

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**Optimalizace podmínek derivatizační reakce pro  
GC-MS analýzu vybraných látek**

Diplomová práce

**Tomáš Jan**

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové, 2022

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 10.05.2022

Tomáš Jan

#### Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za odbornou pomoc, vedení, trpělivost a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Mé poděkování taktéž patří všem členům výzkumné skupiny Pharmaceutical Analysis Group, kteří mi pomáhali s ovládním přístrojového vybavení katedry.

Tato diplomová práce vznikala za podpory projektu SVV 260 547.

## Obsah

Abstrakt .....	6
Abstract .....	7
ZKRATKY .....	8
1 ÚVOD .....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	12
2.1 Chromatografie.....	13
2.2 Plynová chromatografie.....	14
2.2.1 Plynový chromatograf .....	14
2.2.2 Nosný plyn .....	15
2.2.3 Regulátor tlaku a průtoku .....	15
2.2.4 Injektor .....	15
2.2.5 Kolony .....	16
2.2.6 Teplotní program.....	16
2.2.7 Detektor .....	17
2.2.8 Řídící jednotka .....	17
2.3 Hmotnostní spektrometrie .....	18
2.3.1 Hmotnostní spektrometr.....	18
2.3.2 Ionizační techniky.....	18
2.3.3 Hmotnostní analyzátoy .....	19
2.3.4 Detektory.....	21
2.3.5 Hmotnostní spektrum.....	22
2.3.6 Typy skenovacích módů .....	22
2.4 GC/MS .....	23
2.5 Úprava vzorku .....	25
2.5.1 Precipitace proteinů .....	25
2.5.2 Ultrafiltrace.....	26
2.5.3 Extrakce kapalina-kapalina (LLE, Liquid-Liquid Extraction) .....	26
2.5.4 Extrakce na pevnou fázi (SPE; Solid Phase Extraction) .....	26
2.6 Derivatizace.....	28
2.6.1 Acylace .....	28
2.6.2 Chloroformiáty.....	28
2.6.3 Přehled publikovaných prací .....	29
2.7 Kvantifikace.....	31

3 CÍL PRÁCE .....	32
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
4.1 Chemikálie, přístroje a příslušenství .....	35
4.1.1 Chemikálie .....	35
4.1.2 Média, biologické vzorky .....	35
4.1.3 Přístroje .....	36
4.1.4 Počítačové programy .....	36
4.1.5 Chromatografické kolony .....	36
4.1.6 Pomůcky .....	36
4.2 Příprava roztoků .....	37
4.3 Příprava vzorku .....	38
4.4 Stabilitní vzorky .....	39
4.5 Vzorky pro ověření linearity .....	39
4.6 Nastavení parametrů GC/MS .....	40
5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	41
5.1 Vývoj metody derivatizace .....	42
5.2 Vývoj chromatografických podmínek .....	43
5.2.1 Vývoj nastavení GC separace .....	43
5.2.2 Nastavení MS detekce .....	47
5.3 Úprava biologického materiálu .....	49
5.4 Metoda kvantifikace .....	55
5.5 Opakovatelnost přípravy .....	57
5.6 Opakovatelnost nástřiku .....	57
5.7 Stabilita .....	58
5.8 Linearita .....	58
5.9 Aplikace optimalizovaných podmínek na reálné vzorky .....	60
6 ZÁVĚR .....	61
7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....	64
8 SEZNAM OBRÁZKŮ .....	69
9 SEZNAM TABULEK .....	72

# **Abstrakt**

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy**

**Vedoucí diplomové práce:** doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

**Kandidát:** Tomáš Jan

**Název diplomové práce:** Optimalizace podmínek derivatizační reakce pro GC-MS analýzu vybraných látek

Chinolinová kyselina je endogenní molekula vznikající kynurenátovou cestou jako meziproduct při metabolické přeměně aminokyseliny L-tryptofanu. Chinolinová kyselina působí jako agonista na NMDA receptorech, jejichž nadměrná aktivace vede k buněčné smrti neuronů. Současné výzkumy přisuzují zvýšené hladině chinolinové kyseliny vyšší riziko rozvoje neurodegenerativních chorob a poruch chování. Hladina kyseliny může být zvýšena větším příjmem tryptofanu (např. doplňky stravy pro zklidnění a podporu duševního zdraví) nebo probíhajícím zánětem v organismu.

Cílem této práce bylo vyvinout analytickou metodu pro stanovení chinolinové kyseliny v různých matricích za využití GC/MS a doplnit tak metody, kterými jsou stanovovány ostatní metabolity tryptofanu. Úspěšně byla vyzkoušena derivatizace alkylchloroformiáty.

Selektivita byla testována na koloně RTX-5MS s nepolární stacionární fází a na polární koloně SLB-IL59 využívající iontové kapaliny. Analyty byly detekovány na hmotnostním spektrometru typu jednoduchého kvadrupólu v SIM módu s využitím elektronové a chemické ionizace. Kalibrační křivka byla sestrojena v rozmezí 0,5 až 12,5 ng, což pokrývá fyziologickou i patologickou hladinu chinolinové kyseliny.

**klíčová slova:** chinolinová kyselina, alkylchloroformiáty, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometr

# **Abstract**

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis**

**Supervisor:** doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

**Candidate:** Tomáš Jan

**Title of Thesis:** Optimization of derivatization reaction conditions for GC-MS analysis of selected compounds

Quinolinic acid is an endogenous molecule, downstream product of the kynurenine pathway, through which the amino acid L-tryptophan is metabolised. Quinolinic acid acts as an agonist at the NMDA receptor. Overactivity of this receptor leads to the cell death of neurons. Current research shows the connection between a high level of quinolinic acid and a higher risk of neurodegenerative diseases development and behavioural disorders. The level can be increased by the excessive intake of tryptophan (e.g. food supplements declaring calming effect and mental health support) or ongoing inflammation in the organism.

The current work deals with the development of an analytical method for the determination of quinolinic acid in various biological matrices using GC/MS and complements methods analysing other metabolites of tryptophan. Derivatization by alkyl chloroformate was met with success.

The selectivity was compared on column RTX-5MS containing non-polar stationary phase and polar column SLB-IL59 using ion liquids. Analytes were detected on a single quadrupole mass spectrometer in SIM mode using electron and chemical ionisation. The calibration curve was plotted in the range of 0.5 to 12.5 nanograms. It covers both physiological and pathological levels of quinolinic acid.

**key words:** quinolinic acid, alkylchloroformates, gas chromatography, mass spektrometry

## ZKRATKY

2,3_PDA	kyselina pyridin-2,3-dikarboxylová, chinolinová kyselina
2,4_PDA	kyselina pyridin-2,4-dikarboxylová
2,5_PDA	kyselina pyridin-2,5-dikarboxylová
2,6_PDA	kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová
3,4_PDA	kyselina pyridin-3,4-dikarboxylová
3,5_PDA	kyselina pyridin-3,5-dikarboxylová
5-et_PDA	kyselina 5-ethylpyridin-2,3-dikarboxylová
d3_PDA	kyselina 4,5,6- <i>trideuterido</i> -pyridin-2,3-dikarboxylová
DMEM	médium pro kultivaci buněčných kultur (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EtCF	ethylchloroformiát
EtOH	ethanol
FBS	hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)
GC	plynová chromatografie
HFBCF	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiát
HFBOH	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutan-1-ol
iBCF	isobutylchloroformiát
iBOH	isobutanol
ISOO	isooktan
MeCF	methylchloroformiát
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie



<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
SIM	selektivní záznam vybraných iontů
SPE	extrakce na pevné fázi
TBAB	tetrabutylamonium bromid
TEAI	tetraethylamonium jodid
TMAC	tetramethylamonium chlorid
TPAB	tetrapropylamonium bromid

## **1 ÚVOD**

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je moderní, rutinně používanou metodou s využitím ve výzkumných, klinických i kontrolních laboratořích. Slouží k separaci látek ve směsi v plynném skupenství a k následné identifikaci nebo kvantifikaci látek.

Tato práce se zabývá vývojem analytické metody pro stanovení chinolinové kyseliny (kyseliny pyridin-2,3-dikarboxylové) v biologickém materiálu. Byly porovnány derivatizace čtyřmi různými činidly postupem převzatým z publikovaných prací. Separace proběhla na dvou odlišných kapilárních kolonách. Molekuly analytu byly ionizovány pomocí elektronové a chemické ionizace.

V rámci práce je zoptimalizován proces úpravy biologického vzorku, derivatizační reakce, separace a detekce analytu. Dále je řešena otázka kvantifikace a příprava vhodného kalibračního rozmezí pro potřeby budoucí validace metody.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1 Chromatografie

Chromatografie představuje soubor vysoce účinných separačních metod. Slouží k rozdělení jednotlivých složek ve směsi a umožňují jejich následnou identifikaci a kvantifikaci. Separace je založena na mnohonásobně ustanovované rovnováze mezi vzájemně nemísitelnými fázemi, na schopnosti analytů interagovat různou měrou se stacionární a mobilní fází, která analyty unáší ve směru jejího toku [1].

Chromatografické metody můžeme dělit podle různých kritérií:

- podle skupenství mobilní fáze
  - plynová chromatografie (GC),
  - kapalinová chromatografie (LC),
  - superkritická fluidní chromatografie (SFC)
- podle uspořádání stacionární fáze
  - kolonová chromatografie,
  - plošné techniky
    - papírová chromatografie (PC),
    - tenkovrstvá chromatografie (TLC)
- podle převládajícího separačního děje
  - adsorbční chromatografie,
  - rozdělovací chromatografie,
  - iontově-výměnná chromatografie,
  - gelová chromatografie,
  - afinitní chromatografie [1][2].

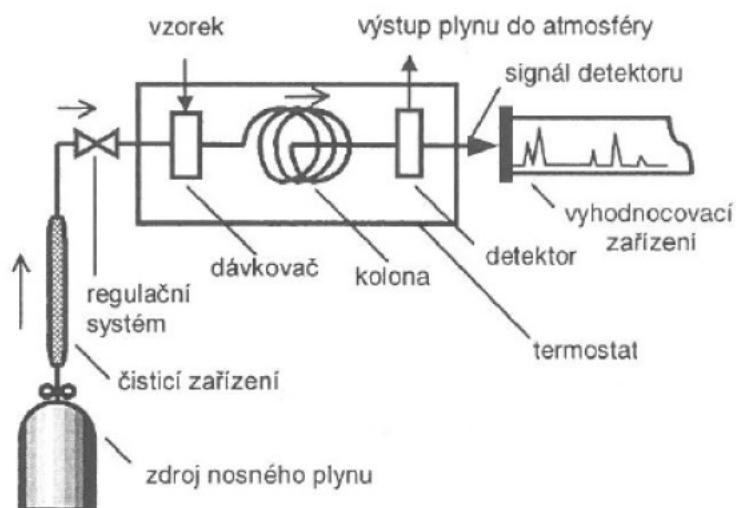
Díky těmto metodám je možné přesně stanovit i velmi nízké koncentrace endogenních a exogenních látek. Chromatografické metody jsou využívány v klinických, toxikologických a forenzních laboratořích. Ve farmaceutickém průmyslu jsou rutinně používány při vstupní kontrole surovin (kontrola čistoty aktivních substancí a pomocných látek, hodnocení nečistot a stanovení zbytkových rozpouštědel); při výstupní kontrole a stabilitních zkouškách vyrobených léčivých přípravků apod. [3][4].

## 2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) je separační metoda založená na rozdílné distribuci látek ve dvou vzájemně nemísitelných fázích – mobilní fází je nosný plyn pohybující se skrz nebo podél stacionární fáze, která je umístěna v koloně. Metoda je použitelná pro látky a jejich deriváty, které lze převést do plynné fáze a jsou stabilní za použitých provozních teplot. GC je založena na mechanismu adsorpce, rozdělování nebo vylučování. Ve spojení s vhodnou detekcí je plynová chromatografie vysoce citlivá separační metoda. Slouží pro kvalitativní a kvantitativní stanovení analytů[3][5].

### 2.2.1 Plynový chromatograf

Plynový chromatograf se skládá z tlakové lahve s nosným plynem nebo generátoru plynu, regulátoru průtoku a tlaku, nástřikového prostoru s dávkovačem, kolony, termostatu, detektoru a řídicí jednotky (Obrázek 1). Sestava může být doplněna o filtry zajišťující vysoušení a přečištění nosného plynu před jeho vstupem do přístroje. Při používání head-space analýzy je instrumentace GC rozšířena o autosampler temperující vzorky na zvolenou teplotu [1][2].



Obrázek 1 - Schéma plynového chromatografu; převzato z [2]

### **2.2.2 Nosný plyn**

Nosný plyn představuje mobilní fázi a separačních dějů se přímo neúčastní, rychlost průtoku a tlak však ovlivňují retenci analytů. Podle lékopisné monografie 2.2.28 se při separaci na náplňové koloně může využít dusík a helium, při práci s kapilární kolonou dusík, helium a vodík [3].

Dalším možným nosným plynem je argon. Používá se většinou ve směsi s methanem (95:5) při analýzách s detektorem elektronového zachytu. Součástí tohoto detektoru je beta zářič, který emituje elektrony s nízkou energií. Ty kolidují s plynem (mobilní fází) konstantní měrou. Na koloně separované analyty po vstupu do detektoru s elektrony interagují také, což se projeví změnou intenzity signálu a ve výsledném chromatogramu je zaznamenán pík. Čistý argon, případně ve výše zmíněné směsi s methanem je ve spojení s teplotně-vodivostním detektorem využíván při stanovování množství vodíku ve vzorku [6].

Při výběru vhodného plynu hraje roli jeho inertnost, čistota, viskozita, typ použitého detektoru, bezpečnost práce a v neposlední řadě i cena [2][3][6][7].

### **2.2.3 Regulátor tlaku a průtoku**

Regulátor zajišťuje, že po celou dobu analýzy průtok plynu kolonou odpovídá nastaveným parametrům. Se vzrůstající teplotou klesá viskozita plynu. Při analýze s teplotním gradientem je tedy nutné průběžně korigovat množství plynu vstupujícího do kolony. Moderní plynové chromatografy mají regulaci a korekci řízenou elektronicky [2].

### **2.2.4 Injektor**

Injektor slouží k nanesení vzorku na čelo kolony proudem nosného plynu. Vzorek je z vialky přenesen pomocí mikrostříkačky anebo dávkovací smyčky. První způsob je využíván při měření kapalných vzorků, druhý při head-space analýzách. Kapalným vzorkem (většinou jednotky mikrolitrů) je v prostoru tzv. lineru – trubici naplněné skleněnou vatou – rovnoměrně zahříván a převeden do plynného skupenství [1][2].

### 2.2.5 Kolony

Kolona je část chromatografu, ve které dochází k vlastní separaci jednotlivých složek vzorku. Používány jsou kolony náplňové a kapilární, přičemž kapilární dnes převládají.

Náplňové kolony jsou trubice ze skla nebo nerezové oceli o průměru 2 – 4 milimetrů a délce 1 – 3 metrů. Náplň tvoří silikagel, grafit nebo alumina pokrytá vrstvou kapalné fáze, na které se odehrává separace analytů.

Kapilární kolony mají vnitřní průměr 0,1 – 0,53 milimetrů a délku 15 – 60 metrů. Jsou vyrobeny z vysoce inertního křemene a potaženy polyimidovou vrstvou, která zajišťuje jejich flexibilitu a odolnost při manipulaci. Uvnitř kapilární kolony je v tenké vrstvě nanosena stacionární fáze. Tloušťka filmu bývá v rozmezí 0,25 – 5 mikrometrů. Rozlišujeme typy kapilárních kolon:

- WCOT (Wall Coated Open Tubular Column) – kapalná stacionární fáze tvoří tenký film na vnitřní stěně,
- SCOT (Support Coated Open Tubular Column) – na vnitřní straně kapiláry je vrstva nosiče, na kterém je zakotvena kapalina,
- PLOT (Porous Layer Open Tubular Column) – na vnitřní stěně kapiláry je tenká vrstva pevného pórovitého materiálu, ve kterém probíhá separace [2][8].

Kapilární kolony se vyznačují vyšší účinností ale menší kapacitou. Při analýze koncentrovaných vzorků je bočním proudem plynu tzv. splitterem většina vzorku odstraněna a analyzován je pouze malý podíl (desetiny až setiny). Při stopových analýzách nemusí být funkce děliče toku využito [2].

