upraveným kyselinou octovou na pH 4,0 [129]. Chirální separace se stacionární fází tvořenou kovalentně vázaným makrocyclickým glykopeptidem teikoplaninem pro stanovení L-argininu a dalších analytů v plazmě bylo využito Marcovecchio a kol. (2008) [130].

Tab. 3: Přehled vybraných publikovaných LC-MS/MS metod pro stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v biologických tekutinách

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Retenční čas (min.)	Kalibrační rozsah (μmol/l)	Ref.
ARG, ORN, CIT a další	Atlantis dC18 100 × 4,6 mm, 3 μm	0,03% TFA v H ₂ O izokrat, 0,6 ml/min, 20 °C	ESI-MS/MS	1,7; 1,5; 1,8	10–500 (P)	[107]
ARG, ORN, AGM a další	SHIM-PACK XR-ODS 75 × 3 mm, 2,2 μm	A: 0,05% HFBA v H ₂ O B: 0,05% HFBA v MeOH gradient, 0,4 ml/min, 30 °C	ESI-MS/MS	2,02; 1,70; 1,61	ARG 0,2–71,8 (P, M) ORN 0,2–74,6 (P, M) AGM 0,005–2,19 (P) AGM 0,137–54,79 (M)	[110]
ORN	Atlantis HILIC 150 × 2,1 mm, 5 μm	A: 0,1% TFA v H ₂ O B: ACN izokrat A : B 25 : 75, 0,4 ml/min, 30 °C	APCI-MS/MS	2,15	7,5–205 (P)	[119]
ARG, ORN, CIT	Kinetex HILIC 100 × 4,6 mm, 2,6 μm	A: 5 mmol/l AmFo, 0,1% FA v H ₂ O B: 0,1% FA v ACN gradient, 0,6 ml/min, 30 °C	ESI-MS/MS	3,32; 3,29; 2,90	4–200 (P)	[121]
ARG, CIT a další	Alltima HP HILIC 150 × 2,1 mm, 3 μm	A: 0,5% AA a 0,025% TFA v H ₂ O B: 0,5% AA a 0,025% TFA v H ₂ O izokrat A : B 15 : 85, 0,25 ml/min	ESI-MS/MS	3,38; 2,82	ARG 5–200 (P, M) CIT 2–100 (P) CIT 0,2–100 (M)	[123]
ARG, ORN, CIT a další	Acquity BEH Amide 100 × 2,1 mm, 1,7 μm	A: 10 mmol/l AmFo v 85% ACN s 0,15% FA B: 10 mmol/l AmFo v H ₂ O s 0,15% FA gradient, 0,4 ml/min, 35 °C	ESI-MS/MS	10,5; 10,9; 9,0	ARG 0,1–250 (P) ORN 0,1–250 (P) CIT 0–100 (P)	[124]
ARG, ORN, CIT a další	Atlantis HILIC 100 × 3 mm, 3 μm	A: 75 % ACN, 25 % MeOH, 0,2 % FA B: 0,2% FA v H ₂ O gradient, 0,2 ml/min, 30 °C	ESI-MS/MS	6,10; 6,16; 5,61	1,625–125 (P)	[125]
ARG a další	Nucleosil SiOH 125 × 3 mm, 5 μm	H ₂ O, ACN, TFA, PA 100 : 900 : 0,25 : 10 (ml) izokrat, 0,5 ml/min	ESI-MS/MS	5,14	1,5–60 (MM)	[126]
AGM a další	SHIM-PACK XR-ODS 75 × 3 mm, 2,2 μm	A: 0,0125% PFHpA v H ₂ O B: 0,0125% PFHpA v MeOH, gradient	ESI-MS/MS	2,43	0,002–0,438 (P) 0,22–438,1 (M)	[128]
AGM a další	Acclaim Mixed Mode WCX 150 × 2,1 mm, 3 μm	A: 0,1% FA v MeOH : H ₂ O 20 : 80 (v/v) B: 2,0% FA v MeOH : H ₂ O 20 : 80 (v/v) gradient, 0,4 ml/min	APCI-MS/MS	8,2	0,014–8,76 (M)	[129]

ARG L-arginin, ORN L-ornitin, CIT L-citrulin, AGM agmatin, ACN acetonitril, MeOH methanol, AmFo mravenčan amonný, FA kyselina mravenčí, TFA trifluoroctová kyselina, PA propionová kyselina, AA kyselina octová, HFBA kyselina heptafluormáselná, PFHpA perfluorheptanová kyselina, ESI-MS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, APCI-MS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosferického tlaku, P plazma, M moč, MM mozkomíšní mok

Tab. 4: Přehled vybraných publikovaných metod pro extrakci L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v biologických tekutinách

Analyt	Matrice	Technika	V (μl)	RE (%)	Ref.
ARG, ORN, CIT a další	Plazma	PP: 10 mmol/l AmFo v 85% ACN s 0,15% FA	40	neuveďeno	[80]
ARG, ORN, AGM a další	Plazma, moč	PP: 0,1% AA v MeOH odpaření supernatantu, odparek rozpuštěn ve směsi 0,05% HFBA v MeOH a 0,05% HFBA v H ₂ O 20 : 80 (v/v)	250	ARG 52–70 ORN 55–64 AGM 67–70	[84]
ARG, ORN, CIT a další	Plazma	PP: ACN odpaření supernatantu, rozpuštění odparku v H ₂ O	100	ARG 76 ORN 79 CIT 71	[107]
ORN	Plazma	Ř: 69 μmol/l FA + 22 μmol/l AmFo v H ₂ O PP: ACN	100	neuveďeno	[119]
ARG, ORN, CIT	Plazma	PP: MeOH, Ř: 5 mmol/l AmFo	50	ARG 83–75 ORN 86–91 CIT 81–85	[121]
ARG, CIT a další	Plazma, moč, buněčné kultury	PP: 0,5% AA a 0,025% TFA v ACN	20	neuveďeno	[123]
ARG, ORN, CIT a další	Plazma	PP: 0,1% FA v IPA	25	ARG 99–112 ORN 93–97 CIT 104–107	[125]
ARG a další	Mozkomíšni mok	PP: ACN : TFA : PA, 100 : 0,025 : 1 (v/v/v)	100	neuveďeno	[126]
AGM a další	Plazma, moč, jaterní tkáň	PP: 0,2% PFHpA v MeOH, odpaření supernatantu, odparek rozpuštěn ve směsi 0,0125% PFHpA v MeOH a 0,0125% PFHpA v H ₂ O 30 : 70 (v/v) – pro plazmu a moč	250	68 (P) 64 (M)	[128]
AGM a další	Moč	Ř: 5,56% TCA, ředění supernatantu 1 : 10 (v/v) 0,5 mmol/l AmAc pH 4 (upraveno AA)	neuveďeno	100 ± 9,5	[129]

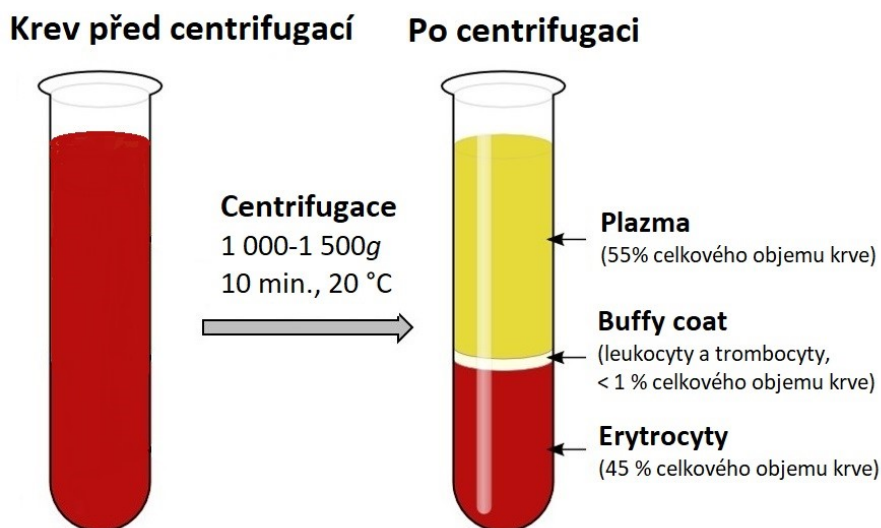
ARG L-arginin, ORN L-ornitin, CIT L-citrulin, AGM agmatin, ACN acetonitril, MeOH methanol, AmFo mravenčan amonný, FA kyselina mravenčí, IPA propan-2-ol, TFA trifluoroctová kyselina, PA propionová kyselina, AA kyselina octová, HFBA kyselina heptafluormáseľná, TCA trichloroctová kyselina, PFHpA perfluorheptanová kyselina, P plazma, M moč.

3.3 Vybrané biologické matrice používané k analýze

3.3.1 Krev

Krev představuje jednu z nejvíce využívaných biologických matric pro biochemické analýzy v rutinní praxi i výzkumu. Je tvořena plazmou a krevními buňkami (erytrocyty, leukocyty a trombocyty).

Pro analýzu lze využít plnou krev nebo její jednotlivé frakce, které lze oddělit centrifugací (Obr. 13). Centrifugace pro oddělení plazmy nebo séra se často provádí při relativní odstředivé síle (RCF) 1 000–1 500g po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Delší doba centrifugace nebo zvýšená hodnota RCF může způsobovat částečnou nebo úplnou hemolýzu. Sérum nebo plazma by měly být odděleny od krevních elementů nejpozději do 2 hodin od odběru. Pro účely tohoto typu centrifugace stačí nízkoobrátkové nebo středně obrátkové centrifugy (do 25 000g), které patří k běžnému vybavení klinických laboratoří. Pro oddělení velmi malých částic (například subcelulárních částic, virů nebo lipoproteinových vrstev) se využívají ultracentrifugy (až 1 000 000g) [131, 132].



Obr. 13: Centrifugace plné krve pro oddělení plazmy.
Převzato ze zdroje [133] a upraveno.

3.3.1.1 Plazma

Plazma je nažloutlý, opaleskující, vodný roztok organických a anorganických látek o pH $7,4 \pm 0,04$. Skládá se z vody (91–92 %), elektrolytů, živin, proteinů a hormonů. Celková koncentrace proteinů je zhruba 65–85 g/l, což představuje hlavní podíl sušiny plazmy [132, 134, 135].

Plazma se získává z nesrážlivé plné krve centrifugací. Pro odběr krve je nutné použít systém s přidavkem protisrážlivého činidla, jako například draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (označení K_2EDTA , K_3EDTA), citrát sodný, antikoagulanty heparinového typu atd. Při odběru je nutné dodržet správný poměr krve a protisrážlivého činidla. Pro výběr antikoagulačních přísad je nutné zohlednit požadovaná laboratorní stanovení a možné interference. Odběrové systémy určené pro následné oddělení plazmy jsou z plastu nebo silikonového skla, protože běžný skleněný povrch je výrazným aktivátorem koagulace [131, 136].

3.3.1.2 Sérum

Sérum vzniká koagulací plné krve. Na rozdíl od plazmy pak neobsahuje srážecí faktory (včetně fibrinogenu), protože k jejich spotřebování dochází v průběhu koagulace. Naopak obsahuje některé degradační produkty srážecích faktorů, které zase nejsou přítomny v plazmě. Sérum bývá častěji hemolytické než plazma, a může tak obsahovat látky pocházející z cytoplazmy erytrocytů [132, 134].

K odběrům se používá odběrová souprava bez protisrážlivého činidla nebo s různými akcelerátory srážení (např. gelové substance). Krev se po odběru nechá srážet při pokojové teplotě nejméně 20–30 minut. Krátká doba srážení může vést k dodatečné tvorbě fibrinu a pocentrifugační koagulaci. Tento jev může následně způsobit problémy při analýzách a vést k vydání chybného výsledku měření. Pro zjednodušení procesu oddělení séra od krevního koagula lze využít odběrové zkumavky se separačním gelem. V tomto případě je nutné vyloučit možnou interferenci látek pocházejících z gelu s analytickou metodou (například při MS detekci).

3.3.2 Komplikace při analýze krve

Laboratorní výsledek získaný analýzou plné krve, plazmy nebo séra může být zatížen řadou chyb. Ty mohou vzniknout ze strany pacienta, chybným postupem při odběru, skladování nebo transportem vzorku do laboratoře. Častou komplikací je vznik hemolýzy. V tomto případě dochází k přechodu řady látek z erytrocytů do séra nebo plazmy a následně k ovlivnění výsledku. Změna zbarvení séra nebo plazmy interferuje s řadou analytických metod. Problematické mohou být také vzorky, které jsou výrazně chylózní nebo ikterické [131, 132].

3.3.3 Moč

Moč je velmi snadno dostupný biologický materiál. Vzniká filtrací krve v glomerulech ledvin a jsou do ní vylučovány odpadní látky. Za normálních okolností se jedná o čirou kapalinu zlatožlutého zbarvení s pH v rozsahu 5,5–6,0. Hodnoty pH vyšší než 7,0 mohou poukazovat na kontaminaci bakteriemi s ureázovou aktivitou. Dále může být pH ovlivněno některými léčivými nebo složením stravy.

Složení moče je velmi pestré a je ovlivněné řadou faktorů (dobou odběru, příjmem a produkcí různých látek, zdravotním stavem organismu i samotných močových cest). Hlavní složku tvoří voda, ve které jsou obsažené dusíkaté látky jako, například močovina, kreatinin a amoniak. Dále moč obsahuje rozpuštěné soli (například K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , HCO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), sacharidy a lipidy (například mastné kyseliny, malé množství fosfolipidů, cholesterolu a triglyceridů). U zdravého člověka by moč měla obsahovat pouze velmi malé množství bílkovin (ztráty do 0,15 g/den, převážně albuminu). Jejich koncentrace výrazně vzrůstá při patologických projevech nebo nesprávném odběru. V moči jsou obsažené buněčné elementy pocházející z krve nebo urogenitálního traktu, mikroorganismy, krystaly atd. [131, 132, 137].

Odběr je většinou neinvazivní a nepředstavuje zátěž pro pacienta. Nejčastěji se k vyšetření používá vzorek první ranní moče (střední porce). Během noci se moč koncentruje v močovém měchýři a patologické hodnoty jsou lépe zachytitelné. Pro bilanční studie se využívá moč sbíraná za delší časový úsek (nejčastěji 12–24 hod.).

Získání správného výsledku je ovlivněno postupem při odběru, proto je nutné důkladně pacienta instruovat. Moč se odebírá nebo sbírá do běžných polyethylenových nebo skleněných nádob [131].

3.3.4 Peritoneální a pleurální tekutina

Pleurální tekutina je transparentní, nažloutlá nebo bezbarvá tekutina o pH kolem 7,64. Jejím základem je ultrafiltrát krevní plazmy. Při normálním zdravotním stavu se vyskytuje pouze ve velmi malém množství (1–10 ml) v pohrudničním prostoru. Vlivem patologických stavů, například srdečním městnání, portální hypertenzi nebo infekci, dochází ke zvýšení objemu. Peritoneální tekutina se fyziologicky nachází v peritoneální dutině v malém objemu (pod 50 ml). Stejně jako v případě pleurální tekutiny se její objem zvětšuje při patologických stavech (záněty dutiny břišní, tumory nebo městnání) [131, 137].

Pleurální i peritoneální tekutina mohou mít povahu transsudátu nebo exsudátu. Odběr se provádí punkcí nebo pomocí drénů zavedených při chirurgickém výkonu. Pro běžná biochemická vyšetření se používají odběrové soupravy bez přísad. V závislosti na požadovaném vyšetření se podmínky pro odběrové soupravy a transport do laboratoře mohou lišit [131, 137, 138].

3.3.5 Exsudát z rány

Exsudát blízce připomíná krevní plazmu. Obsahuje celou řadu látek, včetně vody, elektrolytů, živin, zánětlivých mediátorů, leukocytů a enzymů (například matrixové metaloproteinasy – MMP). Jedná se o tekutinu, která uniká z krevních kapilár do tělních tkání. Normálně je většina (90 %) této tekutiny znovu absorbována do kapilár a asi 10 % se vrací zpět do centrálního oběhového systému přes lymfatický systém. Nadbytečná tekutina, která se dostane do rány, vytváří exsudát. Při normálním hojení rány se jeho tvorba postupem snižuje, naopak u chronických ran nadměrná produkce často přetrvává. Základní informace o hojení rány lze získat z exsudátu hodnocením jeho

barvy, zápachu, konzistence a množství. Některé léky nebo obvazové materiály ale mohou charakteristiku exsudátu ovlivnit [139–141]. Přehled poskytuje Tab. 5.

Tab. 5: Přehled vybraných charakteristik exsudátu a jejich možných příčin [141].

Charakteristika exsudátu	Možná příčina
Čirý, jantarový	<ul style="list-style-type: none"> • často normální (sérový exsudát) • přítomnost bakterií tvořících fibrinolysin (např. <i>Staphylococcus aureus</i>) • exsudát z močové nebo lymfatické píštěle
Zakalený, mléčný, krémový	<ul style="list-style-type: none"> • souvislost s infekcí (hnisavý exsudát obsahující leukocyty a bakterie) • přítomností fibrinových vláken (vláknitý exsudát – reakce na zanícení)
Růžový, červený	<ul style="list-style-type: none"> • obsah erytrocytů (krevní nebo hemoragický exsudát)
Zelený	<ul style="list-style-type: none"> • bakteriální infekce – často <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Žlutý, hnědý	<ul style="list-style-type: none"> • přítomnost odumřelé tkáně • exsudát ze střevních nebo močových píštělí
Šedý, modrý	<ul style="list-style-type: none"> • obvazové materiály obsahující stříbro
Vysoká viskozita (hustý, lepkavý)	<ul style="list-style-type: none"> • vysoký obsah bílkovin (infekce, záněť) • nekrotický materiál • exsudát ze střevní píštěle • sraženina z topických přípravků nebo některých obvazových materiálů
Nízká viskozita (řidký, tekoucí)	<ul style="list-style-type: none"> • nízký obsah bílkovin (žilní nebo kongestivní srdeční onemocnění, podvýživa) • exsudát z močové, lymfatické píštěle
Nepříjemný zápach	<ul style="list-style-type: none"> • růst počtu bakterií (rozvoj infekce) • nekrotická tkáň • exsudát z dutinové/střevní, močové píštěle • obvazový materiál

Standardizované postupy pro odběr exsudátu z rány jsou zatím pouze v oblasti mikrobiologie pro bakteriologická vyšetření. Jedná se o aspiraci pomocí punkční jehly nebo ze zavedeného drénu do sterilních zkumavek. Další možností je stěr/výtěr vatovým tampónem, který se umístí do transportního média. Transport do laboratoře je doporučován do 2 hodin od odběru při pokojové teplotě [142].

Odběr exsudátu pro analýzu biomarkerů je využívám zatím zejména v oblasti výzkumu a standardizované postupy nebyly doposud zavedeny. Důvodem mohou být komplikace, které často souvisí se získáváním tohoto materiálu [140].

Jako příklad těchto komplikací lze uvést:

- a) získání adekvátního objemu pro analýzu
- b) výběr vhodného nasákového materiálu, ze kterého se cílové analyty budou snadno uvolňovat do extrakčního roztoku
- c) konzervace a skladování vzorků
- d) interpretace kvantitativních výsledků

Mezi nejčastěji publikované metody používané pro odběr exsudátu pro analýzu biomarkerů patří [139, 140]:

- a) sběr tekutiny do sběrných kanystrů při podtlakové terapii rány
- b) odběr ze zavedených drénů
- c) odběr jehlou z rány překryté semi-okluzivním nebo okluzivním krytím
- d) extrakce exsudátu z absorpčního materiálu do extrakčního roztoku
 - otisk filtračního nebo jiného typu papíru
 - extrakce z části materiálu použitého pro krytí rány
 - speciální absorpční materiály (tampony, polyvinylalkoholové materiály, disky s mikrovlákny atd.)
- e) odběr pomocí mikrokapilár
- f) mikrodialýza

Rozdílná metodika odběru může způsobit změny v koncentracích cílových analytů v získaném exsudátu. Rozdíl může být také zapříčiněn odlišnou dobou odběru v závislosti na stádiu hojení rány [143].

3.4 Úprava biologických vzorků před analýzou

Biologická matrice představuje velmi složitý a komplexní materiál. Kromě cílových analytů obsahuje celou škálu dalších „balastních“ látek, které jsou v daleko vyšší koncentraci než cílový analyt. Tyto látky mohou interferovat se zvolenou detekční technikou, případně i analýzu znemožnit. Například přítomnost fosfolipidů a solí výrazně zvyšuje maticový efekt v případě hmotnostní spektrometrie.

Aplikace série neupravených vzorků tělních tekutin, zejména s vysokým obsahem proteinů, do chromatografického systému může způsobit zanesení jednotlivých částí. Proteiny adsorbované na stacionární fázi vedou ke ztrátě účinnosti separace a zvýšení zpětného tlaku. Tento přístup velmi snižuje životnost chromatografické kolony a jednotlivých komponent systému, což výrazně zvyšuje finanční náročnost stanovení a samotnou údržbu systému.

Dobře provedená preanalytická fáze v laboratoři má velký podíl na správnosti a spolehlivosti stanovení. Manipulace se vzorkem, jeho úprava a extrakce cílového analytu zahrnuje stále 60–80 % času nutného pro stanovení dané látky. Vhodná technika pro úpravu vzorku se volí na základě charakteristiky dané biologické tekutiny, její dostupnosti, fyzikálně-chemických vlastností analytů a požadované selektivity. Jejím cílem je odstranit co nejvíce balastních látek ze vzorku a v případě nutnosti zakoncentrovat cílový analyt [131, 144, 145].

Pro porovnání lze uvést úpravu vzorku moče před chromatografickou analýzou, kde v mnoha případech postačí filtrace, případně naředění vhodným roztokem. Naopak u vzorků plné krve je často prvním krokem centrifugace vedoucí k získání séra nebo plazmy. Poté následuje úprava takto získaného materiálu. V případě chromatografické analýzy se používají zejména metody k odstranění proteinů.

Z historického hlediska a četnosti použití lze metody rozdělit na:

- konvenční metody pro úpravu vzorků
- moderní extrakční techniky

Konvenční techniky zahrnují skupinu metod, které jsou široce používané a dlouhodobě zavedené i v rutinních laboratořích. Jejich široké používání vedlo k dobře

optimalizovaným postupům a reprodukovatelným výsledkům. Materiál nutný k provedení konvenčních metod je běžně komerčně dostupný. Řada těchto technik byla automatizována, čehož lze využít zejména při zpracovávání velkých sérií vzorků [144].

Moderní extrakční techniky mají často základ v konvenčních metodách. Jejich záměrem je eliminovat nevýhody těchto přístupů a jejich modernizace, aby odpovídaly požadavkům na stále rychlejší prostupnost vzorku laboratoří, snížení ceny, redukce spotřeby patientského vzorku a organických rozpouštědel. Dále pak snížení počtu kroků extrakce a automatizace celého procesu, která povede k minimalizaci chyb vzniklých při procesu úpravy biologického vzorku [144, 146].

Nejčastěji používanými způsoby úpravy tělních tekutin jsou:

- Centrifugace
- Filtrace
- Srážení proteinů (PP, Protein Precipitation)
- Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, Liquid-Liquid Extraction)
- Extrakce na tuhou fázi (SPE, Solid Phase Extraction)

3.4.1 Centrifugace

Centrifugy patří k běžnému vybavení rutinních biochemických i výzkumných laboratoří. Jedná se o zařízení, které díky odstředivé síle umožní dělení látek na základě jejich hustoty. V podstatě jde o urychlený způsob sedimentace. Běžně se centrifugace uplatňuje při oddělení směsí kapalin, směsí kapalin a pevných látek (sraženin), izolaci a odstranění buněk i subcelulárních částic [131].

Hlavní používanou veličinou je relativní odstředivá síla (RCF, Relative Centrifugal Force). RCF udává, kolikrát je odstředivé zrychlení vyšší než tíhové zrychlení (g). Je vyjádřena zpravidla v násobcích g . Tato veličina umožní porovnání centrifugačních podmínek u různých centrifug. Lze uvádět i počet otáček za minutu (RPM, Revolutions Per Minute). Pro aplikaci na jiné centrifugy je ale nutné znát poloměr rotoru [147].

$$\text{RCF} = (1,118 \times 10^{-5}) \cdot r \cdot \text{rpm}^2$$

rpm – počet otáček za minutu
r – poloměr rotoru (cm)

Centrifugy lze dělit podle maximálního dosaženého zrychlení na: nízkobrátkové, středněobrátkové, vysokoobrátkové a ultracentrifugy. Mohou být vybaveny rotory úhlovými, výkyvnými a se svislým uložením kyvet [131, 147].

V dnešní době existuje na trhu celá řada komerčně dostupných centrifug různých provedení lišících se dle zamýšlené aplikace. Umožňují jednoduchou výměnu nástavců v rotorech, a je tak možné používat různé průměry zkumavek, mikrozkušavek i mikrotitrační destičky. Zkušavky pro centrifugaci nemusí být jen ze skla, ale i z odolného plastu. Běžně jsou dostupné centrifugy s chlazeným rotorovým prostorem pro případné zachování stability vzorku.

3.4.2 Filtrace

Filtrace je technika, která tvoří nevyhnutelnou součást chromatografické analýzy biologického materiálu. Filtrování vzorků před nástřikem do systému výrazně prodlužuje životnost kolony i dalších komponent. Jedná se o základní a velmi jednoduchou techniku oddělení tuhé fáze od kapalné. Částice, které jsou menší než je velikost pórů filtru, přecházejí do filtrátu, větší částice jsou zadrženy na filtru. Volba filtru se odvíjí od vlastností filtrovaných analytů, přítomné matrice a dalších látek přidaných do vzorku během jeho úpravy. Filtr by neměl interagovat s analytem ani s rozpouštědlem vzorku [131, 148, 149].

Pro filtraci biologických tekutin se nejčastěji používají semipermeabilní membránové filtry. Na trhu jsou dostupné membránové filtry z regenerované celulózy, acetát celulózy, nylonu, polyesteru, polypropylenu, polyvinylchloridu, polysulfonu, polytetrafluorethylenu (Teflon®) atd. Tyto druhy filtrů jsou k dostání v různém uspořádání s rozdílnou velikostí pórů (často 0,2–2 μm). Pro filtraci jednotlivých vzorků jsou určeny stříkačkové filtry. Naopak pro velké série lze s výhodou využít 96 jamkové mikrotitrační destičky s filtry, kdy je filtrace provedena pomocí vakuového manifoldu. Využití tohoto formátu vede k výraznému urychlení procesu filtrace velké série vzorků.

Umožňují použití multikanálových pipet a jímací mikrotitrační destičky lze rovnou umístit do autosampleru chromatografického systému [148].

Pro úpravu biologické materiálu jsou oblíbené také centrifugační ultrafiltrační zkumavky. Jedná se o filtrační membrány umístěné do vložky, která se vkládá do zkumavek nebo mikrozkušavek. K průchodu vzorku přes filtrační membránu je využívána odstředivá síla centrifug. Vlivem centrifugace voda, rozpouštědla, soli a malé molekuly prochází přes filtrační membránu do sběrné zkumavky, zatímco makromolekuly, větší než „cut off“ hodnota filtrační membrány (např. 10 kDa), zůstávají zadrženy. Výhodou tohoto přístupu je, že ke koncentraci/odstranění malých molekul nebo makromolekul nejsou vždy vyžadována organická rozpouštědla nebo další látky, které by mohly vést k ovlivnění vlastností analytů. Vzorek je možné na membránu aplikovat bez úpravy a nedochází tak ani k jeho naředění. Tato metoda je často spojována s vysokou hodnotou výtěžnosti analytu. Zkumavky v různém provedení jsou běžně komerčně dostupné [147, 148, 150, 151].

3.4.3 Srážení proteinů (deproteinace)

Úprava vzorku před analýzou pomocí deproteinace patří mezi nejjednodušší a nejvíce oblíbené tradiční postupy u biologických tekutin. Jedná se o levnou velmi rychlou metodu z pohledu optimalizace i samotného provedení. Metodika spočívá pouze v přidání precipitačního činidla ke vzorku obsahujícího proteiny. Proteinový precipitát může být odstraněn centrifugací za vzniku supernatantu (horní kapalná část) a sedimentu (dolní pevná část) nebo filtrací. Supernatant lze po filtraci přímo aplikovat na kolonu chromatografického systému. Díky snadnému postupu dochází k minimalizaci vzniku chyb a deproteinace tak může být snadno použita i pro velké série vzorků.

