

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE V ANALÝZE
BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU PRO KLINICKÝ VÝZKUM**

Disertační práce

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

Hradec Králové 2023

Mgr. Dorota Turoňová

Poděkování

Velké poděkování patří mé školitelce doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. za odborné vedení, veškeré cenné a podnětné rady a připomínky, za obrovskou trpělivost, podporu a pomoc po celou dobu studia a to nejen při experimentální práci v laboratoři, ale zejména pak při sepisování odborných výstupů a především na konci studia při sepisování této disertační práce. Děkuji i za přátelský přístup. Moc si cením jejího pozitivního náhledu na situaci a rovněž i motivace v časech, kdy výsledky experimentální práce nebyly tak příznivé a má motivace se zdála být v nedohlednu. Velmi si vážím i zapojení do řady grantových projektů, díky kterým jsem mohla získat mnoho cenných zkušeností a inspirace pro další práci.

Děkuji také prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr.h.c. za možnost pracovat ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové a možnost spolupracovat na mnoha výzkumných projektech. Nesmírně si vážím spolupráce s prof. MUDr. Bohuslavem Melicharem, Ph.D, který mi umožnil podílet se na výzkumu ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Olomouc, ale i spolupráce s doc. MUDr. Milanem Vošmikem, Ph.D. a Klinikou onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Ráda bych rovněž poděkovala celému kolektivu Katedry analytické chemie za příjemné pracovní prostředí i milý přístup, za získané pedagogické zkušenosti, za možnost zúčastnění se řady domácích i zahraničních konferencí a kurzů a získat tak nové znalosti i další motivaci k práci, ale i za možnost odborné zahraniční stáže. Obzvláště bych pak chtěla poděkovat celému kolektivu Výzkumné laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK. Především děkuji RNDr. Lence Javorské, Ph.D. a PharmDr. Kateřině Matoušové, Ph.D. za jejich vysvětlení všech potřebných postupů spjatých s chodem laboratoře, zaučení s přístrojovou technikou, veškerou pomoc, ale i za cenné rady a připomínky k experimentální práci v laboratoři či při psaní odborných publikací, když jsem si už nevěděla rady. Děkuji za vytvoření přátelského prostředí v laboratoři a za veškerou podporu, ale také za prima chvíle, které jsme strávily i mimo práci, rovněž i Mgr. Andree Vernerové, Ph.D., PharmDr. Kristýně Mrštné a Msc. Chaweewan Suwanvecho. Díky patří i Ivetě Svobodové a Filipovi Hátlemu za ochotu pomoci a poradit. Navíc bych chtěla poděkovat PharmDr. Kristýně Mrštné i za její optimistický přístup a nadšení, díky němuž jsem se mohla stát spoluřešitelkou studentského grantu GAUK. Moreover, special thanks go also to Msc. Chaweewan Suwanvecho for all her support and help especially during the final part of finishing the degree.

I would like to thank also to Assoc. Prof. Laura Mercolini for the opportunity to become a part of her research group of Pharmaco-Toxicological Analysis (PTA Lab) at the Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum - University of Bologna, Italy, as a visiting researcher during the doctoral stay abroad and get the knowledge on microsampling applications in bioanalysis. Thanks go to all of the research group for their kind attitude, but especially I would like to thank Marco Cirrincione, PhD a Michele Protti, PhD for all their patience, help, and advice.

During that stay, I was very lucky with all the friends who I gained there. Big thanks thus go to our Bologna family and also to Christian for their kindness and support. I am very grateful for all my friends who encouraged me to study PhD and believed in me throughout the long journey.

Největší díky ovšem patří celé rodině a zejména pak té nejúžasnější mamince za její nesmírnou oporu, motivaci a trpělivost během celého mého studia.

Vznik této disertační práce by nebyl možný bez významné podpory Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 662). Poděkování patří i všem grantovým projektům, které podporovaly mou práci během studia, prezentaci výsledků na konferencích i mou stáž v zahraničí: AZV MZ ČR 18-03-00130, NU21J-02-00021 a NU22-A-108, dále i MH CZ-DRO (UHHK, 00179906), GAUK 215016 i programu mobility Erasmus+ (3014521).

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. 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 19.7. 2023

.....
Dorota Turoňová

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Dorota Turoňová

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

Název disertační práce: Využití kapalinové chromatografie v analýze biologického materiálu pro klinický výzkum

Disertační práce je zaměřená na využití kapalinové chromatografie pro klinický výzkum. Je rozdělená na dva hlavní oddíly, Teoretickou část a Komentáře k vybraným publikovaným pracím.

V teoretické části je popsáno použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie v praxi. Jsou zde diskutovány klíčové parametry pro vývoj LC metody a trendy současné bioanalytické praxe. Dále je vysvětlen odběr a úprava vzorků různých biologických matric, včetně všech překážek a nástrah, které je třeba zohlednit. Stručně jsou rovněž zmíněny moderní trendy. Součástí kapitoly o úpravě vzorků je také část věnovaná derivatizaci a její využití v analýze platinových derivátů, která souvisí s komentářem k publikované práci.

Hlavní část práce se zabývá komentářem ke čtyřem vybraným publikovaným pracím. První prezentuje přehledový článek zabývající se použitím mikroextrakce v pipetovacích špičkách v klinické a forenzní toxikologii. Jsou zde diskutovány výhody a nevýhody jednotlivých aplikací s důrazem na jejich praktičnost a možnost uplatnění v praxi. Druhou a nejvíce diskutovanou je práce zabývající se použitím HPLC pro stanovení platinových léčiv v různých druzích biologických matric po derivatizaci diethyldithiokarbamátem a jeho vhodnost pro použití v rutinní praxi. Pozornost je především věnována výskytu různých matricových efektů a tím i ovlivnění robustnosti metody. Cílem bylo vyvinout jednoduchý, levný a složitou instrumentaci nevyžadující přístup pro použití v rutinní praxi. Třetí a čtvrtý komentář se zaměřuje na biomedicínské práce, které se zabývají potenciálem využití markerů aktivace imunitní odpovědi pro predikci odpovědi organismu postiženého nádorovým onemocněním na léčbu imunoterapií a vývoje onemocnění a pro zvládnutí léčby COVID-19. Ty vznikly za

Abstrakt

spolupráce s ostatními pracovišti Fakultní nemocnice Hradec Králové a Fakultní nemocnice Olomouc.

V závěru disertační práce je vložen rovněž přehled publikací i dalších výstupů.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Dorota Turoňová

Supervisor: Assoc.prof. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Title of doctoral thesis: Application of liquid chromatography in the analysis of biological material for clinical research

The dissertation focuses on the use of liquid chromatography for clinical research. It is divided into two main sections, Theoretical part and Commentary on selected published articles.

The theoretical part describes the application of high-performance liquid chromatography in practice. Key parameters for the development of LC methods and trends in current bioanalytical practice are discussed. Furthermore, the sample collection and preparation of different biological matrices is explained, including all the obstacles and pitfalls that need to be taken into account. Modern trends are also briefly mentioned. The chapter on sample preparation also includes a section on derivatization and its use in the analysis of platinum derivatives, which is related to the commentary on the published work.

The main part of the thesis deals with commentary on four published articles. The first presents a review article dealing with the use of microextraction in pipette tips in clinical and forensic toxicology. The advantages and disadvantages of each application are discussed with emphasis on its practicality and applicability. The second and most discussed is a paper dealing with the use of HPLC for the determination of platinum drugs in various types of biological matrices after derivatization with diethyldithiocarbamate and its suitability for use in routine practice. Attention is mainly paid to the occurrence of various matrix effects and thus affecting the robustness of the method. The aim was to develop a simple, inexpensive and demanding instrumentation-free approach for use in routine practice. The third and fourth commentaries focus on biomedical papers that address the potential of using markers of immune response activation to predict the response of the cancer-affected organism to immunotherapy treatment and disease progression, and to manage the treatment of

Abstract

COVID-19. These were developed in collaboration with other departments of the University Hospital Hradec Králové and the University Hospital Olomouc.

A list of publications and other outputs is also included at the end of the dissertation.

Obsah

Obsah	11
Seznam zkratk	15
1. Úvod	19
2. Cíl práce	21
3. Teoretická část	23
3.1. HPLC v klinické praxi	23
3.1.1. Postavení chromatografie vůči ostatním metodám v klinické praxi	23
3.1.2. Klíčové parametry metody pro praxi	25
3.1.2.1. Rychlost analýzy	26
3.1.2.2. Selektivita, senzitivita	28
3.1.3. Faktory ovlivňující výsledek analýzy biologického materiálu	32
3.1.3.1. Preamalytické vlivy	32
3.1.3.2. Důležité faktory ovlivňující analytickou fázi procesu	35
3.2. Odběr vzorku v bioanalýze	40
3.2.1. Konvenční odběr vzorku	40
3.2.1.1. Plná krev, plasma, sérum	41
3.2.1.2. Moč	42
3.2.1.3. Peritoneální laváž	43
3.2.2. Microsampling – Metoda suché kapky krve	44
3.3. Úprava vzorku před chromatografickou analýzou	47
3.3.1. Základní techniky úpravy vzorku	47
3.3.1.1. Ředění	47
3.3.1.2. Srážení proteinů	48
3.3.1.3. Filtrace	48
3.3.1.4. Centrifugace	50
3.3.1.5. Extrakce z kapaliny do kapaliny	50
3.3.1.6. Extrakce na tuhou fázi	51
3.3.2. Moderní trendy v úpravě vzorku	52
3.3.2.1. Mikroextrakce	52
3.3.2.2. Úprava vzorku suché kapky krve	54
3.3.3. Derivatizace	54
3.3.3.1. Úvod do problematiky derivatizace	54
3.3.3.2. Derivatizace a stanovení platiny v bioanalýze – přehled	56
4. Komentáře k publikovaným výstupům	61

4.1. Rešeršní práce: Využití mikroextrakce v pipetovacích špičkách v klinické a forenzní toxikologii	61
4.1.1. Úvod	61
4.1.2. μ -SPE-PT a DPX	61
4.1.3. Aplikace mikroextrakčních špiček v klinické a forenzní toxikologii	62
4.1.4. Závěr	62
4.2. Použití HPLC pro stanovení platinových léčiv v biologických matricích po derivatizaci diethyldithiokarbamátem	65
4.2.1. Úvod a cíl	65
4.2.2. Výsledky a diskuze	66
4.2.2.1. Vzorky matric	66
4.2.2.2. Úprava vzorku před analýzou	66
4.2.2.3. Chromatografické podmínky	67
4.2.2.4. Vývoj úpravy vzorku pro jednotlivé biologické matrice	68
4.2.2.5. Aplikace metody	73
4.2.3. Závěr	75
4.3. Biomarkery zánětu a progresu během imunoterapie u pacientů s metastatickým renálním karcinomem	77
4.3.1. Úvod a cíl	77
4.3.2. Výsledky a diskuze	78
4.3.3. Závěr	79
4.4. Neopterin a kynurenin v séru a moči jako prognostické biomarkery u hospitalizovaných pacientů s variantou delta a omicron infekce SARS-CoV-2	81
4.4.1. Úvod a cíl	81
4.4.2. Metodika	82
4.4.3. Výsledky a diskuze	83
4.4.4. Závěr	84
5. Závěr	85
6. Seznam použité literatury	87
7. Přehled publikovaných výstupů	109
8. Přehled ostatních výstupů	111
8.1. Přednášky	111
8.2. Plakátová sdělení	112
8.3. Grantové projekty	114
8.4. Stáž	115

9. Přílohy	
9.1. Příloha 1	117
9.2. Příloha 2	135
9.3. Příloha 3	177
9.4. Příloha 4	185

Seznam zkratek

μ-SPE-PT	mikroextrakce pomocí plněných pipetovacích špiček (micro-solid-phase extraction pipette tips)
BMI	index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
CFS	škála klinické křehkosti (Clinical Frailty Scale)
CRP	C-reaktivní protein
CT	prahový cyklus polymerázové řetězové reakce (cycle threshold values)
DBS	metoda suché kapky krve (dried blood spot)
DDTC	diethyldithiokarbamát (diethyldithiocarbamate)
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid-liquid microextraction)
DPX	disperzní mikroextrakční špičky (dispersive micro-solid-phase extraction pipette tips)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
FDA	Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FLD	fluorescenční detekce
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HF LPME	extrakce v kapalně fázi za použití dutého vlákna (hollow-fibre liquid-phase microextraction)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

ICI	Inhibitory kontrolních bodů imunity (immune checkpoint inhibitors)
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem (inductively coupled mass spektrometry)
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci (International Conference on Harmonisation)
K ₃ EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction)
LLME	mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid microextraction)
LLOQ	dolní mez krantifikace (lower limit of quantitation)
MEPS	mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (microextraction by packed sorbent)
mRCC	metastatický karcinom ledviny (metastatic renal cell carcinoma)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
PDA/DAD	detekce s diodovým polem (photodiode array detection, diode-array detection)
PFP/F5	pentafluorfenylové fáze
POCT	testování u lůžka pacienta (point of care testing)
PUF	plasmatický ultrafiltrát (plasma ultrafiltrate)
RCF	relativní odstředivá síla (rotation centrifugation force)
SBSE	sorpční extrakce míchadlem (stir bar sorptive extraction)
SDME	extrakce do jediné kapky rozpouštědla (single-drop microextraction)
SPE	extrakce na tuhou fázi (solid-phase extraction)
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi (solid-phase microextraction)

TDM	terapeutické monitorování léčiv (therapeutic drug monitoring)
TFME	mikroextrakce pomocí tenké vrstvy (thin-film microextraction)
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
ULOQ	horní mez stanovitelnosti (upper limit of quantitation)
UV	ultrafialová oblast (ultraviolet)

1. ÚVOD

Jedním z hlavních cílů v bioanalýze je stanovení exogenních či endogenních látek, případně jejich metabolitů, se snahou získat více informací o molekulární úrovni různých onemocnění. Kvalitativní a/nebo kvantitativní změny hladin biomarkerů jsou často nedílnou součástí diagnostiky, monitoringu terapie a zjištění prognózy celé řady onemocnění. Biologický materiál je také využíván pro terapeutické sledování lékových hladin s hlavním cílem optimalizace terapie se snahou minimalizovat vedlejší účinky. Jedním ze směrů je také toxikologická analýza, která je zcela nezbytná po identifikaci a následnou léčbu otrav, ale rovněž významná pro forenzní účely. Je odhadováno, že zhruba 60-70 % všech rozhodnutí týkajících se vytvoření diagnózy pacienta, výběru vhodné léčby a sledování její efektivity je založeno na výsledcích laboratorních testů.

Jednou z moderních separačních technik využívaných v bioanalýze je kapalinová chromatografie. Její hlavní výhodou je univerzálnost, krátká doba analýzy, citlivost (dle zvoleného způsobu detekce) a hlavně možnost stanovení celé řady látek různých fyzikálně chemických vlastností během jedné analýzy. Jednou z klíčových a nejnáročnější částí využití této techniky v bioanalýze je úprava vzorku. Při práci s různými druhy biologického materiálu je chromatografista často nucen vynaložit větší úsilí pro vývoj extrakčního procesu než při tvorbě samotné metody pro analýzu. V rámci klinické praxe musíme vzít v potaz aspekty jako je nedostatek matrice v rámci jednoho odběru, velké série vzorků, co nejkratší turnaround time a samozřejmě dostatečná citlivost a selektivita pro daný analyt. Jedním z nových směrů v preanalytické fázi je v posledních letech miniaturizace, snižování množství rozpouštědel, ale zejména vzorku, zabezpečující větší komfort pacienta, dále automatizace celých postupů zejména z důvodů eliminace chyb vzniklých díky lidskému faktoru a také zvýšení kapacity laboratoře pro zpracování vzorků. Kvůli narůstající potřebě zvyšování efektivity laboratorního procesu, dochází i k modernizaci laboratorní instrumentace. Kapalinová chromatografie spolu s moderními preanalytickými postupy proto stále více proniká nejen do klinického výzkumu, ale i do rutinní laboratorní praxe.

2. CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části disertační práce bylo shrnout význam kapalinové chromatografie v klinické praxi, požadavky na metody a parametry, které mají přímý vliv na výslednou metodiku. Dále zhodnotit preanalytické i analytické faktory, které ovlivňují výsledek analýzy biologického materiálu. Následně je popsán způsob odběru a úpravy vzorku pro bioanalytické účely, který je běžně používán v rutinních laboratořích s krátkým přehledem nových trendů v dané oblasti. V kapitole zabývající se úpravou vzorku je také část věnována derivatizaci a její využití v analýze platinových derivátů.

Jedním z cílů je shrnout dříve publikované informace týkající se úpravy vzorku biologického materiálu s využitím mikroextrakce v pipetovacích špičkách, a to z pohledu důležitosti přepracování tradičních pro praxi nevýhodných extrakčních postupů, seznámit se s principy extrakce, poukázat na jejich výhody a nevýhody s praktickým hodnocením aplikací pro možné uplatnění v rutinních laboratořích.

Hlavním cílem experimentální práce bylo vyvinout a optimalizovat metodiku pro stanovení platinových chemoterapeutik v různých biologických materiálech, aby bylo možné zhodnotit jejich hladiny u pacientů léčených těmito preparáty. Hlavním úsilím bylo vyvinout jednoduchou, rychlou a finančně i instrumentálně nenáročnou metodu, která by byla vhodná pro zpracování většího počtu vzorků za použití kapalinové chromatografie. Výsledkem této práce by mělo být posouzení vhodnosti použití předkolonové derivatizace s diethyldithiokarbamátem, aplikované na komplexní matrice, aniž by matricové efekty ovlivnily správnost výsledků.

Zavedené bioanalytické metody ve Výzkumné laboratoři ÚKBD byly uplatněny pro klinické studie FNHK. Jedním z cílů bylo zjištění potenciálu nových biomarkerů pro zlepšení laboratorní diagnostiky a následně i péče o pacienty s některými závažnými onemocněními.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. HPLC v klinické praxi

3.1.1. Postavení chromatografie vůči ostatním metodám v klinické praxi

Klinické laboratoře v současné době využívají několik základních technik pro analýzu většiny látek pro rutinní praxi. Mezi tyto přístupy řadíme atomovou a molekulární absorpční spektrometrii, kompetitivní a sendvičovou imunoanalýzu, imunonefelometrii, elektrochemické metody zahrnující potenciometrii a amperometrii a další. Z oblasti separačních technik je také využívána elektroforéza a chromatografie [1–3].

Často využívané metody založené na spektrofotometrii a elektrochemii disponují uspokojivou selektivitou a sensitivitou pro danou aplikaci. Jelikož jsou tyto techniky většinou velmi levné, plně automatizované a dosahují spolehlivých výsledků, není nutné je nahradit náročnějšími přístupy i když poskytují vyšší citlivost a selektivitu [4]. V rutinní laboratorní praxi jsou využívány zejména metody imunoanalýzy založené na komerčně dostupných kitech. Hlavním limitujícím faktorem je možná reakce s interferujícími látkami podobné struktury zkreslující výsledek analýzy, a to zejména v případě nezařazení úpravy vzorku před analýzou. Problematické se jeví i stanovení analytů o nízkých hladinách [5]. Dalším velmi důležitým aspektem zejména imunoanalýzy je její citlivost na složení použitých chemikálií. Složení reagenčních látek komerčně dostupných kitů se mezi jednotlivými sadami může lišit a je tak zdrojem odlišnosti výsledků vydaných mezi různými laboratořemi. Proto je doporučováno provádět imunuanalytické analýzy pouze v rámci stejné laboratoře [3]. Vzhledem ekonomické stránce, imunoanalýza se svými náklady vyrovná stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), jelikož je nutné počítat i se stanovením v dubletu a náklady na kalibraci. Imunoanalýza je tedy vhodnější jako test pro skupiny látek např. v rámci screeningu v toxikologické analýze v kombinaci s následnou selektivní chromatografickou analýzou pro confirmaci [1, 2]. Jednotlivé techniky, které jsou pro účely screeningu používány v rutinních laboratořích je možné mezi sebou porovnat v tabulce (Tab. 1) [6].

Tab. 1 Srovnání dostupných screeningových metod v klinických laboratořích (převzato a upraveno z [6])

(LC-DAD, kapalinová chromatografie ve spojení s detektorem s diodovým polem; GC-MS, plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí; LC-MS(/MS), kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí nebo tandemovou hmotnostní detekcí; UV, ultrafialová oblast)

Metoda	Výhody	Nevýhody	Poznámky
LC-DAD	Uživatelsky přístupná Komerčně dostupné kity	Limitovaná selektivita (UV) a senzitivita	Limitováno pro látky schopné UV absorpce (případně zařazení derivatizace)
GC-MS	Senzitivní Selektivní Dostupné knihovny spekter	Často nutná derivatizace, nevhodná pro velké molekuly	Off-line úprava vzorku, headspace GC Vhodné pro nepolární, termostabilní látky, pro látky s nízkou molekulární hmotností
Imunoanalýza	Senzitivní (?) Rychlá analýza Velká prostupnost vzorků Uživatelsky přístupná	Limitovaná specifita Drahé reagentie (většinou na jeden analyt)	V toxikologii pouze dostupné pro malý počet skupin analytů (benzodiazepiny, opiáty, kanabinoidy, amfetaminy,...)
LC-MS(/MS)	Senzitivní Selektivní Není nutná derivatizace Pro široké spektrum analytů	Nedostupná spektra analytů Matricové efekty	Off-line i on-line úprava vzorku Vhodné pro látky s vysokou molekulární hmotností, pro netěkavé látky a termolabilní látky

Kapalinová chromatografie (LC) je sice v dnešní době již rutinně zastoupenou technikou, ale stále ne tak rozšířenou jako automatizované optické techniky či finančně náročný provoz, ale i požadavky na zkušeného operátora [3, 7, 8]. Z hlediska nutnosti použití vysoce citlivých a specifických metod je klíčová především oblast monitorování lékových hladin, klinická a forenzní toxikologie, imunologie, dále také stanovení biomarkerů, metabolomika, lipidomika a další odvětví klinické bioanalýzy [1, 4].

Jedním z řešení pro implementaci LC do rutinní klinické praxe je rozšíření nabídky komerčně dostupných LC kitů (např. [9–11]) obsahujících potřebné chemikálie, stacionární fázi, často i spotřební materiál potřebný pro úpravu vzorku a instrukce které umožňují jednoduché zavedení „metody na klíč“ pro rutinní použití bez jejího předešlého složitého vývoje a komplexní validace (Obr. 1). Bohužel nevýhodou těchto souprav je značná finanční náročnost, která se ještě navyšuje v případě neúplného využití spektra nabízených analytů v rámci jednoho kitu.



Obr. 1 LC-MS kit pro diagnostiku steroidů (Biocrates inc., Aliso Viejo, CA, USA) [9]

3.1.2. Klíčové parametry metody pro praxi

Při vývoji nové metody, která by měla být využita pro klinickou praxi, je nutno brát v potaz celou řadu klíčových okolností, které podstatně ovlivňují její budoucí využití. Jedná se zejména o rychlou a spolehlivou kvantifikaci sledovaných analytů, dostatečnou citlivost, kalibrační rozsah (LLOQ a ULOQ) a v neposlední řadě finanční,

manuální a přístrojovou nenáročnost. Nově zavedená metoda by měla splňovat doporučení validačních norem i externí a interní kontroly kvality.

3.1.2.1. Rychlost analýzy

Jak již bylo komentováno výše, rychlá analýza je jedním z hlavních požadavků na moderní metodiku. V chromatografické analýze bylo zrychlení analýzy ve spojení s účinnější separací dosaženo zavedením technologie ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), zejména díky aplikaci nových strukturně efektivnějších stacionárních fází.

UHPLC systémy s částicemi menšími než 2 μm

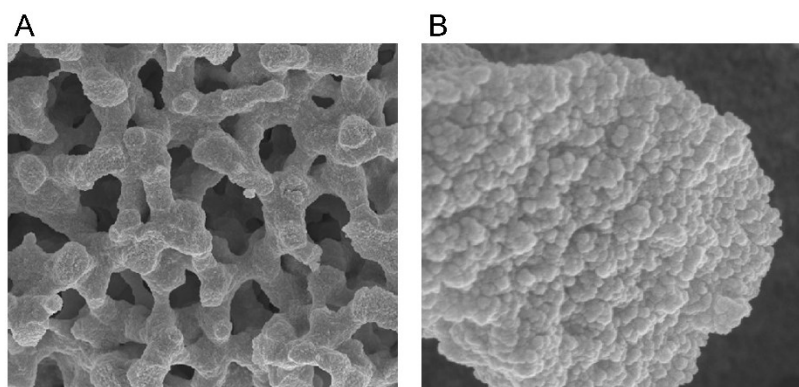
Velmi vysoké účinnosti separace a lepšího rozlišení píků ve značně zkráceném čase analýzy bylo dosaženo zejména využitím stacionárních fází se sub-2 μm . Díky vysokému zpětnému tlaku, který tyto fáze generují bylo nutno zareagovat i na poli instrumentace a přizpůsobit nové přístroje ve směru vysoké mechanické odolnosti systému. Nedílnou vlastností moderní UHPLC instrumentace je kromě její rezistence k vysokým tlakům i nutnost rychlého dávkování vzorku, minimální mimokolonové objemy a v neposlední řadě vysoká rychlost sběru dat v detekčním systému [12].

UHPLC systémy jsou ovšem také v porovnání s běžnými HPLC, využívajícími častěji kolony s větším průměrem, mnohem náchylnější na případné zanesení systému, zejména při analýze biologického materiálu. Proto je často nutné volit komplexnější úpravu vzorku.

Aplikace LC v klinické praxi je poněkud střídavější z hlediska uplatňování moderních trendů kvůli pomalejšímu rozšíření nejnovější instrumentace v jednotlivých laboratořích. Z hlediska získání rychlejší a účinnější separace se v bioanalýze do popředí dostaly především technologie monolitických kolon a kolon plněných povrchově porézními částicemi (core-shell částicemi), jako jedno z ekonomicky výhodných řešení této problematiky.

Monolitické kolony

Monolitickou stacionární fází tvoří jeden kus porézního materiálu (Obr. 2 A), který zcela vyplňuje vnitřní prostor kolony. Výhodou monolitních kolon oproti klasickým částicemi plněnými kolonami jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Makropóry, o velikosti zhruba 2 μm , poskytují rychlý a konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a tím výrazně urychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází. Mezopóry (Obr. 2 B), o velikosti cca 13 μm , poskytují velký povrch pro vysokou separační účinnost monolitu. Porézní struktura monolitu umožňuje použití vyššího průtoku mobilní fáze při zachování nízkého zpětného tlaku. Tudíž jejich použití nevyžaduje novější, tlaku odolnější systém a jsou tak vhodné pro využití i se starší technikou [13], což je velmi užitečné zejména v rutinní praxi. Druhá generace monolitních kolon je vyráběna s menšími makropóry s větší homogenitou, díky kterým dochází k zlepšení tvaru píků a zvýšení separační účinnosti [14]. Zvýšení průtoku je ovšem logicky spojeno s vyšší spotřebou mobilní fáze, proto je nutno při vývoji nové metody brát ohled i na délku analýzy, po kterou zvýšený průtok aplikujeme. Hlavní výhodou monolitických kolon v bioanalýze je díky jejich charakteristickému skeletu možnost efektivní a robustní separace při zachování dlouhé životnosti kolony [15].

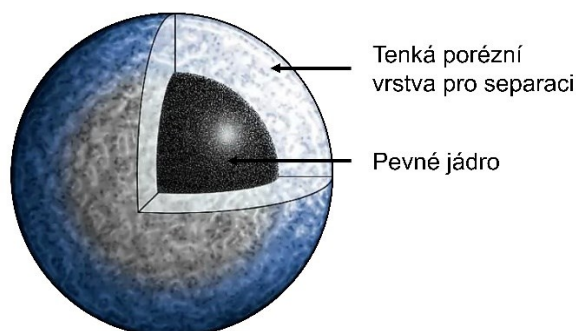


Obr. 2 Charakteristická struktura monolitní kolony s makropóry (A), struktura mezopóru (B). (Převzato z [16])

Povrchově porézní částice

Povrchově porézní částice (core-shell částice) se staly finančně dostupnou alternativou k sub-2 μm částicím. Jejich hlavní výhodou je možnost využití i v běžných HPLC systémech při dosažení vysoce efektivní separace. Core-shell částice jsou

charakteristické svým pevným neporézním jádrem potaženým porézní vrstvou (Obr. 3). Vyšší separační účinnost částic je výsledkem rychlejšího přenosu hmoty mezi mobilní fází a tenkou povrchovou porézní vrstvou v porovnání s plně porézními částicemi a tudíž dosahují srovnatelné separační účinnosti se sub-2 μm částicemi ale s mnohem nižším zpětným tlakem [14]. Redukce axiální difúze umožňuje využití vyšších průtoků mobilní fáze bez ztráty výkonu separace. Použití core-shell silikagelových částic výrazně zlepšil tvar píků [13, 17, 18].



Obr. 3 3D struktura povrchově porézní částice. (Převzato a upraveno z [19])

3.1.2.2. Selektivita, senzitivita

UV-Vis detekce, DAD

I když je UV-Vis detekce v porovnání s nejmodernější hmotnostní spektrometrií méně citlivá, rutinní laboratoře ji častěji využívají, protože se jedná o poměrně univerzální, jednoduchý a zejména mnohem levnější typ detekce s dostatečnou senzitivitou pro řadu aplikací.

Pro absorpci záření v rozmezí 190-800 nm a analýzu pomocí UV-Vis detekce, je nutná přítomnost chromoforu v molekule, tzn. násobné vazby mezi atomy, konjugované dvojně vazby, či přítomnost volného elektronového páru. Kvantifikace je založena na Lambertově-Beerově zákoně, kdy hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci analytu v roztoku. Linearitu stanovení ovlivňuje mnoho faktorů jako jsou vlastnosti (parametry) spektrofotometru, fotodegradace molekul, přítomnost rozptylujících nebo absorbujících interferencí ze vzorku, interakce mezi analytem a rozpouštědlem vzorku, ale rovněž i pH [20]. Jednou z možností zvýšení selektivity je využití detekce s diodovým polem (PDA nebo DAD), kde díky skenování absorpčních spekter v daném časovém okamžiku můžeme odhalit možnou koeluci s interferencí v biomatrici [21, 22].

Fluorescenční detekce

Fluorescenční detekce (FLD) je jedna z dalších relativně méně finančně náročných (ve srovnání s MS) technik, které nabízí vysokou selektivitu a poměrně dobrou citlivost.