### 2.2.6 Teplotní program

Jednotlivé části chromatografu jsou po dobu analýzy zahřívány na nastavené provozní teploty. Nástřikový prostor, ve kterém přechází kapalný vzorek do plynného skupenství, je zpravidla zahříván na teplotu o 50°C vyšší, než je teplota varu nejméně těkavé složky vzorku. Je nutno znát, případně experimentálně ověřit teplotní stabilitu analyzovaných látek. Jejich částečnou či kompletní degradaci v nástřikovém prostoru by získávané výsledky měření byly nepřesné [6].



Teplota pro kolonový prostor může být nastavena jako konstantní anebo postupně rostoucí. Druhá zmíněná – metoda s teplotním gradientem – je používaná, pokud se jednotlivé složky ve směsi výrazně liší teplotou varu, případně pokud chceme analýzu urychlit. Teplotní profil se dá libovolně zvolit, případně v průběhu jednoho cyklu nárůst pozdržet a zlepšit tak separaci blízko se eluujících píků. Každá kolona má výrobcem určenou maximální teplotu, která by neměla být překročena. Zabrání se tak narušení separační vrstvy a kolona neztrácí na životnosti [6].

### **2.2.7 Detektor**

Po separaci analytů na koloně následuje jejich detekce. Nosný plyn prochází detektorem, což vyvolává signál, který je v řídicí jednotce zpracován do grafické podoby. Čistý plyn vyvolává konstantní signál základní linie, tzv. base line. Separované látky svým průchodem vyvolají změnu signálu. Mezi velikostí změny signálu a koncentrací analytu platí úměra. Výsledkem analýzy je graf závislosti odezvy detektoru na čase, tzv. chromatogram [2].

Používané detektory se liší svoji citlivostí. Pracují na různých principech a volí se na základě stanovovaných látek. Používají se teplotně vodivostní detektor (TCD), plamenoionizační detektor (FID), termoionizační detektor (TID), fotoionizační detektor (PID), plamenofotometrický detektor (FPD), detektor elektronového záchyty (ECD) a hmotnostní spektrometr (MS) [2][5][7].

### **2.2.8 Řídicí jednotka**

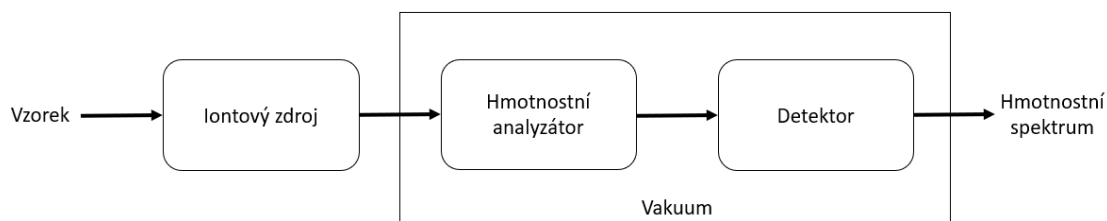
Nastavení přístroje a zpracovávání dat je prováděno v příslušných programech pomocí počítače. Chromatografický software je dodáván přímo výrobcem. Programy obsahují nástroje pro servis přístroje, tvorbu sekvencí vzorků, vyhodnocování získaných dat a jejich zpracování do reportů. Informace z měření jsou ukládána na disku počítače, případně na externích serverech. Je možné je zpětně dohledat a dále s nimi pracovat. Data, které do řídicí jednotky odesílá detektor ve formě změny signálu, jsou převedena do podoby křivek, tzv. píků. Ty jsou následně pomocí integračních nástrojů číselně vyjádřeny. Při kvantifikaci se pracuje s parametry Area (plocha píku), Height (výška píku), S/N (poměr signálu k šumu) a  $R_s$  (rozlišení) [3][4][9].

## 2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spektrometry, MS) je metoda separující ionty analyzovaných látek podle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Ze získaných informací je možné určit parametry kvalitativní (molekulová hmotnost analytu a jeho fragmentů, poznatky o struktuře podle charakteristické fragmentace) a kvantitativní. MS představuje vysoce citlivý analytický nástroj pro zkoumání komplexních směsí látek. Pro měření stačí malé množství vzorku, které je však detekcí nenávratně zničeno. Detekční limit hmotnostní spektrometrie dosahuje řádů pikomolů až femtomolů [2][3][10].

### 2.3.1 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení. Skládá se z iontového zdroje, akcelérátoru, analyzátoru a detektoru (Obrázek 2). Dále z portu pro vstup vzorku, turbomolekulární a rotační pumpy zajišťující vakuum, iontové optiky a řídicí jednotky k ovládání přístroje a zpracovávání dat. První krok analýzy – ionizace probíhá v případě GC/MS ve vakuu. Pro následnou separaci a detekci iontů je nutné aplikovat vysoké vakuum ( $10^{-4} - 10^{-8}$  Pa) zajišťující minimalizaci vzájemných kolizí mezi ionty analytu a plynu [2][10].



Obrázek 2 - Schéma hmotnostního spektrometru

### 2.3.2 Ionizační techniky

Nezbytným krokem při analyzování látek pomocí MS je jejich převedení na ionty. Výsledkem interakce jsou kladně a záporně nabitě ionty, které jsou následně separovány.

Ionizační techniky mohou být děleny podle míry energie, kterou analytu dodávají na tzv. „tvrdé“, kdy molekula získá velké množství vnitřní energie a charakteristicky fragmentuje (což se může projevit až úplnou ztrátou molekulárního iontu) a „měkké“, které jsou šetrnější a díky kterým získáváme

zejména informace o hmotnosti (de)protonizovaných molekul. I při použití měkké ionizace dochází k fragmentacím v molekulách analytů; ne však v takové míře. Jako tvrdou ionizační techniku označujeme elektronovou ionizaci (EI). Mezi měkké způsoby ionizace patří chemická ionizace (CI), ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Off-line technikami (bez předchozího kroku separace) jsou ionizace desorpce laserem v přítomnosti matrice (MALDI) a desorpční ionizace elektrosprejem (DESI) [3][7][10].

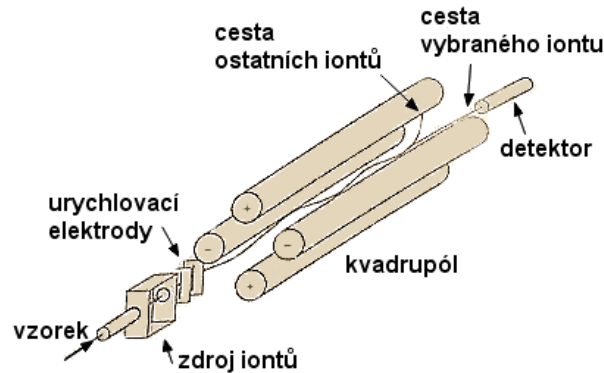
Při výběru ionizační techniky je nutno vzít v úvahu polaritu a molekulovou hmotnost analytů. Pokud analyzujeme kladně nabitě částice, hovoříme o pozitivním módu. Je univerzální a umožňuje stanovit široké spektrum látek. V negativním módu jsou detekovány anionty. Spektrum látek, pro které je vhodný, není tak široké. Je využitelný pro detekci látek mající určité funkční skupiny (sulfonovou, karboxylovou, hydroxylovou nebo nitro- funkční skupinu), pro halogenované sloučeniny a organokovy [11][12].

### 2.3.3 Hmotnostní analyzátory

Analyzované molekuly jsou po získání náboje transportovány do analyzátoru pomocí iontové optiky – série elektromagnetických čoček – zaostřující proud iontů (podobně jako optické čočky zaostřují proud fotonů). Následně jsou nabitě částice od sebe děleny různými fyzikálními principy:

- zakřivení dráhy letu působením magnetického nebo elektrického pole
  - Při průchodu iontů magnetickým polem, které sektorový analyzátor vytváří, je zakřivena jejich dráha letu podle  $m/z$ . Na větší molekuly působí větší odstředivá síla a tím je výsledná dráha méně ovlivněna. Při případné aplikaci následující elektricko-statické fokusace elektrickým polem jsou dráhy letu částic zakřiveny podle kinetické energie  $E_k$ .
- stabilita iontů v prostředí stejnosměrného a střídavého napětí
  - Kvadrupólový analyzátor (Q) se skládá ze 4 rovnoběžně uložených tyčí, na které je přiváděno stejnosměrné napětí (vždy shodný náboj na protilehlých tyčích). Na všechny tyče je dále zavedeno vysokofrekvenční střídavé napětí. Plynujou

změnou napětí a amplitudy dochází k postupnému propouštění iontů o určité hodnotě  $m/z$  směrem k detektoru. Případným nárazem do tyčí analyzátoru ionty zanikají (Obrázek 3).



Obrázek 3 - Schéma kvadrupólového analyzátoru; převzato z [13]

- Trojitý kvadrupól (QqQ, TQMS) představuje tandemové zapojení kvadrupólových hmotnostních spektrometrů. Chromatograficky separované a ionizované analyty vstupují do prvního kvadrupólu  $Q_1$ . Ten podle operátorem nastavených parametrů propustí ionty s určitou hodnotou  $m/z$  dále do kolizní cely  $q_2$ . Prostor kolizní cely  $q_2$  je vyplněn kolizním plynem inertního charakteru (dusík, argon, helium). Produktem kolize iontů s molekulami plynu jsou fragmenty, které jsou pomocí dalšího kvadrupólu  $Q_3$  analyzovány (Obrázek 4).



Obrázek 4 - Schéma trojitého kvadrupólu

- Kvadrupólová iontová past (QIT) shromažďuje ionty v elektrodami vymezeném prostoru, který je vyplněn héliem. Změnou parametrů jsou jednotlivé ionty propouštěny směrem k detektoru. Čím déle jsou ionty v pasti uzavřeny, tím vyšší je pravděpodobnost kolize částic a jejich zániku.

- rychlost letu nabité částice
  - Analyzátor doby letu (TOF) je rychlý spektrometr dělící ionty podle  $m/z$  na základě rychlosti pohybu v evakuované trubici. Lehčí ionty se pohybují rychleji a svým dopadem na detektor vytváří signál dříve než ionty těžší. Využíváno je často spojení tohoto analyzátoru s ionizátorem MALDI.
- frekvence harmonických oscilátorů
  - V analyzátoru Orbitrap ionty oscilují podél elektrody vřetenovitého tvaru, na kterou je vloženo napětí. Částice zaujmají stabilní dráhu v určitých vzdálenostech a zformují se do prstenců. Následně je měřen proud indukovaný na vnějších elektrodách a pomocí Fourierovy transformace (matematickou funkcí) převeden na hmotnostní spektrum.
- absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli
  - Analyzátor iontové cyklotronové rezonance (FT-ICR) je nejcitlivější (a nejdražší) analyzátor na trhu. Cela je umístěna v silném magnetickém poli, díky kterému se ionty pohybují po stabilní dráze s cyklotronovou frekvencí. Ta je charakteristická pro každé  $m/z$ . Ionty stykem s detekčními deskami vytváří proud, který je zaznamenán a stejně jako u Orbitrapu Fourierovou transformací vykreslen do podoby hmotnostního spektra [2][10].

### 2.3.4 Detektory

Detektor následuje po všech typech analyzátorů kromě Orbitrapu a FT-ICR; ty zajišťují i detekci. Ionty svým dopadem na stěnu detektoru vyrazí z jeho povrchu elektron. Ten následně:

- a) dopadem na povrch dynody způsobí indukci elektrického proudu (Faradayova klec),
- b) vyrazí další elektrony a lavinovým efektem dojde ke znásobení signálu (elektronové násobiče),
- c) dopadne na fosforescenční destičku a vyrazí foton, který je zachycen a zesílen (fotonásobič) [2][10].

### 2.3.5 Hmotnostní spektrum

Výstupem z MS detektoru je hmotnostní spektrum. Jedná se o grafický záznam závislosti absolutní nebo relativní intenzity na poměru hmotnosti a náboje  $m/z$ . V záznamu s relativní intenzitou je nejintenzivnějšímu iontu přiřazena hodnota 100 %. Spektrum a jeho následná interpretace se odvíjí od použité techniky ionizace. Při ionizaci analytu může molekula fragmentovat až do úplné ztráty molekulového píku v hmotnostním spektru (běžně při EI).

Fragmentace při elektronové ionizaci je charakteristická a reprodukovatelná. Byly sestaveny komerčně dostupné knihovny spekter, např. knihovny NIST, Wiley, databáze léčiv a pesticidů. Jsou běžnou a široce používanou součástí softwaru dodávaného výrobcem, případně je možné je dokoupit. Programy umožňují vytvořit vlastní databáze naměřených struktur a porovnávat je s knihovnami. Nutností je pracovat se stejně nastaveným parametrem rychlosti elektronů eV, které analyty ionizují. Pro potřeby mezilaboratorního porovnávání získaných dat byla určena hodnota parametru na 70 eV jako standard. Program nabízí i procentuální vyjádření shody mezi spektry a navrhuje možnou chemickou strukturu [10][11].

### 2.3.6 Typy skenovacích módů

Hmotnostní spektrometry nabízejí více typů záznamů:

- Full scan – sken celého spektra
  - o Při práci v tomto módu analyzátor mění parametry napětí tak, že postupně propouští všechny ionty směrem k detektoru. Tato metoda je vhodná pro screening neznámých látek, k určení molekulové hmotnosti iontů a k popsání případné fragmentace. Šíře rozmezí, která je nastavitelná, však snižuje citlivost metody. Full scan poskytuje záznam s vyšším šumem pozadí na základní linii a látky s velmi nízkou koncentrací nemusí být registrovány.
- SIM – Selective Ion Monitoring – sken vybraného iontu/iontů
  - o Metoda SIM umožňuje sledovat jen vybrané hodnoty  $m/z$ , čímž je zvýšena citlivost detekce. Její použití je vhodné při známé struktuře analytu, při kvantifikaci a stopových analýzách. Látky mající pozměněnou strukturu a jinou molekulovou hmotnost (např.

metabolity léčiv a jiných xenobiotik, nově syntetizované zneužívané psychoaktivní substance) nejsou při nesprávně nastavených parametrech metodou SIM zaznamenávány.

- SRM – Selective Reaction Monitoring – monitorování vybrané reakce
  - o Metoda SRM poskytuje informace o fragmentacích v molekule analytu, ke kterým dochází vlivem řízené kolize (např. s plynem v kolizní cele  $q_2$  trojitého kvadrupólu). Jedná se o hlavní mód pro kvantifikaci látek v biologických matricích. Interpretace takto získaných dat je složitější a klade větší nároky na obsluhu. Obdobu SRM metody je Multiple Reaction Monitoring (MRM), kdy operátor vybere pomocí prvního analyzátoru větší počet prekurzorových iontů, které podstoupí řízenou kolizi a fragmentaci. Práce v SRM, resp. MRM módu má velké využití například v proteomice.

Dalšími využívanými detekčními módy jsou sken prekurzorových iontů, sken produktových iontů a sken neutrálních ztrát [12].

## 2.4 GC/MS

Spojení plynové chromatografie pro separaci a hmotnostní spektrometrie pro následnou analýzu látek našlo své místo v analytických laboratořích. Vývoj náplní kapilárních kolon a nové derivatizační postupy vedly k významnému rozšíření portfolia látek, které je možné plynovou chromatografií separovat.

Při napojení na GC je použita ionizace elektronová (EI) nebo chemická (CI). Při EI dostávají analyty velké množství vnitřní energie, což má za následek rozsáhlou fragmentaci vazeb až do možné ztráty molekulového iontu. Elektrony emitované katodou svým přiblížením se k molekulám analytu způsobí změnu jejich magnetického pole a uvolnění valenčních elektronů. Díky tomu analyt ionizuje a může být dále separován. Pro chemickou ionizaci je používána stejná konstrukce, navíc je do prostoru ionizační komůrky přiváděn reakční plyn (např. methan, isobutan). V porovnání s množstvím analytu je plyn v nadbytku, s emitovanými elektrony interaguje přednostně a následně analyt ionizuje s nižší intenzitou. V záznamu CI je většinou pozorovatelný i molekulový ion a

jeho adukty. Analyzátozem je jednoduchý nebo trojitý kvadrupól, iontová past nebo TOF. Jako nosný plyn se dnes nejčastěji používá helium [10].



## 2.5 Úprava vzorku

Biologické vzorky (plasma, sérum, moč, vlasy a další) představují složité matrice. Při jejich analýze je často nutné před samotným měřením vzorek upravit a odstranit z něj interferující složky (polypeptidy, organické soli, fosfolipidy aj.), které by zanášely součásti chromatografického aparátu, snižovaly jejich životnost, vnášely do výsledného záznamu balastní píky a ovlivňovaly účinnost analytické metody.

K nejčastějším a v běžné laboratorní praxi používaným metodám patří precipitace, ultrafiltrace, extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce na pevnou fázi (SPE) [14].