Volba precipitačního činidla/způsobu deproteinace závisí na vlastnostech analytu a matici vzorku. Nesmí interagovat se stanovovanou látkou, snižovat její výtěžnost, stabilitu nebo citlivost detekce. K odstranění proteinů lze použít organická rozpouštědla mísitelná s vodou (nejčastěji methanol, ethanol, acetonitril nebo jejich kombinace), silné kyseliny (trifluoroctová, trichloroctová, chlorovodíková atd.), soli vícemocných iontů (např. síran zinečnatý nebo měďnatý, hydroxid barnatý). Dále lze

vzorek deproteinovat vlivem fyzikálních podmínek (teplota 100 °C) nebo pomocí proteolytických enzymů (papain, trypsin). Uvádí se, že výběrem vhodného deproteinačního činidla a dobrou optimalizací podmínek lze ze vzorku plazmy odstranit až 98 % proteinu. Ovšem soli, fosfolipidy, lipidy a další látky stále zůstávají v supernatantu. Nevýhodou deproteinace může být nepříliš čistý supernatant, který může vést k nízké selektivitě metody pro daný analyt. Ovšem ve spojení s dobře optimalizovanou chromatografickou separací a vhodnou volbou detekce se tato nevýhoda může zcela potlačit. Dále dochází k naředění vzorku a vzniká riziko ovlivnění analytu přidávanými látkami [144, 146, 148].

Metodiku pro odstranění proteinů ze vzorku lze také jednoduše modernizovat. Celý proces deproteinace může probíhat ve speciální 96 jamkové mikrotitrační destičce. Jamky obsahují membránu/filtr, která umožní přímou filtraci deproteinovaného vzorku do sběrné mikrotitrační destičky pomocí vakua. Tím se eliminuje nutnost centrifugace, přenosu supernatantu, výrazně se sníží spotřeba vzorku a rozpouštědel. Jímací destička je kompatibilní s autosamplery chromatografických systémů. Celý proces extrakce lze automatizovat. Tímto přístupem může být výrazně zvýšena propustnost vzorků v laboratořích zpracovávajících velké série. Pro menší série vzorků jsou dostupné jednotlivé kolonky na stejném principu [148, 152].

3.4.4 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, Liquid-Liquid Extraction)

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) představuje jednu z nejstarších extrakčních technik a stále patří k velmi využívaným nejen pro úpravu biologických tekutin. Jejím principem je převedení analytu z vodné fáze (například séra, moče) do organického rozpouštědla vzájemně nemísitelného s touto vodnou fází [146].

Metoda je nenáročná na vybavení laboratoře, levná, dá se snadno optimalizovat a uplatnit pro velké spektrum analytů (s výjimkou hydrofilních). Poskytuje poměrně čisté extrakty, a tím i nižší riziko vzniku interferencí a vysokého matricového efektu (soli zůstávají ve vodné fázi). Ve srovnání s předchozími metodami vyžaduje LLE větší náročnost na provedení i na čas. V dnešní době existuje automatizace této metody, která může proces výrazně urychlit. Automatizace LLE byla dlouhou dobu problematická,

zejména pro krok centrifugace. Ke zjednodušení automatizace přispěla modifikace LLE, a to LLE na tuhém nosiči (SLE, Supported Liquid Extraction). Jako nosič vodného roztoku vzorku zde slouží kolonky z inertní křemeliny. Toto provedení je možné i ve formátu 96 jamkové mikrotitrační destičky [146].

Při vývoji metody je nutné zohlednit fyzikálně-chemické vlastnosti analytu a zvolit vhodné extrakční rozpouštědlo, které povede k dostatečnému oddělení vrstev. Optimalizuje se jeho poměr k vodné fázi a doba trvání extrakce. Oblíbená rozpouštědla pro extrakci (například hexan, ethyl-acetát a chloroform) nejsou zcela kompatibilní s mobilní fází pro reverzní chromatografii a musí být ze vzorku odpařeny. Odpařek bývá následně rozpuštěn ideálně v mobilní fázi. Odpařením je možné vzorek zakoncentrovat. U vodné fáze (biologické tekutiny) může být vyžadována úprava pH nebo například odstranění proteinů. Dále je nutné vyvarovat se vzniku emulzí a zákalu [146, 153].

Klasické provedení LLE vyžaduje poměrně velkou spotřebu často toxických organických rozpouštědel i biologického materiálu. Proto v dnešní době aplikace směřuje zejména na miniaturizované provedení v mikrozkušnicích nebo vialkách, kde požadované objemy všech komponent jsou výrazně sníženy. Problém s velkou spotřebou materiálu lze vyřešit také modernější modifikací LLE tzv. mikroextrakčními metodami do kapaliny. Jedná se o velmi početnou skupinu metod, které své uplatnění nacházejí zatím zejména v oblasti výzkumu a nejsou zcela vhodné pro velké série vzorků. Jejich rutinní provedení vyžaduje zkušenějšího operátora, vývoj metody je časově náročnější a doba trvání extrakce je často delší než u jiných metod. Jako příklad lze uvést metody disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce do jediné kapky rozpouštědla (ve statickém nebo kontinuálním uspořádání). Dále membránou podpořené techniky jako mikroextrakce do kapalné fáze pomocí dutého vlákna, elektromembránová extrakce, paralelní extrakce pomocí umělé kapilární membrány [144, 145].

3.4.5 Extrakce na tuhou fázi (SPE, Solid Phase Extraction)

Extrakce na tuhou fázi (SPE) představuje další dominantní techniku na poli úpravy biologických vzorků. K extrakci cílového analytu dochází na principu interakce vzorku (kapalná fáze) se sorbentem v SPE kolonce (stacionární fáze). Klíčový je výběr vhodného SPE sorbentu, který ovlivní výslednou selektivitu a výtěžnost extrakce. Komerčně je dostupná celá škála sorbentů silikagelových i polymerových s různou modifikací povrchů podobnou jako u chromatografických kolon. Nejrozšířenější je stále klasické provedení ve formě SPE kolonek. Možné je i uspořádání v mikrotitrační destičce, SPE discích nebo pipetovacích špičkách [144, 148].

SPE metodika je vícezkroková: smočení sorbentu (kondicionace), ekvilibrace stacionární fáze rozpouštědlem co nejvíce podobným nanášené matici (v případě biologických tekutin často voda), nanesení vzorku, odstranění interferujících látek promytím kolonky a finálně eluce analytu. Každý krok je nezbytné při vývoji metody optimalizovat. Před samotnou SPE extrakcí může být vyžadována i úprava biologického vzorku, aby nedošlo k zanesení kolonky. Eluční rozpouštědlo analytu může být, v případě nutnosti zakoncentrování vzorku nebo nekompatibility s mobilní fází, odpařeno a odparek rozpuštěn v požadovaném rozpouštědle [146, 148, 153].

Jako u každé vícezkrokové metodiky je zde poměrně vysoké riziko vnesení chyby. Zejména pokud je prováděna manuálně. Výhodou je ale vysoká selektivita metody, výtěžnost, výrazné snížení matricových efektů a možných interferencí. Ve srovnání s LLE je pro provedení SPE vyžadován vakuový manifold a použití jednorázových SPE kolonek činí metodu finančně náročnější. Také se jedná o metodu časově náročnou, ale lze ji poměrně jednoduše automatizovat. Komerčně jsou dostupné plně nebo semiautomatizované robotické systémy pro SPE, které lze s výhodou využívat pro série vzorků bez nutnosti vstupu lidského faktoru [146, 154].

Konvenčně prováděná SPE vyžaduje poměrně velké objemy vzorku a rozpouštědel. Ovšem, stejně jako u LLE, lze aplikovat moderní mikroextrakční přístupy. Například techniky jako mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS, Micro Extraction Packed Sorbent) a mikroextrakce na tuhou fázi pomocí plněných špiček pipet (μ -SPE-PT, Micro-SPE Pipette Tips) dodržují stejný postup jako u konvenční SPE, jen

objemy vzorků a rozpouštědel jsou výrazně sníženy. V případě MEPS je sorbent umístěn v barelu připojeném k mikrostříkačce Hamilton, která umožní provést extrakci. Ta je prováděna buď manuálně, nebo automatizovaně. U μ -SPE-PT je sorbent umístěn v pipetovací špičce a pro extrakční proceduru jsou použité buď pipety, nebo jsou špičky vloženy do centrifugy. Obě tyto techniky se stávají oblíbenými a vybavení pro jejich provedení je komerčně dostupné nebo jej lze připravit v laboratoři. Dalším mikroextrakčním přístupem je disperzní SPE. Sorbent je zde přidáván přímo ke vzorku nebo je volně vložen mezi dvě frity v pipetovací špičce (DPX, Disposable Pipette Tips Extraction). Tento přístup umožní lepší kontakt sorbentu se vzorkem v porovnání s klasickými kolonkami. Všechny uvedené mikroextrakční techniky mohou být použity pro extrakci biologických tekutin [144, 145, 148, 152].

3.4.6 Online extrakční techniky

Jedním z moderních trendů v oblasti úpravy vzorků je automatizace. Cílem je, aby se co nejméně eliminoval kontakt laboratorního personálu s patientským biologickým materiálem, který může představovat vždy potencionální zdravotní riziko. Další snahou automatizace je časová úspora, zrychlení prostupnosti vzorku laboratoří a také eliminace chyb, které vznikají při manuálním provádění extrakcí. Na trhu je dostupná celá řada automatizovaných systémů pro přípravu vzorků dle různých technik. Jak již bylo uvedeno dříve, je automatizována celá řada konvenčních i mikroextrakčních postupů (SPE, LLE, PP, MEPS, DPX atd.).

Populární technikou se stává on-line SPE zapojená přímo do chromatografického systému. Provedení vyžaduje přepínací ventil a přídatnou pumpu. Optimalizace vývoje metody poté zahrnuje podobné kroky jako v off-line SPE. Při aplikaci on-line SPE pro biologický materiál je občas nutné upravit vzorek před zavedením do systému filtrací nebo centrifugací. U vzorku s vysokým obsahem proteinů je nutná deproteinace. Neupravené vzorky velmi komplexní matrice mohou vnášet riziko zanesení SPE kolonky, chromatografické kolony a dalších částí systému. Výhodou on-line SPE je vyšší citlivost v porovnání s off-line provedením, protože na kolonu je dávkován celý objem extraktu.

Nevýhodou je riziko překročení kapacity chromatografické kolony objemovým nebo koncentračním přetížením [144, 153].

Specifické on-line přístupy pro biologický materiál představuje například chromatografie s turbulentním tokem (TCF, Turbulent Flow Chromatography) a materiály s omezeným přístupem (RAMs, Restricted Access Materials). Tato provedení umožňují přímý nástřik neupravené biologické matrice. Na základě rozdílných principů dokáží oddělit makromolekuly biologické matrice (např. proteiny) od malých molekul analyzované látky [144, 146].

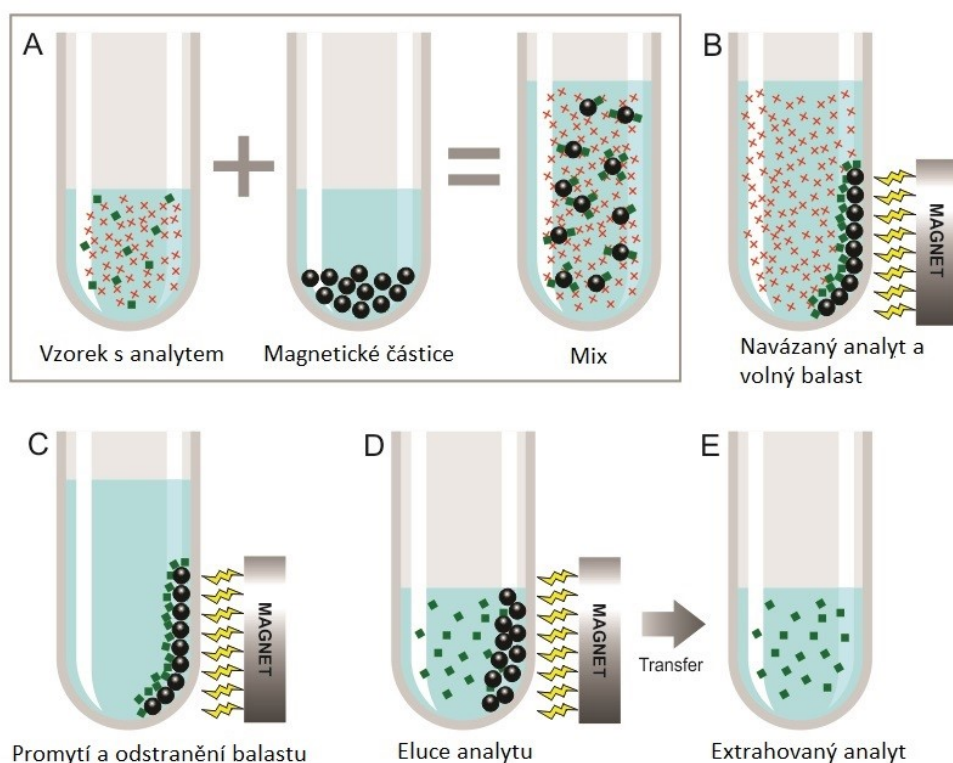
3.4.7 Extrakční techniky s vysokou selektivitou

Techniku s vysokou selektivitou představuje SPE využívající specifické sorbenty. Jako příklad lze uvést molekulárně vtištěné polymery (MIP, Molecularly Imprinted Polymers) a imunoafinitní sorbenty. MIP jsou syntetické polymerní sorbenty, obsahující dutinky s vazebnými místy specifickými pro daný analyt, které vzniknou vtištěním templátu analytu. Populární formou jsou SPE kolonky, avšak lze použít i miniaturizované a on-line přístupy. Výhodou je vysoká selektivita a schopnost eliminace balastních látek. Kolonky lze často používat opakovaně, což snižuje finanční zátěž. Zatím jsou komerčně dostupné sorbenty jen pro určité spektrum látek. Jejich příprava je možná v laboratoři a v oblasti výzkumu je častou praxí. Imunoafinitní sorbenty obsahují navázané protilátky, které zajišťují vysoce specifické interakce protilátka-antigen. Problémem je riziko vzniku zkřížených reakcí podobných analytů. Možným řešením je pak následná chromatografická separace. Rozšíření do rutinního provozu brání složitost přípravy sorbentu a poměrně vysoká cena [146, 155].

3.4.8 Magnetické separační techniky

Zajímavou kapitolu představuje využití vnějšího magnetického pole pro extrakci/purifikaci analytů ze vzorku. Konkrétně se jedná o použití magnetických mikro nebo nanočástic. Pro účely extrakce cílových analytů z biologické matrice jsou tyto částice složeny z magnetického jádra a ochranného obalu. Ochranný obal je tvořený

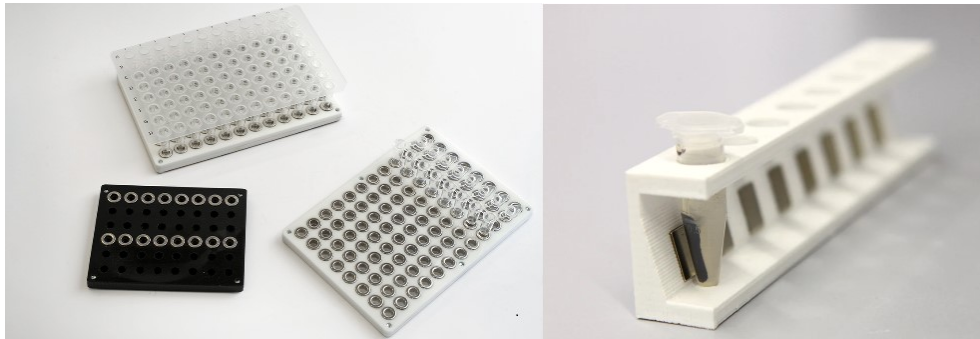
například polymerní nebo silikagelovou vrstvou, která chrání jádro před kontaktem se vzorkem a umožňuje modifikaci povrchu nosiče za účelem cílené extrakce. Jádro částice je nejčastěji připravováno z biokompatibilních oxidů železa (například magnetit nebo maghemit). Cílové analyty lze separovat/extrahovat po jejich vazbě na povrch magnetické částice následnou aplikací magnetického pole. K uvolnění analytů z vazby dochází po promytí částic vhodným roztokem. Analyzované látky poté zůstávají v roztoku a magnetické částice jsou opět separovány magnetickým polem [156–159]. Provedení je znázorněno na Obr. 14.



Obr. 14: Extrakce cílového analytu pomocí magnetických částic.
Převzato ze zdroje [160] a upraveno.

Magnetická separace představuje velmi rychlou a šetrnou techniku, kterou lze využít k extrakci malých molekul i makromolekul. Provedení je možné ve zkumavkách, mikrozukavkách, vialkách i mikrotitračních destičkách (Obr. 15). Tuto metodu je velmi jednoduché automatizovat. Častou aplikací je izolace a purifikace proteinů a DNA, kde se používají magnetické částice s navázanými afinitními ligandy. Dále lze tyto částice využít například k deproteinaci biologických tekutin [161]. Na trhu jsou dostupné

kompletní sady umožňující jednoduché provedení extrakce dle pokynů výrobce [162–164].



Obr. 15: Ukázka uspořádání pro magnetickou separaci/purifikaci.
Převzato ze zdroje [165] a upraveno.

3.5 Validace metod v bioanalýze

Validace bioanalytické metody je proces, který má posoudit a dokumentovat, že daná metoda je vhodná pro zamýšlený účel a bude poskytovat přesné a reprodukovatelné výsledky [166]. Výstupem validace by měl být validační protokol. Existuje celá škála norem a doporučení pro validaci analytických metod, jako například International Conference on Harmonization (ICH), European Pharmacopoeia (Ph.Eur.), A Focus for Analytical Chemistry in Europe (Eurachem), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Český lékopis (ČL) atd. Speciálně pro metody zabývající se analýzou látek v biologické matrici lze jmenovat dva základní dokumenty: Guideline on bioanalytical method validation od agentury European Medicines Agency (zkr. EMA, aktuální verze je z roku 2011) a Bioanalytical method validation – Guidance for industry vydané U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (zkr. FDA, aktuální verze z roku 2018). Oba tyto dokumenty uvádějí pouze doporučení pro provedení validací. Z toho vyplývá, že každý validační proces musí být přizpůsoben dané bio/analytické metodě a jejímu zamýšlenému účelu tak, aby metoda poskytovala dostatečně validní výsledky [146, 167, 168].

Obě EMA i FDA dělí validace do tří skupin:

- ✓ plná validace
- ✓ částečná validace
- ✓ křížová (cross) validace

Plná validace by měla být prováděna u každého nově vyvinutého bio/analytického stanovení nebo u metody založené na podkladech z literatury. Měla by prověřit spolehlivost daného procesu pro stanovení konkrétního analytu ve zvolené biologické matrici. Pokud je v metodě více analytů nebo je určena pro stanovení v různých druzích biologických matric, měla být validace provedena pro všechny analyty a matrice jednotlivě. Je důležité zachovat stejné podmínky, při kterých bude stanovení běžně probíhat (např. antikoagulační činidla, odběrový materiál atd.) Při vývoji bioanalytických metod se lze často setkat s problémem, že není možné získat matrici bez cílového analytu (blanková matrice). V tomto případě lze použít blankovou matrici

připravenou uměle (např. umělé sérum, umělá moč). Dle zvolené autority plná validace může zahrnovat parametry jako: selektivita, limity kvantifikace, linearita, rozsah metody, preciznost, přesnost, výtěžnost, matricový efekt, stabilita analytů [169, 170].

Částečná validace je prováděna u metod, které byly už jednou plně validované. Tento druh validace se může týkat metody přenášené do jiné laboratoře nebo na jiný přístroj. Dále pak u různých změn, jako například: jiná matrice, jiný odběrový systém nebo antikoagulační činidlo, změna kalibračního rozsahu, změna v extrakčním postupu. V těchto případech postačí ověření přesnosti a preciznosti metody [169, 170].

Křížová (cross) validace představuje postup, kdy dosažené výsledky analýzy jsou porovnány s výsledky získanými jinou metodou ve stejné laboratoři nebo i například stejnou metodou v jiné laboratoři [169, 170].

3.5.1 Kontrolní materiál a standardní látky

Během validace metody lze využít komerčně dostupný certifikovaný materiál obsahující daný analyt v příslušné matrici. Nebo si připravit vlastní kontrolní materiál v laboratoři. Ideálně se jedná o blankovou matrici (sérum, moč atd. bez cílového analytu), do které byl cílový analyt přidán v požadované koncentraci ve formě roztoku referenčního standardu. Je důležité, aby tento standard dosahoval určité deklarované kvality. Může se jednat o standard zakoupený komerčně nebo připravený v laboratoři. Při vývoji a následné validaci chromatografické metody je vhodné používat vnitřní standard (IS), který je přidáván ke vzorku před jeho úpravou nebo extrakcí. V případě hmotnostně spektrometrické detekce je doporučováno použití izotopově značeného vnitřního standardu [168, 170].

3.5.2 Vybrané validační parametry

3.5.2.1 Selektivita (Selectivity)

Metodu lze považovat za selektivní, pokud dokáže odlišit cílový analyt a vnitřní standard od balastních látek pocházejících z matrice vzorku. Dle EMA i FDA je doporučováno tento parametr testovat na šesti individuálních zdrojích dané matrice bez cílového analytu. Pokud je tato matrice „vzácná“ je možné tento počet snížit. Selektivní metoda splňuje požadavky pro odezvu v měřených matricích nižší než 20 % dolního kvantifikačního limitu (LLOQ, Lower Limit of Quantification) cílového analytu a 5 % IS [169, 170]. Problém stanovení selektivity nastává v případě nedostupnosti blankových vzorků (například při analýze endogenních látek). V tomto případě lze použít matici, která obsahuje cílový analyt a sledovat kvalitativní data signálu (UV a hmotnostní spektra). Pokud není ani tento přístup možný, je doporučováno použít jinou techniku (např. změna vlnové délky u UV detektoru nebo změna chromatografických podmínek) nebo certifikovaný materiál s deklarovanou hladinou analytu [146].

3.5.2.2 Přenos (Carry-over)

Přenos cílového analytu z přechozího měření lze ověřit nástřikem blankové matrice následně po analýze vzorku s vysokou koncentrací cílového analytu nebo kalibračního standardu odpovídajícího hornímu limitu kvantifikace (ULOQ, Upper Limit of Quantification). K přenosu nedochází, pokud je odezva v blankové matici v odpovídajícím retenčním čase nižší než 20 % LLOQ cílového analytu a 5 % IS [169, 170].

3.5.2.3 Kalibrační křivka (Calibration Curve)

Kalibrační křivka představuje lineární závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu a měla by být tvořena nejméně šesti kalibračními body. Je doporučováno, aby jednotlivé kalibrační hladiny byly připraveny přidavkem standardu o známé koncentraci do blankové matrice (vzorku bez endogenního obsahu analytu), která je totožná s maticí, pro kterou je metoda validována [169, 170]. Tento přístup je vhodný zejména v případě hmotnostní spektrometrie [168, 171]. Dále je vhodné připravit nulový bod

(blanková matrice pouze s IS). Nulový bod by neměl být brán v potaz při výpočtu parametrů kalibrační křivky [169].

Sestrojená kalibrační křivka má obvykle přímkovou závislost. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných vyjadřuje korelační koeficient (R). Hodnota R by měla být při lineární závislosti ideálně rovna 1 (většinou $R > 0,999$). Pro hodnocení linearit je vhodné použít ještě další parametr, tzv. QC koeficient (ideálně $QC < 5 \%$) [146].

Kalibrační křivka by měla pokrývat předpokládané koncentrační hladiny cílových analytů. Prvním bodem by měla být hodnota LLOQ a posledním bodem ULOQ. LLOQ představuje nejnižší možnou hladinu cílového analytu, kterou lze stanovit s odpovídající přesností a precizností. Signál odpovídající koncentraci pro hodnotu LLOQ musí být nejméně 5x vyšší než odezva blankové matrice v odpovídajícím retenčním čase [169].

Po sestavení kalibrační křivky by měly být zpětně přepočítány koncentrační hodnoty kalibračních standardů. Maximální doporučená odchylka od nominální hodnoty je 15 % a pro LLOQ 20 %. Minimálně 75 % kalibračních standardů s minimem šesti koncentračních hladin musí splňovat tuto podmínku [169, 170].

V případě nedostupnosti vzorku bez endogenního analytu lze použít alternativní matrici (např. pufr, dialyzované sérum, uměle připravenou matrici). Bohužel tato matrice se často liší v komplexnosti při porovnání s originální. Nebo je možné využít matrici, ze které byl cílový analyt odstraněn. Dále mohou být kalibrační vzorky pro endogenní látku připraveny přidáním standardu do biologické matrice, která obsahuje cílový analyt (endogenní látku). Před přidavkem standardu musí být změřen originální obsah endogenní látky v této matrici [170]. Získaný údaj je považován za nulový bod, který je následně použitý pro odečtení pozadí (koncentrace endogenní látky přítomné v matrici původně). V tomto přístupu je dosažení LLOQ limitováno přítomností endogenní látky. Problém mohou představovat i velké rozdíly v pozadí jednotlivých vzorků. Dalším přístupem je metoda standardního přidavku, kde je každý vzorek analyzován samostatně (s vlastní kalibrační křivkou). Tento proces je velmi časově náročný a vyžaduje velké objemy vzorků [171]. Problematikou kvantifikace endogenní látek se zabývá řada prací a stále je velmi diskutována [121, 171–173].

3.5.2.4 Přesnost (Accuracy)

Přesnost je parametr, který udává míru těsnosti shody mezi naměřeným výsledkem a nominální (referenční) hodnotou. Stanovení se provádí pomocí kontrolních vzorků, buď komerčně zakoupených certifikovaných materiálů, nebo připravených v laboratoři. Je vhodné stanovit přesnost měření v rámci jedné série měření (within-run accuracy) a mezi měřeními (between-run accuracy) [169]. V rámci jednoho měření by měly být testovány nejméně čtyři koncentrační hladiny (LLOQ, nízká, střední a vysoká) pokrývající celý rozsah kalibrační křivky dle EMA. Podle FDA postačují tři koncentrační hladiny v koncentračním rozsahu, který odpovídá oblasti očekávaných hodnot v reálných vzorcích. V každé koncentrační hladině by mělo být stanoveno nejméně pět vzorků. Pro určení přesnosti metody mezi měřeními (between-run) by měly být proměřeny stejné koncentrační hladiny po třech vzorcích (opakováních) v nejméně dvou odlišných dnech. Naměřené hodnoty by se neměly lišit více než o 15 % od nominální hodnoty s výjimkou LLOQ, kde je povolena 20% odchylka [169].

3.5.2.5 Preciznost (Precision)

Parametr preciznost vyjadřuje míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky měření, která je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Provedení je stejné jako v případě stanovení přesnosti (viz kap. 3.5.2.4). Získané hodnoty by neměly vykazovat RSD vyšší než 15 %, s výjimkou LLOQ, kde je povoleno RSD do 20 % [169].

3.5.2.6 Matricový efekt (ME, Matrix Effect)

Matricový efekt je jev, který se vyskytuje v souvislosti s LC-MS analýzou, zejména při ESI ionizaci. Tento jev je způsobován přítomnou maticí vzorku. Jeho vysoký výskyt může ovlivnit výsledek měření ve smyslu zesílení nebo potlačení signálu [146, 168, 170].

Dle směrnice EMA [169] by pro zjištění tohoto parametru mělo být použito nejméně šest blankových vzorků dané matrice od individuální dárců. Ideálně je doporučováno, aby tato skupina zahrnovala vzorky zdravé populace, hemolytické nebo hyperlipidemické (v případě séra nebo plazmy) a nemocných dárců (například s poškozenými játry nebo ledvinami).

Pro výpočet tohoto parametru dle EMA se využívá poměr plochy píku analytu, který byl do blankové matrice přidán až po extrakci (B) k ploše píku analytu bez matrice (čistý roztok analytu) (A). Tento výpočet vyjadřuje Matuszewskiho rovnice [174]:

$$ME(\%) = \frac{B}{A} \cdot 100$$

Stanovení by se mělo provádět na dvou koncentračních hladinách. ME by měl být zjištěn také pro vnitřní standard. Použití IS pak umožní výpočet normalizovaného matricového efektu vydělením ME analytu a ME IS. CV ME i normalizovaného ME získaného u šesti vzorků by nemělo přesáhnout 15 % [169].

Dále lze matricový efekt stanovit pomocí porovnání směrnic kalibračních křivek sestrojených pro analyt měřený v matrici a bez matrice nebo metodou post-kolonového přídatku [146].

3.5.2.7 Stabilita

V rámci validace by měla být stanovena stabilita cílového analytu v matrici, zásobních a pracovních roztoků standardu a IS. Stabilita by měla být prověřena pro celý proces úpravy vzorku, jeho analýzy a skladování. Stabilitu vzorku může ovlivnit například přítomnost matrice, odběrového materiálu, materiálu používaného při extrakčním procesu, podmínky při analýze a skladovací podmínky. Tento parametr by měl být sledován na dvou koncentračních úrovních. Měla by být prověřena stabilita dlouhodobá i krátkodobá, při různých teplotách (při pokojové teplotě, v lednici nebo mrazáku), při opakovaném rozmražení a zamražení [169, 170].