Mnoho látek je schopno absorbovat světlo, ale jen pár z nich je schopno přirozeně fluoreskovat, tzn. následně světlo i emitovat. Rozdíl ve vlnových délkách (absorpce vs. emise) poskytuje větší selektivitu a fluorescenční světlo se měří na pozadí s velmi slabým osvětlením, čímž se zlepšuje poměr S/N [23]. Pokud analyzované látky obsahují ve své molekule fluorofor, tedy pokud se jedná o cyklické molekuly nebo polycyklické aromatické uhlovodíky, rovněž pokud obsahují skupiny $-NH_2$, $-NR_2$, $-OH$, $-OR$, které zvyšují fluorescenci, mohou být detekovány pomocí fluorescenční detekce. Na druhou stranu deaktivující skupiny např. $-COOH$, $-COOR$, $-COR$, $-CHO$ a $-NO_2$ naopak fluorescenci potlačují. Mezi přirozeně fluoreskující řadíme např. vitamíny, některé aminokyseliny, či aflatoxiny [24]. Molekuly, které přirozeně nefluoreskují, nebo fluoreskují s nízkou odezvou lze derivatizovat zavedením vhodného fluoroforu [25]. Nevýhodou FLD je právě její omezená využitelnost kvůli nutné přítomnosti fluorescence analytů, právě zařazení derivatizace může způsobit značné komplikace při vývoji metody i při jejím následném použití.

Zatímco dynamický rozsah FLD detektorů je relativně velký, lineární dynamický rozsah je u mnoha analytů často menší. Při použití FLD je důležité věnovat pozornost správnému výběru složek mobilní fáze, protože mohou způsobit fluorescenci na pozadí nebo naopak mohou vést k jejímu zhasnutí (zejména při špatném odplynění), což značně ovlivňuje citlivost stanovení [21].

Hmotnostní detekce

Spojení LC-MS výrazně rozšířilo možnosti této techniky zejména v laboratorní diagnostice [8].

Hmotnostní detektory jsou schopny poskytnout absolutní identifikaci analytů na základě poměru hmotnosti/náboje iontů, na které jsou převedeny ionizačními technikami. V bioanalýze je často využíván trojitý kvadrupól většinou v kombinaci s elektrosprejovou ionizací. Právě typ použité ionizace má největší vliv na získaný metabolický profil [26]. Pro klinické aplikace se často využívá také laserová desorpce za účasti matrice a to ve spojení s analyzátozem doby letu a to zejména v mikrobiologii.

Dále je možné se setkat i s uplatněním chemické ionizace za atmosférického tlaku či fotoionizace za atmosférického tlaku [27, 28].

Jak již bylo zmíněno, nevýhodou hmotnostní detekce je vysoká pořizovací cena přístrojového vybavení, ale i náklady na údržbu. Rovněž pro její provoz musí být zajištěn vysoce kvalifikovaný personál. Náročnější je i vývoj nové metodiky, protože musí být optimalizována celá řada parametrů detekce [1, 26]. Problematická ovšem může být iontová suprese, kdy kvůli přítomné interferenci může dojít k potlačení nebo naopak falešnému zvýšení signálu cílového analytu. Proto použití hmotnostní detekce vyžaduje účinnou úpravu vzorku, ale velmi doporučováno je i použití vnitřního standardu [1, 29]. LC-MS má ovšem hlavně celou řadu výhod ve srovnání s ostatními detekčními technikami. Jedná se především o senzitivitu a selektivitu.

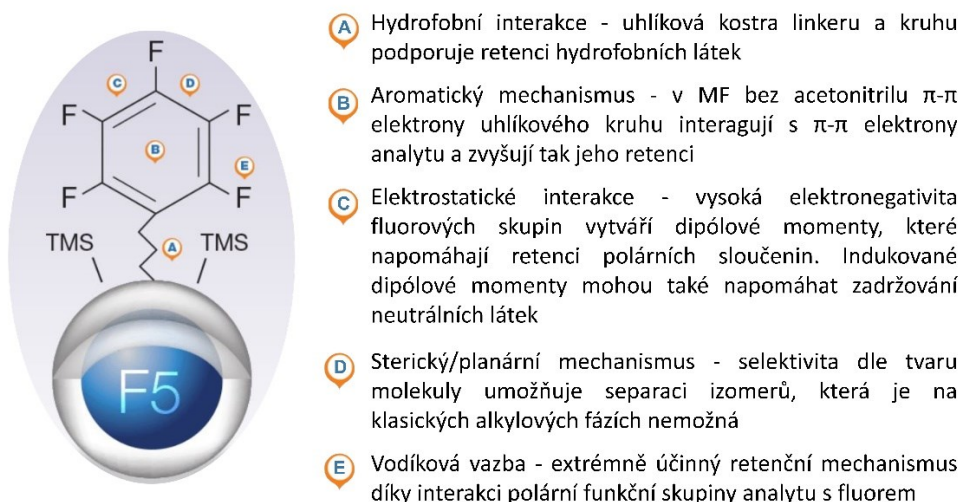
Reverzní mód, C18 fáze

Volba separačního módu, patří mezi klíčové parametry chromatografické separace. V klinické praxi je nejuniverzálnější a nejrozšířenější použití separace v reverzním módu, který je vhodný především pro nepolární a středně polární analyty. Z hlediska chemismu jsou nejčastěji využívány stacionární fáze s C18 z důvodu vysoké separační účinnosti pro široké spektrum, zejména malých molekul. Velkou výhodou C18 kolon je robustnost v chování analytů během opakovaných analýz a zejména životnost kolon, která dosahuje více než tisíc nástřiků [30, 31]. Pro analýzu polárních látek se často využívá jiného chemismu či separačního módu.

F5 fáze

Pro analýzu polárních látek mohou být použity polárně endcappované kolony, fáze s vloženou polární funkční skupinou či fluorované stacionární fáze. Popularitu pentafluorfenylové kolony (F5, PFP) získaly díky poskytování různé selektivity jak pro polární, tak i nepolární látky. Kombinace polárních a nepolárních interakcí zahrnuje interakce vodíkových vazeb, hydrofobní, elektrostatické, aromatické a stérické/planární mechanismy (Obr. 4). Tato fáze je komplementární k C18 a C8 fázím. Výhodou použití F5 kolon díky vyšší retenci pro polární látky je možnost použití mobilní fáze s vyšším obsahem organických rozpouštědel, což umožňuje účinnější ionizaci při použití hmotnostní detekce, ale poskytuje i lepší symetrii píku [32, 33]. Zejména F5 fáze vykazují dle složení mobilní bimodální retenční mechanismy. Zastoupené

množství organických rozpouštědel v mobilní fázi, které poskytuje vyšší retenci látek za rozdílných podmínek vytváří „U retenční profil“. Při nižších procentech organického modifikátoru se retence látek podobá retenci reverzní fázi. Při vyšších procentech organických látek je však se zvyšujícím se podílem organického modifikátoru pozorováno chování typické spíše pro separace na normální fázi [34]. Tento druh stacionární fáze je často volen pro analýzu polycyklických a aromatických sloučenin [35], obecně je vhodná pro chemické homology [36] nebo pro izomerní látky.



Obr. 4 Interakce F5 fáze ovlivňující retenci analytů na koloně.

(Převzato a upraveno z [37])

HILIC

Další možností pro separaci polárních látek je využití hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). V porovnání s reverzní fází HILIC není tak rozšířena, pravděpodobně kvůli menší flexibilitě a složitějšímu vývoji metody. Použití HILIC je ale velmi atraktivní z hlediska podobnosti k reverzní fázi. Je velmi vhodná pro analýzu aniontů, kationtů, látek nenabitých i s zwitterionovým charakterem [33]. Své uplatnění v rutinní praxi našla zejména v analýze malých molekul, drog a jejich metabolitů, biomarkerů, nebo rovněž i metabolomice.

HILIC zahrnuje multimodální separační mechanismus mezi polární stacionární fází a relativně hydrofobní mobilní fází složené z vodně-organické směsi. Eluent typicky obsahuje 5-40 % vody a tvoří vodnou vrstvu, která je částečně imobilizována na povrchu stacionární fáze. HILIC mód je velice senzitivní na změnu obsahu vody

v mobilní fázi, která s sebou přináší velké ovlivnění retence analytu. Ačkoli bylo v posledních letech učiněno mnoha poznatků v oblasti HILIC, mechanismus retence analytu v tomto módu ještě není zcela objasněn. Nicméně by mohlo docházet k dělení mezi hydrofobní částí mobilní fáze a hydrofilní vrstvou zakotvenou na polární stacionární fázi. Dále jsou diskutovány i přispívající vlivy jako např. dipól-dipól interakce, vodíkové vazby a také elektrostatické interakce, které jsou považovány za hlavní faktory ovlivňující retenci v HILIC. Problematický v tomto módu může být častý posun retenčních časů a nízká kapacita píku pokud není věnována dostatečná pozornost klíčovým aspektům, jako je rozpouštědlo vzorku, objem nástřiku a použité pufrů. Navíc, HILIC v porovnání s RP vyžaduje delší čas ekvilibrace. Použití zejména pro necílenou analýzu je tedy poměrně komplikované kvůli možnému driftu [33, 38]. Také byl prokázán výskyt vyšších matricových efektů při použití neselektivní úpravy vzorku než na reverzních fázích [39].

Spornou nevýhodou HILIC z hlediska environmentální přívětivosti může být vysoké procento organických rozpouštědel obsažených v mobilní fázi, zejména acetonitrilu, který je často použit dokonce až v poměru 95 % v/v, což navyšuje množství vyprodukovaného organického odpadu [40]. Na druhou stranu použití takových mobilních fází poskytuje vysokou kompatibilitu s hmotnostní detekcí kvůli snadnější ionizaci analytů vedoucí k větší senzitivě analýzy a rovněž i možnost přímého nástřiku organických extraktů vzorku. Velký počet komerčně dostupných polárních stacionárních fází je rovněž velkým benefitem [38].

3.1.3. Faktory ovlivňující výsledek analýzy biologického materiálu

3.1.3.1. Preanalytické vlivy

Při hodnocení chyb v rámci laboratorní praxe je často diskutována chyba metody, tedy vlastní analýzy. Přitom 60-70 % všech chyb vyskytujících se v laboratorní diagnostice vyplývá z preanalýzy. Součástí preanalytické fáze je příprava pacienta, odběr a transport vzorku a jeho uchování před analýzou [41, 42].

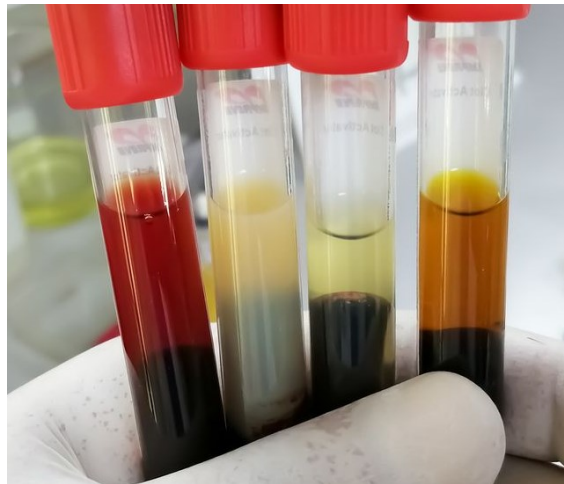
Jelikož výsledky laboratorních vyšetření přispívají k rozhodnutí lékařů ohledně diagnózy a léčby pacienta, anebo se jedná o výsledky toxikologické či anti-dopingové analýzy, případně i klinické studie léčiv, je ve všech případech potřeba důkladně dbát na zásady, které minimalizují preanalytické vlivy a tím zvyšují správnost výsledků.

Příprava pacienta

Mezi neovlivnitelné faktory preanalýzy řadíme věk, genetické faktory, etnicitu, rasu a pohlaví. Řešením pro tyto vlivy je zavedení referenčních rozmezí pro každou skupinu. Faktory, které jsme schopni ovlivnit představuje druh diety, fyzická zátěž nebo poloha pacienta při odběru. Rovněž i denní rytmus, léky, menstruační cyklus či gravidita, mechanické trauma, stres a mnoho dalších činitelů se mohou podílet na variabilitě hladin sledovaných analytů v organismu [43].

Odběr vzorku a manipulace se vzorkem

Aby bylo zamezeno chybnému nebo neúplnému označení vzorku, je nutné dodržovat zásady správné laboratorní praxe. Na štítku by mělo být uvedeno jméno pacienta (popř. číslo, pod kterým je zařazen do studie), rodné číslo, pojišťovna a ideálně také datum a čas odběru [44]. Nesprávná identifikace pacienta může vést ke špatné diagnóze, chybné léčbě a v některých případech může být i fatální [45]. Důležitou součástí je i správně vyplněná žádanka na vyšetření bez které nemůže být vzorek přijat do laboratoře k následnému zpracování [46]. Rovněž nesprávné pořadí odebíraných vzorků krve může vést k ovlivnění laboratorních výsledků, a to z důvodu případné kontaminace aditivou obsaženými ve zkumavkách. Při použití zkumavek se separačním gelem může být v rámci analýzy pozorována interference pocházející právě z tohoto gelu, nebo může dojít i k adsorpci analytu na gel [47]. Analyty avšak mohou být adsorbovány i na povrch odběrového systému [48]. Poloha pacienta při odběru může mít vliv na hladinu některých analytů (cholesterol, aldosteron) [44, 49]. Použití odběrové jehly o příliš velkém průměru může způsobit hemolýzu. K hemolýze může dojít i kvůli velkému podtlaku zkumavky nebo přílišnému promíchání vzorku po odběru [45, 50]. Při vylití obsahu erytrocytů do séra/plasmy může dojít k navýšení hladin některých analytů (laktát dehydrogenázy, kreatinkinázy MB, draslíku atd.), ale rovněž může dojít i k jejich poklesu (naředění plasmatické koncentrace), jelikož v erytrocytech je mnohem nižší koncentrace např. albuminu, bilirubinu, glukózy, sodíku, hořčíku a jiných. Současně může také dojít k spektrofotometrické interferenci s ovlivněním hladin analytů u kterých se při detekci používá vlnová délka z oblasti absorpce hemoglobinu. Zákal vzorku může působit potíže i při turbidimetrickém stanovení. Obdobný problém může nastat i u chylózních nebo ikterických vzorků (Obr. 5). Vylitý intracelulární obsah s aktivními látkami (např. adenylát kinázou nebo glykolytickými enzymy) může také interferovat v rámci reakčního mechanismu stanovení [41, 45, 46, 51–53].



Obr. 5 Variabilita vzorků séra. Zleva: hemolytický, chylózní, normální a ikterický vzorek séra.

U vzorků moči nastává nejvíce chyb při samotném odběru mimo nemocniční zařízení, ať už se jedná o nevhodně zvolenou nádobu, kontaminaci vzorku, nedodržení ranního odběru, nebo metody středního proudu. Pokud je analyzován vzorek sbírané moči, chyba může nastat při nedodržení časového úseku pro sběr, díky nesprávnému změření objemu moči ale i špatnému odběru finálního vzorku. U žen pak není doporučováno odebírat vzorek v období menstruace. Jak bylo pozorováno u vzorků krve, i u moči může docházet k adsorpci analytu na povrch odběrové nádoby a negativnímu ovlivnění analýzy. V neposlední řadě je nezbytné zdůraznit i nutnost dodržení přesného množství vzorku pro daný odběrový systém. Kvůli příliš malému odebranému objemu často není možné analýzu provést [45, 49, 52–54].

Transport, uchování a stabilita vzorku

Zatímco příprava pacienta a odběr vzorku jsou všeobecně známými zdroji chyb a častěji se klade důraz na jejich eliminaci, pozornost transportu materiálu k analýze bývá často opomíjena. V rámci nemocnic transport vzorku nebývá až tak zásadním problémem a je ho možné zajistit celkem rychle sanitární službou nebo potrubní poštou. Jelikož je ale pozorován narůstající trend konsolidace laboratoří čímž vzniká problém prodlužování doby transportu materiálu do laboratoře ze vzdálenějších míst, je třeba věnovat této problematice větší pozornost [41, 42].