### 2.5.1 Precipitace proteinů

Při precipitaci se ve vodě rozpustné proteiny vysráží do pevného skupenství pomocí vhodného precipitačního činidla a oddělí se od zbytku matrice. Běžně se využívají organická rozpouštědla mísitelná s vodou, silné anorganické kyseliny a soli těžkých kovů. Jednotlivá činidla se liší účinností v odstranění proteinů, cholesterolu a triacylglycerolů (Tabulka 1). Pro vyšší účinnost je možné použít i kombinaci činidel. Při výběru je nutné vzít v úvahu i další úpravu biologického materiálu (např. zda nebudou vstupovat do derivatizační reakce a tvořit vedlejší produkty) [14][15].

*Tabulka 1 - Zbytkové množství proteinů, cholesterolu a triacylglycerolů v supernatantu při použití různých precipitačních činidel; převzato a přeloženo z [15]*

Měřené vzorky	Celkový protein (g/l)	Celkový cholesterol (mM)	Triacylglyceroly (mM)
Nativní plasma	71,6	4,16	1,70
Supernatanty po precipitaci:			
Kyselinou trichloroctovou	1,03 (1,4%)	0	0,05 (2,9%)
Kyselinou chloristou	1,53 (2,1%)	0,05 (1,2%)	0,05 (2,9%)
Směsí $H_3[P(W_3O_{10})_4]+MgCl_2$	10,0 (14,1%)	0,02 (0,5%)	0,05 (2,9%)
Acetonitrilem	6,63 (9,3%)	0,06 (1,4%)	0,08 (4,7%)
Methanolem	12,65 (17,7%)	0,18 (4,3%)	0,10 (5,9%)

### **2.5.2 Ultrafiltrace**

Při ultrafiltraci dochází k prostupu molekul přes semipermeabilní membránu. Skrze membránu prochází pouze volné molekuly analytu; frakce s vazností na proteiny je zachycena. Vzorky jsou po nanesení na filtr stáčeny v centrifuze. O účinnosti ultrafiltrace rozhoduje velikost pórů a materiál, ze kterého je filtr vyroben (např. modifikovaná celulóza, PTFE). Při výběru filtrů je nutné vzít v úvahu s jak velkým objemem biologického materiálu se bude pracovat a podle toho zvolit vhodnou velikost. Na trhu jsou dostupné filtry o objemu od stovek mikrolitrů až po desítky mililitrů. Při správné regeneraci je možné filtry použít vícenásobně a šetřit tak finanční náklady metody [14][16].

### **2.5.3 Extrakce kapalina-kapalina (LLE, Liquid-Liquid Extraction)**

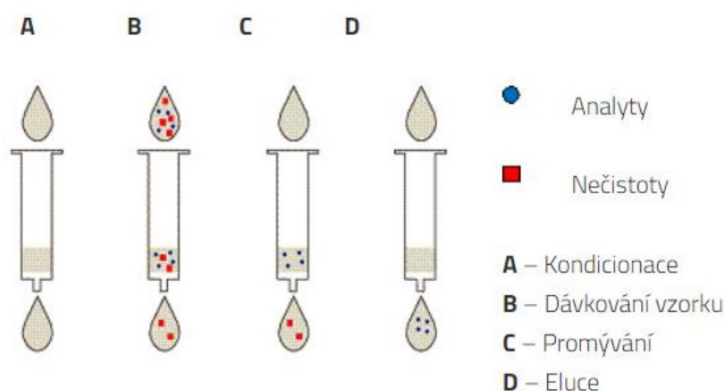
LLE je extrakční metoda, při které analyt přechází přes rozhraní dvou vzájemně nemísitelných kapalin – vodné vrstvy (např. naředěný biologický vzorek) a organického rozpouštědla – do ustavení fázové rovnováhy. Tento způsob úpravy vzorku je velmi výhodný pro analýzu nepolárních látek, které mají v organických rozpouštědlech vyšší rozpustnost než ve vodných roztocích. Extrakci je možné podpořit úpravou pH roztoku dle hodnoty pK<sub>a</sub> analytů, aby byl poměr neionizované a ionizované formy 100:1 (u látek kyselého charakteru pH o 2 řády nižší než je hodnota pK<sub>A</sub>, u bazických sloučenin o 2 řády vyšší než je hodnota pK<sub>B</sub>). Pro zlepšení výtěžnosti je možné dále provádět extrakci opakovaně nebo zvětšit objem organické fáze [14].

LLE je rychlá a finančně nenákladná úprava. Umožňuje přečistit a zakoncentrovat vzorek před jeho analýzou. Pro podpoření přechodu látek je vzorkem třepáno, čímž se zvětšuje se povrch fázového rozhraní. Není vhodná, potřebujeme-li analyzovat vysoce polární látky. Nežádoucím jevem, který může při LLE nastat, je vytvoření emulze. Ta může být natolik stabilní, že další manipulace se vzorkem je obtížná až nemožná [2][14][15].

### **2.5.4 Extrakce na pevnou fázi (SPE; Solid Phase Extraction)**

SPE je vysoce výkonnou a rutinně používanou extrakční metodou. Principem metody je zachycení analytu na pevné fázi (sorbentu), skrze kterou protéká vzorek, podobně jako u stacionárních fází v chromatografických kolonách. V prvním kroku SPE – kondicionace je sorbent propláchnut vhodným činidlem,

které aktivuje funkční skupiny sorbentu. Následně je na kolonku pomalu nanesen biologický vzorek. Molekuly analytu a funkční skupiny sorbentu spolu vzájemně interagují slabými a silnými fyzikálními silami (Van der Waalsovy síly, vodíkové vazby, interakce dipól-dipól, elektrostatické interakce) v závislosti na jejich chemických strukturách. V promývacím kroku je analyt zadržován, zatímco balastní látky jsou z kolonky vymyty. Závěrečným krokem SPE je eluce, při které je analyt uvolněn v podobě přečištěného a koncentrovaného extraktu a může být dále analyzován (Obrázek 5) [2][14].



Obrázek 5 - Postup SPE; převzato z [17]

Práce s SPE je automatizovatelná a v jedné sérii lze při vhodné instrumentaci upravit i větší počet vzorků. Vhodným výběrem sorbentu je možno stanovit široké spektrum látek. Sorbenty jsou většinou na bázi silikagelu, modifikovaného C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> alkylovými řetězci, fenylovými jádry nebo alkyly zakončenými polárními funkčními skupinami. Mohou se též chovat jako silné nebo slabé iontoměniče [2][14].

## 2.6 Derivatizace

Plynová chromatografie je vhodná pro analýzu těkavých organických látek. U látek, které se nedají snadno převést do plynného stavu, případně nejsou stabilní při vyšších teplotách (vysoká teplota je pro úspěšnou separaci podmínkou), je možné provést derivatizační reakci. Derivatizace dále zlepšuje chromatografické chování, zvyšuje těkavost a stabilitu analytů, selektivitu a citlivost metody [18].

Ideální derivatizační činidlo by mělo splňovat následující kritéria:

- vysoká a opakovatelná výtěžnost reakce (95 - 100%),
- zachování chemické struktury a množství analytu,
- tvorba derivátů, které nebudou reagovat s náplní analytické kolony,
- dostatečná teplotní a časová stabilita produktů [18].

Molekula analytu musí obsahovat vhodnou funkční skupinu (např. hydroxyl, karboxyl, thiol, amin, imin), která vstupuje do reakce. Používanými derivatizačními reakcemi jsou acylace, alkylace a silylace [18].

### 2.6.1 Acylace

Acylace je vhodnou reakcí pro molekuly, které obsahují funkční skupiny s aktivním vodíkem. Aminy, hydroxyly a thioly jsou převedeny na méně polární amidy, estery, respektive thioestery. Použití acylačních činidel přináší řadu výhod:

- chrání nestabilní funkční skupiny,
- snižuje polaritu molekuly,
- zlepšuje těkavost a odolnost vůči zvýšeným teplotám,
- umožňuje GC analýzu látek, které by jinak analyzovatelné nebyly.

Jako acylační činidla se využívají anhydridy perfluorovaných kyselin, perfluoracylimidazoly, flourované acetamidy. V posledních desítkách let roste míra využití alkylchloroformiátů [18].

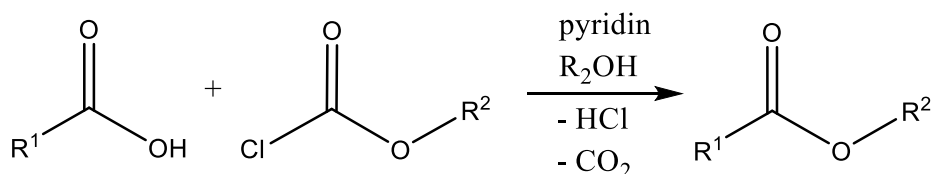
### 2.6.2 Chloroformiáty

Derivatizace alkylchloroformiátem (RCF) představuje rychlý způsob převedení hydrofilního analytu na lipofilnější derivát. Chloroformiáty splňují řadu podmínek pro ideální způsob derivatizace. Konverze je rychlá a celá reakce i s analýzou

zabere několik minut. Oproti silylaci není potřeba pracovat v bezvodém prostředí ani zahřívat reagující složky. V porovnání s alkylací můžeme pomocí RCF provést derivatizaci širšího spektra látek. Alkylchloroformiáty jsou kromě analýzy využívány i při syntéze organických látek k ochraně volných hydroxylových skupin [19][20].

Na trhu jsou k dostání chloroformiáty s čistě alkylovým nebo arylovým řetězcem, perfluorovaným anebo různými halogenidy substituovaným řetězcem. RCF jsou silně korozivní, hořlavá a karcinogenní činidla. Manipulace s nimi má probíhat v digestoř při použití ochranných pomůcek [21][22].

Chloroformiáty (též chlormravenčany) vnášejí do molekuly analytu alkylový zbytek esterifikací (Obrázek 6), thioesterifikací, resp. amidací (v závislosti na reagujících funkčních skupinách). Pro zvýšení výtěžnosti reakce o desítky procent se k chloroformiátu přidává alkohol. Ten může mít s chloroformiátem shodný anebo odlišný alkylový řetězec. Tomu odpovídají i výsledné produkty derivatizační reakce. V rámci reakce se z molekuly RCF uvolní oxid uhličitý a chloridové anionty. Uvolnění CO<sub>2</sub> se projeví mléčným zákalem ve zkumavce. Vyčeření jejího obsahu je známkou dokončení reakce. Do soustavy je přidáván pyridin jako katalyzátor reakce a organické rozpouštědlo, do kterého jsou lipofilní deriváty extrahovány. V závěrečném kroku reakce je prostředí okyseleno kyselinou chlorovodíkovou. Tímto krokem získá pyridin náboj a je zachycen ve vodné vrstvě jako pyridinium chlorid. Pro potřeby analýzy se dále pracuje s organickou vrstvou. Tu je možné buď přímo nastříknout a analyzovat, anebo odpařit a analyt tím zakoncentrovat [23].



Obrázek 6 – Esterifikace karboxylové kyseliny pomocí chloroformiátu

### 2.6.3 Přehled publikovaných prací

Derivatizace polárních molekul pomocí chloroformiátů a jejich následné stanovení GC/MS představovala revoluci a pro plynovou chromatografii částečnou renesanci. První experimenty s alkylchloroformiáty v analýzách

sloučenin byly popsány v roce 1976. Nejvíce prací bylo publikováno v devadesátých letech minulého století a počátkem tohoto milénia [24].

V České republice je průkopníkem a celosvětově uznávaným odborníkem Ing. Petr Hušek, Dr.Sc. Ve spolupráci s dalšími členy své výzkumné skupiny vyvinuli a opublikovali metody pro stanovení aminokyselin [25][26], biogenních aminů [27][28], mastných kyselin [29], fenolických kyselin [30], vícesytných kyselin [31], sterolů a tokoferolů [20] chloroformiáty v různých biologických vzorcích. Výsledné produkty analyzovali nejenom GC/MS ale též kapalinovou chromatografií s následnou hmotnostní detekcí. Taktéž ve svých pracích popsali mechanismus reakce [21][23] a charakteristickou fragmentaci molekul při použití MS s tvrdou ionizační technikou [31]. Huškův tým zavedl do klinické praxe metodu ke stanovení aminokarboxylových metabolitů ve vzorku moči pacienta. Jednoduchou a levnou úpravou vzorku je možné detekovat a kvantifikovat 153 analytů; řada z nich je v medicíně využívána jako biomarkery u onemocnění provázených metabolickými změnami (fenyلكetonurie, cystinurie, Alzheimerova choroba, diabetes 1. typu a další) [32].

Analýzám s využitím alkylchloroformiátů se věnovaly i týmy Vincentiho a Huanga. Ve svých pracích povětšinou s Huškem buď spolupracovali anebo na něj odkazují [22][24][33][34][35].

Chloroformiáty je možné využít i ve farmaceutickém průmyslu v rámci kontroly čistoty léčiv na bázi peptidů. Hydrolyzou oktapeptidu karbetocinu (analog oxytocinu) a následnou derivatizací uvolněných D- a L-aminokyselin je možné stanovit chirální čistotu a zajistit tak pro pacienta vysokou terapeutickou účinnost léčivého přípravku [36].

## 2.7 Kvantifikace

Řada endogenních molekul byla vybrána jako biomarkery pro monitoring fyziologických a odhalování patologických procesů v těle. Skutečnost, že jde o tělu vlastní látky, komplikuje kalibraci a validaci analytických metod. Autority posuzující nově vyvinuté metody doposud nevydaly jasné směrnice (guidelines), jak postupovat z hlediska kvantifikace [37][38][39].

Vhodným postupem dle práce Thakare et al. z roku 2016 je a) kalibrace v náhradní matici (surrogate matrix), která je analytu prostá, b) kalibrace s využitím náhradního analytu (surrogate analyte) v biologické matici. Dalšími použitelnými metodami je c) odečítání pozadí (background subtraction) a d) standardní přídavek analyzované látky (standard addition) [40].

Náhradními maticemi mohou být např. roztok albuminu ve fosfátovém pufru, matrice přečištěna imunologicky nebo aktivním uhlím, anebo matrice získaná odběrem vzorku z jiného organismu. Poslední z uvedených je vhodný pro analýzu peptidů, které mají odlišnou expresi napříč živočišnými druhy [40].

Při kalibraci s náhradním analytem se využívá stabilního izotopicky značeného analytu (SIL), který se při úpravě vzorku a analýze chová stejně jako analyt, liší se však molekulovou hmotností. Endogenní látka a náhradní analyt mohou poskytovat lehce odlišnou odezvu při detekci. Tuto skutečnost (RF, Response Factor) je nutné zohlednit při tvorbě kalibrační křivky a určování koncentrace v reálných vzorcích. Dále je vhodné přidat do vzorku vnitřní standard pro korekci ztrát vzniklých při manipulaci se vzorkem. Detekce se provádí pomocí hmotnostní spektrometrie [40].

## **3 CÍL PRÁCE**



Cílem práce bylo vyvinout vhodnou analytickou metodu pro stanovení chinolinové kyseliny skládající se z dostatečně účinného způsobu extrakce kyseliny z biologických vzorků, optimalizace procesu derivatizace pomocí alkylchloroformiátů, nalezení vnitřního standardu pro GC/MS analýzu a sestrojení kalibračního rozmezí. Získaná data byla použita pro ověření možnosti tuto metodu do budoucna validovat.