3.5.2.8 Test způsobilosti chromatografického systému

Test způsobilosti systému (SST, System Suitability Test) slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického přístroje pro zamýšlená stanovení [175]. Tento test by měl být vždy součástí metody [175]. Je doporučováno jej provádět na počátku každého měření analýzou kontrolního materiálu nebo referenčních standardů odlišných od vzorků použitých pro kalibraci [170, 175]. Test by měl prověřit jednotlivé části použitého zařízení, jako například účinnost chromatografické kolony, opakovatelnost

nástřiku, mez detekce a stanovitelnosti. Doporučení využívána pro validaci konkrétně bioanalytických metod EMA a FDA se touto problematikou nezabývají. FDA pouze doporučuje ověření provádět, ale testované parametry nedefinuje. Definici, charakteristiku a provedení testu způsobilosti chromatografického systému lze nalézt například v Českém lékopise (aktuální verze r. 2017) [175].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

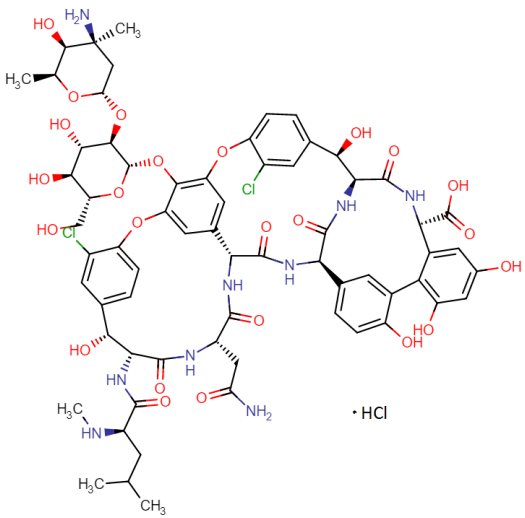
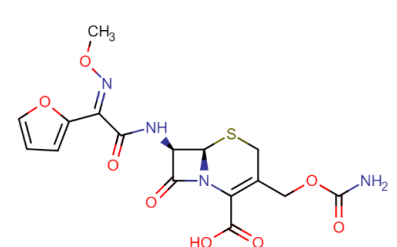
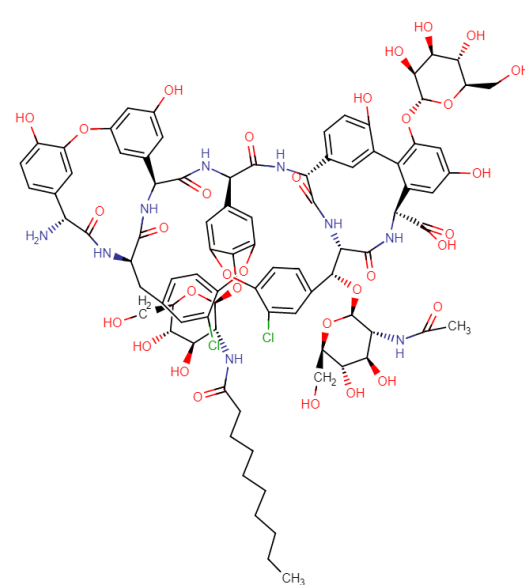
4.1 Stanovení vankomycinu v séru, moči a peritoneálním nebo pleurálním výpotku s využitím kapalinové chromatografie

4.1.1 Úvod do problematiky a cíl práce

Vankomycin patří mezi běžně užívaná antibiotika pro léčbu závažných bakteriálních infekcí. Avšak zvládnutí terapie těchto stavů je velmi závislé na správném dávkování. Byla vydána celá řada doporučených postupů, která ale mohou být v některých nestandardních případech nedostatečná. Příkladem by mohl být stav, kdy dochází k závažným patologickým změnám v systémové cirkulaci, a s tím související sekvestraci tekutin (např. 10–30 l) do „třetího prostoru“ (tj. do dutiny peritoneální, pleurální, střevního traktu či podkoží). Následná nedostatečná cílová koncentrace antibiotika v séru a tkáních potom může vést k rozvoji bakteriálních rezistencí či nozokomiálních infekcí.

Cílem této práce bylo vyvinout chromatografickou metodu s jednoduchou úpravou vzorku před analýzou pro stanovení vankomycinu v lidských tělních tekutinách – tj. séru, moči a pleurálním či peritoneálním výpotku. Dle našich informací nebyla doposud publikována metoda, která by umožnila stanovení vankomycinu ve všech uvedených biologických matricích současně. Metoda byla vyvíjena s ohledem na její budoucí aplikaci v rámci klinického výzkumu, kde jsou očekávána stanovení ve velkých souborech vzorků. Byl kladen důraz na malou spotřebu biologického materiálu, a to zejména v případě séra (z důvodu zátěže pacienta) a výpotku (jedná se o obtížně dostupný materiál). Struktury jednotlivých látek a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 6

Tab. 6: Strukturní vzorce a fyzikálně-chemické vlastnosti používaných látek.
Data a struktury získány z [176].

Látka	Strukturní vzorec	M _w (g/mol)	LogP	pK _A
Vankomycin hydrochlorid		1485,72	-4,4	3,38 9,90
Cefuroxim (IS)		424,38	-0,90	2,96 -1,16
Teikoplanin (IS)		1879,67	-2,26	3,34 7,13

IS vnitřní standard, pK_A nejsilnější kyseliny, pK_A nejsilnější base

4.1.2 Přístrojové vybavení, chemikálie a biologický materiál

4.1.2.1 Chromatografický systém

Pro stanovení vankomycinu v biologických tekutinách byl nejprve využit HPLC systém LC 20 Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Tato sestava je tvořena dvěma binárními vysokotlakými gradientovými čerpadly LC-20AB s nastavitelnou rychlostí průtoku mobilní fáze 0,0001–10 ml/min a maximálním tlakem 40 MPa. Pro odplynění mobilní fáze je do sestavy zařazen degaser DGU-20A₅. Dávkování vzorků je zajištěno autosamplermem SIL-20AC s injekčním objemem 0,1–100 µl a s nastavitelnou teplotou v rozsahu 4–40 °C. Přímo v autosampleru je umístěn zásobník pro vialky. Dávkování vzorku je možné také z mikrotitračních destiček. Jejich přesun do autosampleru je zajištěn pomocí Rack changer/c modulu. Konstantní teplotu kolony zajišťuje kolonový termostat CTO-20A s teplotním rozsahem 4–85 °C. Další součástí je šesticestný selekční ventil umožňující zapojení dvou kolon do systému nebo odklonění části toku mobilní fáze obsahující balastní látky do odpadu a tím ochranu detektorů. Sestava dále obsahuje fluorescenční detektor RF-10A_{XL} a detektor s diodovým polem SPD-M20A. Celý systém je řízen prostřednictvím softwaru LC Solution.

Následně byl použit systém UFLC Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) umožňující práci v režimu velmi vysokého tlaku (až 130 MPa). Mobilní fáze je do systému přiváděna dvěma čerpadly LC-30AD s rozsahem průtoku od 0,0001–5 ml/min. Odplynění zajišťuje nízkobjemový vysokoúčinný vakuový degaser DGU-20A₃. Nástřik vzorku je prováděn pomocí autosampleru SIL-30AC, pro vzorky umístěné ve vialkách i mikrotitračních destičkách s nastavitelnou teplotou v rozsahu 4–40 °C. Manipulace a uchování mikrotitračních destiček před kontinuální analýzou je zajištěna Rack changer II modulem. Konstantní teplota kolony je udržována kolonovým termostatem CTO-20AC s teplotním rozsahem 4–85 °C. Další významnou součástí je šesticestný selekční ventil FCV-32AH. Systém je spojen se třemi detektory: fluorescenčním detektorem RF-20A_{xs}, UV/VIS detektorem SPD-20A a hmotnostním spektrometrem LCMS 8030 s trojitým kvadrupólem s ionizací elektrosprejem, popř. s duálním iontovým zdrojem kombinujícím ionizaci elektrosprejem a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku.

Komunikační modul CBM-20A zajišťuje spojení mezi systémem a počítačem prostřednictvím programu LabSolution.

4.1.2.2 Laboratorní vybavení

Pro úpravu vzorků biologických tekutin byly využity následující přístroje: centrifuga 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) a mikrocentrifuga D3024 (Scilogex, Rocky Hill, Connecticut, USA). Filtrace vzorků byla provedena pomocí mikrotitračních destiček s filtry (0,2 μm /350 μl AcroPrep 96 filter plates) a vakuového manifoldu pro mikrotitrační destičky (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) spojeného s vakuovým čerpadlem VAC Space-50 (Chromservis, Praha, Česká republika).

4.1.2.3 Standardní látky a chemikálie

Standardní látky (vankomycin hydrochlorid, cefuroxim a teikoplanin) a methanol HPLC gradient grade, acetonitril HPLC gradient grade, voda o čistotě LCMS, acetonitril LCMS, kyselina mravenčí LCMS byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Redestilovaná voda byla připravena v laboratoři metodou reverzní osmózy a filtrace Ultrapure water system (Goro, Praha, Česká republika). Substance pro přípravu fosfátového pufru (hydrogenfosforečnan draselný a dihydrogenfosforečnan draselný) a ethanol absolute byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

4.1.2.4 Příprava standardních roztoků

Zásobní roztok vankomycinu a cefuroximu (IS) byl připraven rozpuštěním požadované navážky ve vodě. Substance pro zásobní roztok teikoplaninu byla rozpuštěna ve směsi acetonitrilu a vody (1 : 1 v/v). Pracovní roztoky byly dále ředěny vodou. Všechny zásobní roztoky byly skladovány při teplotě $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2.5 Biologické vzorky

Blankové vzorky séra a moči byly poskytnuty dobrovolníky. Vzorky (séra, moči, peritoneálního/pleurálního výpotku) s obsahem vankomycinu byly získány od pacientů Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Odběr byl schválen Etickou

komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (No.201206–S62P, 27. června, 2012). Sérum bylo z plné krve odděleno centrifugací (2 000g, 4 °C, 10 min.) a následně zmrazeno (–84 °C). Vzorky moči a výpotku byly zmrazeny (–84 °C) bez předchozí úpravy.

4.1.3 Vývoj metody HPLC-UV

Z důvodu nižší cenové náročnosti stanovení byl pro vývoj metody nejprve využitý HPLC systém Prominence LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) ve spojení s UV detekcí.

4.1.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Prvním krokem vývoje metody byla optimalizace chromatografických podmínek pro separaci vankomycinu a zvoleného vnitřního standardu cefuroximu. Bylo důležité zohlednit polární charakter vankomycinu a docílit jeho dostatečné retence na chromatografické koloně. Z přehledu publikovaných metod v kap. 3.2.2 je patrné, že nejčastěji používaná byla C18 stacionární fáze. Jelikož je C18 běžně využívanou stacionární fází s jednoduchou predikcí retenčního chování analytů, byla tato fáze zvolena pro optimalizaci. Pro separaci polárních látek se nabízí i chromatografický mód na bázi HILIC. Ovšem tento přístup není příliš vhodný pro velké molekuly, jako je vankomycin.

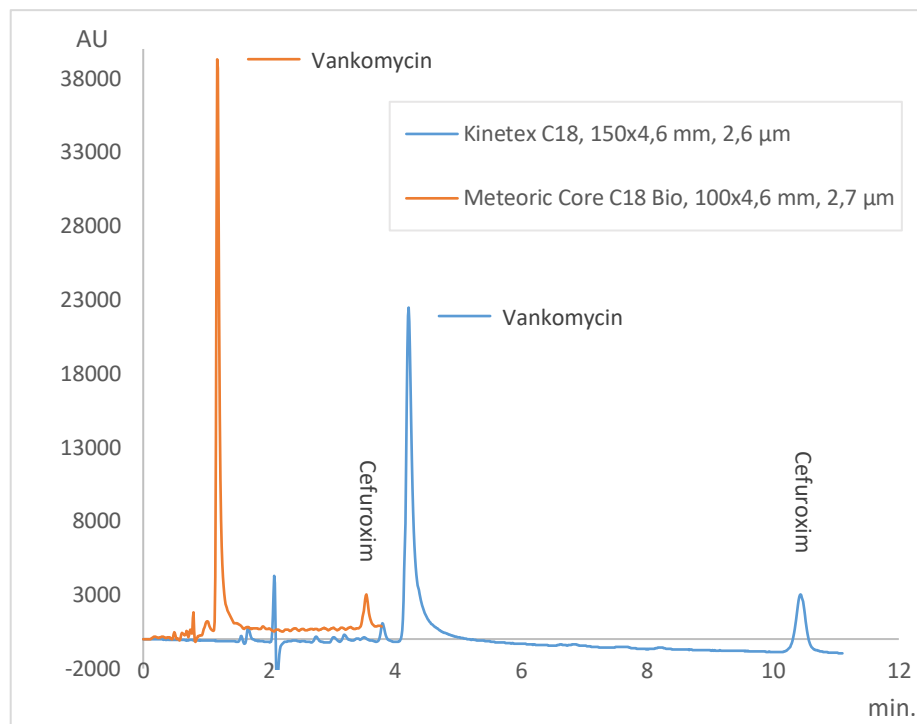
V průběhu vývoje byly vyzkoušeny různé technologie zpracování C18 stacionární fáze: monolitické, plně porézní částice a částice s pevným jádrem. Porovnání jednotlivých kolon je uvedeno v Tab. 7. Ze získaných hodnot bylo patrné, že nejlepší separační účinnosti bylo dosaženo při použití kolony Kinetex C18 150 × 4,6 mm s částicemi o průměru 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Avšak, při porovnání chromatogramů bylo zjištěno, že separací standardních látek na koloně Meteoric Core C18 Bio 100 × 4,6 mm, 2,7 μm (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Německo) bylo dosaženo výrazně vyšší intenzity píku vankomycinu (Obr. 16). To by mohlo být klíčové při velmi nízkých koncentracích vankomycinu v biologickém materiálu (zejména pleurálním či peritoneálním výpotku).

Testovanými mobilními fázemi byla voda v kombinaci s acetonitrilem nebo methanolem a následně záměna vody za fosfátový pufr. Použití fosfátového pufru vedlo k vyšší intenzitě píků vankomycinu a lepší retenci na koloně. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při snížení pH fosfátového pufru na hodnotu 4,5. Testováním různých koncentrací fosfátového pufru (50, 30, 20, 15 mmol/l) nebylo dosaženo významných změn v retenci na koloně a intenzitě píků vankomycinu. Vysoká koncentrace fosfátového pufru způsobovala časté zanesení kolony, případně dalších komponent systému. Proto bylo vhodnější používat nižší koncentrace.

Tab. 7: Testované kolony a výsledné parametry chromatografické separace

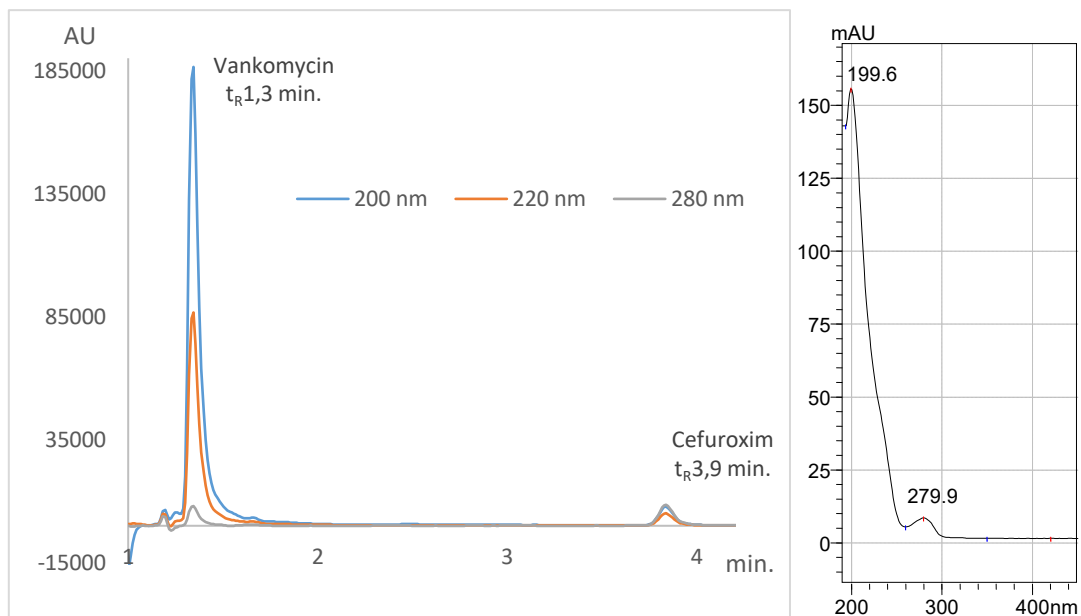
Kolona	Analyt	HETP (μm)	Rozlišení	Faktor symetrie	Průtok MF (ml/min)	t_R (min.)
Chromolith® Performance RP-18e , 100 × 2,0 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)	VCM	159,7		4,5	0,8	0,8
	CFX	43,7	6,1	1,4		1,7
Chromolith® HighResolution RP-18e , 100 × 4,6 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)	VCM	24,0		2,2	2	1,7
	CFX	11,5	15,7	1,4		3,7
Gemini-NX C18 150 × 2,0 mm, 3 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	VCM	116,4		2,9	0,3	3,3
	CFX	20,6	14,9	1,6		9,4
Kinetex® C18 , 150 × 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	VCM	11,9		2,1	0,8	5,7
	CFX	6,1	4,0	1,1		13,4
Kinetex® C18 , 50 × 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	VCM	43,0		2,7	2	0,6
	CFX	12,8	9,0	1,5		1,5
Meteoric Core Bio C18 , 100 × 4,6 mm, 2,7 μm (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Německo)	VCM	33,0		2,2	1	1,3
	CFX	8,8	20,7	1,4		3,7

VCM vankomycin, CFX cefuroxim, HETP výškový ekvivalent teoretického patra, MF mobilní fáze, t_R retenční čas. U všech testovaných kolon byla složka A mobilní fáze tvořená 50 mmol/l fosfátovým pufrům o pH 4,5 a složka B acetonitrilem v poměru 90 : 10 (v/v), při teplotě 25 °C. Výjimkou byla kolona Meteoric Core Bio, kdy složka A mobilní fáze obsahovala 15 mmol/l fosfátový pufr.

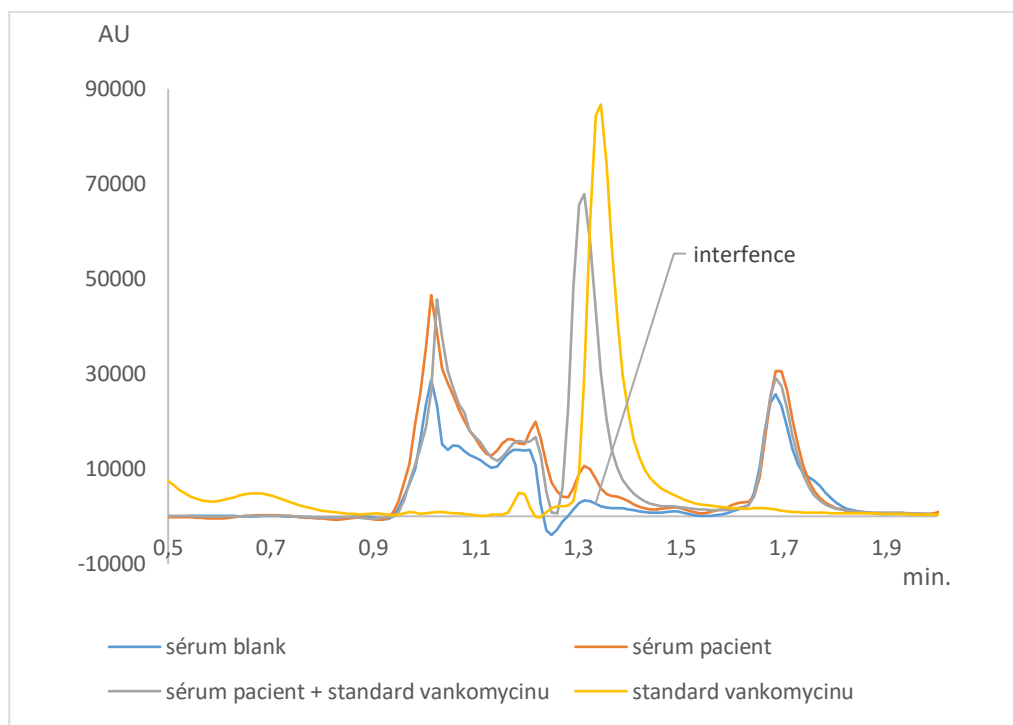


Obr. 16: Chromatografický záznam porovnání separace 15 $\mu\text{mol/l}$ standardu vankomycinu a cefuroximu (IS). Mobilní fáze: 15 mmol/l fosfátový pufr pH 4,5 s ACN 90 : 10 (v/v), objem nástřiku 5 μl . UV detekce 220 nm. Průtok Kinetex C18 0,8 ml/min, Meteoric Core C18 1 ml/min.

Pro UV detekci byly testovány tři různé vlnové délky vycházející z oblasti maxima absorpčního spektra vankomycinu. Absorpční maximum vankomycinu odpovídalo vlnové délce 200 a 280 nm (Obr. 17). Dále byla testována vlnová délka 220 nm, protože hodnota 200 nm je blízká hodnotě *UV cut-off* používaných rozpouštědel (Obr. 17). Tyto poznatky byly dále použity pro separaci vankomycinu v biologickém materiálu (konkrétně séru), upraveném před nástřikem do HPLC systému metodou deproteinace. Z důvodu interference vyskytující se v séru v retenčním čase, který odpovídal retenčnímu času vankomycinu, nebyla možná spolehlivá kvantifikace (Obr. 18). Proto byla pro další fázi vývoje zvolena hmotnostní spektrometrie.



Obr. 17: Porovnání chromatografického záznamu s UV detekcí standardu vankomycinu a cefuroximu při různých vlnových délkách. Chromatografická kolona: Meteoric Core Bio C18, mobilní fáze: 20 mmol/l fosfátový pufr pH 4,5 s ACN 88 : 12 (v/v), průtok 1 ml/min. Vpravo ukázka absorpčního spektra vankomycinu.



Obr. 18: Chromatografický záznam separace séra pacienta léčeného vankomycinem. Kolona Meteoric Core C18 Bio, 100 × 4,6 mm, 2,7 μm. Mobilní fáze: 20 mmol/l fosfátový pufr pH 4,5 s ACN 88 : 12 (v/v), průtok 1 ml/min, objem nástřiku 8 μl. UV detekce 220 nm.

4.1.3.2 Úprava vzorku před analýzou

Vzhledem k zamýšlené aplikaci metody na velké série měření bylo důležité, aby krok úpravy vzorku před analýzou byl jednoduchý, časově nenáročný a vyžadoval malý objem biologického materiálu. Proto byla nejprve zkoušena metoda precipitace proteinů. Testovaným materiálem bylo sérum, a to z důvodu jeho lepší dostupnosti než výpotku a složitější matrice než v případě moči. Testovanými precipitačními činidly byly: methanol, ethanol, acetonitril, síran zinečnatý a kyselina trifluoroctová v různých poměrech a kombinacích (např. síran zinečnatý s methanolem). Po deproteinaci činidlem podpořené sníženou teplotou ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) následovala centrifugace pro oddělení supernatantu od sedimentu. Nezbytným krokem byla filtrace supernatantu před nástřikem do HPLC systému. K tomuto kroku byly využívány mikrotitrační destičky s filtry s velikostí pórů $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Pall, Ann Arbor, MI, USA) za pomoci vakua. Bylo nutné otestovat, zda nedochází k ucpávání sledovaných analytů na tomto filtru. Testováním bylo vyhodnoceno, že filtrací vzorku nedochází k nechtěným ztrátám vankomycinu a vnitřního standardu cefuroximu.

4.1.4 Vývoj metody UHPLC-MS/MS

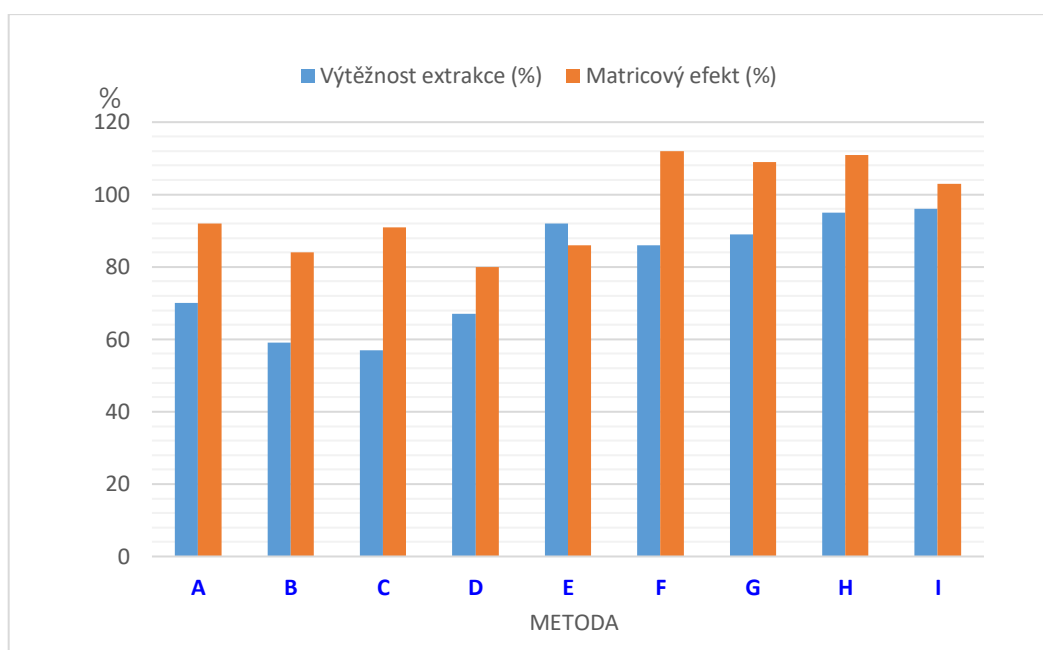
4.1.4.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Pro optimalizaci chromatografické separace vankomycinu pro metodu HPLC-UV byla vybrána mobilní fáze složená z 15 mmol/l fosfátového pufru a acetonitrilu. Ovšem fosfátový pufr není vhodný pro použití v kombinaci s hmotnostním spektrometrem. Z toho důvodu bylo nutné znovu optimalizovat chromatografické podmínky pro separaci vankomycinu a vnitřního standardu. Výhodou hmotnostní spektrometrie je, že umožňuje využití značeného vnitřního standardu. Ten má stejné fyzikálně-chemické vlastnosti jako cílový analyt, a tím i stejné retenční charakteristiky a ionizaci jako analyzovaná látka. Bohužel v období vývoje této UHPLC-MS/MS metody, nebyl značený standard vankomycinu dlouhodobě dostupný. Proto musela být zvolena jiná alternativa v podobě glykopeptidového antibiotika teikoplaninu (inspirace dle publikace Cass a kol. (2001) [68]). Pro optimalizaci chromatografických podmínek byla ponechána kolona Meteoric Core C18 Bio (100 × 4,6 mm, 2,7 μm). Optimální retence vankomycinu na koloně bylo dosaženo s použitím mobilní fáze tvořené směsí vody LCMS čistoty s 0,1% kyselinou mravenčí v kombinaci s acetonitrilem 88 : 12 (v/v). Ovšem tyto podmínky nebyly vhodné pro vnitřní standard teikoplanin, a proto byla zvolena gradientová eluce.

4.1.4.2 Úprava vzorku před analýzou

Stejně jako v případě vývoje extrakčního postupu pro HPLC-UV techniku byla zvolena metoda precipitace proteinů. Odstranění proteinů ze vzorků bylo důležité zejména v případě séra a peritoneálního nebo pleurálního výpotku. Ve vzorcích moče by mohla být dostačující pouze technika naředění. Jelikož se ale jedná o těžce nemocné pacienty, mohla by se i u těchto vzorků objevit vyšší koncentrace bílkovin. Zkoušenými precipitačními činidly byly organická rozpouštědla jako acetonitril, methanol, ethanol a jejich kombinace. Dále pak byl testován 4% roztok síranu zinečnatého samotného nebo v kombinaci s organickým rozpouštědlem. Použití síranu zinečnatého, jako precipitačního činidla, by mohlo způsobit zanesení iontového zdroje při měření velké série vzorků. Tento problém byl vyřešen zapojením šesticestného selekčního ventilu do metody, který umožnil odklon části mobilní fáze obsahující tuto látku do odpadu.