Některé vzorky s nízkou stabilitou (např. pro analýzu krevních plynů, parathormonu aj.) vyžadují okamžitý transport do laboratoře ihned po odběru. Plasma/sérum pro další

analýzu by většinou měly být odděleny od krevních buněk během 2 hodin [44]. Během transportu vzorku musí být splněny i nároky jednotlivých analytů na optimální teplotu a například ochranu před slunečním zářením [49, 55]. Aby se zabránilo hemolýze erytrocytů či aktivaci vzorku (pro analýzu srážení krve), měly by být omezeny také otřesy biologického materiálu. Zásady správného transportu do laboratoře bývají často porušeny například při odběru moči v domácím prostředí [41, 51].

Velmi často nejsou vzorky doneseny/dopraveny do laboratoře při optimálních teplotách, nebo byly dlouze skladovány při pokojové teplotě a jsou již tedy značně degradovány. Často se vzorky před analýzou skladují v lednici (2-8 °C), ale zejména pro hematologická vyšetření je často nutné analyzovat je ihned [49]. Pokud není materiál analyzován ihned, pro zachování stability analytů je upřednostňováno skladování v mrazáku při nižší teplotě (-20 °C) a rovněž i v hluboko mrazícím boxu při -80 °C, který by měl zajistit dlouhodobější stabilitu analytu v případě pozdější analýzy [41, 55].

Preanalytická fáze se ovšem nedá zobecňovat a je potřeba vzít v potaz nároky jednotlivých analytů/metod a dle nich ji přizpůsobit.

3.1.3.2. Důležité faktory ovlivňující analytickou fázi procesu

V oblasti analytické fáze, zejména nové milénium přineslo obrovský pokrok s desetinásobným úbytkem chyb analýzy v rámci vlastní analytické fáze a to díky zlepšení standardizace analytických technik a reagensů, pokrokům na poli instrumentace a informačních technologií, ale rovněž i díky dostupnosti lépe kvalifikovaného personálu [56]. Navíc správnost výsledků podpořilo také pravidelné hodnocení interní i externí kontroly kvality klinických laboratoří. Pro ověření kvality vyvinuté či optimalizované metody se často provádí její validace či verifikace.

Faktory hodnotící spolehlivost metody, validace metod

Pro zabezpečení kvality vydávaných bioanalytických výsledků je třeba ověřit řadu parametrů používané metody. Validace je proces, který má zhodnotit a dokumentovat, že vyvinutá metoda je vhodná pro plánované použití a poskytuje spolehlivé, reprodukovatelné a kvalitní výsledky [57]. Získané výsledky jsou pak uvedeny ve validačním protokolu. Speciálně pro zhodnocení bioanalytických metod existuje řada pokynů a předpisů. Nejčastěji jsou používány doporučení Bioanalytical method

validation- Guidance for industry od U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA, Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) [58], dále Guideline on bioanalytical method validation vydané European Medicines Agency (EMA, Evropskou lékovou agenturou) [59] a také doporučení ICH M10 „Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis“ vytvořenými International Conference on Harmonisation (ICH, Mezinárodní rada pro harmonizaci) [60]. Právě poslední zmíněný dokument ICH obsahuje více všeobecná doporučení kombinující příručky EMA a FDA. EMA popisuje precizněji praktickou stránku provedení, zato FDA doporučení jsou více komplexní [61].

Validace můžeme rozdělit do 3 skupin na:

- 1) Plnou validaci
- 2) Částečnou validaci
- 3) Křížovou (cross) validaci

Plnou validaci provádíme u nově vyvinutých bioanalytických metod, částečnou validaci při modifikaci již v minulosti validované metody (např. při změně detekčního systému, kalibračního rozmezí apod.). Plná validace metody zahrnuje parametr linearity, správnosti, preciznosti, selektivity, opakovatelnosti, citlivosti a robustnosti, dále i zhodnocení matricových efektů, stability či přenosu analytu [57, 61].

Křížová validace slouží k porovnání validačních parametrů, pokud dvě a více metod (v rámci různých laboratoří) produkují data v rámci jedné studie. Navíc křížová validace by měla být zvažena, když jsou data získaná různými analytickými technikami (např. LC-MS/MS vs. ELISA).

Zařazení vnitřního standardu

Zařazení vnitřního standardu do metod využívajících LC je zejména v bioanalýze klíčové. Správně zvolený vnitřní standard nejen koriguje případné kolísání odezvy detektoru i objemu nástřiku, což při analýze velkého počtu vzorků není neobvyklým jevem, ale pokryje i případně vzniklou chybu během složité úpravy vzorku. Zlepšuje se tedy přesnost a preciznost kvantifikace analytu, ale i robustnost metody a tím i kvalita vydávaných výsledků.

V přístupech využívajících HPLC v kombinaci s UV nebo FLD detekcí se aplikuje vnitřní standard s podobnou strukturou a vlastnostmi, který nesmí být primárně ve vzorku přítomen. V metodách s hmotnostní detekcí se využívají zejména izotopicky

značené standardy, které navíc korigují náhodné faktory, které mohou ovlivnit ionizaci. Standardy značené C^{13} uhlíkem jsou více upřednostňovány díky téměř totožným chromatografickým vlastnostem jako cílový analyt, nevýhodou je jejich cena a nižší dostupnost na trhu. Druhým často využívaným typem jsou deuteriem značené standardy, které jsou sice levnější, ale méně stabilní, s nižší čistotou a vykazující mírně odlišné chování během analýzy [8, 62].

V praxi zařazení vnitřních standardů často nedovoluje jejich vysoká cena nebo jejich nedostupnost na trhu. Pokud je standard komerčně dostupný, jeho použití je velmi doporučováno. Vhodnost jeho výběru by měla být vždy testována nejen při vývoji metody ale i při její validaci [62–64].

Blankové matrice pro vývoj a validaci metod

Pro správnou kvantifikaci analytu v rámci vývoje a zejména validace bioanalytických metod je důležité použití vhodné blankové matrice, tzn. matrice, která obsahuje pokud možno všechny součásti jako reálný vzorek, bez přítomnosti analytu. Blankové matrice můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na autentické (reálné) a náhradní matrice.

Náhradní blankové matrice

Pro přípravu kalibračních roztoků s přidanými standardy či kontrolních vzorků se jako nejjednodušší náhradní matrice používají různá rozpouštědla či např. puřry. Avšak problémem jejich použití je fakt, že takto připravené kalibrační roztoky postrádají jakékoliv interferenty z reálné matrice a tudíž se nedá posoudit vliv matricových efektů. Z tohoto důvodu by se solventy jako náhradní matrice neměly používat. Výjimkou je pokud reálná matrice není nebo je velmi těžce dostupná a/nebo i v případě že vyvinutý extrakční postup je velmi robustní, efektivní a výsledný extrakt je bez matricových efektů, které by ovlivnily ionizaci při MS detekci [65, 66]. Další možností v případě těžce dostupného reálného materiálu je použití umělých matic, které simulují reálný biologický materiál. Tyto matrice mohou být vyrobeny v laboratoři dle mnoha dostupných protokolů, kdy analyzovanou látku můžeme při přípravě vynechat. Existují i komerčně dostupné varianty (Obr. 6), jejichž složení je většinou chráněno výrobním tajemstvím a známy jsou jen některé specifikace. Dle naší zkušenosti použití umělých matic může způsobit značné potíže při vývoji robustní metody, jelikož taková matrice nikdy neodpovídá různorodosti reálného biologického materiálu a v něm obsažených

interferujících látek. Rovněž i výsledná citlivost metody bude mnohem vyšší v umělé matrici než v reálných vzorcích, kde matricové efekty jsou obvykle větší.



Obr. 6 Příklady komerčně dostupných variant umělé moči [67]

Autentické blankové matrice

Pro kvantifikaci exogenních látek, které za normálních okolností nejsou přítomny v daném analyzovaném materiálu, je použití autentické blankové matrice snazší. Vzorky kalibračních standardů či vzorky pro kontrolu kvality mohou být snadno připraveny z reálného biologického materiálu, který přirozeně neobsahuje hledané analyty. V případě endogenních analytů je problémem neznámá koncentrace analytu v matrici, ale rovněž i fakt, že je velmi náročné získat materiál bez obsaženého analytu.

Použití autentické matrice je velmi doporučováno, jelikož přesně zrcadlí chování následně analyzovaných reálných vzorků. Dle validačních doporučení by mělo být řádně odůvodněno použití náhradní varianty [58]. Standardy použité pro obohacení blankové matrice musí být deklarované čistoty i identity. Před použitím reálného materiálu pro validaci endogenních analytů je velmi důležité zhodnotit jeho stabilitu a kvantifikovat množství endogenního analytu v matrici [65, 68].

Další možností je odstranění endogenního analytu např. pomocí afinitní chromatografie/extrakce, zvýšením teploty u tepelně nestabilních analytů, vystavením záření fotolabilních analytů, oxidací vzorku aj. Těmito přístupy může bohužel dojít ke kontaminaci nebo degradaci matrice, či také vzniku nových metabolitů, které by následně mohly interferovat s analytem během analýzy [66, 69]. Přístup využívající ředění se příliš nedoporučuje, jelikož dochází k ovlivnění kvality matrice [65].

Referenční materiál

Standardem obohacené blankové matrice, které se používají jako referenční materiál mohou být připraveny přímo v laboratoři, avšak musí být zajištěna jejich stabilita. Jako přídavek je nutno použít standard látky o přesně definované čistotě a složení. U vnitřních izotopicky značených standardů nesmí docházet k izotopické výměně, tedy standard musí být velmi stabilní, požadována je také jeho vysoká čistota.

V současnosti je rovněž dostupné široké spektrum komerčně připravených referenčních materiálů používaných jak pro validaci metody, tak i pro její ověření (Obr. 7). Referenční materiál je materiálem adekvátně homogenním a stabilním s jednou nebo více specifikovanými vlastnostmi. Referenční materiál dělíme podle vlastností na certifikovaný a bez certifikace. Součástí certifikátu je hodnota dané vlastnosti a rozmezí její nejistoty [70, 71].



Obr. 7 Příklad komerčního referenčního materiálu-kontroly séra pro naředění [72]

3.2. Odběr vzorku v bioanalýze

Výsledek laboratorního vyšetření přímo závisí na preanalytické fázi. Ta se skládá z několika částí: přípravy pacienta, odběru, manipulace, transportu vzorku do laboratoře a v neposlední řadě také jeho uchování před analýzou. Je velmi důležité, aby se nejen bioanalytik předem informoval o všech úskalích analýzy cílového analytu, ale je klíčové, aby správný postup byl zajištěn již od samotného odběru. Součástí preanalýzy je rovněž i úprava vzorku, ale tomuto tématu bude věnována pozornost v kapitole 3. Kapitola odběru biologického materiálu bude věnována tradičnímu odběru vzorku, ale krátce bude zmíněna i technika suché kapky krve jakožto základu microsamplingu, který v posledních letech získává stále větší popularitu.

3.2.1. Konvenční odběr vzorku

Odběr a následné zpracování biologického materiálu můžeme rozdělit podle několika způsobů. Dle naléhavosti získání výsledku dělíme vzorky k analýze na rutinní, statimové a tzv. POCT (point of care testing) - rychlé testování základních parametrů u lůžka pacienta, kdy je nutné vydat výsledek do 30 minut. Toto rychlé testování je většinou založeno na využití iontově-selektivních elektrod, biosenzorů či diagnostických proužků. Statimová vyšetření se provádí v případě kritického stavu pacienta, kdy je nutné co nejrychlejší zahájení nebo pozměnění léčby. Výsledek je pak nutno vydat do hodiny od doručení materiálu do laboratoře [47, 73]. Příkladem může být vyšetření bioptických vzorků během operace, kdy informace o charakteru nádoru či o jeho rozšíření je nezbytná pro další pokračování ve výkonu [74].

Způsob jakým je vzorek odebírán ve vztahu k šetrnosti procesu k pacientovi lze rozdělit na invazivní nebo neinvazivní. Mezi invazivně odebírané matrice řadíme např. krev, mozkomíšní mok, tkáň, synoviální tekutinu, plodovou vodu nebo i různé druhy exsudátu. Na druhou stranu snadno a pro pacienta bezbolestně lze provést odběr moči, slin, stolice či mekonie, slz, vlasů, nehtů a jiných materiálů. V následujících podkapitolkách bude pozornost věnována odběru těch matric, se kterými jsem pracovala v rámci experimentů.

3.2.1.1. Plná krev, plasma, sérum

Krev patří mezi nejčastěji analyzovaný druh biologického materiálu který je v laboratorní diagnostice využíván např. za účelem hematologického, biochemického, mikrobiologického, imunologického, molekulárně-biologického, toxikologického či genetického vyšetření. Dle požadavků analýzy je odebírána především žilní (nejčastěji v rozmezí 2-10 ml), ale i tepenná či kapilární krev. Pro odběr krve se v současné době využívají uzavřené systémy. Ty jsou tvořeny skleněnými či plastovými zkumavkami opatřenými víčky, jejichž barva se liší dle přidaného aditiva (Obr. 8). Jako antikoagulační činidla se používají soli heparinu, nebo chelatační činidla vyvazující ionty kalcia mezi které se řadí citrát, K_2 - a K_3 EDTA, oxalát, nebo fluorid sodný, které zabraňují sražení vzorku. Aktivátory srážení naopak proces koagulace urychlují. Při odběru více zkumavek krve z jednoho vpichu je doporučováno odebírat je v následujícím pořadí: odběrové systémy pro hemokulturu, zkumavky s aktivátorem srážení, zkumavky s citrátem, heparinem, K_3 EDTA a poslední v pořadí s NaF, aby se předešlo případné kontaminaci aditivity [47, 75, 76].



Obr. 8 Příklad barevného odlišení vybraných zkumavek dle přidaného aditiva systému Vacuette® (Greiner Bio-One, Rakousko). Žlutá/zlatá zkumavka s aktivátorem srážení a separačním gelem, červené zkumavky s aktivátorem srážení, fialové s EDTA, zelená s heparinem a šedá s NaF [77]

Krev je velmi komplikovanou matricí složenou z krevních elementů a plasmy, která kromě vody a anorganických látek a iontů obsahuje rovněž i organické složky jako bílkoviny, lipidy, glukosu, hormony aj. K analýze plné krve se využívá nesrážlivá krev

s přidavkem antikoagulancia. Její centrifugací po dobu 10 - 15 min při 1500 - 2000 g získáme plasmu a sediment krevních buněk a jejich úlomků. Obdobným způsobem se rovněž vytváří i sérum. Pro tyto účely se však volí systém s aktivátorem srážení a po odběru je potřeba nechat krev srážet po dobu 20-30 minut. Teplotní podmínky během centrifugace se liší dle požadavků analýzy. Hlavním rozdílem mezi plasmou a sérem je nepřítomnost fibrinogenu v séru, který byl odstraněn procesem srážení krve. Podobně je tomu i se sníženým celkovým množstvím bílkovin (cca o 4 %). Naopak oproti plasmě je zde vyšší přítomnost glukózy, draslíku a fosforu. I když obě matrice vznikají obdobnou cestou, výhodou plasmy je možnost její okamžité separace z plné krve a tím i urychlení zpracování vzorku [3, 47, 78, 79].