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 Chemikálie, přístroje a příslušenství

### 4.1.1 Chemikálie

Biologické centrum AV ČR – 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiát

Fluka Chemie – tetrabutylamonium bromid

Fluorochem – 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutan-1-ol

Lachema – tetraethylamonium jodid

Lachner – hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina sírová

Merck – dimethylsulfoxid, kyselina ethylendiamintetraoctová, kyselina pyridin-2,4-dikaboxylová, methanol

Millipore – voda upravená reverzní osmózou

Penta – chloroform, pyridin

Reachim – isobutanol

Sigma-Aldrich – dichlormethan, ethylchloroformiát, ethanol, isobutylchloroformiát, kyselina chloristá, kyselina pyridin-2,3-dikaboxylová, kyselina pyridin-2,5-dikaboxylová, kyselina pyridin-2,6-dikaboxylová, kyselina pyridin-3,4-dikaboxylová, kyselina pyridin-3,5-dikaboxylová, methylchloroformiát, propan-1-ol, síran měďnatý, síran zinečnatý, tetramethylamonium chlorid, tetrapropylamonium bromid, wolfram sodný

Supelco – isooktan

Toronto Research Chemicals – kyselina 4,5,6-*trideuterido*-pyridin-2,3-dikarboxylová, kyselina 5-ethylpyridin-2,3-dikarboxylová

VWR – acetonitril

### 4.1.2 Média, biologické vzorky

Hovězí sérum FBS, médium pro kultivaci buněčných kultur DMEM, placentární homogenát (lidský, potkaní), plasma (lidská, králičí, potkaní), sérum (lidské) – dodáno z Katedry farmakologie a toxikologie a Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy FaF UK

#### **4.1.3 Přístroje**

ECOM – termovap

Ecoson – ultrazvuková lázeň Ecoson U-3 STH

Eppendorf – Centrifuga MiniSpin

KERN&Sohn – analytické váhy ABT 220-4M

Qsonica – Sonicator Q500

Sartorius – analytické váhy CPA225D-0CE

Shimadzu Corporation – autoinjektor/autosampler AOC-20i, plynový chromatograf/hmotnostní spektrometr GCMS-QP2010 Plus, spektrofotometr UV-2401PC

Supelco – SPE vakuový manifold Visiprep 5-7030

Velp Scientifica – třepačka Vortex Classic

#### **4.1.4 Počítačové programy**

Microsoft 365

PerkinElmer – ChemDraw Professional 17.1

Shimadzu Corporation – GCMSsolution Version 4.45, UV Probe 2.43

#### **4.1.5 Chromatografické kolony**

RTX-5MS – 30 m x 0,25 mm, 0,2 µm, Restek

SLB-IL59 – 30 m x 0,25 mm, 0,2 µm, Supelco

#### **4.1.6 Pomůcky**

- SPE kolonky:

HyperSep™ Retain CX (30 mg/1 ml, Thermo Scientific)

HyperSep™ Verify CX (50 mg/1 ml, Thermo Scientific)

Supelclean™ LC-SCX (100 mg/1 ml, MilliporeSigma™)

- membránové filtry:

LUT membrane disc, MCE (25 mm, 0,45 µm, Labstore)

LUT membrane disc, nylon (25 mm, 0,45 µm, Labstore)

LUT membrane disc, PTFE (25 mm, 0,45 µm, Labstore)

- centrifugační filtry:

Amicon® Ultra 0,5 (MWCO 30 kDa, 0,5 ml, Merck)

Microcon-30kDa (MWCO 30 kDa, 0,5 ml, Merck)

## 4.2 Příprava roztoků

**Derivatizační směs s MeCF** byla připravena v odměrné baňce o objemu 5 ml, smísením 250 µl MeOH, 1000 µl MeCF a doplněním CHCl<sub>3</sub> po rysku.

**Derivatizační směs s EtCF** byla připravena v odměrné baňce o objemu 5 ml, smísením 250 µl EtOH, 1000 µl EtCF a doplněním CHCl<sub>3</sub> po rysku.

**Derivatizační směs s iBCF** byla připravena v odměrné baňce o objemu 5 ml, smísením 250 µl iBOH, 1000 µl iBCF a doplněním CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> po rysku.

**Derivatizační směs s HFBCF** byla připravena v odměrné baňce o objemu 5 ml, smísením 250 µl HFBOH, 1000 µl HFBCF a doplněním ISOO po rysku.

**Katalytické médium** bylo připraveno v odměrné baňce o objemu 5 ml. 200 µl pyridinu bylo doplněno 1M roztokem NaOH po rysku a promícháno.

**Roztoky standardů (orientační)** byly připraveny navážením 1 mg substance do vialky z hnědého skla a přidáním 1 ml vody. Takto připravené roztoky byly uchovávány v lednici a před používáním temperovány na laboratorní teplotu v ultrazvukové lázni.

**Roztoky standardů (přesné)** byly připraveny navážením příslušné substance do odměrné baňky a doplněním vodou po rysku. Přesné navážky:

2,3\_PDA – 0,00535 g/50 ml

3,5\_PDA – 0,00560 g/50 ml

d3\_PDA – 0,00078 g/5 ml

Takto připravené roztoky byly uchovávány v chladu a před používáním temperovány na laboratorní teplotu v ultrazvukové lázni.

V rámci otestování stability roztoků analytů byly připraveny směsné roztoky s DMSO v poměru 1:1 a uchovávány v laboratorní teplotě.

**Zásobní roztoky anorganických solí** používané pro precipitaci byly připraveny v 1 M koncentraci a následně ředěny v čase potřeby. Navážky solí:

ZnSO<sub>4</sub> – 8,07 g/50 ml

Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> – 1,47 g/5 ml

CuSO<sub>4</sub> – 0,80 g/5 ml

**Zásobní roztoky tetraalkylamoniových solí** byly připraveny v 1 M koncentraci a následně ředěny v čase potřeby. Navážky solí:

TMAC – 0,55 g/5 ml

TEAI – 1,29 g/5 ml

TPAB – 1,33 g/5 ml

TBAB – 1,61 g/5 ml

### 4.3 Příprava vzorku

1. kondicionace filtrů – Filtr Milipore Microcon byl naplněn 500 µl 0,1M roztoku TEAI a následně stáčen po dobu 15 minut rychlostí 13,6k ot./min. Filtrát i přebytečná kapalina nad filtrem byly odstraněny a filtr byl uzavřen v eppendorfci, aby byl chráněn před nečistotami a vyschnutím.
2. příprava biologického vzorku – Ve skleněné zkumavce bylo smíseno 50 µl biologického materiálu, příslušné množství roztoků standardů kyselin a 200 µl 0,25M roztoku TEAI. Objem byl doplněn vodou na výsledných 500 µl, přenesen na filtr a stáčen po dobu 30 minut rychlostí 13,6k ot./min.

3. derivatizace – Ultrafiltrát byl přenesen beze zbytku do čisté skleněné zkumavky, ve které byla provedena derivatizace. Za stálého protřepávání bylo postupně přidáváno: 50 µl derivatizační směsi HFBCF, 2x25 µl katalytického média, 1000 µl ISOO a 60 µl 1M HCl
4. 900 µl isooktanové vrstvy bylo přeneseno do čisté skleněné zkumavky a vysušeno proudem dusíku v Termovapu zahřívaném na 50 °C. Zbytek po vysušení byl následně rekonstituován ve 100 µl ISOO a přenesen do inzertu k následné GC/MS analýze.

#### **4.4 Stabilitní vzorky**

Ve skleněné zkumavce bylo smíšeno 10 µl roztoku standardu 2,3\_PDA, 10 µl roztoku standardu d3\_PDA, 200 µl 0,25M roztoku TEAI a 260 µl vody. Derivatizace byla provedena podle kroku 3 postupu „Příprava vzorku“. Isooktanová vrstva byla přenesena do vialky a uchovávána při laboratorní teplotě. Vzorek byl pravidelně měřen a získané údaje byly současně používány pro ověření nastavení GC/MS systému.

#### **4.5 Vzorky pro ověření linearity**

Linearita metody byla ověřena na biologických vzorcích podle postupu „Příprava vzorku“. Byly použity roztoky standardů o přesně známé navážce pro získání kalibrační křivky v rozmezí 0,5 až 12,5 ng. Kyselina pyridin-3,5-dikarboxylová byla ve všech vzorcích kromě blanku v množství 3,5 ng. Jednotlivé složky byly dány podle Tabulky 2.

Tabulka 2 - Příprava vzorků pro ověření linearity; objemy jsou uvedeny v  $\mu\text{l}$

	matrice	TEAI 0,025M	3,5_PDA	2,3_PDA		d3_PDA		voda
zředění			*50	*2000	*200	*2000	*200	
blank	50	200	0	0	0	0	0	250
0 + 3,5	50	200	10	0	0	0	0	240
0,5	50	200	10	10	0	10	0	220
0,75	50	200	10	15	0	15	0	210
1	50	200	10	20	0	20	0	200
1,5	50	200	10	30	0	30	0	180
2,5	50	200	10	0	5	0	5	230
5	50	200	10	0	10	0	10	220
7,5	50	200	10	0	15	0	15	210
10	50	200	10	0	20	0	20	200
12,5	50	200	10	0	25	0	25	190

#### 4.6 Nastavení parametrů GC/MS

V Tabulce 3 je uvedeno nastavení GC/MS soustavy, při kterém probíhalo měření vzorků.

Tabulka 3 - Nastavení parametrů GC/MS

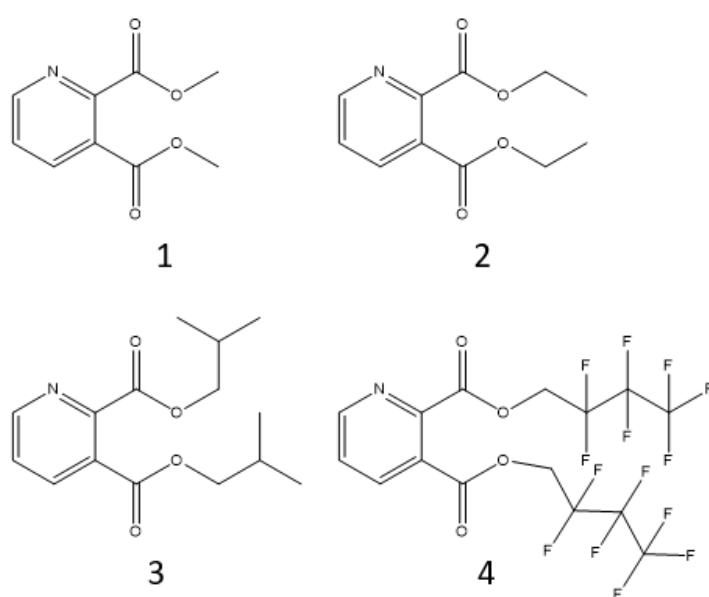
GC:	MS:	
Teplota termostatické pece: 80 °C	Teplota iontového zdroje: 220 °C	
Nárůst teploty: 30 °C/min	Teplota přechodu: 300 °C	
Konečná teplota: 260 °C	Ionizace: EI	
Teplota injektoru: 240 °C		
Nosný plyn: Helium	Scan (m/z):	70 - 750
Tlak plynu: 72,4 kPa	SIM (m/z):	304
Celkový průtok plynu: 9,5 ml/min		307
Průtok plynu kolonou: 1,09 ml/min		332
Lineární rychlost: 38,5 cm/s		335
Split: 5		
Injekce za vysokého tlaku: 172,0 kPa		
Doba trvání vysokého tlaku: 1 min		
Celkový čas analýzy: 6 min		



## **5 VÝSLEDKY A DISKUZE**

## 5.1 Vývoj metody derivatizace

Postup derivatizace alkylchloroformiáty jsme převzali z práce Hušek et al. [32] – zachovali jsme množství a pořadí přidávání reakčních činidel do soustavy a poměry jednotlivých složek v derivatizační a katalytické směsi. Upravili jsme množství a poměr vodné a organické vrstvy a přidavek kyseliny chlorovodíkové v závěru reakce (Tabulka 4). V rámci této práce jsme porovnali derivatizaci chinolinové kyseliny následujícími chloroformiáty: MeCF, EtCF, iBCF a HFBCF. Pro zvýšení výtěžnosti reakce byl do derivatizační směsi přidán i alkohol se shodným alkylovým řetězcem. Výsledné produkty jsou na Obrázku 7.



Obrázek 7 - Výsledné produkty derivatizace 2,3\_PDA s MeCF (1), EtCF (2), iBCF (3) a HFBCF (4)

Vzniklé estery byly vytřepány do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou a analyzovány. Nejlepší výtěžnost poskytla reakce chinolinové kyseliny s derivatizační směsí HFBCF-HFBOH-ISOO. Fluorovaný derivát vykazoval stabilitu, lepší těkavost a interakci se stacionární fází. S isooktanem se též dobře pracovalo při zakoncentrování vzorku proudem dusíku v mírně vyhřívaném Termovapu.

Tabulka 4 - Postup derivatizační reakce

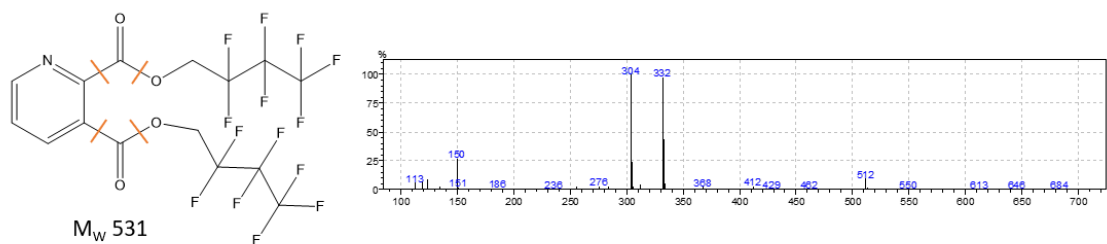
Postup dle práce [32]	Zoptimalizovaný postup
25 µl moči + 25 µl IS + 25 µl THP <sup>1</sup>	ultrafiltrát (ca 470 µl)
↓	↓
+ 50 µl der. směsi (ISOO : HFBCF : HFBOH; 15:4:1)	+ 50 µl der. směsi (ISOO : HFBCF : HFBOH; 15:4:1)
↓	↓
+ 2x 25 µl kat. média (1M NaOH : pyridin; 24:1)	+ 2x 25 µl kat. média (1M NaOH : pyridin; 24:1)
↓	↓
+ 50 µl ISOO	+ 1000 µl ISOO
↓	↓
+ 25 µl 1M HCl	+ 60 µl 1M HCl
↓	↓
1 µl organické vrstvy k GC/MS analýze	900 µl organické vrstvy vysušit
	↓
	+ 100 µl ISOO
	↓
	1 µl organické vrstvy k GC/MS analýze

## 5.2 Vývoj chromatografických podmínek

### 5.2.1 Vývoj nastavení GC separace

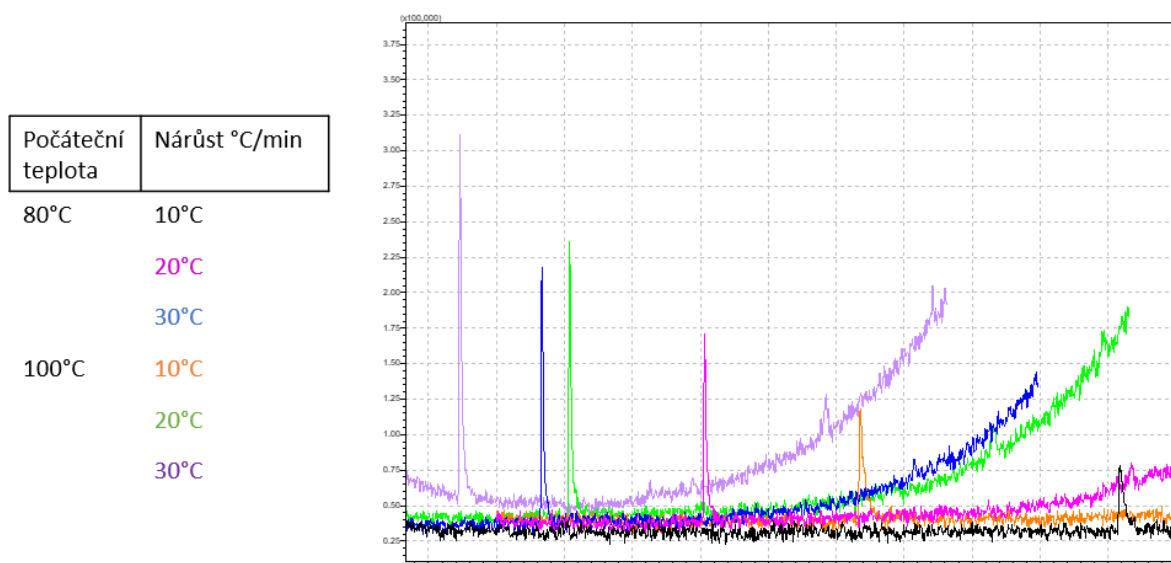
Analýzou chinolinové kyseliny zderivatizované směsí s HFBCF jsme získali hmotnostní spektrum látky (EI; full-scan; sledovaný rozsah  $m/z$  70 – 750). Nejintenzivnější hodnoty  $m/z$  304 a 332 potvrzovaly, že vlivem elektronové ionizace dochází k fragmentaci molekuly. Na Obrázku 8 je fragmentace naznačena červeně. V získaném spektru absentuje  $m/z$  odpovídající  $M^+$  radikálu z důvodu použití tvrdé ionizační techniky.