Po přidavku deproteinačního činidla bylo dále testováno vložení kroku sonikace vzorku v ultrazvukové lázni do extrakčního procesu. Tento krok by mohl podpořit uvolnění cílového analytu z proteinového precipitátu a vést tak k vyšší výtěžnosti extrakce. Avšak testování tohoto postupu neprokázalo zvýšení výtěžnosti. Lepších výsledků nebylo dosaženo ani vlivem 5 min. inkubace za snížené teploty (4 °C). Přehled výsledků vybraných testovaných variant precipitace proteinů je uveden na Obr. 19.



Obr. 19: Porovnání výsledků výtěžnosti extrakce a matricového efektu u vybraných testovaných variant precipitace proteinů pro extrakci vankomycinu. Testovaným biologickým materiálem bylo sérum.

Legenda k jednotlivým metodám:

A: precipitační činidlo 4% ZnSO₄ · H₂O: 200 µl séra + 50 µl ZnSO₄ · H₂O + 150 µl H₂O
10 s vortex, 5 min. inkubace 4 °C, UZ 5 min.*, centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu

B: precipitační činidlo 4% ZnSO₄ · H₂O: 200 µl séra + 50 µl ZnSO₄ · H₂O + 150 µl H₂O
10 s vortex, 10 min. inkubace 4 °C, UZ 15 min., centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu

C: precipitační činidlo 4% ZnSO₄ · H₂O: 200 µl séra + 50 µl ZnSO₄ · H₂O + 150 µl H₂O
10 s vortex, 10 min. inkubace 4 °C, UZ 15 min., centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu, naředění supernatantu 0,1% FA

D: precipitační činidlo 4% ZnSO₄ · H₂O: 200 µl séra + 100 µl ZnSO₄ · H₂O + 100 µl H₂O, 10 s vortex, 5 min. inkubace 4 °C, UZ 5 min., centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu

E: precipitační činidlo 4% ZnSO₄ · H₂O v kombinaci s ACN: 200 µl séra + 50 µl ZnSO₄ · H₂O + 150 µl ACN, 10 s vortex, 5 min. inkubace 4 °C, UZ 5 min., centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu

F: precipitační činidlo ACN: 100 µl séra + 150 µl ACN, 10 s vortex, inkubace 4 °C 5 min., UZ 5 min., centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu

G: precipitační činidlo ACN: 100 µl séra + 150 µl ACN, 10 s vortex, inkubace 4 °C 5 min., centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu (bez UZ)

H: precipitační činidlo ACN: 100 µl séra + 150 µl ACN, 10 s vortex, centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu (bez inkubace při 4 °C 5 min.)

I: precipitační činidlo ACN: 50 µl séra + 50 µl H₂O, 150 µl ACN, 10 s vortex, centrifugace 14 100g 10 min. 4 °C, filtrace supernatantu

**změněné podmínky označené kurzívou*

Dalším testovaným přístupem pro extrakci vankomycinu byla technika využívající magnetické částice pro odstranění proteinů, fosfolipidů a solí z biologické matrice před nástřikem do LC-MS/MS systému. Magnetické částice byly získány u firmy MagnaMedics Diagnostic BV (Geleen, Nizozemsko) a byly určeny pro úpravu séra nebo plazmy s obsahem vankomycinu a dalších terapeuticky významných látek. Proces úpravy vzorku byl proveden dle návodu výrobce. V plastových mikrozkuvkách bylo smícháno 50 µl séra s ředícím pufrem (dodán výrobcem) a roztokem obsahujícím magnetické částice. Dále bylo přidáno organické rozpouštědlo (acetonitril nebo methanol) a obsah byl promíchán. Poté byly mikrozkuvky umístěny do stojánku s magnetem, kde došlo k oddělení magnetických částic od roztoku. Následnou LC-MS/MS analýzou bylo zjištěno, že výtěžnost vankomycinu byla nižší ve srovnání s klasickým postupem precipitace proteinů. Navíc by tento postup výrazně zvyšoval finanční náklady na stanovení.

4.1.5 Finální podmínky UHPLC-MS/MS metody

Chromatografické a detekční podmínky

LC systém: UFLC Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Kolona: Meteoric Core C18 BIO, 100 × 4,6 mm, 2,7 μm (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Německo) s předkolonou SecurityGuard Ultra cartridge C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA), teplota na koloně 35 °C

Mobilní fáze:

složka A: 0,1% FA v H₂O (LCMS čistota)

složka B: 0,1% FA v ACN (LCMS čistota)

gradientová eluce, 1 ml/min:

Na začátku metody byl lineární gradient od 100% do 88% složky A do 0,8 min. Složení mobilní fáze o obsahu 88% složky A bylo ponecháno do 1,8 min. Pak bylo složení mobilní fáze skokově změněno a následoval lineární gradient od 70% do 50% složky A do 3,8 min. Pro pročištění a ekvilibraci kolony bylo složení mobilní fáze vráceno do výchozího nastavení (100% složky A). Do metody byl zapojen selekční ventil, který byl přepnut do pozice umožňující tok mobilní fáze do detektoru po dobu 1,8–4 min. Zbývající čas byl přepnut do pozice, která umožnila tok mobilní fáze s balastními látkami eluovanými z kolony do odpadu.

Objem nástřiku: 3 μl

Detektor: LCMS 8030

Typ ionizace: ESI, pozitivní mód

Software: LabSolutions 5.41 SP1, využitý i pro optimalizaci podmínek MS detekce (Tab. 8)

Chromatografické záznamy s použitými finálními podmínkami pro UHPLC-MS/MS stanovení vankomycinu v séru, moči a peritoneálním/pleurálním výpotku jsou uvedeny na Obr. 20.

Tab. 8: Optimalizované podmínky MS detekce

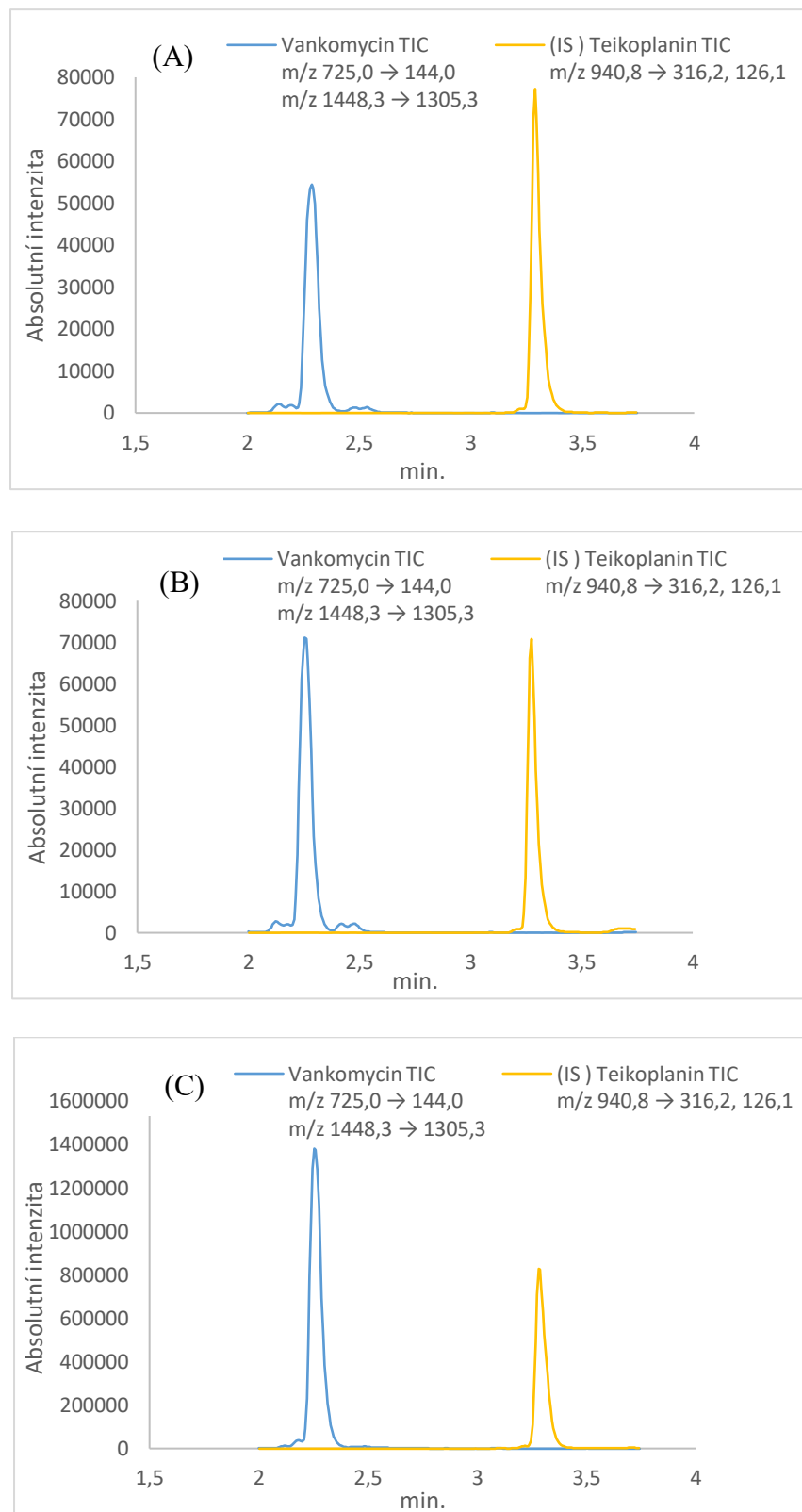
Analyt	Ion prekurzoru (<i>m/z</i>)	Ion produktu (<i>m/z</i>)	Dwell time (ms)	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
Vankomycin	725,00	144,00	100,00	-30,0	-41,0	-46,0
	1448,30	1305,30	100,00	-24,0	-20,0	-15,0
Teikoplanin (IS)	940,80	316,20	100,00	-20,0	-19,0	-23,0
	940,80	126,05	100,00	-20,0	-49,0	-27,0

Q1 první kvadrupól, CE kolizní energie, Q3 třetí kvadrupól, IS vnitřní standard

Extrakční postup

Stejná metodika úpravy vzorku před analýzou byla aplikována pro všechny tři biologické tekutiny: sérum, moč, peritoneální/pleurální výpotek. Roztok vnitřního standardu teikoplaninu (50 μ l, koncentrace 4 μ mol/l pro sérum a výpotek a 40 μ mol/l pro moč) byl přidán k 50 μ l biologické tekutiny. Pro precipitaci proteinů bylo použito 150 μ l ACN. Vzorek byl vortexován po dobu 10 s. Následovala centrifugace (14 100g, 10 min., 4 °C). Poté bylo 150 μ l supernatantu filtrováno pomocí filtračních mikrotitračních destiček s velikostí pórů 0,2 μ m (Pall, Ann Arbor, MI, USA). Nástřik supernatantu do LC-MS/MS systému byl proveden přímo z mikrotitrační destičky.

Dostatečná výtěžnost použité extrakční metody byla prokázána pomocí procentuální odchylky plochy píku vankomycinu u vzorku s přidaným standardním roztokem vankomycinu do séra, moči a výpotku před extrakčním procesem, od plochy píku získané měřením vankomycinu přidaného do supernatantu po extrakci (před nástřikem do LC systému). Stanovení bylo provedeno na třech koncentračních hladinách pokrývajících kalibrační rozsah metody. Průměrná výtěžnost vankomycinu při použití finální extrakční metody byla 94,43 %, 114,91 % a 92,16 % pro sérum, peritoneální nebo pleurální výpotek a moč.



Obr. 20: Chromatografický záznam stanovení vankomycinu a vnitřního standardu (teikoplaninu) v reálných vzorcích pacientů dle finálních podmínek. (A) sérum (9,17 $\mu\text{mol/l}$ vankomycin), (B) peritoneální/pleurálním výpotek (6,64 $\mu\text{mol/l}$ vankomycin), (C) moč (159,90 $\mu\text{mol/l}$ vankomycin). Kvantifikace byla provedena metodou celkového iontového proudu (TIC).

4.1.6 Validace metody

Validace metody vycházela ze směrnic určených pro validaci bioanalytických metod: Guideline on bioanalytical method validation (European Medicine Agency, EMA) a Bioanalytical method validation – Guidance for industry (Food and Drug Administration, FDA) [169, 170]. Metoda byla validována samostatně pro všechny uvedené druhy biologického materiálu. Kontrolní vzorky byly připraveny v laboratoři přidavkem standardní látky vankomycinu o požadované koncentraci do blankové matrice (séra, moči, výpotku bez původního vankomycinu).

4.1.6.1 Vybrané parametry hodnocené v rámci validace metody

Přesnost a preciznost metody

Preciznost metody byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) naměřené plochy píků. Přesnost metody byla vyhodnocena jako procentuální odchylka získané plochy píku od nominální hodnoty. Ověření obou parametrů v rámci jedné série bylo provedeno analýzou pěti vzorků na třech koncentračních hladinách. Mezidenní přesnost a preciznost metody byla prověřena analýzou tří vzorků na třech koncentračních hladinách ve dvou rozdílných dnech. Dosažené výsledky akceptují kritéria uvedené směrnicí EMA a FDA pro preciznost RDS nižší než 15 % a pro přesnost odchylka do 15 % od nominální hodnoty (Tab. 9).

Tab. 9: Přesnost a preciznost metody pro jednotlivé biologické matrice

	Sérum			Peritoneální/pleurální výpotek			Moč		
Koncentrace (μmol/l)	5	10	40	0,27	5	10	25	150	250
Měření v rámci jedné série (within-run), n = 5									
Preciznost (% RSD)	1,95	3,88	3,40	5,92	2,29	1,37	1,91	2,32	0,80
Přesnost (%)	101,07	101,02	99,60	94,81	93,40	102,60	88,93	104,16	100,25
Mezidenní měření (between-run), n = 3									
Preciznost (% RSD)	4,03	4,30	2,60	7,99	4,79	2,19	3,21	6,52	5,61
Přesnost (%)	102,46	103,31	99,69	99,56	94,85	102,71	89,87	100,11	99,00

n = počet opakování extrakce

Linearita

Linearita metody byla stanovena pomocí matricových kalibračních křivek vyhodnocených pro každý typ biologického materiálu zvlášť. Kalibrační křivky byly tvořeny šesti kalibračními hladinami připravenými přidáním standardního roztoku vankomycinu a vnitřního standardu (teikoplaninu) do blankové matrice. Pro sérum a výpotek byly stanoveny dvě kalibrační přímky pro nízké a vysoké hladiny. Lineární rozsah pro vankomycin v séru byl 2–60 μmol/l (nebo 0,5–10 μmol/l) a 0,27–10 μmol/l (nebo 2–60 μmol/l) pro vankomycin ve výpotku. Pro moč byl lineární rozsah 25–300 μmol/l. Vzorky močí pacientů, u kterých byly hladiny vankomycinu vyšší než kalibrační rozsah metody, mohly být ředěny.

Selektivita

Selektivita metody pro všechny uvedené biologické matrice byla testována analýzou blankové matrice. V retenčních časech vankomycinu a vnitřního standardu nebyly pozorovány žádné interferující píky.

Matricový efekt

Vliv matrice vzorku na vankomycin a vnitřní standard (teikoplanin) byl demonstrován porovnáním ploch píků jednotlivých analytů přidaných do matrice po extrakci (získané od šesti zdravých i nemocných dobrovolníků, kteří nebyli léčeni vankomycinem) s plochami píků standardů bez matrice. Matricový efekt byl testován u všech typů matrice na dvou koncentračních hladinách. Matricový efekt pro vankomycin ve všech uvedených matricích nebyl vyšší než 100 ± 15 %. Avšak u vnitřního standardu v séru a výpotku byl vliv matrice výrazně vyšší. Proto pro tyto matrice nebyla využita metoda normalizace matricového efektu vnitřním standardem. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Matricový efekt (ME %) pro vankomycin a teikoplanin stanovený v biologickém materiálu od šesti dobrovolníků

Typ matrice		Vankomycin (ME %)		Teikoplanin (IS) (ME %)
		2 $\mu\text{mol/l}$	20 $\mu\text{mol/l}$	4 $\mu\text{mol/l}$
Sérum	1	109,31	112,04	131,52
	2	113,57	108,72	143,09
	3	107,66	105,35	140,21
	4	102,12	101,72	147,04
	5	114,55	107,01	139,12
	6	112,27	113,02	144,26
Peritoneální/pleurální výpotek	1	94,36	102,48	132,03
	2	99,08	110,40	145,51
	3	104,39	101,47	136,82
	4	99,38	108,18	143,64
	5	93,60	108,55	153,78
	6	98,12	112,42	142,33
Moč		25 $\mu\text{mol/l}$	250 $\mu\text{mol/l}$	40 $\mu\text{mol/l}$
	1	86,70	105,80	115,09
	2	95,80	97,67	108,33
	3	86,43	96,15	107,58
	4	86,91	91,22	107,35
	5	91,44	94,45	101,80
	6	84,83	110,36	89,51

Robustnost

V rámci ověření robustnosti metody byl testován vliv změny obsahu kyseliny mravenčí v mobilní fázi a změny teploty na koloně. Testovaným koncentračním rozmezím procentuálního obsahu kyseliny mravenčí v obou složkách mobilní fáze bylo 0,075–0,125 %. Hodnota plochy píku pro obsah 0,1% FA odpovídal 100 %. Vliv změny teploty na koloně byl testován v rozmezí 33–37 °C (35 °C = 100 %). Měřením bylo prokázáno, že plochy píků nebyly změnou podmínek ovlivněny více než o 15 %.

4.1.7 Aplikace metody na reálné vzorky

Použitelnost validované metody pro klinickou praxi byla ověřena stanovením vankomycinu v séru, moči a výpotku u pěti pacientů Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové léčených vankomycinem. Stanovení byla prováděna před a po nitrožilním podání vankomycinu v průběhu několika dní léčby (výsledky Tab. 11). Protokol byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (No.201206–S62P, 27. června, 2012) a Státním ústavem pro kontrolu léčiv, Praha (EudraCT number: 2013–003213–17).

Tab. 11 : Výsledné hladiny vankomycinu u pacientů s intravenózním podáním

Pacient	Sérum	Moč	Výpotek
P1 ^a	21,6	74,9	NA
P1 ^b	30,2	57,8	NA
P2 ^a	6,8	159,9	NA
P2 ^a	9,2	149,8	NA
P2 ^b	30,1	272,4	NA
P2 ^a	7,3	51,6	NA
P2 ^b	27,0	284,5	NA
P3 ^a	9,8	652,3	NA
P3 ^b	13,1	772,6	NA
P3 ^a	9,0	543,1	1,05
P3 ^b	15,4	665,7	6,64
P3 ^a	8,7	682,0	2,61
P3 ^b	16,3	130,0	NA
P4 ^a	2,2	275,9	NA
P4 ^b	81,6	207,5	NA
P4 ^a	3,3	253,8	NA
P4 ^b	15,0	958,2	NA
P4 ^a	2,6	95,8	NA
P4 ^b	13,8	120,3	NA
P5 ^a	2,5	361,2	NA
P5 ^b	13,7	572,4	NA
P5 ^a	3,3	175,1	NA
P5 ^b	19,7	491,0	NA

Koncentrace jsou vyjádřeny v $\mu\text{mol/l}$.

^a Stanovení před podáním další intravenózní dávky vankomycinu.

^b Stanovení po intravenózním podání dávky vankomycinu.

NA - vzorek peritoneálního nebo pleurálního výpotku nebyl dostupný/pacient bez výpotku.

4.1.8 Závěr

V rámci této práce byla vyvinuta a validovaná UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení vankomycinu v séru, peritoneálním či pleurálním výpotku a moči. Tato metoda vyžaduje pouze malý objem vzorku (50 µl), což je důležité zejména s ohledem na zátěž pacienta, nebo v případě ne vždy dobře dostupného biologického materiálu (výpotek). Podmínky metody byly optimalizovány tak, aby její použití bylo vhodné pro jednoduché stanovení velkých sérií vzorků. Také stejná technika úpravy biologického materiálu před LC analýzou a stejná chromatografická metodika pro všechny tři matrice, výrazně zjednodušuje celý proces měření. Validace metody byla provedena dle doporučení směrnic EMA a FDA pro všechny uvedené typy biologických tekutin samostatně.

V budoucnu bude tato metoda využita pro měření hladin vankomycinu v séru, moči a peritoneálním/pleurálním výpotku v rámci klinické studie zaměřené na personalizaci dávkování vankomycinu u kriticky nemocných pacientů se syndromem systémové zánětlivé odpovědi (SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome). U těchto pacientů je možný předpoklad, že z důvodu sekvestrace velkého objemu tekutin ve „třetím prostoru“ a (nebo) selhání ledvin, mohou být hladiny tohoto antibiotika v cílových tkáních nedostatečné.

4.2 Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro monitorování procesu hojení chronické rány pomocí metabolismu L-argininu s využitím UHPLC-MS/MS

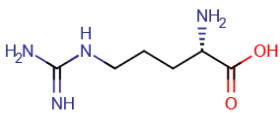
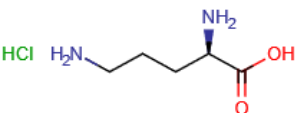
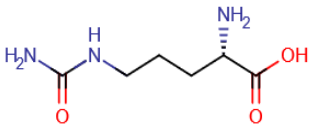
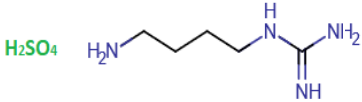
4.2.1 Úvod do problematiky a cíl práce

Chronické rány představují často opomíjený, avšak velký problém ve zdravotnictví. Významně snižují kvalitu života nemocného pro přetrvávající bolest a častou sekreci z rány. Léčba je komplikovaná, protože chronické rány jsou nezdídkou doprovázeny přidruženými nemocemi. Často je vyžadována dlouhodobá hospitalizace, která vytváří vysoké náklady a také je zatěžující pro pacienta. Hojení ran je velmi komplexní proces, který ovlivňuje řada faktorů [94, 104]. Z biochemického hlediska je významným mediátorem aminokyselina L-arginin. Představuje prekurzor řady významných látek a výrazně tak ovlivňuje celý průběh hojení (viz kap. 3.2.3).

V klinické praxi patří stanovení L-argininu, L-ornitinu a L-citrulinu k rutinně využívaným vyšetřením. Stanovení se nejčastěji provádí v plazmě, séru a moči. Avšak dle našich informací doposud nebyla publikovaná metoda pro stanovení všech námi zvolených analytů včetně agmatinu v exsudátu z chronických ran. Aplikace metod určených pro stanovení v jiných biologických tekutinách (například v séru nebo plazmě) by mohla být nepřesná. Exsudáty z chronických ran totiž představují velmi variabilní materiál, často kontaminovaný bakteriemi přítomnými v ráně. Z toho důvodu je pro stanovení vhodnější použít citlivější metodu, kterou je hmotnostní spektrometrie. Přesnost tohoto stanovení je také umocněna použitím značeného vnitřního standardu, který velmi dobře koriguje variability biologického materiálu.

Cílem této práce bylo vyvinout UHPLC-MS/MS metodu vhodnou pro monitorování metabolismu L-argininu v exsudátu získaného z chronických ran s využitím izotopicky značených vnitřních standardů. Jelikož metoda je určena pro aplikaci v klinickém výzkumu bylo snahou vyvinout rychlou, spolehlivou metodu s jednoduchou přípravou vzorků, která by nezahrnovala krok derivatizace. Fyzikálně chemické vlastnosti cílových analytů a jejich struktury jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 12: Strukturní vzorce a fyzikálně-chemické vlastnosti používaných látek.
Data a struktury získány z [176].

Analyt	Struktura	M _w (g/mol)	LogP	pK _A
L-arginin		174,20	-3,16	2,41 12,41
L-ornitin monohydrochlorid		168,62	-3,66	2,67 10,29
L-citrulin		175,19	-3,93	2,27 9,23
Agmatin sulfát		228,27	-1,18	12,61

pK_A nejsilnější kyseliny, pK_A nejsilnější báze

4.2.2 Přístrojové vybavení, chemikálie a biologický materiál

4.2.2.1 Chromatografický systém

Pro vývoj metody byl využit LC systém UFLC Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) ve spojení s hmotnostním spektrometrem LCMS 8030 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) vybavený trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem. Parametry přístrojů jsou uvedeny v kapitole 4.1.2.1.

4.2.2.2 Laboratorní vybavení

Pro úpravu vzorků byly využity následující přístroje: ultrazvuková lázeň DU-100 (Argo Lab, Carpi MO, Itálie), mikrocentrifuga D3024 (Scilogex, Rocky Hill, Connecticut, USA). Filtrace byla provedena pomocí mikrotitračních destiček s filtry (0,2 μm/350 μl AcroPrep 96 filter plates) a vakuového manifoldu pro mikrotitrační destičky (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) s pojeného s vakuovým čerpadlem VAC Space-50 (Chromservis, Praha, Česká republika).

4.2.2.3 Chemikálie

Standardní látky jako L-arginin (ARG), L-citrulin (CIT), L-ornitin monohydrochlorid (ORN), agmatin sulfát (AGM) byly zakoupeny u firmy Merck (Darmstadt, Německo). Substance pro látky používané jako vnitřní standardy L-arginin-¹³C₆ hydrochlorid, L-citrulin-d7 a L-ornitin-d6 hydrochlorid byly získány u firmy Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Kanada). Voda o čistotě LCMS, acetonitril LCMS, methanol LCMS, kyselina mravenčí LCMS, mravenčan amonný LCMS a síran zinečnatý monohydrát byly pořízeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

4.2.2.4 Příprava standardních roztoků

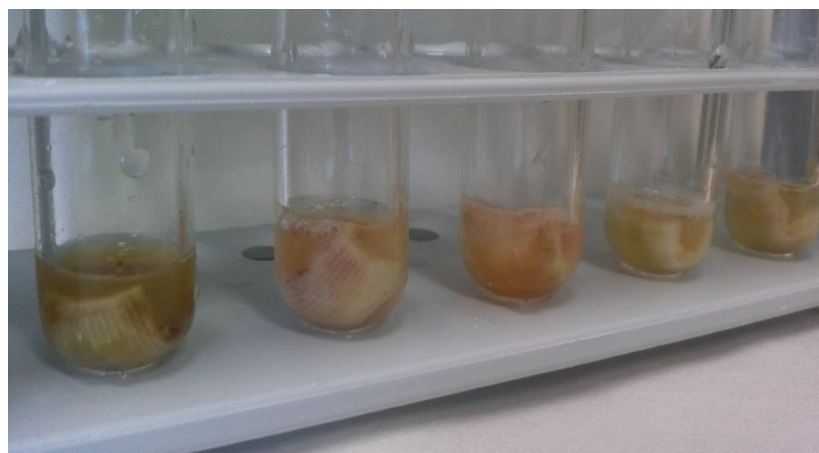
Zásobní roztoky ARG, ORN, CIT, AGM a všech vnitřních standardů (L-arginin-¹³C₆ hydrochlorid, L-citrulin-d7 a L-ornitin-d6 hydrochlorid) byly připraveny rozpuštěním požadované navážky ve vodě. Pracovní roztoky ARG, ORN, CIT a AGM byly dále ředěny vodou. Pracovní roztoky vnitřních standardů byly ředěny 10mmol/l mravenčanem amonným. Zásobní roztoky ARG, ORN, CIT a AGM byly skladovány v lednici (4 °C). Roztoky vnitřních standardů byly skladovány při teplotě -27 °C.

4.2.2.5 Biologické vzorky

Vzorky exsudátu chronických ran byly získány při rutinním převazu z části krycího materiálu. Jednalo se o pacienty III. interní gerontometabolické kliniky, Fakultní nemocnice Hradec Králové. Odběr byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (čj. 201811 S11P, 16. října 2018). Postup získání exsudátu z krycího materiálu byl inspirován dle Kujovská a kol. (2015) [177] a upraven. Pro sběr exsudátu a následnou extrakci byl použit krycí materiál Sorelex® (Contipro, Dolní Dobrouč, Česká republika), který byl následně nastříhán na čtverce (cca 1 × 1 cm). Z těchto čtverců byl exsudát uvolněn sonikací v ultrazvukové lázni (20 °C, 20 min.) do vody o čistotě LCMS (Obr. 22). Vzorky před analýzou byly uskladněny při -20 °C. Byla testována také extrakce z krytí značky Aquacel® Ag (ConvaTec, Praha, Česká republika), ale pro velkou bobtnavost materiálu nebylo možné tento postup provést. Ukázkou krytí rány zobrazuje Obr. 21



Obr. 21: Ukázka krytí pro odběr a extrakci exsudátu.
V dolní části materiál Sorelex® (SL), v horní části Aquacel® Ag (Ag).
Obrázek laskavě poskytnut prof. MUDr. Lubošem Sobotkou, CSc.