3.2.1.2. Moč

Moč je neinvazivně odebíranou matricí vyžadovanou pro chemická, biochemická, mikroskopická, toxikologická, mikrobiologická a další vyšetření. Její složení se liší v závislosti na stravě a funkci ledvin, kdy za normálních podmínek je tvořena především vodou, ionty a dusíkatými sloučeninami, různými metabolity a jinými látkami. Jelikož nejčastěji vzorek odebírá sám pacient, je vhodné jej dobře informovat o dodržování správného postupu při odběru a skladování vzorku. Nejčastěji je analyzován vzorek ranní moči, nebo také vzorek po 24hodinovém sběru, zřídka pak je odebírán vzorek náhodně během dne. Pokud není možné, aby byla moč získána během mikce do sběrné nádoby (např. z důvodu obstrukce močových cest, při těžkém stavu pacienta či u kojenců a batolat) je nutno provést odběr cévkováním, které provádí zkušený zdravotnický personál. Je velmi důležité, aby byla moč odebíraná do čistých, nejlépe do sterilních zkumavek/nádobek (Obr. 9) [54, 80, 81].

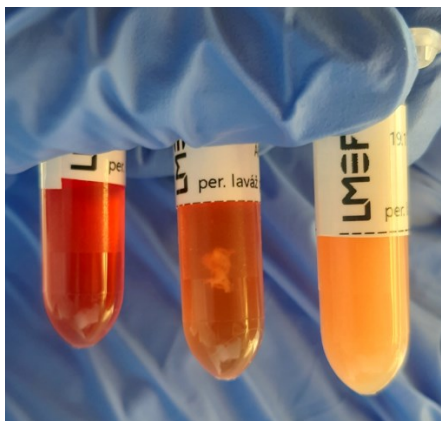


Obr. 9 Příklady odběrových systémů na moč [82, 83]

Zpracování moče před jejím uchováním je velmi přímočaré, neboť se ve většině případů nijak neupravuje. Po její homogenizaci se pouze připraví potřebné množství alikvotů. Případně je možné do moči přidat aditivum pro omezení interakce analytu s materiálem zkumavky [54, 75].

3.2.1.3. Peritoneální laváž

Peritoneální tekutina je v malém množství produkována pobřišnicí a funguje jako lubrikant v dutině břišní. Při jejím nahromadění v peritoneální dutině se tato tekutina nazývá ascites. Vzorek této ascitu je odebírán při podezření na trauma v dutině břišní, přítomnost nádoru, infekci nebo zánět orgánu či tkáně, a to odsátím z peritoneálního prostoru za stálé kontroly jehly ultrazvukem, anebo je možné získat vzorek i během operace. Ascites může být rozdělen dle jeho charakteru na chylózní, hemoragický, infikovaný nebo neoplastický [84, 85]. Peritoneální laváž pocházející od pacientů podstupujících hypertermickou intraperitoneální chemoterapii má charakter peritoneální tekutiny zředěné podaným roztokem chemoterapeutika [86, 87]. Ve vzorku jsou na pohled viditelné částičky tkání rozptýlené v méně či více čiré žluté až červené tekutině (Obr. 10).



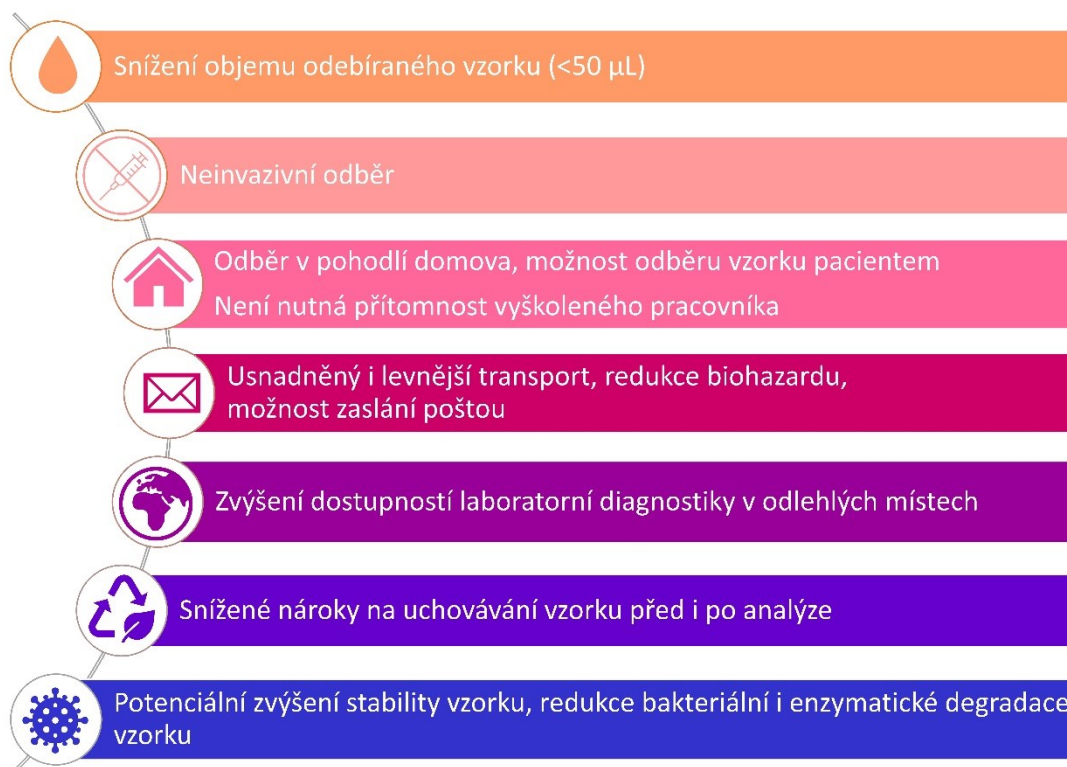
Obr. 10 Variabilita charakteru vzorků peritoneální laváže od pacientů podstupujících hypertermickou intraperitoneální chemoterapii

3.2.2. Microsampling – Metoda suché kapky krve

Metoda suché kapky krve (dried blood spot, DBS) je zřejmě nejznámější a nejčastěji využívanou technikou microsamplingu. Od 60. let minulého století byla DBS zavedena do rutinní praxe za účelem screeningu fenylketonurie u novorozenců a od té doby je základem novorozeneckého screeningu. Později byla snaha uplatnit metody microsamplingu i v dalších odvětvích bioanalýzy, jako např. ve forenzní toxikologii, pro účely monitoringu léčiv - TDM (therapeutic drug monitoring), ve farmakokinetických či farmakodynamických studiích, v sérologii nebo DNA/RNA analýze. Metoda DBS se začala aplikovat i na další matrice, tudíž se v literatuře můžeme setkat s pojmy „dried matrix spot“ a dále i s jednotlivými modifikacemi dle druhu materiálu jako např. DPS (dried plasma spot, metoda suché kapky plasmy), DUS (dried urine sport, metoda suché kapky moči), DSS (dried saliva spot, metoda suché kapky slin) a jiné [88–92]. Popularita microsamplingu narostla zejména v poslední dekádě, a to především díky velkému pokroku na poli instrumentace ve vztahu k vyšší sensitivitě. Od olympijských her v Pekingu (2022) byla metoda analýzy DBS zařazena i do rutinního antidopingového testování sportovců [93].

Microsampling má nespočet výhod (Obr. 11) a představuje řešení mnohých potíží, které se pojí s tradičním odběrem a zpracováním tekutých vzorků. Microsampling se vyznačuje odběrem velmi malého objemu krve (nebo i dalších druhů biologického materiálu) v rozmezí jednotek až několika desítek mikrolitrů, který je sorbován na nosič (kartu) vyrobený nejčastěji z celulózy. To je výhodné především pro pediatrické a geriatrické pacienty, ale i ve studiích pro ochranu laboratorních zvířat. Velkým benefitem DBS je také mikroinvazivní způsob odběru vzorku, který se provádí pouhým napíchnutím prstu (nebo i paty) lancetou, a tudíž není vyžadovaná přítomnost odborného pracovníka. Naopak dle instrukcí si pacient může odebrat vzorek sám a bez nutnosti docházení do zdravotnického zařízení. To vše velmi napomáhá compliance pacientů. Po vysušení kapky je karta v hermeticky uzavíratelném sáčku odeslána do laboratoře. Transport vzorku je velmi usnadněn, jelikož často nemusí být dodržovány tak přísné podmínky, jako je tomu u přepravy kapalných vzorků. Neboť je matrice vysušena, riziko biohazardu a kontaminace vzorku a okolí je omezeno. Do laboratoře pak může být odeslána i poštou, tudíž dochází ke snížení nákladů. Odběrová karta navíc nevyžaduje mnoho prostoru v přepravě ani při uskladnění před a po analýze. Vzorek biologického materiálu v suchém stavu by měl rovněž poskytnout i větší stabilitu analytů, a to kvůli omezení bakteriální či enzymatické degradace matrice. Navíc samotné zpracování vzorků je možné i automatizovat, což umožňuje

zpracování velkých sérií vzorků. Všechny zmíněné výhody microsamplingu napomáhají zvýšení dostupnosti laboratorní diagnostiky v odlehlých, špatně dostupných místech, ale i v rozvojových oblastech [94–96].



Obr. 11 Metoda suché kapky představuje řadu výhod, které by mohly pomoci jejímu většímu rozšíření v rutinní laboratorní diagnostice

Navzdory všem popsaným výhodám, microsampling stále představuje několik výzev. Jelikož je odebírán velmi malý objem vzorku a výsledný extrakt pro analýzu je ve většině případů navíc ještě zředěný, může být nedostatečná senzitivita metody a tím i nutnost použití drahé instrumentace velmi limitujícím faktorem. Při odběru materiálu je vhodné rovněž dbát na dostatečný počet odebraných suchých kapek pro případnou možnost reanalýzy, ale i omezit riziko kontaminace karty. Dále je potřeba věnovat pozornost objemu vzorku, aby nebyla odebrána příliš malá nebo naopak velká kapka. Klíčová je také homogenita vzorku. Zásadní roli pro kvantifikaci DBS hraje hodnota hematokritu vzorku. Opomenuto by rovněž nemělo být i zhodnocení maticových efektů, jejichž vliv by však měl být pokryt aplikací vnitřního standardu. Jelikož se

matrice DBS liší od venózní krve, je taktéž nutné ověřit jejich korelaci. Testování stability analytu je taktéž nezbytné, stejně jako správná validace metody [89, 95, 97].

V posledních letech rovněž tento druh odběru vzorku zaznamenal velký pokrok. Především z důvodu snahy o redukci vlivu hematokritu a nepřesného objemu odebíraného vzorku pro správnou kvantifikaci byly vyvinuty nové odběrové systémy, jako např. Mitra pracující na principu volumetric absorptive microsampling, nebo mikrofluifní systémy založené na DBS jako např. Capitainer qDBS nebo Hemaxis DB 5 a 10 či hemaPEN a jiné [98].

3.3. Úprava vzorku před chromatografickou analýzou

Úprava vzorku před analýzou je často nejdůležitější ale také časově nejnáročnější součástí celého stanovení. Nedokonalá úprava vzorku může být hlavním zdrojem chyb, které vedou k nesprávným a nepřesným výsledkům. Důvodem složitosti tohoto kroku je komplexita biologických matric, které obsahují řadu molekul, mnohdy ve vyšších koncentracích než cílové analyty. Kvůli balastním látkám ve vzorku může dojít k výskytu matricových efektů a tím k potlačení nebo naopak zesílení výsledného signálu odezvy detektoru. Úprava vzorku tedy přímo ovlivňuje senzitivitu a selektivitu stanovení. Nativní biologický materiál v mnoha případech není přímo kompatibilní s analytickou koncovkou. Úprava vzorku tedy cílí na izolaci a po případě zakoncentrování cílových látek [99, 100]. V závislosti na povaze, biologického materiálu, stejně jako cílového analytu, by tedy měla být zvolena adekvátní úprava vzorku [101].

Dle typu analýzy dělíme také i přístupy zpracování vzorku na necílené a cílené. První přístup se používá hlavně k získání maxima informací ze vzorku a identifikaci potenciálních biomarkerů. V cílené analýze a úpravě vzorku je požadována obvykle kvantifikace s maximální citlivostí, selektivitou a opakovatelností.

Příprava vzorků v kontextu necílené analýzy musí být dostatečně univerzální, čehož lze dosáhnout zejména některými neselektivními přístupy například ředěním vzorku, srážením proteinů a filtrací. V necílené analýze lze využít i extrakce, které nejsou příliš specifické pro jeden analyt, biologickou třídu či fyzikálně-chemickou vlastnost. Změnou experimentálních podmínek lze takto extrahovat celou řadu látek s podobnými vlastnostmi [101].

3.3.1. Základní techniky úpravy vzorku

3.3.1.1. Ředění

Výhodou tohoto neselektivního přístupu, který je možné použít pro široké spektrum analytů, je jednoduchost, univerzálnost, nízká finanční náročnost a minimální manipulace se vzorkem. Kvůli zmíněným výhodám je v rutinní praxi ředění vzorku metodou volby i v oblasti cílené analýzy. Přístup „dilute-and-shoot“ je zejména používán pro screeningové analýzy. Limitací tohoto přístupu je naředění analytů, což v případě jejich nízkých koncentrací může značně ovlivnit citlivost celého stanovení. Ředění je jednou ze základních a nejjednodušších možností, jak snížit matricové

efekty. Bohužel ale v mnoha případech díky složitosti biologického materiálu je často tento přístup nedostačující. Ředění je tudíž vhodnější pro jednodušší matrice například moč, nebo některé dialyzáty [76, 102].

3.3.1.2. Srážení proteinů

Odstranění proteinů při úpravě vzorku je jedním ze základních principů úpravy vzorku před chromatografickou analýzou (pokud ovšem nehovoříme o proteomice).

V praxi je deproteinace provedena většinou přidavkem nižších alkoholů (nejčastěji methanolu a ethanolu), acetonitrilu, soli dvojmocných iontů (ZnSO_4), soli $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kyselin (kys. trichloroctová, chlorovodíková, aj.), organických sloučenin (např. močoviny), a jejich různých kombinací. Objem deproteinačního činidla je ve většině případů doporučován v nadbytku k biologickému materiálu. Následuje protřepání a centrifugace. Během denaturace proteinů dochází zároveň k uvolnění vazeb mezi molekulami, které využívají bílkoviny jako nosič. Můžeme tak tedy nejen odstranit nežádoucí balastní látky, ale také uvolnit cílové analyty.

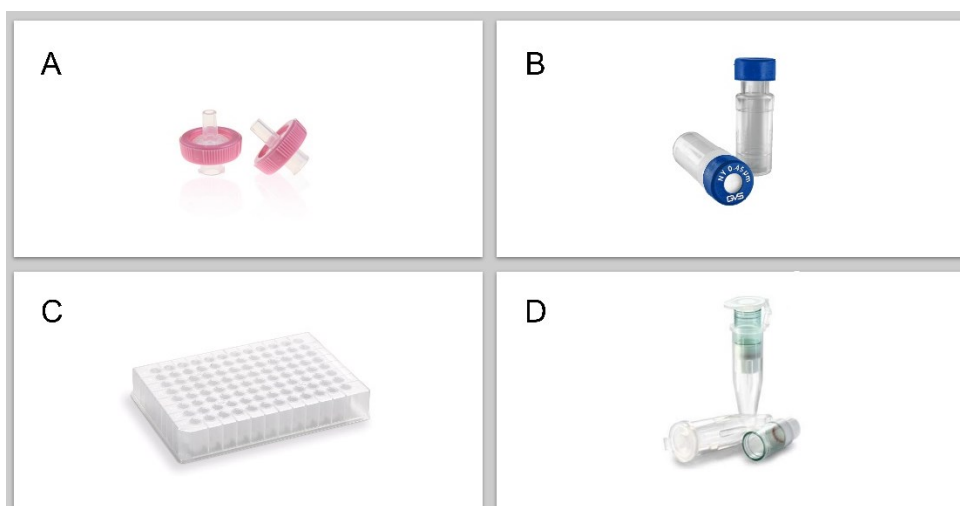
Účinnost srážení proteinů je možno ovlivnit množstvím deproteinačního činidla a jeho druhem. Při volbě objemu musíme vzít v potaz také celkové naředění vzorku [103, 103, 104].