<sup>1</sup> THP = redukční činidlo disulfidických vazeb; tris(3-hydroxypropyl)phosphine



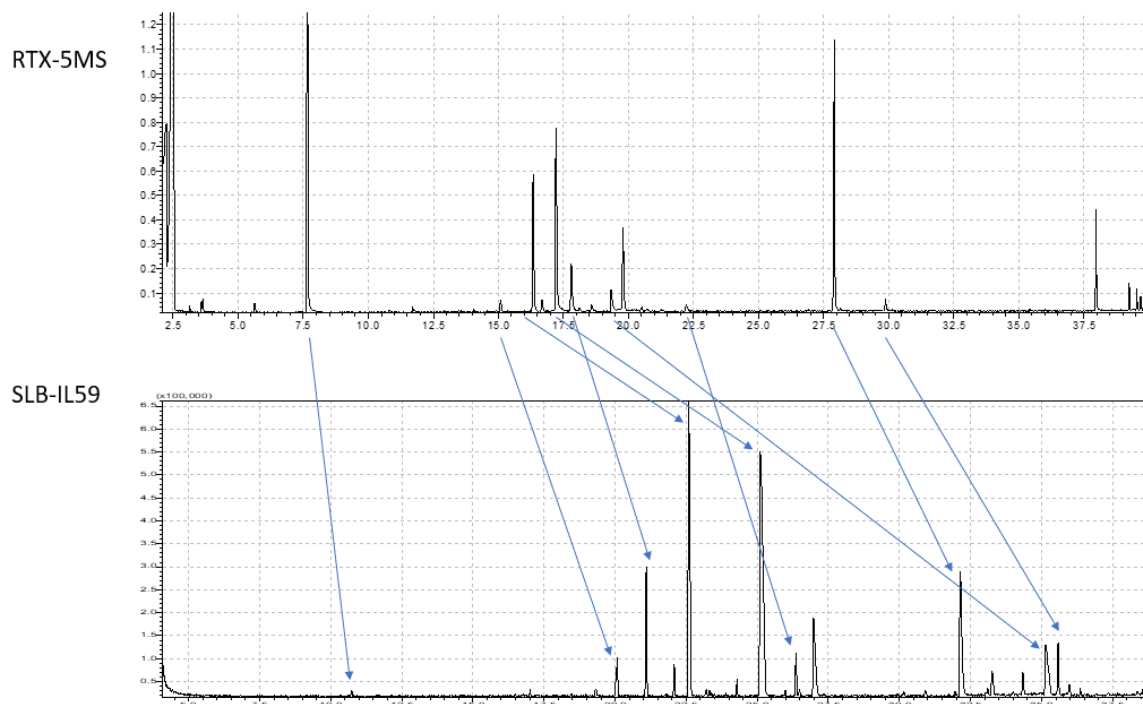
Obrázek 8 - Hmotnostní spektrum 2,3\_PDA\_HFBCF při aplikaci EI; fragmentace v molekule vyznačeny červeně

Dále byl zoptimalizován teplotní gradient. Porovnávali jsme různé počáteční teploty v kolonovém prostoru (80 °C, 100 °C a 120 °C) a rychlost nárůstu teploty (10 °C/min, 20 °C/min, 30 °C/min) při dosažení konečné teploty 320 °C (Obrázek 9). Jako nejlepší teplotní gradient jsme zvolili počáteční teplotu 80 °C a nárůst 30 °C za minutu. Analýza vzorku plasmy s tímto gradientem poskytovala dostatečnou separaci látek ve sledovaném úseku až na základní linii a nedocházelo ke koeluci píků vlivem rychlého nárůstu teploty.



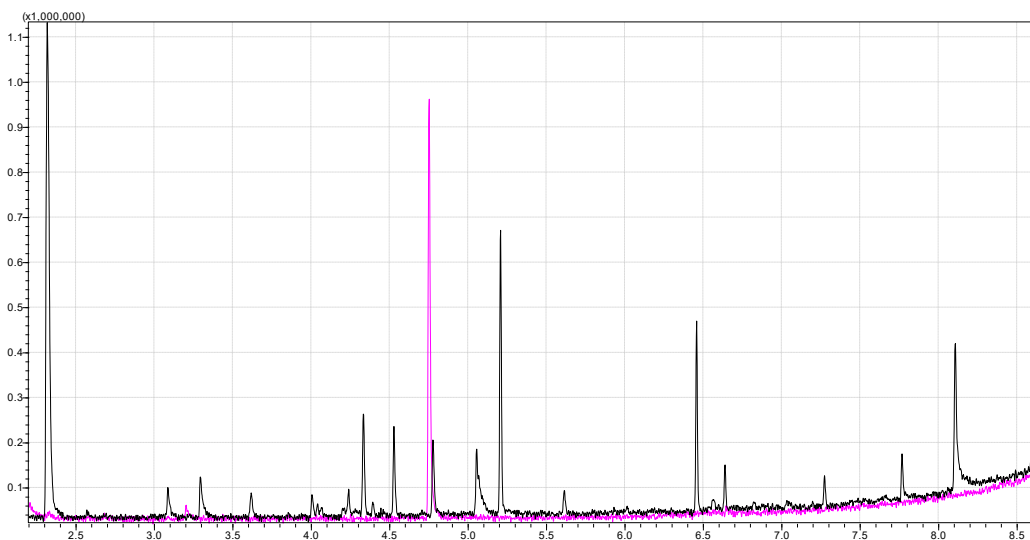
Obrázek 9 - Optimalizace teplotního programu

Na vzorku ultrafiltrací upraveného a zderivatizovaného séra byla provedena separace na dvou kapilárních kolonách lišících se polaritou stacionární fáze. Endogenní látky obsažené v séru (především organické kyseliny, aminokyseliny a jejich metabolity) vykazovaly dle předpokladů odlišné retenční chování (Obrázek 10, změna retence naznačena šipkami).

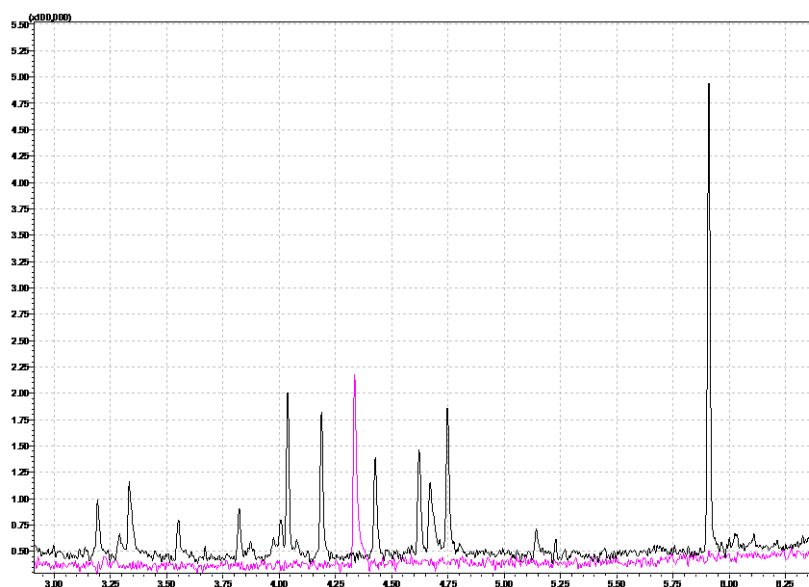


*Obrázek 10 - Porovnání separace analytů v séru na koloně RTX-5MS (nahore) a SLB-IL59 (dole)*

Na obou kolonách jsme proměřili s použitím stejného teplotního programu (80 °C, nárůst 30 °C/min) vzorek chinolinové kyseliny ve vodě a vzorek placenty upravený ultrafiltrací, obojí po zderivatizování heptafluorobutylchloroformiátem (Obrázky 11 a 12). Na koloně RTX-5MS byl po proložení výsledků pozorovatelný částečný překryv píků chinolinové kyseliny s jinou endogenní látkou; na koloně SLB-IL59 nikoliv. Proto jsme se rozhodli pokračovat s kolonou SLB-IL59 s náplní na bázi iontové kapaliny. Teplota kolonového prostoru 260 °C v závěru analýzy byla dostatečná pro eluci všech látek obsažených v reálných vzorcích, následné proplachy neobsahovaly stopy po analytech. Při nastavení teplotního gradientu byla celková doba analýzy 6 minut.

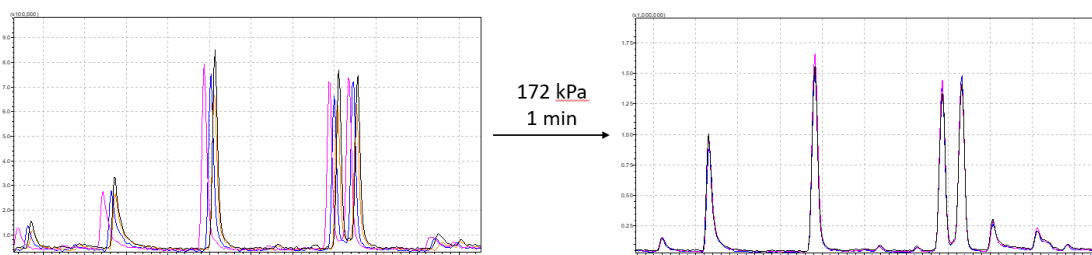


Obrázek 11 - Měření homogenátu placenty (černě) a 2,3\_PDA (růžově) na koloně RTX-5MS



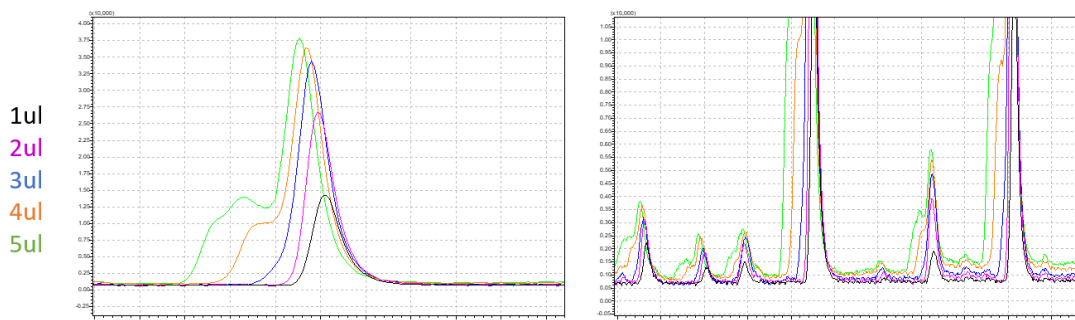
Obrázek 12 - Měření homogenátu placenty (černě) a 2,3\_PDA (růžově) na koloně SLB-IL59

Při porovnávání dat z opakovaných nástřiků jednoho vzorku jsme zjistili, že se retenční časy derivatizovaných látek mírně liší a automaticky prováděná integrace není vždy úspěšně dokončena. Problém byl vyřešen nástřikem vzorků na kolonu za zvýšeného tlaku – první minutu analýzy byl tlak plynu 172 kPa, následně byl snížen na 72,4 kPa (Obrázek 13).



Obrázek 13 - High pressure nástřik

Experimentálně jsme ověřili, že při práci s reálnými vzorky ve split i splitless módu je možné zvýšením nástřikovaného objemu dosáhnout lepších hodnot pro limit detekce a kvantifikace (Obrázek 14). Nástřik jednoho až tří  $\mu\text{l}$  poskytoval dobře vykreslený, izolovaný pík. U vyšších objemů se v záznamech projevil silnější šum na základní linii a zhoršené rozlišení mezi jednotlivými píky.

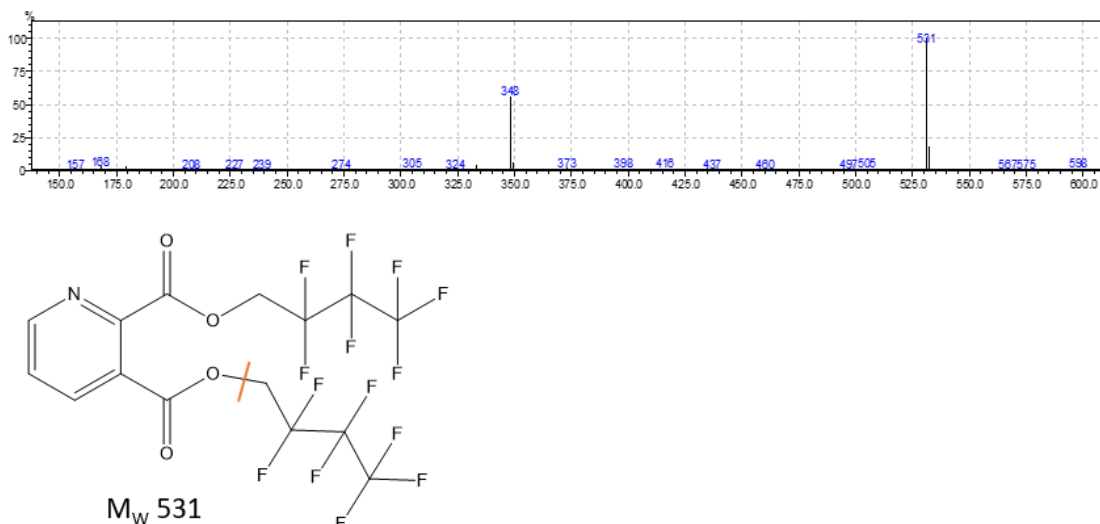


Obrázek 14 - Vliv velikosti nástřiku na tvar píků 2,3\_PDA a ostatních metabolitů

### 5.2.2 Nastavení MS detekce

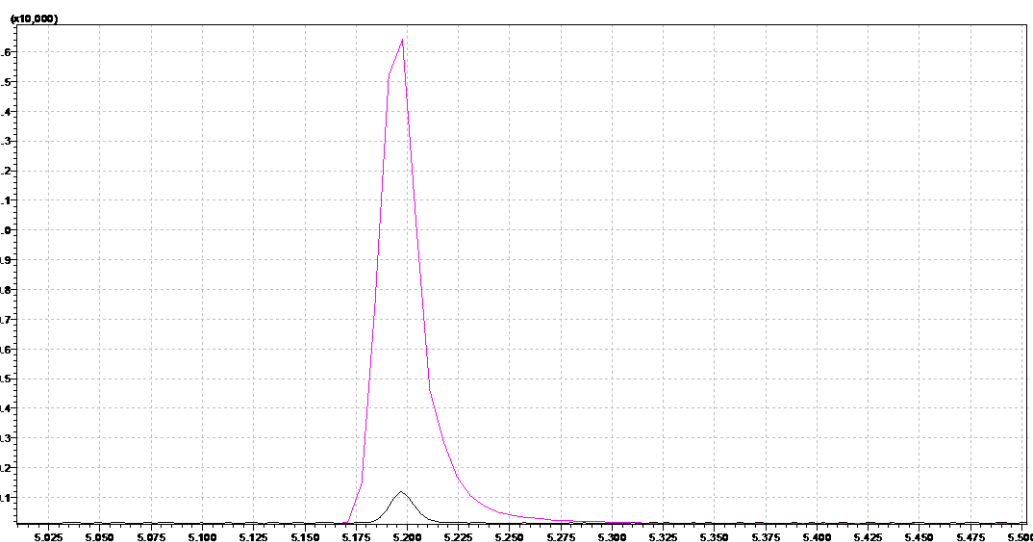
Detekce byla prováděna hmotnostní spektrometrií. Vzorek byl do své iontové formy převeden elektronovou ionizací, separace kladně nabitých iontů probíhala na jednoduchém kvadrupólu. Měření ve scan módu byly zjištěny hodnoty  $m/z$  nejvíce zastoupených fragmentů (Obrázek 8); následné experimenty probíhaly v citlivějším SIM módu. Námi zjištěná fragmentace odpovídala informacím z odborné literatury [31].

V rámci vývoje metody byla vyzkoušena i chemická ionizace se záznamem negativních iontů ve skenovacím rozsahu  $m/z$  80 – 800. Největší intenzitu v hmotnostním spektru měly  $m/z$  348 (fragment) a 531 (molekulový ion) (Obrázek 15).



Obrázek 15 – Hmotnostní spektrum 2,3\_PDA\_HFBCF při aplikaci NCI; fragmentace v molekule vyznačena červeně

Porovnali jsme intenzitu, kterou poskytoval pík odpovídající 4 ng chinolinové kyseliny ve vodě při EI a NCI. Výsledkem chemické ionizace byla odezva zhruba o 3 řády vyšší než u elektronové ionizace (Obrázek 16). Aplikací NCI při GC/MS analýze je možné zlepšit limity detekce a kvantifikace.