Obr. 22: Exsudát z rány extrahovaný z krytí Sorelex® do vody

4.2.3 Vývoj UHPLC-MS/MS metody

4.2.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek

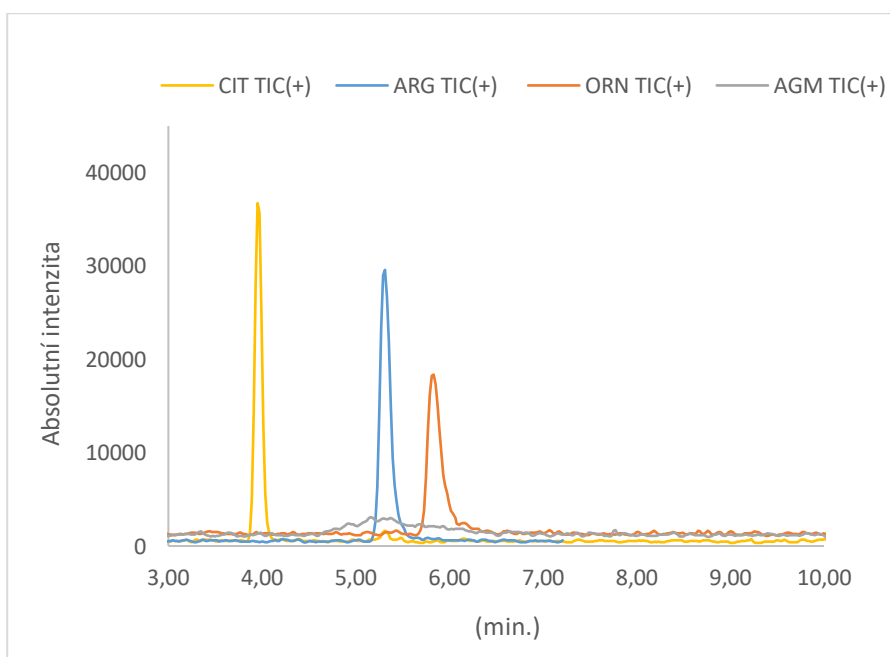
Prvním krokem vývoje metody byl výběr vhodné stacionární fáze a optimalizace chromatografických podmínek pro retenci a separaci cílových analytů (ARG, ORN, CIT, AGM). Nejprve byly testovány stacionární fáze C18 s modifikací vhodnou pro použití 100% vodné mobilní fáze. Dále byly zkoušeny dva typy stacionární fáze pro HILIC a fluorovaná stacionární fáze. Tyto stacionární fáze byly zvoleny s ohledem na polární charakter cílových analytů. Přehled testovaných kolon a porovnání získaných parametrů chromatografické separace je v Tab. 13. Pro všechny uvedené kolony byly optimalizovány separační podmínky ve smyslu složení mobilní fáze, pH a rychlosti průtoku.

Tab. 13: Přehled testovaných kolon a parametrů chromatografické separace

Kolona	Analyt	Účinnost (N·m ⁻¹)	HETP (μm)	Rozlišení	Mobilní fáze	t _R (min.)	Průtok (ml/min)
Meteoric Core C18 BIO (100 × 4,6 mm, 2,7 μm) (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Německo)	ARG	102240	9,81	1,36	A: 10 mmol/l AmFo, pH 2,5 (upraveno FA)	3,71	0,25
	ORN	89030	11,20	-	B: -	3,51	
	CIT	115950	8,68	0,39	A:B 100 : 0	3,91	
	AGM	87310	11,58	0,98		3,76	
Kinetex® Polar C18 (100 × 3 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA)	ARG	57480	17,42	1,56	A: 10 mmol/l AmFo, pH 2,0 (upraveno FA)	2,98	0,15
	ORN	52250	19,17	-	B: -	2,73	
	CIT	74980	13,39	1,21	A:B 100 : 0	3,22	
	AGM	65510	15,30	0,33		3,03	
Kinetex® F5 (100 × 4,6 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA)	ARG	122160	8,28	1,99	A: 10 mmol/l AmFo, pH 2,5 (upraveno FA)	3,95	0,25
	ORN	110370	9,17	-	B: -	3,68	
	CIT	139910	7,14	1,79	A:B 100 : 0	4,24	
	AGM	116400	8,67	0,07		3,96	
Kinetex® HILIC (100 × 4,6 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA)	ARG	62250	16,12	5,93	A: 10 mmol/l AmFo, pH 2,5 (upraveno FA)	3,29	0,80
	ORN	22810	43,88	0,83	B: 10 mmol/l AmFo v 85% ACN, 0,1% FA	3,45	
	CIT	60770	16,50	-	A:B 20 : 80	2,41	
	AGM	61810	16,21	0,17		3,51	
Acquity BEH Amide (150 × 3 mm, 1,7 μm) (Waters, Milford, USA)	ARG	72713	13,83	7,68	A: 10 mmol/l AmFo, pH 2,5 (upraveno FA)	5,32	0,50
	ORN	50800	19,76	2,22	B: 10 mmol/l AmFo v 85% ACN, 0,2% FA	5,81	
	CIT	73660	13,63	-	A:B 20 : 80	3,97	
	AGM	-	-	-		-	

 ARG L-arginin, ORN L-ornitin, CIT L-citrulin, AGM agmatin, HETP výškový ekvivalent teoretického patra (μm), AmFo mravenčan amonný, FA kyselina mravenčí, t_R retenční čas

Z dosažených výsledků (Tab. 13) byla patrná nízká retence analytů na obou typech C18 i F5 stacionární fázi. Také optimalizovaná mobilní fáze, která byla složená pouze ze 100% vodné složky (pufr AmFo s FA), poskytovala nízkou variabilitu separačního řešení při případném výskytu interferencí ve vzorcích chronických ran. Použití amidové stacionární fáze v módu HILIC bylo nepříznivé pro agmatin, který nebylo možné touto cestou separovat (Obr. 23). Inspirací pro použití kolony UHPLC BEH Amide (Waters, Milford, USA) v kombinaci s mravenčanem amonným ve vodné i organické složce mobilní fáze byla publikace Prinsen a kol. (2016) [124]. Aplikace byla určena pro stanovení ARG, ORN, CIT a dalších aminokyselin (bez AGM) v plazmě. Na rozdíl od této metody, kde byla použita gradientová eluce, byla v námi vyvíjené metodě testovaná eluce izokratická.



Obr. 23: Chromatografický záznam separace standardních látek ARG, ORN, CIT a AGM. Chromatografická kolona Acquity BEH Amide (150 × 3 mm, 1,7 μm), mobilní fáze složka A: 10 mmol/l AmFo pH 2,5; složka B: 10 mmol/l AmFo v 85% ACN, A : B 20 : 80, 0,5 ml/min.

Z výše uvedených důvodů byla pro další vývoj metody zvolena kolona Kinetex® HILIC 100 × 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, USA). Neoptimálnějších

separačních podmínek bylo dosaženo při mobilní fázi složené z 10mmol/l mravenčanu amonného pH 2,5 (složka A) a 10mmol/l mravenčanu amonného v 87% acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Obě složky byly v poměru 20 : 80 (A : B). Eluce probíhala v izokratickém módu při průtoku 1 ml/min. Pokud byla složka B mobilní fáze tvořená pouze acetonitrilem s 0,1% kyselinou mravenčí nedocházelo k retenci agmatinu do 10 minuty a tvar píku ornitinu nebyl přijatelný. Snížení koncentrace z 10mmol/l mravenčanu amonného na 5mmol/l mravenčan amonný vedlo ke zkrácení retenčního času interference vyskytující se u některých z testovaných vzorků exsudátů, což vedlo k riziku možné koeluce s píkem agmatinu. Dále byl testován přídavek methanolu do složky B pro snahu o zlepšení tvaru píku. Tento předpoklad se nepotvrdil a přídavek methanolu vedl ke ztrátě retence píku agmatinu (nebyl detekován do 10 minuty).

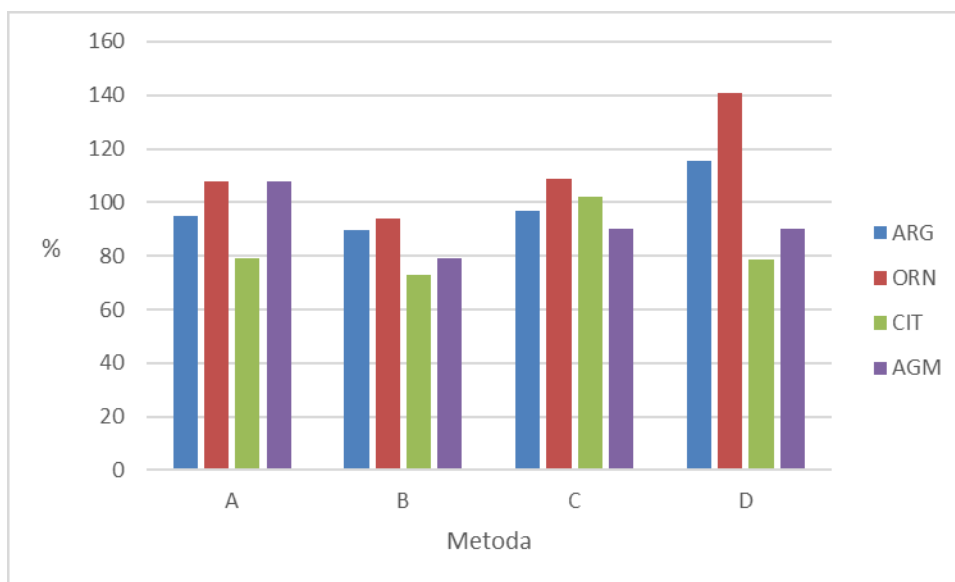
4.2.3.2 Vývoj extrakčního postupu

Postup pro úpravu exsudátu z ran byl optimalizován s cílem vyvinout jednoduchou, manuálně a časově nenáročnou extrakční metodu s předpokladem pro aplikaci na velké série vzorků. Z toho důvodu byla testována zejména technika deproteinace. Tento přístup je často využívám i v doposud publikovaných metodách pro stanovení aminokyselin. Přímý nástřik exsudátu do LC systému nebyl možný pro vysoký obsah proteinů. Ve vzorcích se často vyskytovaly i zbytky tkání.

Pro chromatografickou separaci v HILIC modu je optimální, pokud má rozpouštědlo vzorku podobné složení jako mobilní fáze. Proto vybraným testovaným deproteinačním činidlem byl acetonitril. A dále pak jeho kombinace s methanolem, ethanolem, propan-2-olem nebo 4% síranem zinečnatým. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 87% acetonitrilu s obsahem 10mmol/l mravenčanu amonného a s 0,1% kyselinou mravenčí, což byla současně i složka B mobilní fáze. Byly zkoušeny poměry 1 : 3, 1 : 4, 1 : 9 (v/v) k exsudátu (Obr. 24). Před vlastní deproteinací byl zařazen krok ředění exsudátu roztokem 10mmol/l mravenčanem amonným o pH 2,5 (složka A mobilní fáze), ve kterém byly rozpuštěny vnitřní standardy.

Dalším testovaným přístupem úpravy vzorku před analýzou byla ultrafiltrace. Pro provedení této metody byly využity membránové ultrafiltrační zkumavky (Microcon-10kDa Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane, Merck, Darmstadt, Německo).

Vzorek byl před ultrafiltrací ředěn 10mmol/l mravenčanem amonným o pH 2,5 (osahujícím vnitřní standardy) 1 : 1 (v/v). Centrifugace probíhala 50 minut, 14 000g, při 4 °C. Porovnání uvedeného extrakčního postupu s deproteinací je uvedeno na Obr. 24.



Obr. 24: Porovnání výtěžnosti (%) vybraných extrakcí pro ARG, ORN, CIT a AGM. Testovaným biologickým materiálem byl exsudát z rány s přidavkem standardních látek o koncentraci 50 μ mol/l ARG, ORN, CIT a 50 nmol/l AGM.

Legenda k jednotlivým metodám:

A: 50 μ l exsudátu + 50 μ l 10 mmol/l mravenčanu amonného o pH 2,5 (mobilní fáze A) + 200 μ l 10 mmol/l mravenčanu amonného v 87% acetonitrilu s 0,1% FA (mobilní fáze B), vortex 10 s, centrifugace 21 000g 10 min. 4 °C (poměr exsudátu a precipitačního činidla 1 : 4)

B: 50 μ l exsudátu + 50 μ l 10 mmol/l mravenčanu amonného o pH 2,5 (mobilní fáze A) + 150 μ l 10 mmol/l mravenčanu amonného v 87% acetonitrilu s 0,1% FA (mobilní fáze B), vortex 10 s, centrifugace 21 000g 10 min. 4 °C (poměr exsudátu a precipitačního činidla 1 : 3)

C: 50 μ l exsudátu + 50 μ l 10 mmol/l mravenčanu amonného o pH 2,5 (mobilní fáze A) + 400 μ l 10 mmol/l mravenčanu amonného v 87% acetonitrilu s 0,1% FA (mobilní fáze B), vortex 10 s, centrifugace 21 000g 10 min. 4 °C (poměr exsudátu a precipitačního činidla 1 : 9)

D: 100 μ l exsudátu + 100 μ l 10 mmol/l mravenčanu amonného o pH 2,5 (mobilní fáze A), centrifugace 14 000g 50 min. 4 °C

Jelikož koncentrace agmatinu v exsudátu z ran není známá a v séru se vyskytuje v nízkých hladinách (nmol/l), oproti ostatním testovaným aminokyselinám (μmol/l), byl po deproteinaci vzorku testován krok zakoncentrování supernatantu odpařením. Odparek byl následně rozpuštěn v mobilní fázi. Předpokladem bylo získání nižšího kvantifikačního limitu právě pro agmatin. Výsledkem byly ale poměrně zakalené vzorky a proces extrakce nebyl příliš reprodukovatelný. Navíc odpařování výrazně prodlužovalo délku úpravy vzorku (přibližně o 2 hodiny).

4.2.4 Finální podmínky

LC systém: UFLC Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Kolona: Kinetex® HILIC, 100 × 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, USA), teplota na koloně 25 °C

Mobilní fáze:

složka A: 10 mmol/l mravenčan amonný pH 2,5

složka B: 10 mmol/l mravenčan amonný v 87% acetonitrilu s 0,1% FA

izokratická eluce: A : B 20 : 80, průtok 1 ml/min

Objem nástřiku: 2 μl

Detektor: LCMS 8030

Typ ionizace: ESI, pozitivní mód

Software: LabSolutions 5.41 SP1, využit i pro optimalizaci podmínek MS detekce (Tab. 14)

Chromatografické záznamy s použitými finálními podmínkami pro UHPLC-MS/MS stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu jsou uvedeny na Obr. 25.

Tab. 14: Optimalizované podmínky MS detekce

Analyt	Ion prekurzoru (<i>m/z</i>)	Ion produktu (<i>m/z</i>)	Dwell time (ms)	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
ARG	175,00	70,10	50	-18,0	-25,0	-15,0
		60,00	50	-12,0	-15,0	-13,0
ORN	133,00	69,95	50	-13,0	-21,0	-15,0
		115,95	50	-13,0	-16,0	-27,0
CIT	176,00	158,95	50	-12,0	-14,0	-21,0
		113,00	50	-12,0	-17,0	-12,0
AGM	131,00	72,00	50	-13,0	-16,0	-16,0
		30,00	50	-13,0	-27,0	-13,0
		59,95	50	-13,0	-13,0	-13,0
ARG IS	181,00	74,20	50	-12,0	-25,0	-13,0
		61,15	50	-30,0	-16,0	-24,0
ORN IS	139,00	75,95	50	-25,0	-21,0	-14,0
		121,00	50	-23,0	-15,0	-23,0
CIT IS	183,00	165,90	50	-19,0	-12,0	-19,0
		77,10	50	-18,0	-27,0	-16,0

Q1 první kvadrupól, CE kolizní energie, Q3 třetí kvadrupól, IS vnitřní standard

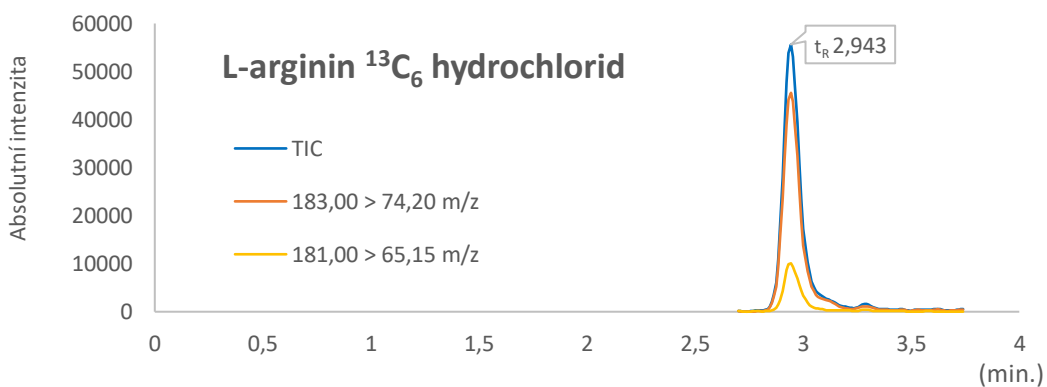
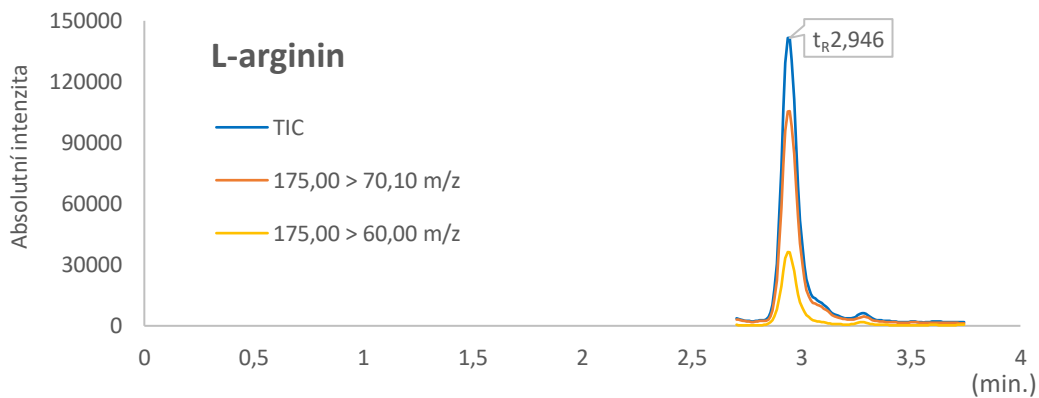
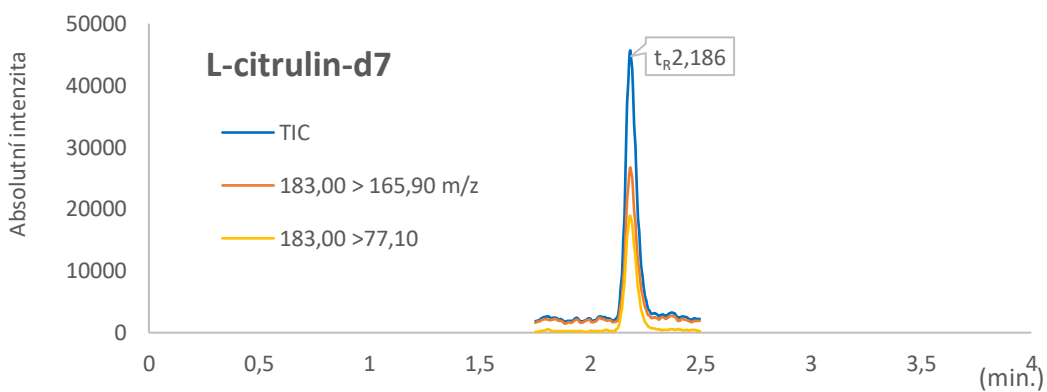
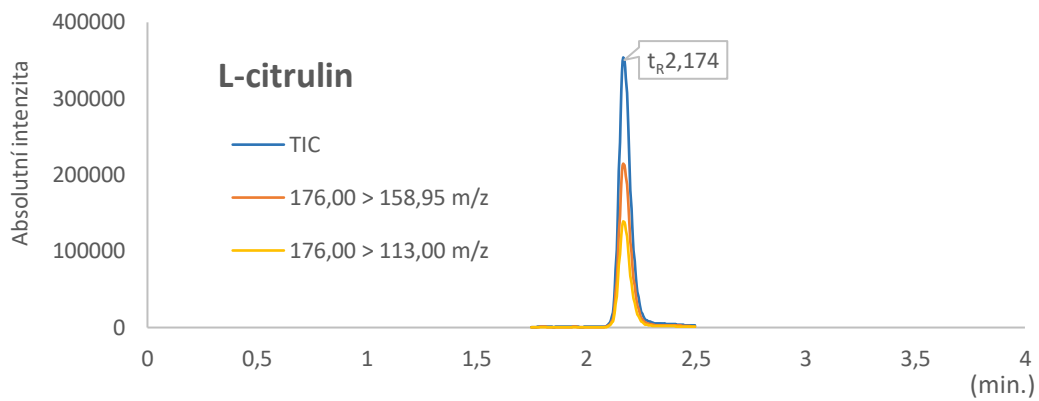
Extrakční postup

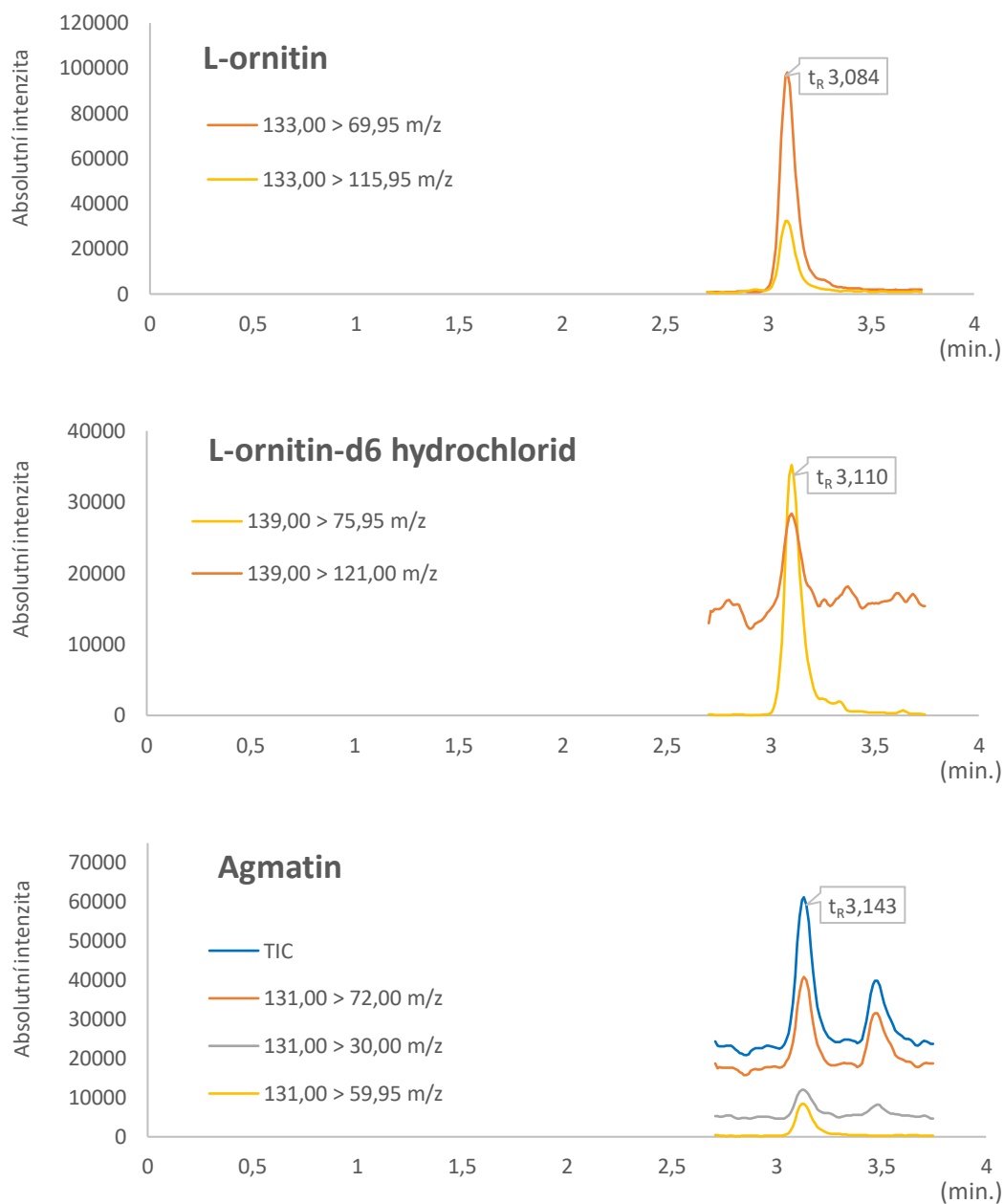
Exsudát z rány (50 μ l) byl smísen s 50 μ l roztoku IS (20 μ mol/l ARG-IS, CIT-IS a 60 μ mol/l AGM-IS) v 10mmol/l mravenčanu amonném pH 2,5 (MF A). Pro precipitaci proteinů bylo přidáno 400 μ l 10mmol/l mravenčanu amonného v 87% acetonitrilu s 0,1% FA (MF B). Vzorek byl vortexován po dobu 10 s. Následovala centrifugace (21 000g, 10 min., 4 °C). Poté bylo 150 μ l supernatantu filtrováno použitím filtračních mikrotitračních destiček s velikostí pórů 0,2 μ m (Pall, Ann Arbor, MI, USA) za pomoci vakua. Nástřik supernatantu o objemu 2 μ l do LC-MS/MS systému byl proveden přímo z mikrotitrační destičky.

Dostatečná výtěžnost použité extrakční metody byla prokázána pomocí procentuální odchylky plochy píků ARG, ORN, CIT a AGM u vzorku s přidavkem standardních roztoků o požadované koncentraci do exsudátu před extrakčním procesem a do supernatantu získaného jako finální produkt extrakce (před nástřikem do LC systému) po odečtu blanku (endogenního obsahu analytů). Stanovení bylo provedeno na čtyřech koncentračních hladinách pokrývajících kalibrační rozsah metody Tab. 15.

Tab. 15: Výtěžnost extrakce

Koncentrace	Analyt RE (%)			
	CIT	ARG	ORN	AGM
5 µmol/l	102,41	100,08	115,22	96,89
25 µmol/l	103,22	102,74	85,43	111,14
50 µmol/l	113,91	98,21	91,09	110,72
250 µmol/l	100,65	92,55	89,18	100,98





Obr. 25: Chromatografické záznamy separace L-argininu (54,81 $\mu\text{mol/l}$), L-ornitinu (127,26 $\mu\text{mol/l}$), L-citrulinu (219,64 $\mu\text{mol/l}$) a agmatinu (168,86 nmol/l) v exsudátu z chronické rány dle finálních podmínek metody. Kvantifikace byla provedena metodou celkového iontového proudu (TIC). Výjimkou byl L-ornitin, kdy ke kvantifikaci byl využitý pouze jeden z přechodů (133,00 > 69,95 m/z) z důvodu častějšího výskytu interferencí v druhém přechodu (133,00 > 115,95 m/z, použit pouze pro kvalitativní hodnocení). Stejná situace byla u L-ornitin-d6 hydrochloridu, kde ke kvantifikaci byl využitý přechod 139,00 > 75,95 m/z.

4.2.5 Validace metody

Ověření vybraných validačních parametrů metody vycházelo ze směrnic určených pro validaci bioanalytických metod: Guideline on bioanalytical method validation (European Medicine Agency, EMA) [169] a Bioanalytical method validation - Guidance for industry (Food and Drug Administration, FDA) [170]. Kontrolní vzorky byly připraveny v laboratoři přidavkem standardních látek ARG, ORN, CIT a AGM v požadované koncentraci do matrice (exsudátu). Problémem byla absence blankové matrice z důvodu fyziologického výskytu cílových analytů v exsudátu. Původní hladiny uvedených látek byly před přidavkem změřeny.

4.2.5.1 Vybrané parametry hodnocené v rámci validace metody

Přesnost a preciznost metody

Preciznost metody byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) plochy píků ARG, ORN, CIT a AGM. Přesnost metody byla vyhodnocena jako procentuální odchylka získané plochy píku od nominální hodnoty. V rámci jedné série (within-run) bylo ověření obou parametrů provedeno analýzou pěti vzorků na čtyřech koncentračních hladinách pokrývajících celý rozsah kalibrační přímky. Mezidenní přesnost a preciznost (between-run) metody byla prověřena analýzou tří vzorků na čtyřech koncentračních hladinách v rámci dvou rozdílných dnů. Dosažené výsledky akceptovaly kritéria uvedené směrnicí EMA a FDA pro preciznost RDS nižší než 15 % a pro přesnost odchylka do 15 % od nominální hodnoty (Tab. 16).