Pro odstranění proteinů a zároveň i fosfolipidů interferujících v chromatografické analýze je možno využít i technologie kombinující tuto techniku s využitím sorbentů pro zachycení proteinů a fosfolipidů, jako druhých nejčastěji interferujících látek. Vzorek s vnitřním standardem a precipitačním činidlem je promíchán a nanesen na daný sorbent a následně pak působením vakua prochází sorbentem, který zachytí interferenty. Takto upravený „extrakt“ je možno přímo nastříknout do analytického systému. Použití takových to hybridních technologií je velmi jednoduché a rychlé. Výhodou je také jejich dobrá dostupnost na trhu [105–107].

3.3.1.3. Filtrace

Filtrace je velmi rychlým a snadným přístupem pro úpravu vzorku. Je vhodná spíše pro jednodušší biologické matrice nebo již upravené vzorky komplexnějšího materiálu. Často je řazena jako finální krok před analýzou. Během filtrace prochází vzorek přes porézní membránu, při které dochází k separaci molekul na základě jejich molekulové

hmotnosti a velikosti pórů membrány. Pro mikrofiltraci se využívají filtry s póry o velikosti 0,1-0,45 μm . Pro větší objemy vzorku v řádech jednotek mililitrů jsou vhodné stříkačkové filtry (Obr. 12 A), které jsou na trhu dostupné v různých velikostech dle filtrovaného objemu. Jejich nevýhodou je ale zadržování většího objemu vzorku ve filtru. Pro filtraci objemů do 500 μl jsou na trhu dostupné i pístové filtrační vialky (Obr. 12 B). Jejich velkou výhodou je možnost upravit vzorek v jediné vialce, kterou je možné následně vložit do autosampleru. Do vnější vialky se vzorkem se vloží píst, jehož stlačením vzorek projde membránou nahoru, čímž dojde k purifikaci vzorku. V závislosti na použitém typu se liší i množství zadrženého vzorku na dně vialky. Pro zpracování větších sérií vzorků jsou velmi praktické 96-jamkové filtrační destičky (Obr. 12 C), které jsou používány ve spojení s vakuovým manifoldem. Ultrafiltrace a centrifugační filtry (Obr. 12 D) se využívají zejména pro separaci proteinů ze vzorku. Do speciální Eppendorf zkumavky je vložen filtr pro oddělení molekul o velikosti 3-30 kDa působením odstředivé síly. Tyto filtry se mohou aplikovat dvojitým způsobem, a to pro odstranění balastních látek ze vzorku, nebo naopak zejména v proteomice se analyzované proteiny mohou takto zakoncentrovat na horní straně filtru. Dle účelu se tudíž dále zpracovává ultrafiltrát či sediment.



Obr. 12 Ukázka formátů filtrů pro mikrofiltraci a ultrafiltraci. Stříkačkové filtry (A) [108], pístová filtrační vialka (B) [109], 96-jamková filtrační destička (C) [110], centrifugační filtry (D) [111].

Všechny výše zmíněné formáty jsou komerčně dostupné v různých objemech, velikostech pórů a složení filtrační membrány. V bioanalýze je třeba zohlednit také

nehomogenitu upravované matrice. Vzorky stejného materiálu se u různých jedinců mohou velmi lišit a tím může být ovlivněna i kvalita a rychlost tohoto procesu [112].

3.3.1.4. Centrifugace

Centrifugace se řadí mezi nejčastěji používané techniky úpravy vzorku. Jejím principem je oddělení rozptýlených pevných částic od okolního média pomocí odstředivé síly. Během tohoto procesu vzniká pevný sediment částic a supernatant roztoku. Částice mohou být separovány na základě rozdílné velikosti, hmotnosti nebo dle hustoty.

Centrifugaci dělíme na analytickou a preparativní. Preparativní centrifugace se pak využívá v úpravě vzorku a dle typu separace diferenciálně nebo v hustotním gradientu. V klinické praxi se centrifugace aplikuje pro odstranění vzniklých sraženin, separaci či odstranění buněk či buněčných komponent, oddělení směsí kapalin, nebo frakcionaci makromolekul dle rozdílných hustot.

Mezi definované centrifugační podmínky patří kromě doby centrifugace a teploty také hodnota relativní odstředivé síly RCF udávána v násobcích tíhového zrychlení g . Velmi často je udávána také frekvence otáček rotoru za minutu, ke které je ale nutno doplnit informaci o poloměru rotoru. Dle centrifugační síly můžeme centrifugy dělit na nízkoobrátkové, vysokoobrátkové a ultracentrifugy. Ultracentrifugy se vyznačují možnou dosažitelnou silou až 1 000 000 g , tudíž k jejímu použití je potřeba chladícího a vakuového systému pro snížení rizika přehřátí a rovněž i třecí síly. Jejich výhodou je možnost oddělení menších částic, než je tomu u klasických centrifug. Na druhou stranu se jedná o velmi nákladná zařízení [113, 114].

Pro správné a bezpečné použití centrifug je nutno pamatovat na pečlivé vyvážení rotoru, na polohu vzorku v rotoru, odolnost materiálu použitých zkumavek/kyvet a i jejich dostatečně odolné uzavření. Velmi důležité je i pravidelné čištění a revize techniky.

3.3.1.5. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction, LLE) je založena na principu rozdělování analytů a balastních látek mezi dvě mezi sebou nemísitelná rozpouštědla. Tento typ je vhodný zejména pro méně polární a lipofilní látky. Avšak do organického

rozpouštěla mohou přecházet pouze neionizované molekuly. Klíčovým parametrem je rozpustnost analytů (ale i ostatních balastních látek) v použitých rozpouštědlech. Nejčastěji se k extrakci využívá hexan, ethyl-acetát, methyl-terc buthyl ether, chloroform a další.

Prvním krokem LLE v bioanalýze je ve většině případů precipitace proteinů. Poté jsou molekuly během třepání extrahovány do fáze, ve které jsou více rozpustné. Následně je vzorek centrifugován a ze zkumavky je odebrána organická vrstva. V závislosti na analýze je možné extrakt přímo nastříknut do systému či jej odpařit a rekonstituovat v rozpouštědle kompatibilním s analytickou metodou a systémem. Extrakt je možné v této fázi zakoncentrovat, výtěžnost lze zvýšit i vícenásobným zopakováním jednotlivých kroků extrakce. Distribuci analytu ovlivňuje mnoho proměnných, především pH, pKa a polarita analytu, ale i typ a množství použitých rozpouštědel. LLE poskytuje oproti ostatním jednodušším přístupům k úpravě vzorku mnohem čistší extrakty, výhodou je i její selektivita a instrumentální nenáročnost. Naopak nevýhodou pro rutinní praxi je pracnost, složitější automatizace, větší množství organického odpadu, nebo omezené použití pro polárnější analyty [76, 115, 116].

3.3.1.6. Extrakce na tuhou fázi

Pro selektivní úpravu vzorku a zakoncentrování stopových hladin analytu byla vyvinuta extrakce na tuhou fázi (solid-phase extraction, SPE). SPE využívá principu rozdílné afinity a interakcí cílových analytů a balastních látek se sorbentem. Protokol se skládá obvykle z několika kroků: 1.) aktivace a ekvibrace sorbentu, 2.) nanesení roztoku vzorku na kolonku a zadržení analytů na sorbentu, 3.) promytí od interferujících balastních látek a 4.) eluce analytů. Extrakt je možné přímo podrobit analýze, pokud je kompatibilní s chromatografickým systémem. Většinou však dále následuje krok odpaření elučního činidla a rozpuštění odparku v mobilní fázi, případně jeho zakoncentrování. Před samotnou SPE je vzorek většinou deproteinován, ředěn, popř. filtrován, aby nedošlo k zanesení sorbentu. SPE lze využít i v obráceném módu, volbou vhodného sorbentu tak, aby na něm byly zachyceny naopak balastní látky a analyty bez retence prošly do jímací zkumavky [116–118].

Úspěšnost extrakce na tuhou fázi ovlivňuje mnoho parametrů. K nejdůležitějším patří fyzikálně chemické vlastnosti použitého sorbentu a jeho množství. Na efektivitě extrakce se rovněž podílí typ a množství použitých rozpouštědel a aditiv, obzvláště pak při eluci. Optimalizovat můžeme i jednotlivé kroky extrakce případně lze celý proces

pro zvýšení výtěžnosti zopakovat. Jednou z výhod SPE je dostupnost široké škály sorbentů s různými chemismy, nabízených v různých formátech a velikostech. Neopomenutelná je také možnost automatizace a v neposlední řadě miniaturizace. SPE je bohužel ve své konvenční podobě spojeno s nezbytným instrumentálním vybavením, větší spotřebou rozpouštědel i vzorku a v rutinním využití potom díky celé řadě nezbytných kroků časově, finančně i manuálně značně náročné [119].

3.3.2. Moderní trendy v úpravě vzorku

Úprava vzorku se v posledních dvou desetiletích vyvíjela ve snaze o zdokonalení bioanalytických metod. Z důvodu nedostatečné účinnosti a efektivity tradičních metod se v praxi začalo aplikovat zpracování vzorku nejčastěji v 96jamkovém formátu. O zrychlení procesu, zlepšení reprodukovatelnosti či možnosti snadnějšího zpracování velkých sérií vzorku se především zasadila automatizace a robotizace metod. Bohužel automatizace některých kroků nebo kompletně technik úpravy vzorku je velmi náročná. Výzkum posledních let se snaží využít i nejmodernějších technologií, jako je například i 3D tisk či *in-vivo* odběr vzorku s následnou extrakcí [4, 120–124].

Jak již bylo zmíněno v této práci, rozšíření nabídky komerčně dostupných analytických kitů významně usnadnilo analýzu dříve zřídka rutinně sledovaných analytů. V rámci odběru a úpravy vzorku je nutno zmínit i zvyšující se trend použití metody suché kapky v rámci odběru a úpravy různých biologických matic.

V následujících částech bude věnována pozornost zejména trendům z oblasti mikroextrakce, ale i zpracování vzorku suché kapky z důvodu jejich slibné uplatnitelnosti v současné klinické praxi.

3.3.2.1. Mikroextrakce

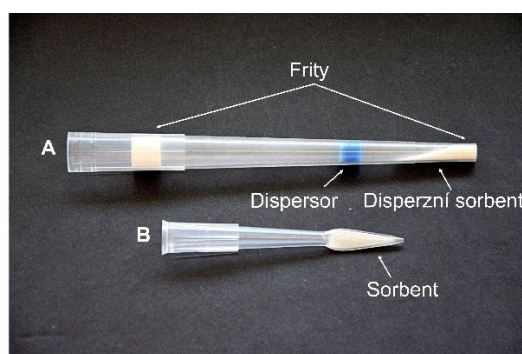
Miniaturizace úpravy vzorku je jedním z hlavních trendů současnosti. Stejně jako dochází ke zmenšování přístrojové techniky, je pozornost věnována také snižování množství toxických rozpouštědel a v neposlední řadě i objemu vzorku.

Tyto nové moderní techniky vychází z konvenčních postupů jako LLE a SPE. Do skupiny mikroextrakcí založených na LLE řadíme například mikroextrakci z kapaliny do kapaliny (LLME, liquid-liquid microextraction), extrakci do jediné kapky rozpouštědla (SDME, single-drop microextraction), extrakci v kapalně fázi za použití dutého vlákna

(HF LPME, hollow-fiber liquid-phase microextraction), disperzní mikroextrakci z kapaliny do kapaliny (DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction) a další. Kromě základního principu miniaturizace, jako je nízká spotřeba vzorku i rozpouštědel a v mnoha případech i jednoduchého způsobu zakoncentrování, trpí tyto techniky řadou komplikací, zejména pro rutinní využití. Jedná se především o dlouhou dobu extrakce (SDME, DLLME), složitější způsob automatizace (LLME, SDME) a nevhodnost aplikovat daný postup na větší sérii vzorků (HF LPME, SDME) [100, 125].

Mezi miniaturizované SPE můžeme zařadit například mikroextrakci na tuhou fázi (SPME, solid-phase extraction) a její kapilární formu pro on-line extrakci (in-tube SPME), mikroextrakci pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS, microextraction by packed sorbent) nebo tenké vrstvy (TFME, thin-film microextraction), mikroextrakci pomocí plněných pipetovacích špiček (μ -SPE-PT, micro-solid-phase extraction pipette tips) a její disperzní formu (DPX, dispersive micro-solid-phase extraction pipette tips), sorpční extrakci míchadlem (SBSE, stir bar sorptive extraction) a mnoho dalších moderních technik. Jejich hlavními výhodami jsou ve většině případů možnost využití jednodušší instrumentace, automatizace, značné zrychlení extrakce a celá řada nabízených chemismů (DPX, μ -SPE-PT, MEPS). Jelikož se jedná o relativně nové možnosti úpravy vzorku, jejich využití v rutinní praxi je stále finančně náročné [99, 126–128].

Podrobnější informace o použití mikroextrakce na tuhou fázi, zejména aplikace μ -SPE-PT a DPX (Obr. 13) se zaměřením na klinickou a forenzní toxikologii je možné získat v přehledovém článku publikovaném Turoňovou a kol. [117].



Obr. 13 Příklady komerčních mikroextrakčních špiček DPX (A) a μ -SPE-PT (B)

3.3.2.2. Úprava vzorku suché kapky krve

Nejčastěji je DBS eluována a extrahována z karty v offline módu. Po vyražení jednoho nebo více terčů z karty je DBS ve zkumavkách či v 96jamkových deskách extrahovaná organickým rozpouštědlem (např. acetonitrilem, methanolem, isopropanolem, ethyl-acetátem aj.) nebo kombinací vodně-organického roztoku a to buď jednoduchou elucí nebo častěji za pomoci vortexu. Zvýšení výtěžnosti je možné dosáhnout extrakcí za pomoci ultrazvuku či mikrovlnné trouby [129–132]. Hydratací suché matrice vodou s další úpravou vzorku či obecně použitím extrakčních směsí s vysokým podílem vody může také dojít ke zlepšení extrakční účinnosti některých analytů, ale především dochází k uvolnění komponentů z matrice jako jsou extrakt zbarvující hemoglobin či jiné proteiny, které zvyšují matricové efekty. Proto další přečištění extraktu je nezbytné a pro tento účel můžeme zvolit srážení proteinů, extrakci na tuhou fázi či z kapaliny do kapaliny nebo mikroextrakci a jiné techniky [95, 131, 132]. Častým finálním krokem před nastříknutím extraktu je centrifugace nebo i prekoncentrace vzorku. Automatizací postupu lze eluci a extrakci provádět i v on-line módu.

3.3.3. Derivatizace

3.3.3.1. Úvod do problematiky derivatizace

Derivatizace je jednou z možností úpravy analytu ve vzorku, pokud chceme změnit jeho fyzikálně chemické vlastnosti. Hlavními důvody jsou:

1. zachycení na stacionární fázi a následná separace ze vzorku během extrakce, nebo vlastní analýzy
2. možnost selektivní detekce a tím zvýšení citlivosti stanovení
3. zvýšení stability analytů

Pomocí derivatizace lze změnit celou řadu vlastností, jako je polarita, velikost molekuly, lipofilita, zavedení chromoforu nebo fluoroforu, či zvýšit schopnost ionizace apod. [133–136].