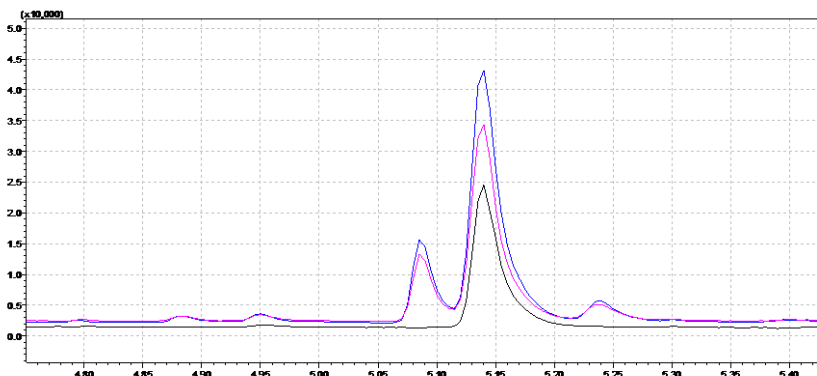


Obrázek 16 - Porovnání odezvy 2,3\_PDA při ionizaci EI (černě) a NCI (růžově)

Vzorek standardu kyseliny chinolinové jsme proměřili při různých hodnotách napětí – 0,00 kV, 0,05 kV a 0,10 kV (Obrázek 17). Vyšší napětí poskytovalo vyšší odezvu detektoru způsobenou větší kinetickou energií iontů. Zároveň se však zvýšil šum na základní linii a v záznamu se objevily píky látek, které při



nulovém napětí nebyly separovány a detekovány. Pro potřeby analýzy není nutné zvyšovat napětí.



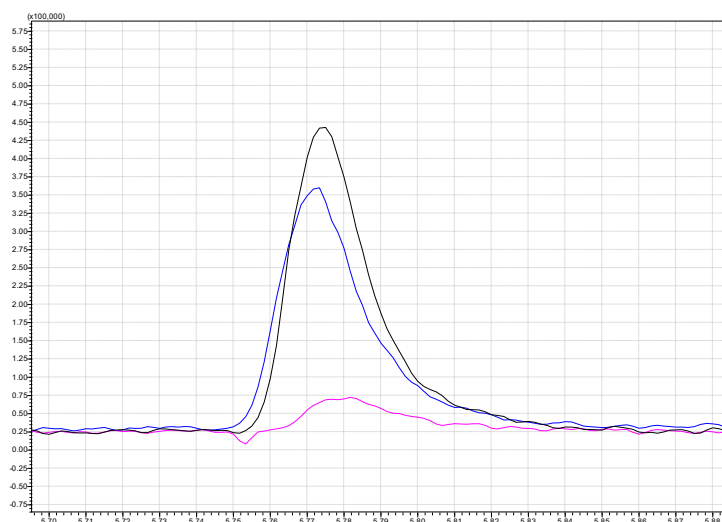
Obrázek 17 - Vliv rostoucího napětí na pík 2,3\_PDA\_HFBCF (0,00 kV černě, 0,05 kV růžově, 0,10 kV modře)

Pro správné měření je nutné čistit prostor lineru a vyměňovat septum a skleněnou vatu v pravidelných intervalech (zhruba po 200 nástřicích). Při zajištění správného servisu a správně nastaveném teplotním programu nedochází ke carry-overu látek z předchozích nástřiků.

### 5.3 Úprava biologického materiálu

V rámci diplomové práce byla vyzkoušena řada precipitačních postupů a dalších způsobů úpravy biologického materiálu na vzorcích plasmy, séra, placentárního homogenátu, média DMEM a laboratorně připraveného roztoku albuminu. Optimalizace byla prováděna se vzorkem plazmy.

Přídavek čistého organického rozpouštědla (acetonitril, methanol) vytvořil sice pevný precipitát a po centrifugaci vzorku byl získán čistý supernatant, 2,3\_PDA se však nepodařilo zderivatizovat a stanovit. Přisuzujeme to nízké rozpustnosti chinolinové kyseliny v používaných činidlech, ačkoliv byly přidávány v malých objemech (Obrázek 18). V prostředí 10% acetonitrilu bylo možné provést derivatizaci; precipitace však byla nedostatečná a zbytkový protein se vysrážel na mezifázovém rozhraní.



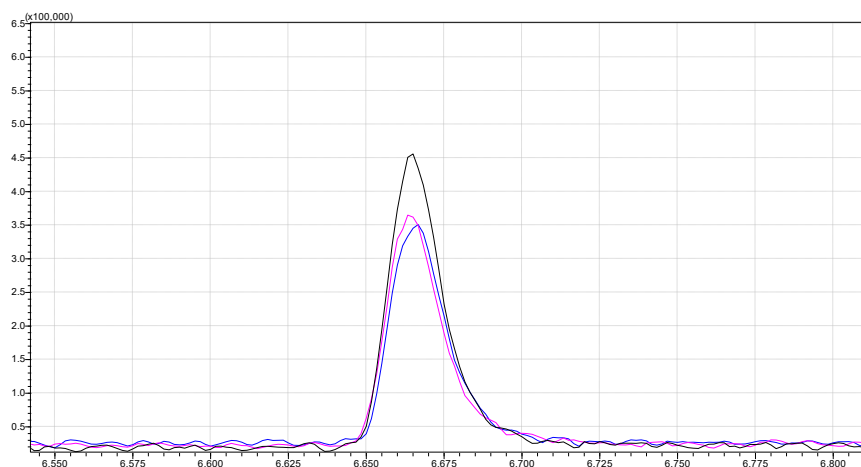
*Obrázek 18 - Porovnání velikosti píku 2,3\_PDA při precipitaci séra 100% ACN (růžově) a 10% ACN (modře) oproti standardu ve vodě (černě)*

Při práci s ACN jsme opakovaně pozorovali následující jev - během vytřepávání derivátů do isooktanu vznikla z organické vrstvy stabilní emulze a se vzorkem nebylo možné dále pracovat. Stejný fenomén popisuje Hušek ve své práci z roku 2012 [15], ačkoliv pro derivatizaci použil odlišnou kombinaci činidel.

Dále jsme zkoušeli precipitovat proteiny varem. Biologický vzorek byl v eppendorfci ponořen do vodní lázně po dobu pěti minut, dokud nevznikla pevná hmota. Ta byla po vychladnutí naředěna vodou a rozrušována pomocí tyčového ultrazvukového sonikátoru (výkon 30%, doba sonikace 1 minuta v nastavení 2 sekundy sonikace + 2 sekundy pauza). Získaná data jsme porovnávali s vodným roztokem chinolinové kyseliny, který byl vystaven stejným fyzikálním podmínkám. Výtěžnost takovýmto precipitačním postupem byla nedostatečná, pohybovala se jen okolo 30 - 50 %.

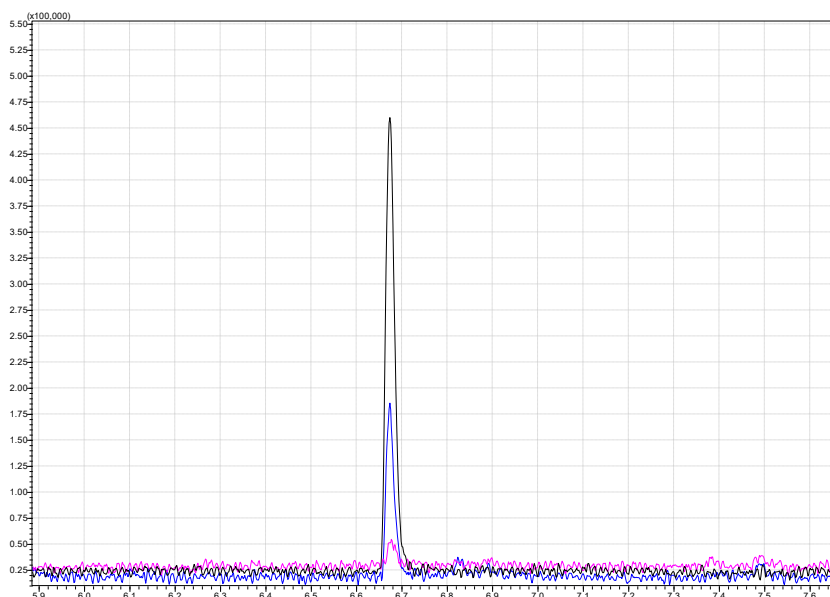
Při práci se silnými kyselinami (sírová, chloristá, trichloroctová) měl získaný supernatant příliš kyselé pH, které bránilo úspěšné derivatizaci. Snaha změnit pH bazickými látkami do neutrální/slabě bazické oblasti nebyla úspěšná. Na vodných standardech jsme však úspěšně ozkoušeli možnost derivatizace při mírně kyselém, neutrálním i mírně bazickém pH (rozsah 3 - 10 podle orientačního měření s využitím indikátorových papírků; Obrázek 19). Rozšířili jsme tak informace z práce Huškovi výzkumné skupiny z roku 2012 [41], ve

keré uvádí potřebu upravit hodnotu pH na 8 - 9 pro zdárnou derivatizační reakci.



*Obrázek 19 - Porovnání derivatizace 2,3\_PDA v prostředí neutrálním (pH 7; černě), kyselém (pH 3; růžově) a bazickém (pH 10; modře)*

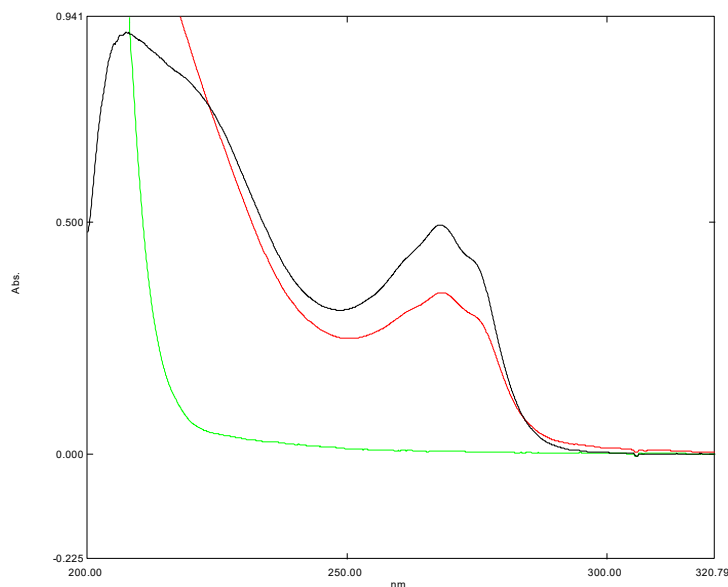
Taktéž jsme provedli sérii experimentů s precipitací proteinů v biologických matricích pomocí vodných roztoků anorganických solí a sice  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$  a  $Na_2WO_4$ . Nejlepších výsledků jsme dosáhli při práci s roztokem síranu zinečnatého. Část  $Zn^{2+}$  iontů, která se pevně nenavázala na proteiny a po stočení zůstala v supernatantu, však výrazně snižovala výtěžnost navazující derivatizační reakce. V prostředí 100 mM  $ZnSO_4$ , který precipitoval výborně a bez viditelných zbytkových proteinů, byla výtěžnost nižší než 10 % (Obrázek 20, růžově). Pokoušeli jsme se problém vyřešit přidáním EDTA (roztok připraven jako zkoumadlo Kyselina edetová R podle Českého lékopisu 2017), se kterou zinečnaté ionty ochotně tvoří ve vodě rozpustné komplexy. Ačkoliv přídavek vedl k vyvázání zinečnatých iontů a zlepšila se výtěžnost derivatizace chinolinové kyseliny (Obrázek 20, modře), v rámci optimalizace množství se nám nepodařilo určit vhodný poměr složek. Výtěžnost reakce ovlivňovaly jak volné zinečnaté ionty, tak nadbytek EDTA. Nadbytek volných zinečnatých iontů se nepodařilo odstranit ani použitím kolonek s iontoměníči.



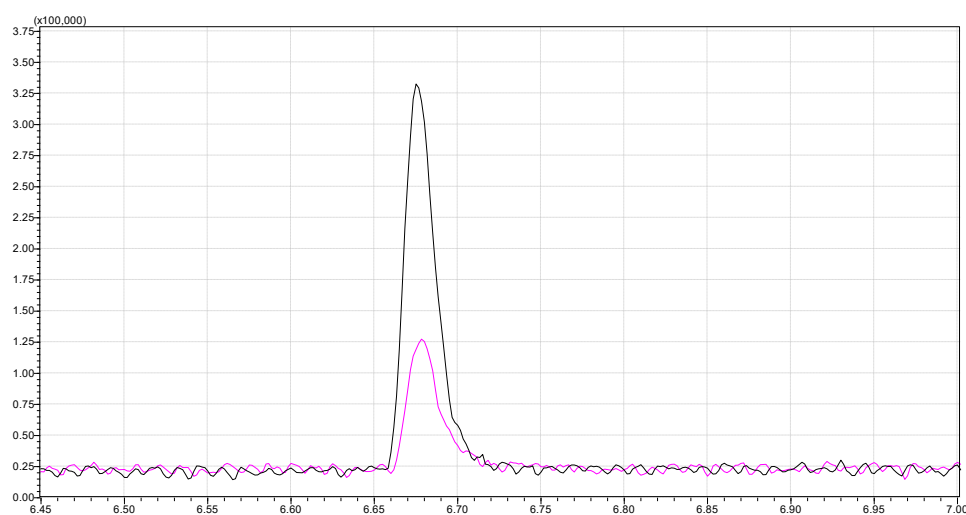
*Obrázek 20 – Porovnání standardu 2,3\_PDA ve vodě (černě), precipitace séra pomocí  $ZnSO_4$  (růžově) a vliv přídavku EDTA (modře) na velikost píku*

Proteiny z biologické matrice jsme se pokusili odstranit pomocí SPE. S ozkoušenými sorbenty z modifikovaného silikagelu náš analyt buďto neinteragoval a v rámci promývacího kroku byl z kolonky vymyt společně s bílkovinami, anebo se ho nepodařilo eluovat činidly umožňujícími následnou derivatizaci.

Dobrou eluční sílu poskytoval 1mM  $NH_4OH$  při předchozím promývání acetonitrilem. Roztoky použité na promytí a eluci byly proměřovány na UV-Vis spektrometru (Obrázek 21 – promývání zelená křivka, eluce červená). Experimentálně jsme na roztoku standardu chinolinové kyseliny v prostředí  $NH_4OH$  ověřili, že derivatizaci směsí HFBCF-HFBOH-ISOO neruší. Přesto byl výsledný pík výrazně menší (Obrázek 22 – standard v bazickém prostředí černě, eluční fáze s SPE růžově).



Obrázek 21 - Spektrometricky proměřený vodný standard 2,3\_PDA (černě), roztok k proplachu (zeleně) a k eluci (červeně)



Obrázek 22 - 2,3\_PDA získaná z SPE (růžově) elucí NH<sub>4</sub>OH v porovnání se standardem 2,3\_PDA v NH<sub>4</sub>OH (černě)

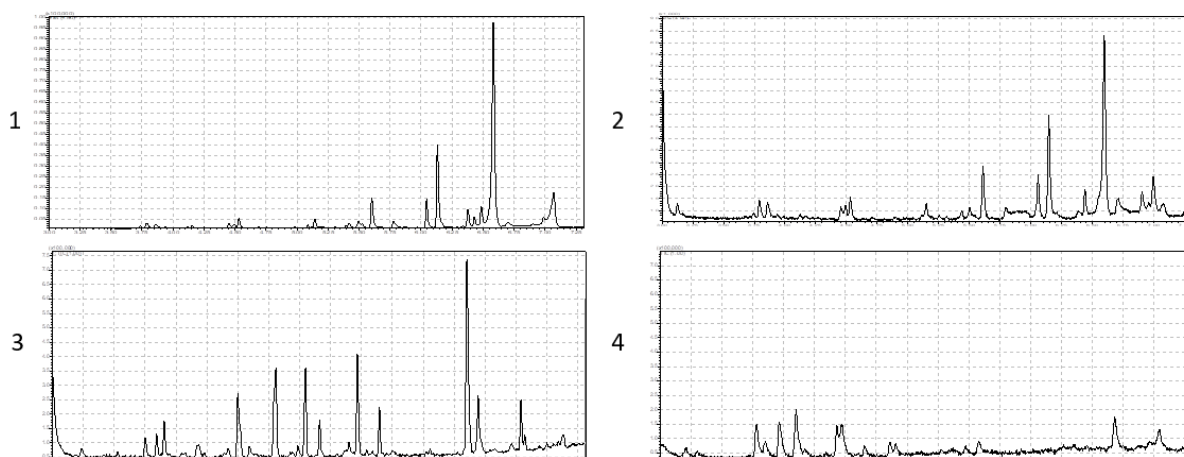
Z doposud získaných poznatků jsme vyvodili, že po ozkoušených precipitačních postupech v soustavě stále zůstává látka, která významnou měrou snižuje výtěžnost reakce. Pokusili jsme se o dodatečné přečištění precipitátů (plasma+ZnSO<sub>4</sub>) pomocí membránových filtrů. Žádný však neposkytoval dostatečné přečištění, případně pro jejich hydrofobní charakter nebylo vůbec možné filtraci provést.