Tab. 16: Přesnost a preciznost metody pro ARG, ORN, CIT a AGM v exsudátu

Analyt		ARG	ORN	CIT	AGM*
Koncentrační hladiny ($\mu\text{mol/l}$, nmol/l^*)	L1	5	5	5	5
	L2	25	25	25	25
	L3	50	50	50	50
	L4	250	250	250	250
Měření v rámci jedné série (within-run), n = 5					
Přesnost (%)	L1	88,00	103,10	100,20	102,85
	L2	98,77	99,09	96,79	100,68
	L3	100,30	104,57	100,26	101,13
	L4	100,07	102,03	99,61	99,89
Preciznost (RDS %)	L1	13,14	9,22	5,25	2,69
	L2	0,78	4,23	3,77	1,07
	L3	0,61	0,43	4,62	1,82
	L4	0,59	1,43	3,95	0,63
Mezidenní měření (between-run), n = 3					
Přesnost (%)	L1	86,11	107,67	97,86	104,73
	L2	95,55	102,22	98,94	99,79
	L3	98,21	106,81	101,68	96,82
	L4	100,4	102,95	98,39	96,06
Preciznost (RDS %)	L1	14,12	6,01	3,35	2,53
	L2	4,77	4,32	3,08	1,26
	L3	3,00	2,96	1,96	6,30
	L4	0,46	1,26	1,75	5,64

* platí pro agmatin, n = počet opakování extrakce

Linearita

Linearita metody byla stanovena pomocí matricových kalibračních křivek s přidavkem standardů ARG, ORN, CIT a AGM o požadované koncentraci a také s použitím standardních roztoků bez obsahu matrice. Směrnice kalibračních křivek s matricí a bez matrice byly porovnány. Vzorek exsudátu s endogenním obsahem cílových analytů („blank“) byl použitý pro odečet pozadí matrice (tj. původních koncentrací cílových analytů). Z porovnání směrnic obou kalibračních křivek bylo patrné, že matrice nemá významný vliv na odezvu analytů. Stejných závěrů bylo dosaženo i při stanovení matricových efektů výpočtem (kap. 4.1.6). Proto pro účely kvantifikace byla sestavena kalibrační křivka tvořená šesti kalibračními hladinami roztoků standardních látek bez obsahu matrice. Pro korekci byly využity izotopicky značené vnitřní standardy.

Lineární rozsah pro ARG, ORN a CIT byl 5–500 $\mu\text{mol/l}$ a pro agmatin 5–500 nmol/l . Vzorky exsudátů z ran, u kterých byly hladiny cílových analytů vyšší než kalibrační rozsah metody, mohly být ředěny. Integrita ředění byla ověřena.

Selektivita

Protože blanková matrice exsudátu z ran není dostupná (cílové analyty jsou endogenní povahy), byla selektivita metody zajištěna uplatněním selektivního záznamu více reakcí (MRM, Multiple Reaction Monitoring) módu, kdy pro potvrzení identity ARG, ORN, CIT byly sledovány dvě fragmentační reakce vybraného iontu pro každý analyt (pro AGM tři) a jejich značené vnitřní standardy (Tab. 14.)

Matricový efekt

Vliv matrice vzorku na ARG, ORN, CIT, AGM a vnitřní standardy byl sledován porovnáním ploch píků jednotlivých analytů přidaných do matrice po extrakci (získané od šesti různých pacientů) s plochami píků standardů bez matrice (roztok standardů). Matricový efekt byl testován na dvou koncentračních hladinách. Pro žádný z testovaných analytů nebyl matricový efekt vyšší než $100 \pm 15\%$. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 17.

Tab. 17: Matricový efekt vyjádřený v procentech (ME %) pro ARG, ORN, CIT, AGM a vnitřní standardy od šesti pacientů

Analyt	Vzorek	L1 (ME %)	L2 (ME %)	IS (ME %)	Normalizovaný ME (%) (Analyt/IS)*100	
					L1	L2
ARG	1	91,97	102,37	91,34	100,69	112,08
	2	91,33	98,04	86,68	105,36	113,11
	3	97,24	96,97	92,49	105,14	104,84
	4	95,76	101,96	93,91	101,97	108,57
	5	90,32	95,43	88,45	102,11	107,89
	6	97,88	99,65	91,25	107,27	109,21
ORN	1	113,50	125,45	109,22	103,92	114,86
	2	114,57	114,85	108,13	105,96	106,21
	3	107,11	112,08	111,74	95,86	100,30
	4	111,89	115,51	109,20	102,46	105,78
	5	113,97	110,81	104,51	109,05	106,03
	6	115,92	115,80	111,83	103,66	103,55
CIT	1	101,71	108,06	97,94	103,85	110,33
	2	98,20	104,87	92,81	105,81	112,99
	3	101,88	106,09	103,83	98,12	102,18
	4	104,02	111,35	101,83	102,15	109,35
	5	98,41	102,09	93,25	105,53	109,48
	6	110,36	108,16	96,06	114,89	112,60
AGM	1	111,95	109,63	*	106,07	103,88
	2	92,24	108,26	*	85,09	100,12
	3	99,31	110,44	*	88,88	98,84
	4	104,18	108,97	*	96,85	101,30
	5	103,84	107,70	*	99,36	103,05
	6	109,22	112,36	*	97,67	100,47

* pro AGM byl zvolen IS L-ornitin-d6 hydrochlorid

4.2.6 Aplikace metody na reálné vzorky

Použitelnost validované metody pro klinickou praxi byla ověřena stanovením ARG, ORN, CIT a AGM v exsudátu z chronických ran u pacientů III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové hospitalizovaných pro léčbu špatně se hojících ran (ukázka Tab. 18). Protokol byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (č. 201511–S22P 16.října 2018). V současné době probíhá sběr vzorků pro pilotní studii. Z důvodu různého objemu exsudátu absorbovaného do krytí určeného pro extrakci musí být výsledné hodnoty vydávány jako poměr. Tím je korigován faktor ředění vzorku.

Tab. 18: Ukázka stanovených koncentrací v exsudátu z chronických ran u vybraných pacientů

Pacient	ARG ($\mu\text{mol/l}$)	ORN ($\mu\text{mol/l}$)	CIT ($\mu\text{mol/l}$)	AGM (nmol/l)	ORN/ARG	CIT/ARG	AGM/ARG
P1	10,66	22,33	11,70	176,42	2,09	1,10	16,55
P2	51,60	373,86	50,89	8,44	7,25	0,99	0,16
P3	181,67	236,47	257,47	6,10	1,30	1,42	0,03
P4	7,02	93,51	69,87	950,57	13,32	9,95	135,41
P5	54,81	127,26	219,64	168,86	2,32	4,01	3,08

4.2.7 Závěr

V rámci této práce byla vyvinuta a validovaná UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v exsudátu z chronických ran. Podmínky byly optimalizovány tak, aby metoda byla vhodná pro velké série měření s jednoduchým a časově nenáročným procesem úpravy vzorku před analýzou bez nutnosti derivatizace. Všechny stacionární fáze v reverzním módu vykazovaly nízkou retenci námi zvolených analytů. Proto byl pro finální vývoj metody využitý HILIC chromatografický mód. Pro zvýšení přesnosti stanovení byly použity tři značené vnitřní standardy. Exsudát z rány byl extrahován z části krycího materiálu získaného při rutinním převazu rány. Tento postup umožnil odběr vzorku neinvazivním způsobem bez zátěže pacienta.

Metoda byla validována dle doporučení EMA a FDA a byla zavedena do spektra vyšetření Výzkumné laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové. V současné době probíhá sběr vzorků pro pilotní studii, jejímž cílem bude zjistit uplatnění monitorování metabolismu L-argininu přímo v chronické ráně, jako indikátoru procesu hojení. Naměřená data by tak měla přispět k získání dalších důležitých informací o procesech probíhajících v chronických ranách a vést eventuálně i k volbě či úpravě možných terapeutických postupů.

4.3 Koncentrace neopterinu, kynureninu a tryptofanu v sekretech z ran u pacientů s rakovinou prsu a maligním melanomem

4.3.1 Úvod do problematiky

V současné době je stále více sledována role imunitního systému v souvislosti s maligními onemocněními. Imunitní odpověď může být klíčovým ukazatelem pro predikci nemoci, protože změny hladin biomarkerů imunitní odpovědi mohou reflektovat růst tumoru a jeho progresi. Management terapie nádorových onemocnění představuje multidisciplinární přístup, který kombinuje operaci, radioterapii a systémovou léčbu. Všechny tyto složky mají vliv na imunitní odpověď organismu.

Neopterin je produkován makrofágy po aktivaci interferonem gamma. Jeho zvýšené hladiny v séru a moči byly prokázány u řady primárních tumorů (např. karcinom prsu a melanom) a predikovaly špatnou prognózu onemocnění. Tryptofan představuje esenciální aminokyselinu nezbytnou pro syntézu proteinů a je prekurzorem řady biologicky významných látek, jako serotonin, melatonin, nikotinamid a kynurenin. Role kynureninu je intenzivně studována v souvislosti s imunitním systémem, zánětlivou odpovědí, patogenezí neurodegenerativních stavů a také zhoubných nádorových onemocnění. Přeměnu tryptofanu na kynurenin katabolizuje enzym indolamin 2,3-dioxygenasa (IDO). IDO je považován za jeden z klíčových faktorů umožňující únik nádoru kontrole imunitního systému. Zvýšená hladina IDO, která je vyjádřena hladinou kynureninu, byla prokázána u řady nádorových onemocnění. U některých typů rakoviny koncentrace kynureninu a poměru kynurenin/tryptofan projevuje signifikantní korelaci s hladinami neopterinu. Avšak na rozdíl od neopterinu jsou informace o koncentracích tryptofanu a kynureninu u těchto pacientů omezenější [178–180].

Tato studie vznikla ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Nemocnice Pardubického kraje, a.s., a Onkologickou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc. Jednalo se o pilotní projekt, jehož cílem bylo sledovat vliv imunitní odpovědi na chirurgický zákrok u pacientů s nádorovým onemocněním. Pro tento účel byly sledovány hladiny

neopterinu, kynureninu a tryptofanu v sekretu z pooperačních ran. Stanovení bylo prováděno ve výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Na tomto projektu jsem se podílela na příjmu klinického materiálu z Pardubické nemocnice, úpravě vzorků před analýzou a konečném stanovení hladin neopterinu, kynureninu a tryptofanu pomocí HPLC-UV-FD techniky.

4.3.2 Metodika

Sledovanou skupinu tvořilo celkem 22 pacientů, 16 žen a 6 mužů, kteří podstoupili chirurgický zákrok z důvodu rakoviny prsu ($n = 15$) a pro maligní melanom ($n = 7$). Vzorky byly odebírány v ranních hodinách z drénů zavedených během chirurgického výkonu. Pokud byl odebraný objem sekretu dostačující, byly vzorky rozděleny na dva alikvoty. Jeden z těchto alikvotů byl stabilizován argonem. Vzorky byly po celou dobu odběru a manipulace chráněny před světlem. Skladování před analýzou probíhalo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hladiny neopterinu, kynureninu a tryptofanu byly měřeny metodou HPLC-UV-FD (Prominence LC20, Shimadzu, Kyoto, Japonsko), která byla vyvinuta pracovníky uvedené laboratoře a publikována Kujovská a kol. (2015) [177]. Pro separace cílových analytů byla zvolena monolitické stacionární fáze C18 Chromolith® high-resolution $100 \times 4,6$ mm s monolitickou předkolumnou $10 \times 4,6$ mm (Merck, Darmstadt, Německo). Mobilní fáze byla tvořená 15mmol/l fosfátovým pufrům ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pH 3) v kombinaci s acetonitrilem. Separace byla provedena v gradientovém módu. Pro neopterin a tryptofan byla použita fluorescenční detekce (neopterin: 353 nm excitační a 438 nm emisní vlnová délka, tryptofan: 254 nm excitační a 404 nm emisní vlnová délka). Detekce kynureninu probíhala s využitím detektoru s diodovým polem při vlnové délce 230 nm. Úprava vzorku před analýzou zahrnovala naředění 200 μl sekretu 100 μl 15mmol/l fosfátového pufru (pH 6,5) a deproteinaci 100 μl chlazeného ethanolu. Následovala centrifugace (14 000g, 10 min.) a filtrace supernatantu pomocí 0,2 μm filtračních mikrotitračních destiček (Pall, Ann Arbor, MI, USA). Objem nástřiku vzorku do HPLC systému byl 5 μl . Pro vyhodnocení výsledků byl použit Wilcoxonův párový test a statistický software NCSS (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, UT, USA).

4.3.3 Výsledky a diskuze

Stabilizace argonem neměla vliv na výslednou koncentraci cílových analytů v porovnání se vzorky bez této úpravy. Z naměřených hladin neopterinu, kynureninu a tryptofanu v sekretu z pooperačních ran vyplývá, že u pacientů s primárním tumorem (karcinom prsu ve všech případech) byly hodnoty poměru neopterin/tryptofan výrazně vyšší než u vzorků odebraných z axily (průměr \pm SD, $0,92 \pm 0,41$ vs. $0,61 \pm 0,14$ mmol/mol; $p = 0,049$). Naopak žádný významný rozdíl nebyl pozorován v hladinách neopterinu ($49,2 \pm 28,6$ vs. $31,5 \pm 11,1$ nmol/l; $p = 0,131$), kynureninu ($5,97 \pm 7,49$ vs. $5,34 \pm 6,25$ μ mol/l; $p = 0,461$), tryptofanu ($52,9 \pm 13,0$ vs. $51,2 \pm 13,3$ μ mol/l; $p = 0,557$) a poměru kynureninu a tryptofanu ($108,1 \pm 107,7$ vs. $103,5 \pm 106,7$ mmol/mol; $p = 0,844$). Žádné signifikantní rozdíly v koncentraci cílových analytů a jejich poměrů nebyly patrné při porovnání sekretů z axily u sedmi pacientů s rakovinou prsu odebraných ve dvou po sobě jdoucích dnech. Použití poměru neopterin/tryptofan koriguje potenciaální možnost zředění vzorku sekretu tekutinou z cirkulace nebo jiných zdrojů.

Je nutné podotknout, že sledovaná kohorta zahrnovala velmi málo pacientů. Žádné porovnání nebylo provedeno mezi vzorky sekretů u pacientů s primárním karcinomem prsu a maligním melanomem. Důvodem bylo, že ve třech případech melanomu ze sedmi byl výkon proveden na lymfatických uzlinách. Malý rozsah skupiny také nedovolil porovnání výsledků ve vztahu s klinickým průběhem a komplikacemi při operacích. Jako vhodné by se jevilo i porovnání hladin těchto biomarkerů ze sekretu z ran s hodnotami naměřenými v systémové cirkulaci nebo jinými.

4.3.4 Závěr

Z dosažených výsledků vyplývá, že měření hladin neopterinu, kynureninu a tryptofanu v sekretu z ran by mohlo být použito pro monitorování lokální imunitní odpovědi po operaci. Lze předpokládat, že stanovení hladin uvedených látek může sloužit i jako ukazatel lokálních komplikací nebo následných nežádoucích účinků. V budoucnu by bylo vhodné tuto hypotézu ověřit na větší skupině pacientů. Dosažené výsledky byly publikovány [178]. Obě uvedené metody byly vyvíjeny se zaměřením na

uplatnění v navazujícím klinickém výzkumu a zavedením do rutinního spektra stanovení výzkumné laboratoře.

4.4 Neopterin, kynurenin a tryptofan jako nové biomarkery pro časnou detekci rektálního anastomotického leaku

4.4.1 Úvod do problematiky

Kolorektální karcinom představuje jednu z nejčastěji se vyskytujících malignit v České republice. Každý rok se objeví přibližně 8000 nových případů a zhruba 4000 pacientů ročně zemře. Obávanou komplikací související s resekcí rekta je porucha hojení anastomózy. Anastomotický leak (incidence 2,5–21 %) je definován jako patologická komunikace mezi intra- a extraluminálním prostorem při poruše integrity střevní stěny v místě anastomózy, kdy dochází k úniku střevního obsahu do okolí. Taková situace vede často ke vzniku sepse při formující se abscesové kolekci v pánvi nebo při peritonitidě. Anastomotický leak představuje nejen zvýšené riziko vzniku lokální recidivy tumoru a zhoršení celkového přežití, ale i funkčních výsledků operace. Pro diagnostiku anastomotického leaku existují běžné laboratorní ukazatele (např. C-reaktivní protein, hladina leukocytů) a klinické skórovací systémy. Stále ale chybí dostatečně silný biomarker nebo efektivní skórovací systém, který by spolehlivě v časném pooperačním období identifikoval pacienta s rozvíjející se poruchou hojení anastomózy, ale zejména v předoperačním diagnostickém procesu umožnil predikovat poruchu hojení a tím ovlivnil chirurgický léčebný postup [181].

Cílem této studie bylo posoudit potenciál sledování hladin neopterinu, kynureninu a tryptofanu v biologických tekutinách v roli biomarkerů pro predikci komplikací hojení anastomózy. Projekt byl realizován ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové, Katedrou válečné chirurgie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Brně a Katedrou informatiky a kvantitativních metod Fakulty informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové. Měření hladin cílových analytů (neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu) v séru, tekutině z drénů a moči probíhalo ve výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Na tomto projektu jsem se podílela na úpravě vzorků před analýzou a konečném stanovení hladin neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu pomocí HPLC-UV-FD techniky.

4.4.2 Metodika

Do této prospektivní klinické studie bylo zařazeno 42 pacientů, kteří podstoupili elektivní resekci rekta pro karcinom s primární anastomózou konstruovanou bistaplerovou technikou. Třicet šest pacientů bylo operováno laparoskopicky a 6 pacientů podstoupilo otevřenou operaci. Hladiny neopterinu, kynureninu a tryptofanu byly měřeny v séru a moči před operačním výkonem a dále 1. až 6. den od operace. V pooperačních dnech byly tyto látky stanovovány také v tekutině z drénu. Druhý a 5. pooperační den byly stanoveny hodnoty CRP a hladiny leukocytů v krvi. Dále byla sledována demografická, onkologická, terapeutická a klinická data pacientů. Statistická data byla zpracována softwarem SPSS (Statistics 22.0 software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Kvantifikace neopterinu, kynureninu a tryptofanu v tekutině z drénu byla uskutečněna dle metody Kujovská a kol. (2015) [177]. Podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.2. Pro stanovení neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu v séru byla použita HPLC-UV-FD metoda vyvinutá Krčmová a kol. (2011) [182]. Separace cílových analytů byla provedena pomocí dvou sériově zapojených monolitických kolon Chromolith® SpeedROD RP-18e 50 × 4,6 mm a Chromolith® Performance RP-18e 100 × 3 mm spojených s předkolonou Chromolith® Guard RP 18e 10 × 4,6 mm. Mobilní fáze byla tvořena 15mmol/l fosfátovým pufr (KH₂PO₄ + K₂HPO₄ · 3H₂O, pH 4,5). Sérum (200 μl) bylo naředěno 100 μl fosfátového pufru pH 6,5 a k deproteinaci bylo použito 100 μl chlazeného ethanolu. Následně byly vzorky centrifugovány (14 100g, 10 min.) a filtrovány pomocí 0,2 μm filtračních mikrotitračních destiček (Pall, Ann Arbor, MI, USA). Objem nástřiku do chromatografického systému byl 1 μl. Kynurenin a kreatinin byl detekován detektorem s diodovým polem při vlnové délce 230 a 235 nm. Neopterin a tryptofan byl stanovován pomocí fluorescenčního detektoru. Pro neopterin byla zvolena 353 nm excitační a 438 nm emisní vlnová délka a pro tryptofan 254 nm excitační a 404 nm emisní vlnová délka. V moči byly hladiny neopterinu a kreatininu stanovovány s využitím HPLC-UV-FD [183]. Pro separaci byla použita hybridní kolona Gemini Twin C18, 150 × 3 mm s velikostí částic 5 μm. Mobilní fázi představoval 15mmol/l fosfátový pufr (KH₂PO₄ + K₂HPO₄ · 3H₂O, pH 6,5). Před nástřikem do HPLC systému byla moč naředěna (1 : 10 v/v) 15mmol/l fosfátovým pufr o pH 6,5 a filtrována stejným

způsobem jako v případě séra. Vzorky byly do HPLC systému nastříkovány v objemu 1 μ l. Detekce neopterinu probíhala pomocí fluorescenčního detektoru při vlnových délkách: 353 nm excitační a 438 nm emisní. Kreatinin byl měřen detektorem s diodovým polem při 235 nm. Všechny uvedené metody byly publikovány pracovníky laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky a jsou zavedeny do spektra rutinních vyšetření. K měření byl využíván chromatografický systém (Prominence LC20, Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

4.4.3 Výsledky a diskuze

U šestnácti pacientů (38,1 %) se objevily různé komplikace hojení anastomózy. Zbývající pacienti měli pooperační průběh bez závažných komplikací. Žádné významné statistické rozdíly nebyly nalezeny při stanovení hladin neopterinu, kynureninu a tryptofanu v séru. Naopak statisticky významné výsledky ($p = 0,037$) byly získány při stanovení neopterinu, korigovaného na kreatinin (poměr neopterin/kreatinin) v moči. Skupina pacientů s anastomotickým leakem vykazovala signifikantně vyšší hladiny (průměr \pm SD 139,47 \pm 44,28 μ mol/mol neopterin/kreatinin) než u skupiny bez komplikací (průměr \pm SD 114,73 \pm 35,54 μ mol/mol neopterin/kreatinin). Významné rozdíly ($p = 0,012$) byly zjištěny u těchto dvou skupin také v průběhu celého sledovaného období, kdy průměrné hodnoty poměru neopterin/kreatinin byly 185,10 \pm 57,96 μ mol/mol u skupiny s anastomotickým leakem a 142,8 \pm 52,91 μ mol/mol u pacientů bez komplikací.

V tekutině z drénu byl statistický rozdíl ($p = 0,048$) patrný v hladinách neopterinu. Skupina s komplikacemi dosahovala opět vyšších hodnot 49,03 \pm 37,41 nmol/l vs. 27,89 \pm 11,31 nmol/l. Dále byl v tomto typu biologického materiálu sledován poměr neopterin/tryptofan s hodnotou $p = 0,062$, což je na hranici statistické významnosti.

Pro predikci anastomotického leaku byly další statistickou analýzou určeny 95% meze, které určují patologickou hladinu neopterinu/kreatininu v moči před výkonem (126,64 μ mol/mol) a po výkonu (159,16 μ mol/mol). Hladina neopterinu v tekutině z drénu vyšší než 31,53 nmol/l a poměru neopterin/tryptofan vyšší než 0,47 nmol/ μ mol byla považována za patologickou.

Ve shodě s dalšími studii bylo prokázáno, že vyšší hodnoty CRP (> 140 mg/l) odrážely patologický pooperační průběh. Avšak nevýhodou spojenou se sledováním hladiny CRP je, že nedokáže odlišit sepse způsobené anastomotickým leakem od jiných příčin.

4.4.4 Závěr

Studie prokázala významně zvýšené hodnoty poměru neopterin/kreatinin před chirurgickým zákrokem i v průběhu pooperačního období u skupiny pacientů s poruchou hojení anastomózy ve srovnání se skupinou bez pooperačních komplikací. Stejný trend byl pozorován v případě hladin neopterinu také v tekutině z drénu. Z těchto poznatků vyplývá, že vysoká hladina neopterinu (neopterin/kreatinin) v moči před operací by mohla predikovat riziko vzniku anastomotického leaku. Také vysoké hladiny neopterinu v moči a drénu v pooperačním období mohou sloužit jako ukazatel komplikací hojení. Stanovení hladiny uvedených látek v séru neprokázalo v této souvislosti statistický význam. Spolehlivá predikce rizika vzniku anastomotického leaku umožní modifikovat operační taktiku a výrazně tak snížit riziko vzniku komplikací. Výsledky byly publikovány [181].

5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývá vývojem, validací a samotným využitím chromatografických technik pro účely biomedicínského výzkumu v rámci spolupráce s významnými klinickými pracovišti České republiky. V experimentální části práce jsou prezentovány dvě UHPLC-MS/MS metody. První z nich se zabývá stanovení vankomycinu v séru, moči a peritoneálním/pleurálním výpotku. Druhá metoda umožňuje analýzu L-argininu a dalších látek souvisejících s jeho metabolismem (L-ornitin, L-citrulin a agmatin) v exsudátech získaných z chronických ran.

Obě vyvinuté metody využívají UHPLC-MS/MS systém. Použití hmotnostní spektrometrie poskytuje, v případě metody pro měření hladin vankomycinu, spolehlivější stanovení v porovnání s UV detekcí v biologických tekutinách. Tento typ detekce také umožňuje vyvinout metodu bez nutnosti derivatizace pro látky související s metabolismem L-argininu, což v případě UV nebo fluorescenční detekce není možné. Důvodem je absence chromoforu v chemické struktuře těchto látek. Díky tandemové hmotnostní spektrometrii s použitím selektivního záznamu více reakcí lze i pro biologické matrice vyvíjet metody s rychlou, levnou a na provedení nenáročnou úpravou vzorku před analýzou v různých druzích biologické matrice. Také v rámci této práce jsou pro stanovení cílových analytů využívány v rozdílné typy biologických tekutin (sérum, moč, peritoneální/pleurální tekutina a exsudát z chronické rány), které byly získaných od pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové. Odběry byly předem schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Společným cílem pro metody určené pro klinický výzkum, kde je předpoklad měření velkých sérií vzorků, je vyvíjet rychlé a spolehlivé metodiky s jednoduchou a časově nenáročnou přípravou vzorku. Proto pro obě metody uváděné v práci je zvolena nenáročná technika deproteinace. Jelikož všechny cílové analyty mají charakter polárních látek, byly testovány chromatografické přístupy vhodné právě pro tyto analyty. Dostatečnou retenci a separaci vankomycinu a vnitřního standardu teikoplaninu od balastních látek poskytuje finálně zvolena kolona Meteoric Core C18 Bio (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Německo). Jedná se o kolonu s větším průměrem pórů (16 nm oproti 8 nm) určenou pro komplexní biologické matrice. Pro retenci a separaci L-argininu,

L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v exsudátu získaném z chronických ran byly testovány modifikace C18 stacionární fáze kompatibilní se 100% vodnou mobilní fází, fluorovaná stacionární fáze a HILIC chromatografie. Právě HILIC chromatografie v kombinaci s kolonou Kinetex® HILIC (Phenomenex, Torrance, USA) nejlépe splňuje požadavky pro vyvíjenou metodu. Společným rysem obou metod je použití kolon plněných povrchově porézními částicemi, které představují jeden z novějších trendů v oblasti chromatografických kolon.

Obě prezentované UHPLC-MS/MS metody jsou validovány dle doporučení směrnic EMA a FDA určených pro validaci bioanalytických metod. V případě metody pro stanovení vankomycinu je validační proces proveden pro všechny tři typy biologického materiálu samostatně. Metody byly vyvíjeny a zavedeny do spektra vyšetření ve výzkumné laboratoři Úseku výzkumu a výuky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Metoda pro UHPLC-MS/MS stanovení vankomycinu v séru, moči a peritoneálním/pleurálním výpotku byla publikována v časopise s IF. V souvislosti s touto problematikou byl publikován (v časopise s IF) i přehledový článek zabývající se stanovením vankomycinu v biologických tekutinách s využitím kapalinové chromatografie. Publikace pro UHPLC-MS/MS analýzu L-argininu, L-ornitinu, L-citrulinu a agmatinu v exsudátu získaném z chronických ran je v současné době sepisována. Současně také probíhá sběr vzorků pacientů pro pilotního měření L-argininu a ostatních látek v exsudátu a výsledky budou použity jako podklad pro podání výzkumného projektu zabývajícího se dlouhodobým sledováním procesu hojení chronických ran.

Dále jsou v práci komentovány dvě publikace s biomedicínskou tematikou zabývající se hodnocením ukazatelů aktivace imunitního systému (neopterinu, kynureninu a tryptofanu) jako potenciálních biomarkerů v souvislosti s onkologickými onemocněními. Pro tyto biomedicínské studie jsou aplikovány v laboratoři již zavedené chromatografické metody, kdy pro separaci cílových analytů v séru a sekretu z pooperačních ran jsou využívány monolitické stacionární fáze. Tyto kolony vykazují velmi dlouhou životnost v kombinaci s biologickým materiálem a umožňují tak analýzy velkých sérií vzorků. Další jejich předností je možnost aplikace vysokých průtoků mobilní fáze s dostatečnou separační účinností pro rychlé separace. Na obou studiích jsem se podílela v rámci úpravy vzorků před analýzou a vlastním chromatografickým stanovením

uvedených analytů v moči, séru a sekretu z pooperačních ran. Z výsledků obou prací vyplývá významný potenciál především neopterinu a jeho poměru s kreatininem nebo tryptofanem, jako ukazatelé lokální odpovědi imunitního systému na operaci, pooperační komplikace, případně jeho využití pro predikci těchto komplikací.