Obecně podle zařazení tohoto kroku do metody lze derivatizaci rozdělit na:

1. předkolonovou (ke změně molekuly dochází před kolonou a výsledný derivát je následně separován na zvolené stacionární fázi)
2. postkolonovou (struktura analytu je změněna až po separaci analytu za kolonou a derivát s novými vlastnostmi je selektivně detekován)
3. derivatizaci na koloně (chemická reakce a změna struktury analytu probíhá přímo v koloně – téměř se ale nevyužívá).

Derivatizaci před kolonou je možné provádět v off-line i on-line zapojení, zatímco postkolonový způsob je ve většině případů on-line.

Předkolonová derivatizace

Pro zařazení předkolonové derivatizace do analýzy by měly být splněny následující podmínky. Průběh reakce a jeho produkt by měl být dobře znám, reakce by měla probíhat rychle za vhodných podmínek, kvantitativně a opakovatelně. Zároveň by měla být selektivní, bez vzniku vedlejších produktů, vzniklý derivát musí být stabilní.

V praxi je hlavním benefitem nenáročnost na instrumentální vybavení. Pro velké série vzorků může být tento způsob derivatizace velmi zdoluhavý i když jsou dodrženy všechny výše zmíněné požadavky. Zároveň mohou interference z matrice ovlivnit selektivitu reakce [136–138].

Postkolonová derivatizace

Nároky kladené na postkolonovou derivatizaci se od předkolonového formátu značně liší. Derivatizační reakce musí být rychlá a reprodukovatelná, produkty reakce nemusí být velmi stabilní, derivatizační činidlo by nemělo vyvolat žádnou odpověď detektoru, velikost reaktoru by měla být co nejmenší pro minimalizaci naředění analytů a rozmývání píků.

Hlavní výhodou je vyšší selektivita tohoto postupu díky předcházející separaci na koloně. Současně jsou detekovány analyty, které prošly derivatizací i ty, které v rámci reakce neinteragovaly. Jelikož celý proces probíhá on-line, je redukován faktor lidské chyby. Naopak nevýhodou této metodiky pro použití v rutinní praxi je nutné použití poměrně finančně náročné instrumentace. Celý proces derivatizace probíhá v reaktoru umístěném mezi kolonou a detektorem. Kromě reaktoru je nutné zapojení další pumpy.

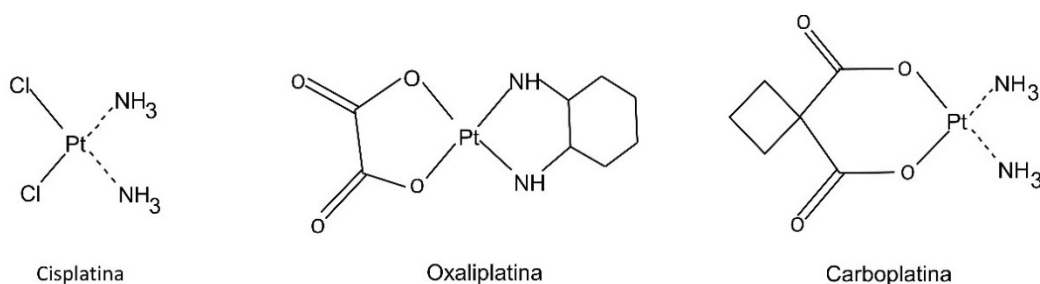
Také velké reakční smyčky snižují účinnost separace a dochází i ke snížení citlivosti metody naředěním derivatizačním činidlem. Navíc jsou používány větší množství reagensů [12, 136, 139].

Jedním z cílů této práce bylo prozkoumat přístup předkolonové derivatizace pro stanovení platinových cytostatik v různých druzích biologických materiálů a zhodnotit vhodnost jeho použití v rutinní praxi. Tomuto tématu se bude práce věnovat v následující části.

3.3.3.2. Derivatizace a stanovení platiny v bioanalýze – přehled

Význam stanovení chemoterapeutik na bázi platiny

Kvantifikace platinových léčiv je klíčová především během systémové léčby rakoviny. Protinádorová aktivita cisplatiny byla prokázána před více než čtyřiceti lety a stále je základem systémové léčby v oblasti maligních nádorů, včetně germinálních nádorů vaječníků, plic a karcinomů hlavy a krku. Vzhledem k výskytu vážných vedlejších účinků po podání cisplatiny, zejména nefrotoxicity, byla vyvíjena další léčiva na bázi platiny, jako je karboplatina a oxaliplatina, které jsou současné době široce využívány. Chemické struktury těchto sloučenin jsou znázorněny níže (Obr. 14). Pro klinické účely byly v některých asijských zemích schváleny i nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina [140, 141].



Obr. 14 Chemické struktury platinových derivátů

Léčba platinovými deriváty je spjatá s akutními i chronickými vedlejšími účinky, včetně nevolnosti a zvracení, bolesti břicha a průjmu, hlavně ale nefrotoxicity, hepatotoxicity,

ototoxicity, neuropatie, gastrointestinální toxicity a suprese kostní dřeně, které mohou být závažné nebo i život ohrožující. Pro cisplatinu je dávkou limitující toxicita spjatá s nefrotoxicitou, pro oxaliplatinu s neurotoxicitou a pro karboplatinu s myelosupresí [141–143]. V důsledku toho je stanovení platinových léčiv zásadní pro účely terapeutického monitorování, ale také ve vývoji nových přípravků a nových léčebných režimů [144].

Přístupy ke stanovení různých forem platinových cytostatik

Mechanismus účinku platinových léčiv je velmi složitý a v mnoha ohledech stále není objasněn. Je známo, že cisplatina vyvíjí svou antineoplastickou aktivitu vazbou na DNA, vytvářením crosslinku a spuštěním buněčné apoptózy [141, 145–147]. Po podání platina v organismu snadno a rychle prochází neenzymatickou biotransformací, jejíž produkty byly zkoumány pro lepší pochopení účinku a toxicity těchto látek. Nicméně produkty biotransformace mohou mít rozdílné vlastnosti. Nevázaná, intaktní platina představuje aktivní formu cytostatika a má toxické účinky [144, 148]. Během hydrolyzy je ale platina z části transformována a vytváří mono- či dihydratované komplexy, které jsou taktéž aktivními, čili toxickými formami [149–152]. Nicméně tyto komplexy jsou ve vodném prostředí nestabilní a podle Xie a kol. je jejich spolehlivá kvantifikace náročná, nebo spíše nemožná kvůli nedostupnému standardu s přesným množstvím monohydratovaných komplexů [148, 153]. Intaktní cisplatina a monohydratované formy ztrácí svou aktivitu během biotransformace vazbou z velké části na bílkoviny, zejména albumin, glutathion, methionin a nukleotidy, čímž ztrácí i svůj toxický účinek [148, 154, 155]. Podobně oxaliplatinu interaguje s endogenními sloučeninami s vysokou a nízkou molekulovou hmotností [156].

Platinová cytostatika mohou být kvantifikována mnohými způsoby. V bioanalytické praxi se vyskytují tři nejčastější: 1) analýza celkové platiny (celkové množství kovu, neselektivní přístup), 2) analýza intaktní formy cytostatik a 3) analýza platinových-DNA adduktů [144].

Analýza platinových derivátů biologickém materiálu a problematika chromatografického stanovení platiny-rešerše metod

Metody pro stanovení platinových cytostatik často využívají hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plasmatem (ICP-MS) [154, 157–160] či různé varianty atomové

absorpční spektrometrie [161–163]. V praxi zůstává metodou volby pro stanovení celkové platiny právě ICP-MS, a to z důvodu citlivosti této instrumentace. Ta se většinou používá samostatně jako hlavní technika, nebo v kombinaci s kapalinovou chromatografií jako způsob detekce [148, 164]. Selektivita těchto metod avšak závisí na zvoleném způsobu separace, ale rovněž i na úpravě vzorku, která může být časově velmi náročná [148, 154, 157, 164, 165].

V současné době jsou nejvíce selektivními metodami pro stanovení cisplatiny a oxaliplatiny HILIC-MS/MS [148, 166] a také HILIC-ICP-MS pro analýzu oxaliplatiny, kdy HILIC separace pomáhá zvyšovat selektivitu metody a MS/MS či ICP-MS zajišťuje vysokou citlivost instrumentace. Separace spíše polárních komplexů je obtížným aspektem LC analýzy platinových chemoterapeutik pro kterou lze využít separace na normální fázi [144] a HILIC [148, 157, 166]. Zhang et al. [165] pro stanovení oxaliplatiny publikoval protokol využívající separace na reverzní fázi. Ačkoli byla prokázána efektivita MS detekce, během analýzy cisplatiny čelíme problému s nastavením MS přechodů, jelikož cisplatina nepodléhá přímé ionizaci [144]. Tato skutečnost je doložena online publikovanými spektry v databázi lidského metabolomu [167]. Xie et al. [148] aplikovali pro analýzu cisplatiny LC-MS/MS v MRM módu přechod 318,1 > 265,0. Důvodem nastavení tohoto přechodu byl pravděpodobně výskyt $[M+NH_4]^+$ iontů ve spektru. Podobný přístup s použitím $[M+NH_4]^+$ iontů pro detekci byl také použit i Arenas et al. [168], kteří rovněž pozorovali nízkou míru fragmentace cisplatiny.

Derivatizace v analýze platinových chemoterapeutik

HPLC ve spojení s DAD je v současné době jedním z nejběžnějších přístrojů bioanalytických laboratoří. Jednou z výzev stanovení cisplatiny pomocí kapalinové chromatografie spojené s UV detekcí je její špatná absorpce UV. Pro její zvýšení byla v minulosti pro před- a postkolonovou derivatizaci použita různá činidla jako např. diethyldithiokarbamat sodný (DDTC) [27,32–35], 2-acetylpyridinyl-4-fenyl-3-thiosemikarbazon [36], 4-methyl-2-thioouracil [37], 4-karboxylfenyl-thiorhodanin [38] nebo 5- (2-hydroxy-5-nitrofenylazo) thiorhodanin [39].

Derivatizace využívající DDTC nabízí pro analýzu platiny několik výhod, neboť zlepšuje detekci konjugátu platiny-DDTC, ale i zvyšuje jeho retenci na reverzní fázi. Více selektivní je však aplikace DDTC v postkolonovém formátu. Tento postup však

vyžaduje použití speciálního reaktoru pro derivatizaci, který je ovšem v rutinních laboratořích zřídka dostupný a celý proces je náročný i pro operátora [40,41].

Předkolonová derivatizace s DDTC umožňuje pohodlnější separaci stabilních derivátů platinových sloučenin na C18 reverzní fázi. Použití DDTC pro kvantifikaci platinových léčiv vyžaduje zohlednění několika parametrů. Pro použití v praxi je rozhodující dostupnost a výkonnost přístrojového vybavení, jakož i finanční zátěž analýzy. Pro účely terapeutického monitorování léčiv je na základě distribuce platinových léčiv v organismu pro analýzu voleno několik biologických matric. Cílem naší práce bylo specifikovat vliv různých biologických matric na HPLC-DAD kvantifikaci celkové a na bílkoviny nenavázané cisplatiny a oxaliplatiny za použití instrumentálně nenáročných, jednoduchých a levných metod. Výsledky našich experimentů budou podrobněji diskutovány v komentáři k publikované práci a také v samotném manuskriptu.

4. KOMENTÁŘE K PUBLIKOVANÝM VÝSTUPŮM SOUVISEJÍCÍCH S DISERTAČNÍ PRACÍ

4.1. Rešeršní práce: Využití mikroextrakce v pipetovacích špičkách v klinické a forenzní toxikologii

Příloha 1: Application of microextraction in pipette tips in clinical and forensic toxicology

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, František Švec

Trends in Analytical Chemistry (2021), 143, 116404

Impakt faktor (IF₂₀₂₁): 14,908 (D1), Article Influence Score (AIS₂₀₂₁): 1,976 (D1)

4.1.1. Úvod

Klinická a forenzní analytická toxikologie se zaměřuje na detekci, identifikaci a kvantifikaci léčiv, alkoholu, kontrolovaných nebo zakázaných látek a jedů v biologických a dalších materiálech. Biologické matrice obsahují širokou škálu složek, včetně solí, proteinů, lipidů, lipoproteinů, buněk a dalších kontaminantů, které mohou být přítomny ve vyšších koncentracích než cílové analyty. Velmi často je k dispozici jen omezené množství vzorku, který je nutno dále upravit, pro zajištění kompatibility s analytickou koncovkou a současně dosažení vysoké citlivosti metody, která umožní detekci cílových analytů i v stopových množstvích. Vzhledem k charakteru forenzní toxikologie a jejím právním důsledkům je zásadní zabezpečit spolehlivost používaných metodik a tím i prezentovaných výsledků [99, 100, 169, 170].

Rešeršní práce je rozdělena do několika podkapitol. V úvodní části je diskutována důležitost úpravy vzorku, zefektivnění této úpravy pro rutinní praxi a také podstata mikroextrakce ve formátu pipetovacích špiček. Publikace dále obsahuje přehled komerčně dostupných špiček, včetně informací o výrobcích, formátech, chemismu sorbentů a jejich kapacitách. Dále jsou popsány i nové stacionární fáze vyvíjené v laboratořích, které se snaží efektivněji extrahovat cílové analyty.

4.1.2. μ -SPE-PT a DPX

Pro úpravu vzorku ve výzkumu je v řadě případů využívána konvenční extrakce na pevnou fázi, která umožňuje dosáhnout vysokých výtěžností a významně přispívá ke

snížení maticových efektů. Nicméně rutinních laboratořích tuto techniku nalezneme jen zřídka z důvodu časové náročnosti a vysokých finančních nákladů. Současné trendy v oblasti úpravy vzorku směřují k miniaturizaci, zrychlení celého procesu, automatizaci a levnému zpracování většího počtu vzorků s důrazem na šetrnost k životnímu prostředí. Jednou z možností, která tyto požadavky splňuje, je využití mikroextrakčních špiček μ -SPE-PT a DPX. Tyto špičky se vyznačují jednoduchým použitím, které obvykle zahrnuje opakovanou aspiraci a vypouštění vzorku přes sorbent umístěný ve špičce. Díky svým výhodám tak jeví velký potenciál pro uplatnění v rutinní praxi.

Pro úpravu vzorku výzkum často využívá konvenční extrakci na pevnou fázi, která umožňuje dosáhnout vysokých výtěžností a snížit maticové efekty. Nicméně tato metoda je v rutinních laboratořích zřídka používaná z důvodu časové náročnosti a finančních nákladů. Současné trendy v oblasti úpravy vzorku směřují k miniaturizaci, zrychlení celého procesu, automatizaci a levnému zpracování většího počtu vzorků s důrazem na šetrnost k životnímu prostředí. Jednou z možností, která tyto požadavky splňuje, je využití mikroextrakčních špiček μ -SPE-PT a DPX. Tyto špičky se vyznačují jednoduchým použitím, které obvykle zahrnuje opakovanou aspiraci a vypouštění vzorku skrz sorbent umístěný ve špičce. Díky svým výhodám tak jeví velký potenciál pro uplatnění v rutinní praxi.

4.1.3. Aplikace mikroextrakčních špiček v klinické a forenzní toxikologii

V publikaci se dále věnujeme aplikaci mikroextrakčních špiček v oblasti klinické a forenzní toxikologie se zaměřením na skupinu psychoaktivních látek (rozděleno na kanabinoidy a ostatních psychoaktivní látky), psychofarmaceutika, toxické látky přírodního původu a polutanty. Jsou zde hodnoceny výhody a nevýhody procesu úpravy vzorku, a to především z hlediska jeho rychlosti a složitosti s důrazem na zhodnocení praktičnosti postupu. Porovnávána je náročnost předúpravy vzorku, způsob extrakce, aplikace či eliminace jednotlivých kroků μ -SPE-PT a DPX extrakce, počet potřebných cyklů aspirace a vypouštění vzorku přes špičku, zařazení dalších kroků úpravy vzorku, druh a použitý objem matrice z pohledu zatížení pacienta, množství použitých rozpouštědel, zařazení automatizace, aplikace vnitřního standardu, výtěžnost a citlivost výsledné metody a další parametry.