Další metodou, kterou jsme se pokusili odstranit proteiny z biologických vzorků, byla ultrafiltrace. Porovnali jsme účinnost dvou filtrů (Amicon, Microcon); oba

s membránou z modifikované celulózy a shodnou velikostí pórů 30 kDa. Výtěžnost u obou filtrů byla přes 75 %; vyšší u filtru Microcon (Tabulka 5). Na tomto filtru jsme přečistili různé biologické vzorky a média – na Obrázku 23 plasma lidská (1), plasma potkana (2), homogenát placenty (3) a FBS (4).

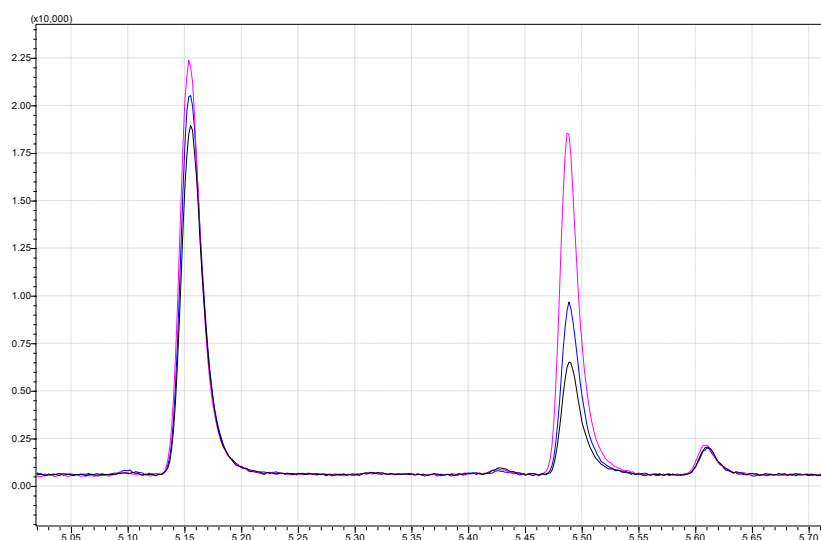
*Tabulka 5 - Výtěžnost 2,3\_PDA a d3\_PDA na filtru Microcon*

	voda		Plasma lidská		Homogenát placenty	
Area 2,3_PDA	17523	100%	15536	<b>88,7 %</b>	14384	<b>82,1 %</b>
Area d3_PDA	12459	100%	10588	<b>85,0 %</b>	9786	<b>78,5 %</b>



*Obrázek 23 – Full scan chromatogramy lidské plasmy (1), potkaní plasmy (2), homogenátu placenty (3) a FBS (4) přečištěné ultrafiltrací*

Pro zlepšení prostupnosti fluorovaných derivátů přes fázové rozmezí jsme provedli sérii experimentů s roztoky tetraalkylamoniových solí (TMAC, TEAI, TPAB a TBAB). U všech ozkoušených došlo ke zvýšení signálu kyseliny chinolinové i kyseliny pyridin-2,4-dikarboxylové, kterou jsme chtěli použít jako potenciální vnitřní standard (Obrázek 24). Při práci s TPAB a TBAB by ve výsledných chromatogramech píky i těchto solí a to s příliš vysokou a rušivou intenzitou. Vybrali jsme proto vodný roztok TEAI a přidávali ho v kroku 1 (kondicionace filtru) a v kroku 2 (příprava biologického vzorku).



*Obrázek 24 - Vliv přídavku TMAC (černě), TEAI (růžově) a TPAB (modře) na velikost píků 2,3\_PDA ( $T_R$  - 5,15 min) a 2,4\_PDA ( $T_R$  - 5,50 min)*

Ultrafiltrace poskytovala dostatečné přečištění biologických vzorků s přídavkem 2,3\_PDA od proteinů. Filtry Microcon úspěšně přečistili sérum, plasmu i placentární homogenát. Výtěžnost byla navíc zvýšena přídavkem roztoku tetraethylamonium jodidu, který nerušil průběh derivatizační reakce. Oproti jiným způsobům úpravy vzorku se derivatizací na fázovém rozhraní voda-isooktan dodatečně nevysrážely proteiny a odběr organické vrstvy tak nebyl zkomplikován.

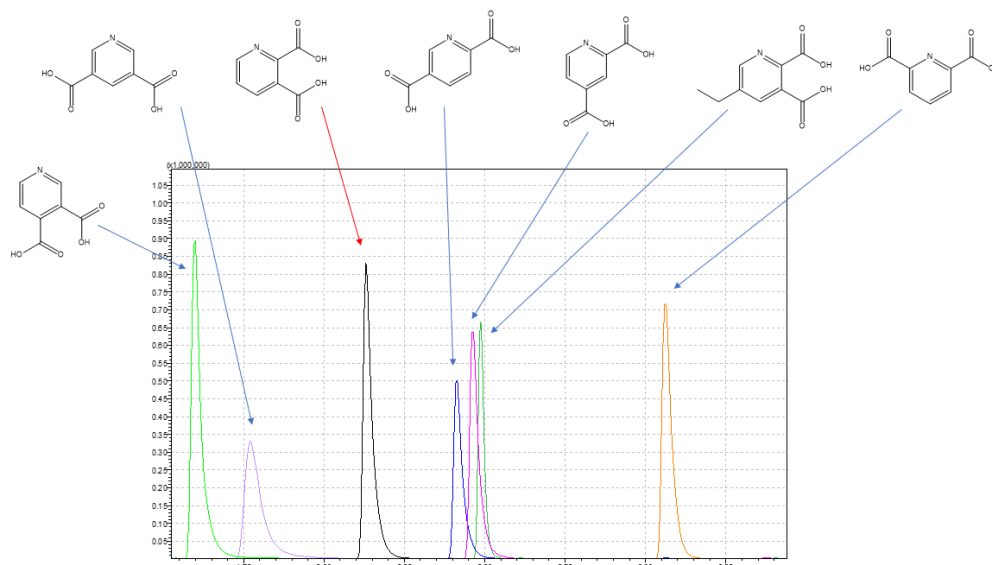
Usuzujeme, že látkou, která v jiných precipitačních postupech snižovala výtěžnost chinolinové kyseliny, byl protein o molekulové hmotnosti větší než 30 000 Da (velikost pórů v membráně).

## 5.4 Metoda kvantifikace

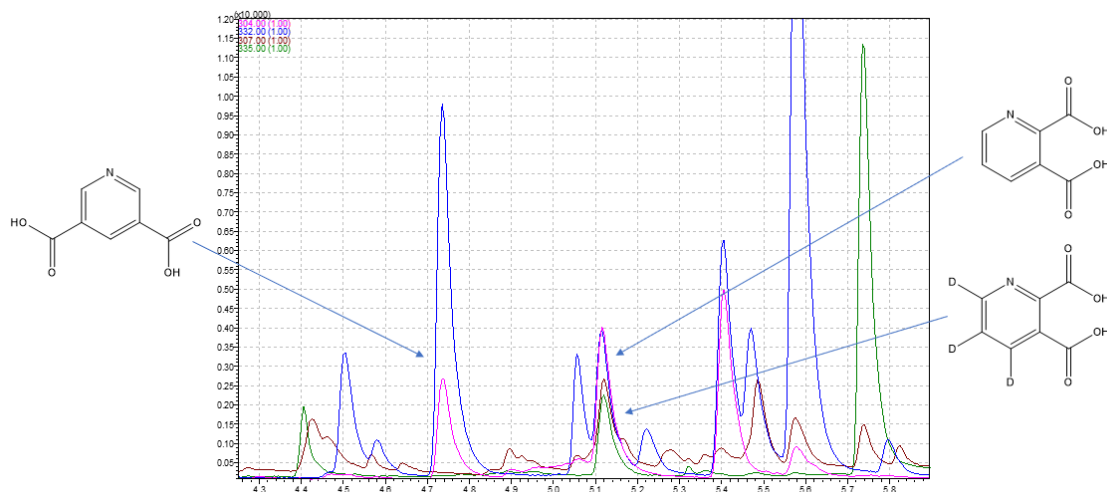
V rámci vývoje metody byl hledán vhodný vnitřní standard a způsob kvantifikace. Prvními měřeními reálných vzorků se ukázalo, že koncentrace chinolinové kyseliny se bude pohybovat ve velmi nízkých hladinách (řádově jednotky ng).

Podle doporučení z práce Thakare [40] jsme zvolili kombinaci vnitřního standardu a náhradního analytu. Jako náhradní analyt jsme zvolili komerčně dostupnou izotopicky značenou obdobu 2,3\_PDA – kyselinu 4,5,6-*trideuterido*-pyridin-2,3-dikarboxylovou. Pro přesnější kvantifikaci jsme hledali ještě další vnitřní standard exogenního charakteru. Porovnali jsme retenční chování

různých polohových izomerů kyseliny pyridindikarboxylové (2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-, 3,5-) a 5-ethylpyridin-2,3-dikarboxylové kyseliny (Obrázek 25). Na základě získaných dat jsme jako vnitřní standard zvolili kyselinu pyridin-3,5-dikarboxylovou. Výsledný záznam z měření vzorku média DMEM s přidáními analyty v SIM módu je na Obrázku 26.



Obrázek 25 - Porovnání retenčních časů 2,3\_PDA (červená šipka) a možných vnitřních standardů (modré šipky)



Obrázek 26 – Záznam vybraných m/z (304, 307, 332, 335) z měření DMEM s přidávkem 3,5\_PDA, 2,3\_PDA a d3\_PDA



## 5.5 Opakovatelnost přípravy

Byla připravena série tří vzorků 2,3\_PDA ve vodném prostředí včetně kroku zakoncentrování a získané hodnoty posloužily pro určení opakovatelnosti přípravy (Tabulka 6). Výslednou hodnotu směrodatné odchylky při vícekrokové derivatizaci, řadě pipetování, transferu vzorku a odpařování vnímáme jako velmi uspokojivou.

*Tabulka 6 - Opakovatelnost přípravy*

	2,3_PDA
Area	684285
	646257
	658713
průměr	663085
RSD	15829,68
%	2,39%

## 5.6 Opakovatelnost nástřiku

Do matrice DMEM s proteiny (FBS) byly přidány roztoky standardů 2,3\_PDA, d3\_PDA a 2,4\_PDA. Vzorek byl zpracován podle postupu „Příprava vzorku“ a získané hodnoty posloužily pro určení opakovatelnosti nástřiku. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 7. Výslednou odchylku okolo jednoho procenta hodnotíme jako uspokojivou.

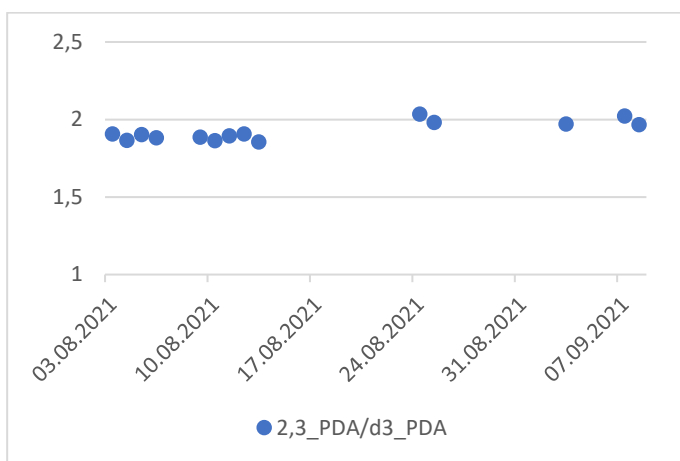
*Tabulka 7 - Opakovatelnost nástřiku*

	2,3_PDA	d3_PDA	2,4_PDA
Area	70827	55448	278354
	70253	54563	275932
	70681	56224	280691
průměr	70587	55412	278326
RSD	243,58	678,59	1942,96
%	0,35%	1,22%	0,70%

## 5.7 Stabilita

V rámci práce byla ověřena stabilita derivatizační a katalytické směsi, vodných zásobních roztoků standardů i zderivatizovaných produktů vytřepaných do isooktanu. Roztoky uchovávané v chladu vykazovaly stabilitu v řádu měsíců. Pro zvýšení stability roztoků standardů jsme je smísili s DMSO v poměru 1:1 a uchovávali při pokojové teplotě. Všechny připravené vzorky vykazovaly dostatečnou stabilitu mezi extrakcí do isooktanu a vlastním změřením (tzv. rack stability).

Po dobu pěti týdnů jsme měřili stabilitu zderivatizované standardů 2,3\_PDA a d3\_PDA. Vzorek byl uchováván při laboratorní teplotě ve vialce pod neporušeným teflonovým septem. Poměr naměřených hodnot byl po celou dobu konstantní (Obrázek 27).



Obrázek 27 – Stabilita 2,3\_PDA a d3\_PDA v izooktanu uchovávaného za laboratorní teploty

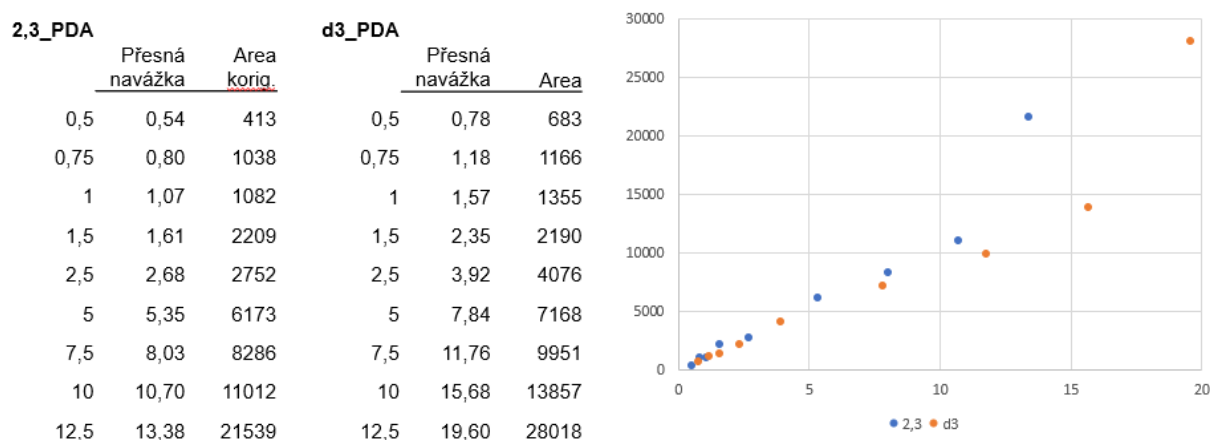
## 5.8 Linearita

Pro ověření linearity metody byla sestrojena kalibrační křivka v médiu DMEM v rozmezí 0,5 - 12,5 ng podle Tabulky 2. Rozmezí bylo určeno na základě měření reálných vzorků dodaných z Katedry farmakologie a toxikologie FaF UK, ve kterých byla očekávána zvýšená hladina chinolinové kyseliny.

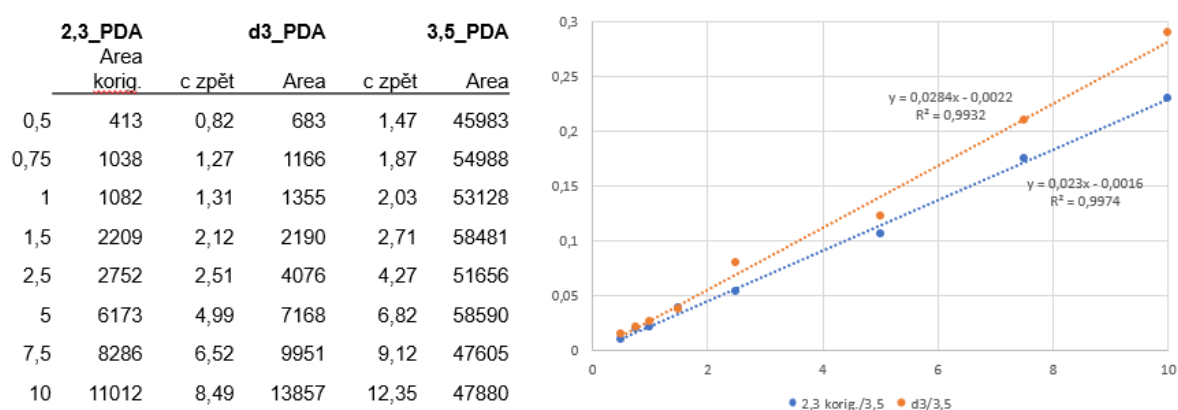
Vzorky byly připraveny z roztoků standardů o přesně známých navážkách – 2,3\_PDA, d3\_PDA a 3,5\_PDA. Množství 3,5\_PDA jakožto vnitřního standardu bylo konstantní – 3,5 ng. Plocha 2,3\_PDA byla korigována u každého kalibračního bodu odečtením velikosti píku v blankovém vzorku. Na základě

přesných navážek byla přepočítána skutečná množství analytů (Obrázek 28). Hodnoty 2,3\_PDA a d3\_PDA byly dány do poměru s vnitřním standardem a ze získaných rovnic byla zpětně vypočítána koncentrace.