6 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ

Publikace uvedené v disertační práci

1. JAVORSKA, L., KRCMOVA KUJOVSKA, L., SOLICH, P., KASKA, M. Simple and rapid quantification of vancomycin in serum, urine and peritoneal/pleural effusion via UHPLC-MS/MS applicable to personalized antibiotic dosing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 142, 59-65. IF₍₂₀₁₈₎ 2,983
Přínos doktorandky: příprava experimentů, vývoj, optimalizace a validace metody, sepsání publikace
2. JAVORSKA, L., KUJOVSKA KRCMOVA, L., SOLICHOVA, D., SOLICH, P., KASKA, M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography - A review. *Journal of Separation Science*, 2016, 39, 6-20. IF₍₂₀₁₈₎ 2,516
Přínos doktorandky: literární rešerše, sepsání publikace
3. MERGANCOVA, J., JAVORSKA, L., SILLER, J., SAKRA, L., MERGANCOVA, J., SOLICHOVA, D., KUJOVSKA KRCMOVÁ, L., MELICHAR, B., MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., STUDENTOVA, H., KLOS, D.: Concentrations of neopterin, kynurenine and tryptophan in wound secretions of patients with breast cancer and malignant melanoma: a pilot study. *Pteridines*, 2017, 28, 205-211. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531
Přínos doktorandky: příjem vzorků a jejich úprava před analýzou, podíl na analytickém stanovení hladin neopterinu, kynureninu a tryptofanu
4. DUSEK, T., ORHALMI, J., SOTONA, O., KUJOVSKA KRCMOVA, L., JAVORSKA, L., DOLEJS, J., PARAL, J.: Neopterin, kynurenine and tryptophan as new biomarkers for early detection of rectal anastomotic leakage. *Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques*, 2018, 13, 44-52. IF₍₂₀₁₈₎ 1,147
Přínos doktorandky: podíl na úpravě vzorků před analýzou a na analytickém stanovení hladin neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu

Další publikace

5. PILKA, R., NEUBERT, D., STEJSKAL, D., KREJCI, G., SVESTAK M., MAREK, R., ADAM, T., SOBKOVA, K., ONDROVA, D., HAMBALÉK, J., MADERKA, M., SOLICHOVA, D., KUJOVSKA KRCMOVÁ, L., JAVORSKA, L., AND MELICHAR B.: Serum concentrations of TFF3, S100-A11 and AIF-1 in association with systemic inflammatory response, disease stage and nodal involvement in endometrial cancer. *Pteridines*, 2018, 29, 6-12. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531
Přínos doktorandky: podíl na příjmu vzorků, úpravě vzorků před analýzou a na analytickém stanovení hladin neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu
6. MELICHAR, B., VITASKOVA, D., BARTOUSKOVA, M., JAVORSKA, L., KUJOVSKA KRCMOVA, L., PESKOVA, E., HYSPLER, R., SOLICHOVA, D., HRUZOVA, K., STUDENTOVA, H.: Comparison of performance of composite biomarkers of inflammatory response in determining the prognosis of breast cancer patient. *Pteridines*, 2017. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531
Přínos doktorandky: podíl na příjmu vzorků, úpravě vzorků před analýzou a na analytickém stanovení hladin neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu
7. MELICHAR, B., HRUZOVA, K., KUJOVSKA KRCMOVA, L., JAVORSKA, L., PESKOVA, E., SOLICHOVA, D., HYSPLER, R., VOSMIK, M., BARTOUSKOVA, M., STUDENTOVA, H.: Association of peripheral blood cell count-derived ratios, biomarkers of inflammatory response and tumor growth with outcome in previously treated metastatic colorectal carcinoma patients receiving cetuximab. *Pteridines*, 2017, 28, 221-232. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531
Přínos doktorandky: podíl na příjmu vzorků, úpravě vzorků před analýzou a na analytickém stanovení hladin neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu
8. VITASKOVA, D., MELICHAR, B., BARTOUŠKOVA, M., VLACHOVA, Z., VRANA, D., JANKOVA, J., ADAM, T., JURANOVA, J., ZLAMALOVA, N., KUJOVSKA KRCMOVA, L., JAVORSKA, L., KLOS, D., STUDENTOVA, H.: Neoadjuvant combination therapy with trastuzumab in a breast cancer patient with synchronous rectal carcinoma: a case report and biomarker study. *Pteridines*, 2017, 28, 233-241. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531
Přínos doktorandky: podíl na příjmu vzorků, úpravě vzorků před analýzou a na analytickém stanovení hladin neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu

7 PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ, GRANTOVÝCH PROJEKTŮ A STÁŽÍ

7.1 Přednášky

1. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., HAZUKOVÁ, N., SOBOTKA, L., SOLICH, P.
UHPLC-MS/MS method for monitoring of arginine metabolism in chronic wounds.
8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, Česká republika, 24.1. - 25.1.2018
2. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., KAŠKA, M., SOLICH, P.
UHPLC-MS/MS method as a powerful tool for personalization of vancomycin therapy
7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, Česká republika 7.-8.2.2017
3. JAVORSKÁ, L., AUFARTOVÁ, J., PISKÁČKOVÁ, H., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., SOLICHOVÁ, D., SOLICH, P.
Development of HPLC-FD method for determination of arginine and its metabolites in chronic wound fluids
6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, Česká republika 9.-10.2.2016
4. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., KUČEROVÁ K., SOLICHOVÁ, D., KAŠKA, M., HAVEL, E., SOLICH, P.
Development of UHPLC-MS/MS method for determination of vancomycin in surgical patients with important fluid sequestration
5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, Česká republika 3.-4.2.2015

7.2 Plakátová sdělení

Prezentující autor:

1. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., HAZUKOVÁ, N., SOBOTKA, L., SOLICH, P.
Determination of Small Polar Molecules in Complex Biological Matrix using UHPLC-MS/MS and Application for Clinical Research
47th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Washington, DC, USA, 29.7.-2.8. 2018
2. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., HAZUKOVÁ, N., SOBOTKA, L., SOLICH, P.
The optimal separation of very polar small molecules using UHPLC-MS/MS: Comparison of various stationary phases and its possible application for clinical research
45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Praha, Česká republika, 18.-22.6.2017
3. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., SOLICHOVÁ, D., KAŠKA, M., SOLICH, P.
Personalization of vancomycin therapy using simple UHPLC-MS/MS method in various biological fluids
45. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, Česká republika, 22.-24.6.2016
4. JAVORSKÁ, L., AUFARTOVÁ, J., PISKÁČKOVÁ, H., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., SOBOTKA, L., SOLICHOVÁ, D., SOLICH, P.
Monitoring of chronic wound healing process via determination of arginine and its metabolites using HPLC-FD method
2nd International Conference and Expo on Separation Techniques, Valencie, Španělsko 26.-28.9.2016
5. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., SOLICHOVÁ, D., KAŠKA, M., HAVEL, E., SOLICH, P.
UHPLC-MS/MS method for determination of vancomycin in clinical research and practice
XVIII Euroanalysis, Bordeaux, Francie, 6.-10.9.2015
6. JAVORSKÁ, L., KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., KUČEROVÁ K., SOLICHOVÁ, D., KAŠKA, M., HAVEL, E., SOLICH, P.
Development of HPLC method for determination of vancomycin in surgical patients with important fluid sequestration
European Therapeutic Drug Monitoring Conference, Praha, Česká republika, 28.-30.8.2014

Spoluautor:

1. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., JAVORSKÁ, L., SOLICHOVÁ, D., MELICHAR, B., SOBOTKA, L., SOLICH, P.
Monoliths in Determination of Immune System Activation Markers and Vitamins in Various Biological Fluids: Ten Years Long Experience in Clinical Research
47th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Washington, DC, USA, 29.7.-2.8. 2018
2. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L., JAVORSKÁ, L., ČERVINKOVÁ, B., KASALOVÁ, E., SOLICHOVÁ, D., SOLICH, P.
Bioanalytical UHPLC-MS/MS methods development – key problems.
42nd International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Ženeva, Švýcarsko, 21.6.-26.6. 2015

7.3 Grantové projekty

1. AZV MZ ČR 18-03-00130 Studium specifických faktorů ovlivňujících toxicitu hypertermické intraperitoneální chemoterapie – člen řešitelského týmu
2. IV 8141 Stanovení retinolu v moči pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním s využitím UHPLC-MS/MS techniky – člen řešitelského týmu
3. IV 8155 Vliv složení pooperační výživy na intenzitu zánětové odpovědi lidského imunitního systému/organismu na operační trauma – člen řešitelského týmu
4. IGA MZ CR NT14265-3/2013 - Využití ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů pro klinickou praxi – laborant
5. GAUK 677012/C/2012 – Role lidských membránově vázaných karbonylreduktas v biotransformaci xenobiotik – člen řešitelského týmu

7.4 Absolvované stáže

2014 Zahraniční stáž na Stockholm University, Department of Analytical Chemistry, Švédsko (1 měsíc, projekt FAFIS)

2015 Zahraniční stáž na University of Las Palmas de Gran Canaria, Department of Chemistry, Las Palmas der Gran Canaria, Španělsko (1 týden, projekt TEAB)

8 LITERATURA

- [1] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [2] FEKETE, Szabolcs, Julie SCHAPPLER, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Current and future trends in UHPLC. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, 63, 2–13. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.08.007
- [3] DONG, Michael W. New HPLC Systems and Related Products Introduced in 2017–2018: A Brief Review. *LCGC North America* [online]. 2018, 36(4), 256–265 [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/new-hplc-systems-and-related-products-introduced-2017-2018-brief-review>
- [4] WIESE, Steffen a Terence HETZEL. The Modern HPLC/UHPLC Device. In: Stavros KROMIDAS, ed. *The HPLC Expert II: Find and Optimize the Benefits of your HPLC / UHPLC*. Germany: John Wiley & Sons, 2017. ISBN 978-3-527-33972-3.
- [5] *LC Detectors | Agilent* [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/products/liquid-chromatography/infinitylab-lc-series-modules/lc-detectors#4>
- [6] SNYDER, Lloyd R. a John W. DOLAN. Milestones in the development of liquid chromatography. In: Salvatore FANALI, Paul R. HADDAD a Marja-Liisa RIEKKOLA, ed. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. 2. vyd. B.m.: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-809345-0.
- [7] GUILLARME, Davy a Jean-Luc VEUTHEY. *UHPLC in Life Sciences*. B.m.: Royal Society of Chemistry, 2015. ISBN 978-1-78262-615-2.
- [8] WALTER, Thomas H. a Richard W. ANDREWS. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, 63, 14–20. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.07.016
- [9] ERXLEBEN, Bjorn-Thoralf. HPLC Current Status and Future Development. In: Stavros KROMIDAS, ed. *The HPLC Expert II: Find and Optimize the Benefits of your HPLC / UHPLC*. Germany: John Wiley & Sons, 2017. ISBN 978-3-527-33972-3.
- [10] *Ultimate Sensitivity | SHIMADZU EUROPA* [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <https://www.shimadzu.be/ultimate-sensitivity-0>
- [11] NOVAKOVA, Lucie, Pavel SVOBODA a Jakub PAVLIK. Ultra-high performance liquid chromatography. In: Salvatore FANALI, Paul R. HADDAD a Marja-Liisa RIEKKOLA, ed. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. 2. vyd. B.m.: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-809345-0.

- [12] LCMS-8060 Liquid Chromatograph Mass Spectrometer/Speed: SHIMADZU (Shimadzu Corporation) [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: https://www.shimadzu.com/an/lcms/8060/8060_3.html
- [13] FRIEDECKÝ, David a K LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 20(41), 152–157. ISSN 1210-7921.
- [14] CROTTI, Sara, Ilena ISAK a Pietro TRALDI. Advanced spectroscopic detectors for identification and quantification: Mass spectrometry. In: Salvatore FANALI, Paul R. HADDAD a Marja-Liisa RIEKKOLA, ed. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. 2. vyd. B.m.: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-809345-0.
- [15] MAJER, Hansjorg, Ashley SAGE, Atsuhiko TOYAMA a Kai SCHEFFLER. LC/LC-MS. *LCGC Special Issues* [online]. 2018, 31(3), 8–15 [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/new-hplc-systems-and-related-products-introduced-2017-2018-brief-review>
- [16] *Rozhovor s Dr. Bertrandem Rochatem | Pragolab* [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/rozhovor-s-dr-bertrandem-rochatem>
- [17] MAJORS, Ronald E. Historical Developmenst in HPLC and UHPLC Column Technology: The Past 25 Years. *LCGC North America* [online]. 2015, 33(11), 818–840 [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/new-hplc-systems-and-related-products-introduced-2017-2018-brief-review>
- [18] MAJORS, Ronald. HPLC and UHPLC Columns: Then, Now, Next. *LCGC North America* [online]. 2018, 36(2), 128–131 [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/new-hplc-systems-and-related-products-introduced-2017-2018-brief-review>
- [19] KOHLER, Isabelle a Martin GIERA. Recent advances in liquid-phase separations for clinical metabolomics. *Journal of Separation Science* [online]. 2017, 40(1), 93–108. ISSN 1615-9314. Dostupné z: [doi:10.1002/jssc.201600981](https://doi.org/10.1002/jssc.201600981)
- [20] BELL, David S. Current State of Superficially Porous Particle Technology in Liquid Chromatography. *LCGC North America*. 2015, 33(6), 386–395.
- [21] FEKETE, Szabolcs, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2012, 69, 9–27. ISSN 0731-7085. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jpba.2012.03.024](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.024)
- [22] *Phase Information* [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/Selectivities>
- [23] BELL, David S., Landon WIEST, Shun-Hsin LIANG a Dan LI. When Do We Need Sub-2-um Superficially Porous Particles for Liquid Chromatography Separations? *LCGC North America*. 2018, 36(7), 436–439.

- [24] Agilent Technologies. *Labicom* [online]. [vid. 2019-07-02]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/kapalinova-chromatogr-prislusenstvi/hplcuhplc-kolony-predkolony-filtry/agilent-technologies>
- [25] VOJTA, Jiří, Adéla MUSILOVÁ-SVOBODOVÁ, Martin FRANC, Pavel COUFAL a Zuzana BOSÁKOVÁ. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. *Chemické listy*. 2014, 108, 127–134. ISSN 1213-7103.
- [26] SÝKORA, David, Eva TESAŘOVÁ, Magda VOSMANSKÁ a Monika ZVOLÁNKOVÁ. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy*. 2007, 101, 190–199. ISSN 1213-7103.
- [27] SVEC, Frantisek. a Jean M. J. FRECHET. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry* [online]. 1992, 64(7), 820–822 [vid. 2019-06-30]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00031a022
- [28] KUCEROVA, Barbora, Lenka KRCMOVA, Dagmar SOLICHOVA, Jiri PLISEK a Petr SOLICH. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, 36(14), 2223–2230. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201300242
- [29] *Chromolith® HPLC Columns* [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Chromolith-HPLC-Columns,MM_NF-C136061#ordering-information
- [30] *Chromolith® HPLC Columns: Separation Efficiency | Merck* [online]. [vid. 2019-07-02]. Dostupné z: <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/analytics-and-sample-preparation/chromolith-hplc-columns/high-separation-efficiency/dySb.qB.99UAAAFD2544KZvN,nav>
- [31] *HPLC Column | Monolith | Phenomenex | Onyx* [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/onyx>
- [32] *Fáze ONYX - Více o chromatografii - Stacionární fáze - Chromatografie / Chromservis.eu* [online]. [vid. 2019-06-30]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/i/ONYX-phase?lang=CZ>
- [33] STOLL, Dwight R. Reversed-Phase Liquid Chromatography and Water, Part 1 - How much is Too Much? *LCGC North America*. 2019, 37(2), 80–90.
- [34] MAJORS, Ronald E. The Top 10 HPLC and UHPLC Column Myths. *LCGC North America*. 2013, 31(7), 552–537.
- [35] BIDLINGMEYER, Brian A. a Alan D. BROSKE. The role of pore size and stationary phase composition in preventing aqueous-induced retention time loss in reversed-phase HPLC. *Journal of Chromatographic Science*. 2004, 42.

- [36] ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography* [online]. 1990, 499, 177–196. Dostupné z: doi:10.1016/s0021-9673(00)96972-3
- [37] JANDERA, Pavel a Petr JANAS. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, 967, 12–32. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2017.01.060
- [38] JANDERA, Pavel. HILIC chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemagazín*. 2011, 21(2), 8–9.
- [39] BUSZEWSKI, Boguslaw a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, 402(1), 231–247. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5308-5
- [40] QIAO, Lizhen, Xianzhe SHI a Guowang XU. Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, 81, 23–33. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.03.021
- [41] BAGHERI, Mohsen, Mohammadreza TAHERI, Mohsen FARHADPOUR, Hassan REZADOOST, Alireza GHASSEMPOUR a Hassan Y. ABOUL-ENEIN. Evaluation of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases for analysis of opium alkaloids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, 1511, 77–84 [vid. 2019-07-02]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.06.072
- [42] PRZYBYCIEL, Matthew. Fluorinated HPLC Phases — Looking Beyond C18 for Reversed-Phase HPLC. *LCGC Europe*. 2006, 19(1), 19–27.
- [43] BACALUM, Elena a Mihaela CHEREGI. Recent analytical applications of fluorinated hydrocarbon-based stationary phases in HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2017, 40(2), 59–68. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2017.1284676
- [44] REGALADO, Erik L., Alexey A. MAKAROV, Ray MCCLAIN, Matthew PRZYBYCIEL a Christopher J. WELCH. Search for improved fluorinated stationary phases for separation of fluorine-containing pharmaceuticals from their desfluoro analogs. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, 1380, 45–54 [vid. 2019-07-02]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.12.025
- [45] *UCT brochures: Selectra PFPP HPLC Columns* [online]. [vid. 2019-07-02]. Dostupné z: <http://www.mz-at.de/resources/brochures/>

- [46] BUTLER, Mark S, Hansford A KARL, Mark AT BLASKOVICH, Reena HALAI a Matthew A COOPER. Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *The Journal of Antibiotics*. 2014, 67, 631–644.
- [47] KACÍŘOVÁ, Ivana a Milan GRUNDMANN. Terapeutické monitorování vankomycinu v rutinní klinické praxi. *Vnitřní lékařství*. 2014, 60(10), 846–851.
- [48] HABALOVÁ, Kateřina a Helena ŽEMLIČKOVÁ. Metecil-rezistentní stafylokoky: přehled terapie a antibiotická rezistence. *Remedia*. 2017, 27(5), 502–505.
- [49] RYBAK, Michael, Ben LOMAESTRO, John C. ROTSCHAFER, Robert MOELLERING, William CRAIG, Marianne BILLETTER, Joseph R. DALOVISIO a Donald P. LEVINE. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* [online]. 2009, 66(1), 82–98. ISSN 1535-2900. Dostupné z: doi:10.2146/ajhp080434
- [50] ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
- [51] SUCHÁNKOVÁ, Hana, Martina MACHAČOVÁ a Tereza HERODESOVÁ. Terapeutické monitorování vankomycinu v klinické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2016, 30(2), 4–8.
- [52] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2004. ISBN 978-80-247-0836-2.
- [53] SATTUR, Avinash P., Je-Hyuk LEE, Ki-Bang SONG, T. PANDA, Chul-Ho KIM, Sang-Ki RHEE a B. GOKUL. Analytical techniques for vancomycin—A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. 2000, 5(3), 153–158 [vid. 2019-07-08]. ISSN 1976-3816. Dostupné z: doi:10.1007/BF02936586
- [54] MARTIN, Jennifer H., Ross NORRIS, Michael BARRAS, Jason ROBERTS, Ray MORRIS, Matthew DOOGUE a Graham R. D. JONES. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society Of Infectious Diseases Pharmacists. *The Clinical Biochemist. Reviews*. 2010, 31(1), 21–24. ISSN 1838-0212.
- [55] ÁLVAREZ, Rocío, Luis E. LÓPEZ CORTÉS, José MOLINA, José M. CISNEROS a Jerónimo PACHÓN. Optimizing the Clinical Use of Vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2016, 60(5), 2601–2609 [vid. 2019-07-08]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.03147-14
- [56] TESFAYE, Hundie. Terapeutické monitorování léčiv – klinické poznámky k vybraným skupinám léčiv. *Klinická farmacie- Remedia* [online]. 2014, (5), 387–395 [vid. 2019-

07-08]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Klinicka-farmacie/Terapeuticke-monitorovani-leciv-klinicke-poznamky-k-vybranym-skupinam-leciv/6-1xn-1KU.magarticle.aspx>

- [57] OYAERT, Matthijs, Nele PEERSMAN, Davy KIEFFER, Kathleen DEITEREN, Anne SMITS, Karel ALLEGAERT, Isabel SPRIET, Johan VAN ELDERE, Jan VERHAEGEN, Pieter VERMEERSCH a Steven PAUWELS. Novel LC-MS/MS method for plasma vancomycin: comparison with immunoassays and clinical impact. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* [online]. 2015, 441, 63–70. ISSN 1873-3492. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2014.12.012
- [58] DUARTE CARVALHO VILA, Marta Maria, Robson Machado DE OLIVEIRA, Marcos Moises GONCALVES a Matthieu TUBINO. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals. *Quimica Nova* [online]. 2007, 30(2), 395–399. ISSN 0100-4042. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-40422007000200029
- [59] JAVORSKA, Lenka, Lenka Kujovska KRCMOVA, Dagmar SOLICHOVA, Petr SOLICH a Milan KASKA. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography – A review. *Journal of Separation Science* [online]. 2016, 39(1), 6–20 [vid. 2019-07-09]. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201500600
- [60] CAO, Yuran, Jicheng YU, Yuancheng CHEN, Jing ZHANG, Xiaojie WU, Yingyuan ZHANG a Guanghui LI. Development and Validation of a New Ultra-Performance Liquid Chromatographic Method for Vancomycin Assay in Serum and Its Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2014, 36(2), 175–181 [vid. 2019-07-09]. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0b013e3182a458bc
- [61] MUPPIDI, Krishna, Andrew S. PUMERANTZ, Betageri GURU a Jeffrey WANG. Development and Validation of a Rapid High-Performance Liquid Chromatography Method with UV Detection for the Determination of Vancomycin in Mouse Plasma. *Journal of Chromatography and Separation Techniques*. 2013, 4(165), 1–5.
- [62] JESÚS VALLE, María José de, Francisco González LÓPEZ a Amparo Sánchez NAVARRO. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2008, 48(3), 835–839 [vid. 2019-07-09]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2008.05.040
- [63] BARANOWSKA, Irena, Andrzej WILCZEK a Jacek BARANOWSKI. Rapid UHPLC method for simultaneous determination of vancomycin, terbinafine, spironolactone, furosemide and their metabolites: application to human plasma and urine. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 2010, 26(7), 755–759. ISSN 1348-2246.
- [64] ZHANG, Jin-feng, Xiu-ling YANG, Zhi-qing ZHANG, Wei-chong DONG a Ye JIANG. Accuracy of the analysis of free vancomycin concentration by ultrafiltration in

- various disease states. *Rsc Advances* [online]. 2014, 4(76), 40214–40222. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c4ra06575a
- [65] ANDRIGUETTI, Nadine B., Letícia L. LISBOA, Siomara R. HAHN, Lidiane R. PAGNUSSAT, Marina V. ANTUNES a Rafael LINDEN. Simultaneous determination of vancomycin and creatinine in plasma applied to volumetric absorptive microsampling devices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, 165, 315–324 [vid. 2019-07-10]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.12.023
- [66] KÖNIG, Katrin, Uwe KOBOLD, Gerhard FINK, Andreas LEINENBACH, Thomas DÜLFFER, Roland THIELE, Johannes ZANDER a Michael VOGESER. Quantification of vancomycin in human serum by LC-MS/MS. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2013, 51(9), 1761–1769. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2013-0142
- [67] ZHANG, Mei, Grant A MOORE a Simon W YOUNG. Determination of vancomycin in human plasma, bone and fat by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*. 2014, 5(196), 1–9.
- [68] CASS, R. T., J. S. VILLA, D. E. KARR a D. E. SCHMIDT. Rapid bioanalysis of vancomycin in serum and urine by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using on-line sample extraction and parallel analytical columns. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2001, 15(6), 406–412. ISSN 0951-4198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.246
- [69] TSAI, I.-Lin, Hsin-Yun SUN, Guan-Yuan CHEN, Shu-Wen LIN a Ching-Hua KUO. Simultaneous quantification of antimicrobial agents for multidrug-resistant bacterial infections in human plasma by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2013, 116, 593–603. ISSN 1873-3573. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.07.043
- [70] HAGIHARA, Mao, Christina SUTHERLAND a David P. NICOLAU. Development of HPLC methods for the determination of vancomycin in human plasma, mouse serum and bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2013, 51(3), 201–207. ISSN 1945-239X. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bms128
- [71] ABU-SHANDI, Khalid Hamad. Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, 395(2), 527–532. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-2948-9
- [72] LIMA, Tácio de Mendonça, Karine Souza SEBA, José Carlos Saraiva GONÇALVES, Fernando Luiz Lopes CARDOSO a Rita de Cássia Elias ESTRELA. A Rapid and Simple HPLC Method for Therapeutic Monitoring of Vancomycin. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2018, 56(2), 115–121 [vid. 2019-07-11]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmx089

- [73] SHI, Meiyun, Zhao XIAOJUN, Tingting WANG a Lei YIN. A LC –MS-MS assay for simultaneous determination of two glycopeptides and two small molecule compounds in human plasma. *Journal of Chromatographic Science*. 2018, 56(9), 828–832.
- [74] SAKAMOTO, Yasuhiro, Yuki JINNO, Ikumi SHINODZUKA, Yusuke IWASAKI, Rie ITO a Koichi SAITO. Sample cleanup using solid-phase dispersive extraction for determination of vancomycin in serum. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 2014, 30(2), 271–275. ISSN 1348-2246.
- [75] SAITO, Mitsue, Tomofumi SANTA, Makoto TSUNODA, Hiroshi HAMAMOTO a Noriko USUI. An automated analyzer for vancomycin in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection. *Biomedical Chromatography* [online]. 2004, 18(9), 735–738 [vid. 2019-07-09]. ISSN 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.386
- [76] BERTHOIN, Karine, Els AMPE, Paul M. TULKENS a Stephane CARRYN. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2009, 34(6), 555–560. ISSN 1872-7913. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.08.005
- [77] DEL NOZAL, M. J., J. L. BERNAL, A. PAMPLIEGA, P. MARINERO, M. I. LÓPEZ a R. COCO. High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, 727(2), 231–238 [vid. 2019-07-09]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(95)01081-5
- [78] ZHANG, T., D. G. WATSON, C. AZIKE, J. N. A. TETTEY, A. T. STEARNS, A. R. BINNING a C. J. PAYNE. Determination of vancomycin in serum by liquid chromatography-high resolution full scan mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2007, 857(2), 352–356. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.07.041
- [79] FURUTA, I., T. KITAHASHI, T. KURODA, H. NISHIO, C. OKA a Y. MORISHIMA. Rapid serum vancomycin assay by high-performance liquid chromatography using a semipermeable surface packing material column. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* [online]. 2000, 301(1–2), 31–39. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/s0009-8981(00)00307-7
- [80] TARIQ, Abu, Masoom Raza SIDDIQUI, Jitendra KUMAR, Dinesh REDDY, Prithvi Singh NEGI, Manu CHAUDHARY, Sanjay Mohan SRIVASTAVA a Raj Kumar SINGH. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of ceftriaxone and vancomycin in pharmaceutical formulations and biological samples. *Scienceasia* [online]. 2010, 36(4), 297–304. ISSN 1513-1874. Dostupné z: doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.297