U posledního vzorku kalibračního rozmezí (12,5 ng) došlo s největší pravděpodobností při pipetování standardů k chybě. Plocha píku 3,5\_PDA vyšla u tohoto vzorku 3x větší než u všech ostatních a negativně se to projevilo na výsledných kalibračních křivkách. Po odebrání tohoto bodu a zúžení kalibračního rozmezí na rozsah 0,5 - 10,0 ng (8 kalibračních bodů), jsme získali křivky s korelací převyšující 0,99 (Obrázek 29).



Obrázek 28 – Výsledné plochy 2,3\_PDA a d3\_PDA ve vzorcích pro ověření linearitý metody



Obrázek 29 – Kalibrační rozmezí 0,5 - 10,0 ng

## **5.9 Aplikace optimalizovaných podmínek na reálné vzorky**

Součástí experimentů bylo i ověření, v jakých biologických matricích by bylo možné hladiny chinolinové kyseliny v praxi stanovovat. Testovány byly: plasma heparinizovaná, plasma s přídavkem EDTA, sérum a homogenát placenty různých živočišných druhů. Dále laboratorní média: DMEM s přídavkem proteinů a antibiotik, DMEM se zvýšeným obsahem glukózy, fyziologický roztok a roztok hovězího albuminu. Všechny vzorky byly upraveny ultrafiltrací s přídavkem TEAL a následně zderivatizovány v souladu s postupem (4.3 Příprava vzorku). Přečistění bylo ve všech případech uspokojivé a výtěžnost převyšovala 85 %.

## **6 ZÁVĚR**

V rámci této diplomové práce byla vyvinuta GS/MS metoda pro stanovení chinolinové kyseliny v biologických vzorcích a médiích. V rámci derivatizace byla porovnána čtyři různá činidla z řad alkylchloroformiátů. Nejlepší výsledky byly získány při použití směsi 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátu a alkoholu se stejným alkylovým řetězcem. Porovnali jsme citlivost MS detekce při použití elektronové a chemické ionizace a za různých hodnot napětí. Za pomoci informací z odborné literatury jsme k nejintenzivnějším hodnotám  $m/z$  v hmotnostních spektrech přiřadili struktury fragmentů.

Separace analytů byla porovnána na kolonách RTX-5MS a SLB-IL59 s odlišnou polaritou stacionární fáze. Pro měření biologických vzorků jsme vyhodnotili kolonu s náplní z iontové kapaliny SLB-IL59 jako vhodnější, protože s použitým teplotním programem nehrozila koeluce chinolinové kyseliny s jinou endogenní látkou obsaženou v matrici.

V kroku úpravy biologické matrice jsme úspěšně vyřešili komplikace vzájemných inkompatibilit mezi precipitačními činidly a derivatizační reakcí kyseliny chinolinové. Zjistili jsme, že řada běžně používaných precipitačních postupů je nevhodných (methanol, acetonitril, silné anorganické a organické kyseliny) anebo poskytují pouze nízkou a nereprodukovatelnou výtěžnost (precipitace varem s následnou sonikací, použití roztoků anorganických solí, SPE). Jako metodu s vysokou výtěžností vybrali ultrafiltraci. Pracovali jsme s filtry tvořenými celulóзовou membránou s velikostí pórů 30 kDa. Pro zlepšení prostupnosti přes semipermeabilní membránu a mezifázové rozhraní při následné LLE jsme přistoupili k přidavku tetraalkylamoniové soli. Výborné výsledky jsme získali experimenty s TEAL. Výsledná výtěžnost reakce přesáhla 90 %.

Pro potřeby kvantifikace jsme porovnali řadu vnitřních standardů, ze kterých jsme pro výslednou kalibraci zvolili izotopicky značenou 4,5,6-*trideuterido*-pyridin-2,3-dikarboxylovou kyselinu a pyridin-3,5-dikarboxylovou kyselinu. V kalibračním rozmezí 0,5 - 10,0 ng dosáhla optimalizovaná metoda linearity s  $R^2$  převyšujícím 0,99. Používané pracovní roztoky, roztoky standardů i zderivatizované produkty jsou stabilní. Ověřování opakovatelnosti přípravy a nástřiku poskytlo uspokojivá data a nízké hodnoty RSD.

V budoucnu bychom rádi tuto metodu validovali u některé z regulačních autorit a zavedli tak stanovování chinolinové kyseliny v biologické matrici pomocí GC/MS do laboratorní praxe.

## **7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY**



- [1] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměněné vyd., Karolinum, Praha 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [2] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 3., upravené vyd., Pavko, Ostrava 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [3] *Český Lékopis 2017 – 1. díl (Pharmacopoea Bohemica)*. Grada Publishing, Praha 2017. ISBN 978-80-271-0500-7
- [4] pracovní instrukce oddělení QC a DIS společnosti PRO.MED.CS Praha a.s.
- [5] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vyd., Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [6] GROB, Robert L., BARRY, Eugene F. *Modern Practise of Gas Chromatography*. 4. vyd., Wiley, 2004, ISBN 978-0-471-22983-4
- [7] Council of Europe. *European Pharmacopoeia*. Vol. 1. 9<sup>th</sup> Ed., EDQM, Strasbourg 2016. ISBN 978-92-871-8127-5
- [8] KUČERA, R. *Plynová chromatografie v lékopisné analýze*. Farmaceutická analýza II. Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova], [online] [cit. 2019-01-09]. Dostupné z <<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KFCHKL/>>
- [9] Provozní manuály společnosti Shimadzu Corporation k přístroji GCMS-QP2010 Plus
- [10] HOLČAPEK M. *Hmotnostní spektrometrie*. Hmotnostní spektrometrie, Katedra analytické chemie, [Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice], [online] [cit. 2022-01-04]. Dostupné z <[http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska6\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf)>
- [11] NOVÁKOVÁ, L. *Hmotnostní spektrometrie*, Speciální metody instrumentální analýzy, Katedra analytické chemie [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova], [online] [cit. 2018-12-15]. Dostupné z <<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/>>
- [12] SKOOG, Douglas A., WEST, Donald M., HOLLER, James F., CROUCH Stanley R. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.

- [13] Chemické nástroje detektivů – Seriál o detektivní chemii - Korespondenční seminář inspirovaný chemickou tematikou KSICHT. 1999. [online] [Zobrazeno 14.04.2022] Dostupné z <<https://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/detektivni-chemie/2>>
- [14] ŠTĚRBOVÁ P. *Úprava biologického vzorku před HPLC analýzou*, Farmaceutická analýza II, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova], [online] [cit. 2018-11-07]. Dostupné z <<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KFCHKL/>>
- [15] HUŠEK, P. et al. Survey of several methods deproteinizing human plasma before and within the chloroformate-mediated treatment of amino/carboxylic acids quantitated by gas chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, 67–68, 159–162.
- [16] Přehled membránových filtrů Millipore nabízených na e-shopu Merck – Sigma Aldrich [online] [Zobrazeno 18.01.2022] Dostupné z <<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/products/filtration/laboratory-filter-membranes/millipore-filter-membranes>>
- [17] Novinky a trendy v přípravě vzorku – pragolab. 2020. [online] [Zobrazeno 14.04.2022] Dostupné z <[https://www.pragolab.cz/files/udalosti/2020-03/MBa\\_priprava\\_vzorku.pdf](https://www.pragolab.cz/files/udalosti/2020-03/MBa_priprava_vzorku.pdf)>
- [18] Guide to Derivatization Reagents for GC – Bulletin 909A – Supelco. 1997. [online] [Zobrazeno 05.01.2022] Dostupné z <<https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/application::paper.paper/t196909.pdf>>
- [19] HUŠEK, P., ŠIMEK, P. Alkyl Chloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analysis. Review on a Decade Use of the Reagents as Esterifying Agents. *Curr. Pharm. Anal.*, **2006**, 2, 23-43.
- [20] ŘIMNÁČOVÁ, L. et al. A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1339, 154–167.
- [21] HUŠEK, P. Quantitation of Amino Acids as Chlorformates - A Return to Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Libr.*, **2005**, 70, 2–38.

- [22] VINCENTI, M. et al. Application of the novel 5-chloro-2,2,3,3,4,4,5,5-octafluoro-1-pentyl chloroformate derivatizing agent for the direct determination of highly polar water disinfection byproducts. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397, 43–54.
- [23] OPEKAR, S. et al. Mechanism of Alkyl Chloroformate-Mediated Esterification of Carboxylic Acids in Aqueous Media. *J. Org. Chem.*, **2021**, 86 (23), 16293–16299.
- [24] MINERO, C. et al. Determination of trace amounts of highly hydrophilic compounds in water by direct derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **1994**, 350, 403-409.
- [25] HUŠEK, P. Amino acid derivatization and analysis in five minutes. *FEBS Lett.*, **1991**, 2, 354-356.
- [26] HUŠEK, P. Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *J. Chromatogr.*, **1991**, 552, 289–299.
- [27] HUŠEK, P., et al. Gas chromatographic determination of amines, aminoalcohols and acids after treatment with alkyl chloroformates. *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 259, 185–192.
- [28] HUŠEK, P. Capillary GC Analysis of Biogenic Amines, Their Precursors and Catabolites after Fast Derivatization with Ethyl Chloroformate. *J. Microcolumn Sep.*, **1993**, 5, 101–103.
- [29] HUŠEK, P., et al. Simple and rapid procedure for the determination of individual free fatty acids in serum. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 465, 433–439.
- [30] HUŠEK, P. Fast Derivatization and GC Analysis of Phenolic Acids. *Chromatographia*, **1992**, 34, 621–626.
- [31] HUŠEK, P., et al. Smooth Esterification of Di- and Tricarboxylic Acids with Methyl and Ethyl Chloroformates in Gas Chromatographic Profiling of Urinary Acidic Metabolites. *Chromatographia*, **2003**, 58, 623–630.
- [32] HUŠEK, P., et al. Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by in-situ heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1443, 211–232.
- [33] HUANG, Z.-H., et al. Characterization of N-ethoxycarbonyl ethyl esters of amino acids by mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **1993**, 635, 271–281.

- [34] MANCA, A., et al. “One-pot” ethyl chloroformate derivatization and liquid-liquid extraction of reduced glutathione in erythrocyte and its quantitative GC–MS analysis. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2017**, *1070*, 15–22.
- [35] WANG, J., et al. Analysis of amino acids by gas chromatography-flame ionization detection and gas chromatography-mass spectrometry: Simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction. *J. Chromatogr. A*, **1994**, *663*, 71–78.
- [36] ZAHRADNÍČKOVÁ, H., et al. Gas chromatographic analysis of amino acid enantiomers in Carbetocin peptide hydrolysates after fast derivatization with pentafluoropropyl chloroformate. *Amino Acids*, **2008**, *35*, 445–450.
- [37] JONES, B. R., et al. Surrogate matrix and surrogate analyte approaches for definitive quantitation of endogenous biomolecules. *Bioanalysis*, **2012**, *4* (19), 2343–2356.
- [38] Bioanalytical Method Validation – Guidance for Industry – Food and Drug Administration. 2018. [online] [Zobrazeno 27.09.2021] Dostupné z <<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>>
- [39] Guideline on bioanalytical method validation – European Medicines Agency. 2011. [online] [Zobrazeno 27.09.2021] Dostupné z <[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)>
- [40] THAKARE, R., et al. Quantitative analysis of endogenous compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, *128*, 426–437.
- [41] ŠIMEK, P., et al. Heptafluorobutyl chloroformate-based sample preparation protocol for chiral and nonchiral amino acid analysis by gas chromatography. *Methods in Molecular Biology*, **2012**, *828*, 137–152.

## **8 SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 - Schéma plynového chromatografu; převzato z [2]

Obrázek 2 - Schéma hmotnostního spektrometru

Obrázek 3 - Schéma kvadrupólového analyzátoru; převzato z [13]

Obrázek 4 - Schéma trojitého kvadrupólu

Obrázek 5 - Postup SPE; převzato z [17]

Obrázek 6 – Esterifikace karboxylové kyseliny pomocí chloroformiátu

Obrázek 7 - Výsledné produkty derivatizace 2,3\_PDA s MeCF (1), EtCF (2), iBCF (3) a HFBCF (4)

Obrázek 8 - Hmotnostní spektrum 2,3\_PDA\_HFBCF při aplikaci EI; fragmentace v molekule vyznačeny červeně

Obrázek 9 - Optimalizace teplotního programu

Obrázek 10 - Porovnání separace analytů v séru na koloně RTX-5MS (nahore) a SLB-IL59 (dole)

Obrázek 11 - Měření homogenátu placenty (černě) a 2,3\_PDA (růžově) na koloně RTX-5MS

Obrázek 12 - Měření homogenátu placenty (černě) a 2,3\_PDA (růžově) na koloně SLB-IL59

Obrázek 13 - High pressure nástřík

Obrázek 14 - Vliv velikosti nástříku na tvar píků 2,3\_PDA a ostatních metabolitů

Obrázek 15 – Hmotnostní spektrum 2,3\_PDA\_HFBCF při aplikaci NCI; fragmentace v molekule vyznačena červeně

Obrázek 16 - Porovnání odezvy 2,3\_PDA při ionizaci EI (černě) a NCI (růžově)

Obrázek 17 - Vliv rostoucího napětí na pík 2,3\_PDA\_HFBCF (0,00 kV černě, 0,05 kV růžově, 0,10 kV modře)

Obrázek 18 - Porovnání velikosti píku 2,3\_PDA při precipitaci séra 100% ACN (růžově) a 10% ACN (modře) oproti standardu ve vodě (černě)

Obrázek 19 - Porovnání derivatizace 2,3\_PDA v prostředí neutrálním (pH 7; černě), kyselém (pH 3; růžově) a bazickém (pH 10; modře)

Obrázek 20 – Porovnání standardu 2,3\_PDA ve vodě (černě), precipitace séra pomocí ZnSO<sub>4</sub> (růžově) a vliv přídavku EDTA (modře) na velikost píku

Obrázek 21 - Spektrometricky proměřený vodný standard 2,3\_PDA (černě), roztok k proplachu (zeleně) a k eluci (červeně)

Obrázek 22 - 2,3\_PDA získaná z SPE (růžově) elucí NH<sub>4</sub>OH v porovnání se standardem 2,3\_PDA v NH<sub>4</sub>OH (černě)

Obrázek 23 – Full scan chromatogramy lidské plasmy (1), potkaní plasmy (2), homogenátu placenty (3) a FBS (4) přečištěné ultrafiltrací

Obrázek 24 - Vliv přídavku TMAC (černě), TEAI (růžově) a TPAB (modře) na velikost píků 2,3\_PDA ( $T_R$  - 5,15 min) a 2,4\_PDA ( $T_R$  - 5,50 min)

Obrázek 25 - Porovnání retenčních časů 2,3\_PDA (červená šipka) a možných vnitřních standardů (modré šipky)

Obrázek 26 – Záznam vybraných m/z (304, 307, 332, 335) z měření DMEM s přídavkem 3,5\_PDA, 2,3\_PDA a d3\_PDA

Obrázek 27 – Stabilita 2,3\_PDA a d3\_PDA v izooktanu uchovávaného za laboratorní teploty

Obrázek 28 – Výsledné plochy 2,3\_PDA a d3\_PDA ve vzorcích pro ověření linearity metody

Obrázek 29 – Kalibrační rozmezí 0,5 - 10,0 ng

## **9 SEZNAM TABULEK**



Tabulka 1 - Zbytkové množství proteinů, cholesterolu a triacylglycerolů v supernatantu při použití různých precipitačních činidel; převzato a přeloženo z [15]

Tabulka 2 - Příprava vzorků pro ověření linearity; objemy jsou uvedeny v  $\mu\text{l}$

Tabulka 3 - Nastavení parametrů GC/MS

Tabulka 4 - Postup derivatizační reakce

Tabulka 5 - Výtěžnost 2,3\_PDA a d3\_PDA na filtru Microcon

Tabulka 6 - Opakovatelnost přípravy

Tabulka 7 - Opakovatelnost nástřiku