- [81] CHENG, Chang, Shaorong LIU, Deqing XIAO, John HOLLEMBAEK, Lili YAO, Jing LIN a Steven HANSEL. LC–MS/MS method development and validation for the determination of polymyxins and vancomycin in rat plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 2010, 878(28), 2831–2838 [vid. 2019-07-09]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2010.08.037
- [82] KEES, Martin G., Sebastian G. WICHA, Astrid SEEFELD, Frieder KEES a Charlotte KLOFT. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. *Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2014, 54(3), 318–323. ISSN 1552-4604. Dostupné z: doi:10.1002/jcph.175
- [83] FARIN, D., G. A. PIVA, I. GOZLAN a R. KITZES-COHEN. A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1998, 18(3), 367–372. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(98)00095-8
- [84] BIJLEVELD, Yuma, Timo DE HAAN, Jan TOERSCHKE, Sona JORJANI, Johanna VAN DER LEE, Floris GROENENDAAL, Peter DIJK, Arno VAN HEIJST, Antonio W. D. GAVILANES, Rogier DE JONGE, Koen P. DIJKMAN, Henrica VAN STRAATEN, Monique RIJKEN, Inge ZONNENBERG, Filip COOLS, Debbie NUYTEMANS a Ron MATHOT. A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2014, 951, 110–118. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.035
- [85] PLOCK, Nele, Cornelia BUERGER a Charlotte KLOFT. Successful management of discovered pH dependence in vancomycin recovery studies: novel HPLC method for microdialysis and plasma samples. *Biomedical Chromatography* [online]. 2005, 19(3), 237–244 [vid. 2019-07-09]. ISSN 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.446
- [86] SHIBATA, Nobuhito, Makoto ISHIDA, Yarasani VENKATA RAMA PRASAD, Weihua GAO, Yukako YOSHIKAWA a Kanji TAKADA. Highly sensitive quantification of vancomycin in plasma samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and oral bioavailability in rats. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, 789(2), 211–218 [vid. 2019-07-09]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(03)00068-0
- [87] LI, L., M. V. MILES, W. HALL a S. W. CARSON. An improved micromethod for vancomycin determination by high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1995, 17(4), 366–370. ISSN 0163-4356.
- [88] LI, Xin, Feng WANG, Bin XU, Xiaowei YU, Yang YANG, Li ZHANG a Huande LI. Determination of the free and total concentrations of vancomycin by two-dimensional liquid chromatography and its application in elderly patients. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2014, 969, 181–189. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2014.08.002

- [89] JERONIMO, Marcio Sousa, Adria do Prado BARROS, Vinicius Elord ZEN MORITA, Erika Oliveira ALVES, Nathalia Lobao BARROSO DE SOUZA, Rosane Mansan DE ALMEIDA, Yanna Karla MEDEIROS NOBREGA, Florencio Figueiredo CAVALCANTI NETO, Rivadavio AMORIN, Maria de Fatima BORIN a Anamelia Lorenzetti BOCCA. Oral or topical administration of L-arginine changes the expression of TGF and iNOS and results in early wounds healing. *Acta Cirurgica Brasileira* [online]. 2016, 31(9), 586–596. ISSN 0102-8650. Dostupné z: doi:10.1590/S0102-8650201600900000003
- [90] ARNOLD, Meghan a Adrian BARBUL. Nutrition and wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 2006, 117(7), 42S-58S. ISSN 0032-1052. Dostupné z: doi:10.1097/01.prs.0000225432.17501.6c
- [91] ZADÁK, Zdeněk. *Výživa v intenzivní péči -2., rozšířené a aktualizované vydání*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2008. ISBN 978-80-247-2844-5.
- [92] STECHMILLER, Joyce K., Beverly CHILDRESS a Linda COWAN. Arginine Supplementation and Wound Healing. *Nutrition in Clinical Practice* [online]. 2015, 20, 52–6 [vid. 2019-07-02]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1177/011542650502000152>
- [93] HALARIS, Angelos a John PLIETZ. Agmatine : metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS drugs* [online]. 2007, 21(11), 885–900. ISSN 1172-7047. Dostupné z: doi:10.2165/00023210-200721110-00002
- [94] FEJFAROVÁ, Vladimíra. Diabetes mellitus a hojení ran. *Interní medicína pro praxi*. 2010, 12(7 a 8), 350–354.
- [95] GOULD, A., C. NAIDOO a GP. CANDY. Arginine metabolism and wound healing. *Wound Healing Southern Africa*. 2008, 1(1), 48–50.
- [96] ELLINGER, Sabine. Can specific nutrients stimulate bowel wound healing? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* [online]. 2016, 19(5), 371–376. ISSN 1363-1950. Dostupné z: doi:10.1097/MCO.0000000000000303
- [97] ALEXANDER, J. Wesley a Dorothy M. SUPP. Role of Arginine and Omega-3 Fatty Acids in Wound Healing and Infection. *Advances in Wound Care* [online]. 2014, 3(11), 682–690 [vid. 2019-07-02]. ISSN 2162-1918. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2013.0469
- [98] BRODY, Tom. *Nutritional Biochemistry*. B.m.: Academic Press, 1999. ISBN 978-0-12-134836-6.
- [99] LAUBE, Gregor a Hans-Gert BERNSTEIN. Agmatine: multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience? *Biochemical Journal* [online]. 2017, 474, 2619–2640. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20170007
- [100] TONG, Betty C. a Adrian BARBUL. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2004, 4(8), 823–832. ISSN 1389-5575.

- [101] MORRIS, Sidney M. Arginine: beyond protein. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2006, 83(2), 508S-512S. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/83.2.508S
- [102] STOPHER, L. a S. JANSEN. Systematic review of the impact and treatment of malnutrition in patients with chronic vascular wounds. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association* [online]. 2017, 25(2), 71–80 [vid. 2019-07-02]. ISSN 1837-6304. Dostupné z: <https://research-repository.uwa.edu.au/en/publications/systematic-review-of-the-impact-and-treatment-of-malnutrition-in->
- [103] POSPÍŠILOVÁ, Alena. Nové pohledy na hojení a léčbu ran. *Practicus*. 2011, 5, 27–30.
- [104] WILD, Thomas, Arastoo RAHBARNIA, Martina KELLNER, Lubos SOBOTKA a Thomas EBERLEIN. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition* [online]. 2010, 26(9), 862–866. ISSN 0899-9007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2010.05.008
- [105] JOHNSON, Myron A. Amino Acids, Peptides and Proteins. In: Carl A. BURTIS, Edward R. ASHWOOD a David E. BRUNS, ed. *Tietz Textbook of Clinical chemistry and molecular diagnosis*. 4. vyd. Missouri, USA: Elsevier Saunders, 2006, s. 533–595. ISBN 0-7216-0189-8.
- [106] ANDRADE, Fernando, Marta LLARENA, Sergio LAGE a Luis ALDAMIZ-ECHEVARRIA. Quantification of Arginine and its Methylated Derivatives in Healthy Children by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2015, 53(5), 787–792. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmu126
- [107] WANG, Hong-Yun, Pei HU a Ji JIANG. Rapid Determination of Underivatized Arginine, Ornithine, Citrulline and Symmetric/Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma by LC-MS. *Chromatographia* [online]. 2010, 71(9–10), 933–939. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-010-1535-8
- [108] CHAE, Jung-woo, In-hwan BAEK, Wonku KANG a Kwang-il KWON. Simultaneous determination of L-arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in the plasma of rodents with LC-MS/MS. *Arzneimittelforschung* [online]. 2011, 61(6), 340–346 [vid. 2019-07-02]. Dostupné z: <https://scite.ai/reports/simultaneous-determination-of-l-arginine-asymmetric-PrbRNb>
- [109] NEMKOV, Travis, Angelo D’ALESSANDRO a Kirk C. HANSEN. Three-minute method for amino acid analysis by UHPLC and high-resolution quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Amino Acids* [online]. 2015, 47(11), 2345–2357. ISSN 0939-4451. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-015-2019-9
- [110] LIU, Ran, Qing LI, Ran MA, Xiaohui LIN, Huarong XU a Kaishun BI. Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to identify

- potential markers for human hepatic cancer. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, 791, 36–45. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.06.044
- [111] MIDTTUN, Oivind, Gry KVALHEIM a Per Magne UELAND. High-throughput, low-volume, multianalyte quantification of plasma metabolites related to one-carbon metabolism using HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, 405(6), 2009–2017. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6602-6
- [112] NICHOLLS, Stephen J., Zeneng WANG, Robert KOETH, Bruce LEVISON, Brian DELFRAINO, Vladimir DZAVIK, Owen W. GRIFFITH, David HATHAWAY, Julio A. PANZA, Steven E. NISSEN, Judith S. HOCHMAN a Stanley L. HAZEN. Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation* [online]. 2007, 116(20), 2315–2324. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.693986
- [113] ZHANG, W. Z. a D. M. KAYE. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Analytical Biochemistry* [online]. 2004, 326(1), 87–92. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2003.11.006
- [114] MARKOWSKI, Piotr, Irena BARANOWSKA a Jacek BARANOWSKI. Simultaneous determination of L-arginine and 12 molecules participating in its metabolic cycle by gradient RP-HPLC method application to human urine samples. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, 605(2), 205–217. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2007.10.033
- [115] FENG, Y. Z., A. E. HALARIS a J. E. PILETZ. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 1997, 691(2), 277–286. ISSN 0378-4347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(96)00458-6
- [116] MARTENS-LOBENHOFFER, J. a S. M. BODE-BOGER. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2003, 798(2), 231–239. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2003.09.050
- [117] DEBATS, Iris B. J. G., Darren BOOI, Nicolaas E. P. DEUTZ, Wim A. BUURMAN, Willy D. BOECKX a Rene R. W. J. van der HULST. Infected Chronic Wounds Show Different Local and Systemic Arginine Conversion Compared With Acute Wounds. *Journal of Surgical Research* [online]. 2006, 134(2), 205–214 [vid. 2019-07-02]. ISSN 0022-4804, 1095-8673. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2006.03.005
- [118] VAN EIJK, H. M., D. R. ROOYAKKERS a N. E. DEUTZ. Rapid routine determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography with a 2-3

- microns Spherisorb ODS II column. *Journal of Chromatography* [online]. 1993, 620(1), 143–148. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(93)80062-9
- [119] MARTENS-LOBENHOFFER, Jens, Sylvia POSTEL, Uwe TROEGER a Stefanie M. BODE-BOEGER. Determination of ornithine in human plasma by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2007, 855(2), 271–275. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.04.045
- [120] KRUMPOCHOVA, P., B. BRUYNEEL, D. MOLENAAR, A. KOUKOU, M. WUHRER, W. M. A. NIESSEN a M. GIERA. Amino acid analysis using chromatography-mass spectrometry: An inter platform comparison study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, 114, 398–407. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.06.001
- [121] LAI, Xianyin, Jeffrey A. KLINE a Mu WANG. Development, validation, and comparison of four methods to simultaneously quantify L-arginine, citrulline, and ornithine in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2015, 1005, 47–55. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2015.10.001
- [122] D'APOLITO, Oceania, Giuseppe PAGLIA, Filomena TRICARICO, Daniela GAROFALO, Alessandra PILOTTI, Olga LAMACCHIA, Mauro CIGNARELLI a Gaetano CORSO. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* [online]. 2008, 41(16–17), 1391–1395. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.08.075
- [123] SHIN, Soyoung, Sun-Mi FUNG, Srinidi MOHAN a Ho-Leung FUNG. Simultaneous bioanalysis of L-arginine, L-citrulline, and dimethylarginines by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2011, 879(7–8), 467–474. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.01.006
- [124] PRINSEN, Hubertus C. M. T., B. G. M. SCHIEBERGEN-BRONKHORST, M. W. ROELEVELD, J. J. M. JANS, M. G. M. DE SAIN-VAN DER VELDEN, G. VISSER, P. M. VAN HASSELT a N. M. VERHOEVEN-DUIF. Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2016, 39(5), 651–660. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-016-9935-z
- [125] BROWN, Candice M., Jessica O. BECKER, Phyllis M. WISE a Andrew N. HOOFNAGLE. Simultaneous Determination of 6 L-Arginine Metabolites in Human and Mouse Plasma by Using Hydrophilic-Interaction Chromatography and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* [online]. 2011, 57(5), 701–709. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2010.155895

- [126] MARTEN-LOBENHOFFER, Jens, Endre SULYOK, Endre CZEITERC, Andras BUKI, Jana KOHL, Raimund FIRSCHING, Uwe TROEGER a Stefanie M. BODE-BOEGER. Determination of cerebrospinal fluid concentrations of arginine and dimethylarginines in patients with subarachnoid haemorrhage. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 2007, 164(1), 155–160. ISSN 0165-0270. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneumeth.2007.04.005
- [127] MARTENS-LOBENHOFFER, Jens a Stefanie M. BODE-BOEGER. Mass spectrometric quantification of L-arginine and its pathway related substances in biofluids: The road to maturity. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2014, 964, 89–102. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.030
- [128] YU, Chunyu, Ran LIU, Chu XIE, Qian ZHANG, Yidi YIN, Kaishun BI a Qing LI. Quantification of free polyamines and their metabolites in biofluids and liver tissue by UHPLC-MS/MS: application to identify the potential biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, 407(22), 6891–6897. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8860-6
- [129] GOSETTI, Fabio, Eleonora MAZZUCCO, Maria Carla GENNARO a Emilio MARENGO. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, 405(2–3), 907–916. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6269-z
- [130] MARCOVECCHIO, M. Loredana, Barry WIDMER, David B. DUNGER a R. Neil DALTON. Effect of acute variations of insulin and glucose on plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in young people with Type 1 diabetes. *Clinical Science* [online]. 2008, 115(11–12), 361–369. ISSN 0143-5221. Dostupné z: doi:10.1042/CS20080079
- [131] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 2. vyd. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-372-3.
- [132] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-7262-324-9.
- [133] *Blood plasma - HORIBA* [online]. [vid. 2019-07-05]. Dostupné z: https://www.horiba.com/en_en/technology/measured-and-controlled-objects/liquid/blood-plasma/
- [134] MURRAY, Robert Kincaid. *Harperova Biochemie*. B.m.: H&H, 1998. ISBN 978-80-85787-38-2.
- [135] LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.

- [136] PECKA, Miroslav. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. 1. vyd. Český Těšín: Infinity art, 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.
- [137] JABOR, Antonín. *Vnitřní prostředí*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2008. ISBN 978-80-247-1221-5.
- [138] ŠPIRKOVÁ, Jana, Radomír HYŠPLER a Ladislava PAVLÍKOVÁ. *Laboratorní příručka Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové* [online]. 2015. Dostupné z: <http://ukbd.fnhk.eu/>
- [139] LOEFFLER, Markus W., Heiko SCHUSTER, Sarah BUEHLER a Stefan BECKERT. Wound Fluid in Diabetic Foot Ulceration: More Than Just an Undefined Soup? *International Journal of Lower Extremity Wounds* [online]. 2013, 12(2), 113–129. ISSN 1534-7346. Dostupné z: doi:10.1177/1534734613489989
- [140] RAMSAY, Sarah, Linda COWAN, Jeffrey M. DAVIDSON, Lillian NANNEY a Gregory SCHULTZ. Wound samples: moving towards a standardised method of collection and analysis. *International Wound Journal* [online]. 2016, 13(5), 880–891. ISSN 1742-4801. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.12399
- [141] HARDING, Keith G. WUWHS – Světová unie asociací pro léčbu ran. Exsudát a funkce terapeutických krytí. Doporučený postup expertní skupiny WUWHS. *Hojení ran : nezávislý, recenzovaný časopis* [online]. 2008, 2(2), 43–54 [vid. 2019-07-03]. ISSN 1802-6400. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/bmc07510040>
- [142] RYŠKOVÁ, Lenka, Miroslava FÖRSTLOVÁ a Lenka PLÍŠKOVÁ. *Laboratorní příručka Ústavu klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové* [online]. 2017. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/ukm/laboratorni-prirucka>
- [143] HANSON, Darlene, Diane LANGEMO, Pat THOMPSON, Julie ANDERSON a Susan HUNTER. Understanding Wound Fluid and the Phases of Healing. *Advances in Skin & Wound Care* [online]. 2005, 18(7), 360 [vid. 2019-07-03]. ISSN 1527-7941. Dostupné z: https://journals.lww.com/aswcjournal/Citation/2005/09000/Understanding_Wound_Fluid_and_the_Phases_of.8.aspx
- [144] NOVÁKOVÁ, Lucie. Advances in Sample Preparation for Biological Fluids. *LCGC Special Issues* [online]. nedatováno, 29(10), 9–15 [vid. 2019-07-03]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/advances-sample-preparation-biological-fluids>
- [145] NAMERA, Akira a Takeshi SAITO. Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis. *Bioanalysis* [online]. 2013, 5(8), 915–932. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/BIO.13.52
- [146] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Praha: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

- [147] OHLENDIECK, Kay a Stephen E. HARDING. Centrifugation and Ultracentrifugation. In: Andreas HOFMANN a Samuel CLOKIE, ed. *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 8. vyd. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2018, s. 956. ISBN 978-1-107-16227-3.
- [148] MAJORS, Ronald E. *Sample preparation fundamentals for chromatography* [online]. B.m.: Agilent Technologies. 2013. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf
- [149] TAYLOR, Tony. Troubleshooting Sample filtration. *LCGC North America*. 2016, 34(2), 158.
- [150] *Microcon Centrifugal Filter Devices* [online]. 2018. Dostupné z: www.emdmillipore.com
- [151] BOER DE, Theo a Henri MEIJERING. Equilibrium Dialysis, Ultracentrifugation, and Ultrafiltration in LC-MS Bioanalysis. In: Wenkui LI, Wenyong JIAN a Yunlin FU, ed. *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*. B.m.: John Wiley & Sons, Inc., nedatováno. ISBN 978-1-119-27431-5.
- [152] KOLE, Prashant Laxman, Gantala VENKATESH, Jignesh KOTTECHA a Ravi SHESHALA. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography* [online]. 2011, 25(1–2), 199–217. ISSN 0269-3879. Dostupné z: [doi:10.1002/bmc.1560](https://doi.org/10.1002/bmc.1560)
- [153] WELLS, David A., ed. Liquid-liquid extraction: Strategies for method development and optimization. In: David A. WELLS, ed. *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. B.m.: Elsevier, 2003 [vid. 2019-07-03], High Throughput Bioanalytical Sample Preparation, s. 307–326. Dostupné z: [doi:10.1016/S1464-3456\(03\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S1464-3456(03)80011-X)
- [154] *SPE / Pragolab* [online]. [vid. 2019-07-03]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/priprava-vzorku/automatizovane-systemy-pripravy-vzorku/spe>
- [155] VASAPOLLO, Giuseppe, Roberta Del SOLE, Lucia MERGOLA, Maria Rosaria LAZZOI, Anna SCARDINO, Sonia SCORRANO a Giuseppe MELE. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, 12(9), 5908–5945 [vid. 2019-07-03]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms12095908](https://doi.org/10.3390/ijms12095908)
- [156] PEČOVÁ, Michaela, Ludmila ZAJONCOVÁ, Kateřina POLÁKOVÁ, Jan ČUDA, Mirka ŠAFAŘÍKOVÁ, Marek ŠEBELA a Ivo ŠAFAŘÍK. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, 105, 524–530.
- [157] RITTICH, Bohuslav a Alena SPANOVA. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, 36(15), 2472–2485. ISSN 1615-9306. Dostupné z: [doi:10.1002/jssc.201300331](https://doi.org/10.1002/jssc.201300331)

- [158] HE, Jincan, Meiying HUANG, Dongmei WANG, Zhuomin ZHANG a Gongke LI. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, 101, 84–101. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2014.04.017
- [159] *Chempoint-Magneticke nano a mikročástice pro biotechnologické aplikace* [online]. [vid. 2019-06-15]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/magneticke-nano-a-mikrocastice-pro-biotechnologicke-aplikace>
- [160] Magnetic Beads. *Abraxis, Inc* [online]. [vid. 2019-07-05]. Dostupné z: <https://www.abraxiskits.com/products/magnetic-beads/>
- [161] KÖNIG, Katrin, Sven F. GOETHEL, Viorel M. RUSU a Michael VOGESER. Deproteination of serum samples for LC–MS/MS analyses by applying magnetic micro-particles. *Clinical Biochemistry* [online]. 2013, 46(7), 652–655 [vid. 2019-07-03]. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.01.003
- [162] *MagMAX Nucleic Acid Isolation Kits - CZ* [online]. [vid. 2019-07-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction/rna-types/total-rna-extraction/magmax-technology/magmax-isolation-kits.html>
- [163] *QuickPick Kits* [online]. [vid. 2019-07-03]. Dostupné z: http://www.bionobile.com/Quick_kits.html
- [164] *Magnetic beads - Superior Surface Chemistry | amsbio* [online]. [vid. 2019-07-03]. Dostupné z: <http://www.amsbio.com/magnetic-beads.aspx>
- [165] *bomb.bio. bomb.bio* [online]. [vid. 2019-07-05]. Dostupné z: <https://bomb.bio/>
- [166] CARDA-BROCH, Samuel a Paul R. HADDAD. Method validation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, 1353, 1 [vid. 2019-07-04]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731400884X>
- [167] GONZALES, Gustavo A a Angeles M HERRADOR. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007, 23(3), 227–238 [vid. 2019-07-04]. Dostupné z: https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=E4SMYjvT3ZQvBXGhqz&page=1&doc=1
- [168] KRUIVE, Anneli, Riin REBANE, Karin KIPPER, Maarja-Liisa OLDEKOP, HANNO EVARD, Herodes KOIT, Pekka RAVIO a Ivo LEITO. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta* [online]. nedatováno, 870, 29–44 [vid. 2019-07-04]. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.02.016
- [169] *Guideline on bioanalytical method validation - European Medicine Agency* [online]. B.m.: London, UK. 2011. Dostupné

z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

- [170] *Bioanalytical method validation – Guidance for industry*. B.m.: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2018
- [171] THAKARE, Rhishikesh, Yashpal S. CHHONKER, Gautam NAGSEN, Jawaher Abdullah ALAMOUDI a Yazen ALNOUTI. Quantitative analysis of endogenous compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 128, 426–437.
- [172] LI, WL a LH COHEN. Quantitation of endogenous analytes in biofluid without a true blank matrix. *Analytical Chemistry* [online]. 2003, 75(21), 5854–5859 [vid. 2019-07-04]. Dostupné z: https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=9&SID=E4SMYyJvT3ZQvBXGhqz&page=1&doc=1
- [173] VAN DE MERBEL, Nico C. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2008, 27(10), 924–933 [vid.2019-07-04]. Dostupné z: https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=16&SID=E4SMYyJvT3ZQvBXGhqz&page=1&doc=1
- [174] MATUSZEWSKI, BK, ML CONSTANZER a CM CHAVEZ-ENG. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* [online]. 2003, 75(13), 3019–3030 [vid. 2019-07-04]. Dostupné z: https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=25&SID=E4SMYyJvT3ZQvBXGhqz&page=1&doc=6
- [175] *Český lékopis 2017*. Praha: Grada Publishing a.s., 2017. 1. díl. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [176] *Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions* [online]. [vid. 2019-07-04]. Dostupné z: <https://chemicalize.com/#/calculation>
- [177] KRCMOVA, Lenka Kujovska, Barbora CERVINKOVA, Dagmar SOLICHOVA, Lubos SOBOTKA, Lenka HANSMANOVA, Bohuslav MELICHAR a Petr SOLICH. Fast and sensitive HPLC method for the determination of neopterin, kynurenine and tryptophan in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates. *Bioanalysis* [online]. 2015, 7(21), 2751–2762. ISSN 1757-6180. Dostupné z: [doi:10.4155/bio.15.175](https://doi.org/10.4155/bio.15.175)
- [178] MERGANCOVA, Jana, Lenka JAVORSKA, Jiri SILLER, Lukas SAKRA, Jindriska MERGANCOVA, Dagmar SOLICHOVA, Lenka Kujovska KRCMOVA, Bohuslav MELICHAR, Beatrice MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Hana STUDENTOVA a Dusan KLOS. Concentrations of neopterin, kynurenine and tryptophan in wound secretions of patients with breast cancer and malignant melanoma: a pilot study.

- Pteridines* [online]. 2017, 28(3–4), 205–211. ISSN 0933-4807. Dostupné z: doi:10.1515/pterid-2017-0018
- [179] MELICHAR, Bohuslav, Martina SPISAROVA, Marie BARTOUSKOVA, Lenka KUJOVSKA KRCMOVA, Lenka JAVORSKA a Hana STUDENTOVA. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2017, 5(13), 280. ISSN 2305-5839. Dostupné z: doi:10.21037/atm.2017.06.29
- [180] VONKA, Vladimír a Jiří HORÁČEK. Indolamin 2,3-dioxygenáza v onkologii a psychiatrii. *Časopis lékařů Českých* [online]. 2015, 154(1), 3–10 [vid. 2019-06-29]. ISSN 1805-4420. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2015-1/indolamin-2-3-dioxygenaza-v-onkologii-a-psychiatrii-51368>
- [181] DUSEK, Tomas, Julius ORHALMI, Otakar SOTONA, Lenka Kujovska KRCMOVA, Lenka JAVORSKA, Josef DOLEJS a Jiri PARAL. Neopterin, kynurenine and tryptophan as new biomarkers for early detection of rectal anastomotic leakage. *Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques* [online]. 2018, 13(1), 44–52. ISSN 1895-4588. Dostupné z: doi:10.5114/wiitm.2018.73363
- [182] KRCMOVA, Lenka, Dagmar SOLICHOVA, Bohuslav MELICHAR, Marketa KASPAROVA, Jiri PLISEK, Lubos SOBOTKA a Petr SOLICH. Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throughput HPLC. *Talanta* [online]. 2011, 85(3), 1466–1471. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2011.06.027
- [183] CERMANOVA, M., B. MELICHAR, D. SOLICHOVA, M. BLAHA, V. BLAHA, M. BLAZEK, V. MASIN, J. CERMAN a Z. ZADAK. Urinary neopterin and microalbuminuria in patients treated by low-density lipoprotein apheresis. *Pteridines*. 2005, 16(4), 174–183. ISSN 0933-4807.

9 PŘÍLOHY

Publikace uvedené v disertační práci

Příloha I: JAVORSKA, L., KRCMOVA KUJOVSKA, L., SOLICH, P., KASKA, M. Simple and rapid quantification of vancomycin in serum, urine and peritoneal/pleural effusion via UHPLC-MS/MS applicable to personalized antibiotic dosing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 142, 59-65. IF₍₂₀₁₈₎ 2,983

Příloha II: JAVORSKA, L., KUJOVSKA KRCMOVA, L., SOLICHOVA, D., SOLICH, P., KASKA, M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography - A review. *Journal of Separation Science*, 2016, 39, 6-20. IF₍₂₀₁₈₎ 2,516

Příloha III: MERGANCOVA, J., JAVORSKA, L., SILLER, J., SAKRA, L., MERGANCOVA, J., SOLICHOVA, D., KUJOVSKA KRCMOVÁ, L., MELICHAR, B., MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., STUDENTOVA, H., KLOS, D. Concentrations of neopterin, kynurenine and tryptophan in wound secretions of patients with breast cancer and malignant melanoma: a pilot study. *Pteridines*, 2017, 28, 205-211. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531

Příloha IV: DUSEK, T., ORHALMI, J., SOTONA, O., KUJOVSKA KRCMOVA, L., JAVORSKA, L., DOLEJS, J., PARAL, J. Neopterin, kynurenine and tryptophan as new biomarkers for early detection of rectal anastomotic leakage. *Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques*, 2018, 13, 44-52. IF₍₂₀₁₈₎ 1,147

Další publikace

Příloha V: PILKA, R., NEUBERT, D., STEJSKAL, D., KREJCI, G., SVESTAK M., MAREK, R., ADAM, T., SOBKOVÁ, K., ONDROVA, D., HAMBÁLEK, J., MADERKA, M., SOLICHOVA, D., KUJOVSKA KRCMOVÁ, L., JAVORSKA, L., AND MELICHAR B. Serum concentrations of TFF3, S100-A11 and AIF-1 in association with systemic inflammatory response, disease stage and nodal involvement in endometrial cancer. *Pteridines*, 2018, 29, 6-12. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531

Příloha VI: MELICHAR, B., VITASKOVA, D., BARTOUSKOVA, M., JAVORSKA, L., KUJOVSKA KRCMOVA, L., PESKOVA, E., HYSPLER, R., SOLICHOVA, D., HRUZOVA, K., STUDENTOVA, H. Comparison of performance of composite biomarkers of inflammatory response in determining the prognosis of breast cancer patient. *Pteridines*, 2017. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531

Příloha VII: MELICHAR, B., HRUZOVA, K., KUJOVSKA KRCMOVA, L., JAVORSKA, L., PESKOVA, E., SOLICHOVA, D., HYSPLER, R., VOSMIK, M., BARTOUSKOVA, M., STUDENTOVA, H. Association of peripheral blood cell count-derived ratios, biomarkers of inflammatory response and tumor growth with outcome in previously treated metastatic colorectal carcinoma patients receiving cetuximab. *Pteridines*, 2017, 28, 221-232. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531

Příloha VIII: VITASKOVA, D., MELICHAR, B., BARTOUŠKOVA, M., VLACHOVA, Z., VRANA, D., JANKOVA, J., ADAM, T., JURANOVA, J., ZLAMALOVA, N., KUJOVSKA KRCMOVA, L., JAVORSKA, L., KLOS, D., STUDENTOVA, H. Neoadjuvant combination therapy with trastuzumab in a breast cancer patient with synchronous rectal carcinoma: a case report and biomarker study. *Pteridines*, 2017, 28, 233-241. IF₍₂₀₁₈₎ 0,531