4.1.4. Závěr

Hlavním cílem této práce je upozornění na důležitost přepracování starých konvenčních postupů a jejich nahrazení novými, účinnějšími technikami.

μ -SPE-PT a DPX špičky jsou opravdu slibnými nástroji pro předúpravu různých druhů biologického materiálu. Podstata jejich použití se shoduje s požadavky praxe. V rutinních laboratořích je důraz kladen zejména na výkonnost metodik, automatizaci, malý objem vzorku, dobu, za kterou se výsledky získají, náročnost z hlediska nákladů a zejména komfort pacienta. Aplikací μ -SPE-PT nebo DPX je umožněno zkrátit proces extrakce dokonce až na 1 minutu. Kromě úspory času je dalším důležitým aspektem schopnost eliminovat lidský faktor pomocí automatických pipetovacích systémů nebo jednoduše použitím vícekanálových automatických pipet. Implementace nových postupů do rutinní praxe se značně liší od jejich použití na poli výzkumu. Protokoly musí být co nejjednodušší, všechny potřebné nástroje musí být komerčně dostupné a měly by být univerzální. I když jsou vlastnoručně připravené mikroextrakční špičky obvykle levnější než špičky dostupné na trhu, pro rutinní praxi je bohužel nemožné vyrábět vlastní sorbenty a špičky bez narušení laboratorního pracovního procesu. Pokud jde o design μ -SPE-PT a DPX, s miniaturizací se snižuje množství sorbentu, tím i jeho kapacita, což je významný fakt, se kterým je nutno při vývoji metody počítat. Bylo zjištěno, že velký vliv na výtěžnost má i počet cyklů nasátí/vypouštění vzorku přes špičku. Účinnost DPX silně ovlivňuje i doba ekvilibrace po aspiraci vzorku. Ve většině případů je nutné vzorek před extrakcí jednoduše předem upravit dle povahy biologického materiálu protein precipitací, nebo naředěním, aby nedošlo k zanesení špičky při extrakci cílových látek. V případě μ -SPE-PT pomáhají tento problém překonat i monolitické sorbenty, jejichž struktura umožňuje lepší průtok vzorku sorbentem ve srovnání s plněnými špičkami s větší hustotou sorbentu. Přes veškerý potenciál mikroextrakčních špiček pro klinickou a forenzní toxikologii, většina publikovaných prací aplikuje jejich metodiku na limitovaný počet vzorků a zatím pouze jedna práce odkazuje na jejich použití v rutinní praxi [171].

Sepsání této práce napomohlo rozšíření znalostí autorky v oblasti úpravy vzorku, které byly využity v experimentální práci v laboratoři i během přípravy grantové přihlášky.

4.2. Použití HPLC pro stanovení platinových léčiv v biologických matricích po derivatizaci diethyldithiokarbamátem

Příloha 2: Using HPLC for the determination of platinum drugs in biological matrixes after derivatization with diethyldithiocarbamate

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, Milan Vošmik, Bohuslav Melichar, František Švec

Journal of Separation Science (2023), doi: 10.1002/jssc.202300392 (v tisku)

Impakt faktor (IF₂₀₂₂): 3,1 (Q2), Article Influence Score (AIS₂₀₂₂): 0,371 (Q3)

4.2.1. Úvod a cíl

Kvantifikace platinových léčiv je klíčová během systematické léčby nádorových onemocnění. Jako každé chemoterapeutikum, je i aplikace cisplatinu spjata s častým výskytem nežádoucích účinků. Z toho důvodu byly vyvíjeny i další deriváty jako je oxaliplatinu nebo karboplatinu. Bohužel všechna tato léčiva mají své nežádoucí účinky. Pro cisplatinu je tou limitující nefrotoxicita, pro oxaliplatinu neurotoxicita a pro karboplatinu myelosuprese [141, 142]. Platinová chemoterapeutika je nezbytné analyzovat nejen pro účely terapeutického monitorování lékových hladin, ale i v rámci vývoje nových léčiv a terapeutických postupů [144].

Pro zjednodušení analýzy polárních látek na bázi platiny, tedy pro zvýšení retence na reverzní fázi, ale i zvýšení absorpce látky během detekce, jsme použili protokol, který je vhodný pro stanovení různých platinových chemoterapeutik. Aplikací diethyldithiokarbamátu (DDTC), které je silným chelatačním činidlem, dochází k odstranění všech ligandů z léčiva za tvorby jednotného komplexu Pt-(DDTC)₂ a Pt-(DDTC)₃ [144]. Přestože je předkolonová derivatizace méně selektivní než její postkolonová verze, představuje jednoduchý, rychlý a univerzální přístup ke stanovení platinových léčiv pomocí HPLC-UV na reverzní fázi. Jednou z jejích hlavních výhod je, že umožňuje cenově dostupnější analýzu pomocí UV detekce bez nutnosti dalšího špičkového přístrojového vybavení, jako je hmotnostní detektor.

Tato práce poukazuje na výzvy a problémy spojené s předkolonovou derivatizací pomocí DDTC a je diskutována vhodnost tohoto přístupu pro stanovení platinových derivátů v různých biologických matricích v rutinní praxi. Během testování biologických matricí jsme zaznamenali rozdílné chování platinových léků, zejména v moči, kde jsme pozorovali nekonzistentní výsledky pro jednotlivé vzorky. S ohledem na tyto výzvy bylo

hlavním cílem práce vyvinout a optimalizovat HPLC metodu ve spojení s derivatizací pomocí DDTC, která by umožnila dosažení konzistentních výsledků ve vzorcích několika biomatric a která by byla robustní i vzhledem k vlivu variability biologické matrice pacienta.

4.2.2. Výsledky a diskuze

4.2.2.1. Vzorky matric

Krev a moč byly poskytnuty zdravými dobrovolníky z řad laboratorního personálu. Peritoneální tekutina byla odebrána během operace od pacientů, kteří nebyli dříve léčeni platinovými léky. Vzorky moči a krve obsahující platinu byly odebrány od pacientů podstupujících intravenózní chemoterapií ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FNHK). Plasma a peritoneální laváž byly odebrány od pacientů léčených hypertermickou intraperitoneální chemoterapií ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL). Protokol studie byl schválen institucionálními etickými komisemi EK FNOL 118/17 (FNOL) a 202303 P01 (FNHK). Všichni zúčastnění pacienti a dobrovolníci podepsali i informovaný souhlas a souhlas se zpracováním osobních údajů.

Krev byla odebírána do zkumavek s K₃EDTA. Plasma byla oddělena od plné krve centrifugací (2000 g, 10 min, 4 °C). Plasmatický ultrafiltrát byl získán ihned po oddělení plasmy ultrafiltrací plasmy přes centrifugační filtr Microcon 10 kDa (21 380 g, 40 min, 4 °C). Vzorky byly před analýzou uchovávány při -84 °C.

4.2.2.2. Úprava vzorku před analýzou

Pro ochranu vzorků před rozkladem analytů způsobeným expozicí dennímu světlu byla provedena opatření na minimalizaci jejich vystavení světlu během experimentů.

Stanovení celkového obsahu cisplatinu a oxaliplatinu v plasmě

Na začátku bylo ke 100 µl plasmy přidáno 10 µl vnitřního standardu a 25 µl DDTC. Směs byla derivatizována po dobu 10 min v termobloku při 45 °C. Následně bylo přidáno 200 µl acetonitrilu, tím byla derivatizační reakce zastavena, vzorek byl intenzivně protřepán na vortexu a centrifugován (21 380 g, 5 min, 20 °C). Nakonec byl supernatant opatrně promíchán a pipetován do 96jamkových destiček.

Oxaliplatina nevyžadovala derivatizaci při vyšší teplotě. Po přidání 10 µl vnitřního standardu a DDTC do plasmy byl vzorek okamžitě vysrážen acetonitrem. Zbytek přípravy vzorku zůstal stejný.

Stanovení celkové cisplatiny a oxaliplatiny v peritoneální laváži

Úprava peritoneální laváže byla podobná jako u plasmy s výjimkou 50násobného zředění na začátku procesu 0,9% fyziologickým roztokem v případě cisplatiny a ultračistou vodou v případě oxaliplatiny. Následné zpracování 100 µl naředěného vzorku bylo stejné jako u plasmy.

Stanovení celkové cisplatiny a oxaliplatiny v plasmatickém ultrafiltrátu

Před zamrazením vzorku před analýzou, 200 µl plasmy bylo pipetováno do centrifugačního filtru Microcon 10 kDa a filtrováno při 21 380 g, 40 min, 4 °C. Po rozmrazení bylo k 100 µl ultrafiltrátu přidáno 10 µl vnitřního standardu. Následné zpracování vzorku bylo stejné jako u plasmy.

Stanovení celkové cisplatiny a oxaliplatiny v moči

Vzorky moči byly zpracovány podobně jako vzorky plasmy s výjimkou počátečního desetinásobného ředění roztokem K₃EDTA 2 g/l. Pro oxaliplatinu bylo použito 100násobné ředění. Zpracování vzorku 100 µl zředěné moči pak bylo shodné se zpracováním vzorku plasmy.

4.2.2.3. Chromatografické podmínky

Pro účely vysokoúčinné chromatografie byl použit systém HPLC Prominence LC-20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) zahrnující degaser, dvě pumpy, autosampler, kolonový termostat, DAD (SPD-M20A). Pro separaci platinových derivátů byla zvolena core-shell kolona Meteoric Core C18 (100 × 4,6 mm, 2,6 µm, velikost pórů 8 nm, YMC, Kyoto, Japonsko), v kombinaci s předkolonou Security Guard ULTRA F5 (10 × 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), které byly temperované na 37 °C. Finální mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a ultračisté milliQ vody v poměru 70:30. Analyty byly eluovány izokraticky při průtoku 1 ml/min. Nástřikový objem vzorku na kolonu byl 10 µl a to z 96jamkové destičky. Teplota rackchangeru byla nastavena na 10 °C. Analyty byly detekovány pomocí DAD detektoru při 254 nm.

Ve vzorcích moči byl rovněž analyzován kreatinin a to mírně modifikovanou metodou, kterou pro použití na sérum publikoval kolektiv autorů z Výzkumné laboratoře

FNHK [172]. Po centrifugaci moči po dobu 45 s bylo 100 µl vzorku zředěno 1000 µl mobilní fáze a poté byl pomocí filtrační desky zfiltrován. Separace bylo dosaženo pomocí High Resolution C18 hybridní monolitické kolony 150 × 4,6 mm za použití izokratické eluce při průtoku 2,5 ml/min (0-2 min) a 3 ml/min (2-8 min). Jako mobilní fáze byl použit 15 mmol/l fosfátový pufr upravený na pH 6,45. Kreatinin byl detekován při 235 nm pomocí PDA detektoru.

4.2.2.4. Vývoj úpravy vzorku pro jednotlivé biologické matrice

V rámci experimentů byla zkoumána metodika využívající DDTC pro předkolonovou derivatizaci jako jednoduchý, rychlý, univerzální a levnější postup pro HPLC stanovení platinových léčiv v různých lidských matricích, který by poskytoval spolehlivé výsledky, protože dle našich dříve získaných dat bylo zjištěno, že právě matricové efekty a variabilita matrice jednotlivých pacientů způsobuje závažný problém vedoucí k nespolehlivým výsledkům, který dosud nebyl v literatuře diskutován.

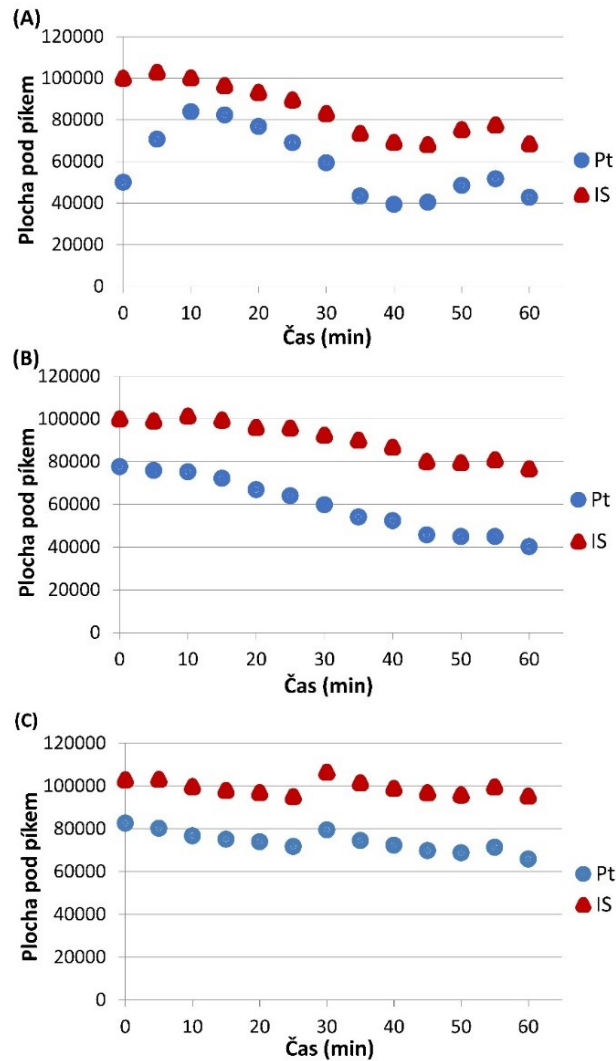
Plasma

Protokol pro úpravu vzorku byl inspirován již publikovanými pracemi [173–175], který jsme ale museli modifikovat.

Během počátečních experimentů byl jako vnitřní standard použit NiCl₂ [173, 176], který byl nahrazen PdCl₂ kvůli koeluuující interferenci.

Dalším optimalizovaným parametrem bylo množství DDTC k derivatizaci. Z testovaného rozmezí 1-10% DDTC v 0,1 M NaOH bylo nejlepších výsledků dosaženo s 5% DDTC.

Jedním z nejdůležitějších faktorů však byla délka a teplota derivatizační reakce. Nesprávně nastavené podmínky vedly k nestabilnímu extraktu. V takovém případě byl pozorován nárůst plochy pod píkem platiny až o 28 % během reanalýzy po 2 a 15 h oproti výslednému extraktu. Dříve publikované práce prováděly derivatizaci při teplotě 37-60 °C po dobu 10-60 minut [164, 168, 173–178]. My jsme prováděli experiment při 20, 40 a 45 °C, kdy největší plochy pod píkem bylo pro cisplatinu dosaženo po 10 minutách při 45 °C (Obr. 15 A). Oxaliplatinu avšak nevyžadovala zvýšenou teplotu a plochy pod píkem bylo dosaženo při okamžitém přidání acetonitrilu po přidání DDTC (Obr. 15 B a C).



Obr. 15 (A) Doba derivatizace cisplatin v plasmě při 45 °C. Nejlepší plocha píku cisplatin byla získána při reakci po dobu 10 minut. (B) Doba derivatizace oxaliplatin v plasmě při 45 °C. Nejvyšší plocha píku oxaliplatin byla získána, když byla derivatizační reakce zastavena ihned po přidání DDTC do vzorku (čas 0). (C) Doba derivatizace oxaliplatin v plasmě při 20 °C. Nižší teplota 20 °C během derivatizační reakce ve srovnání s experimentem při 45 °C vedla k menšímu poklesu plochy píku oxaliplatin s časem. Nejúčinnější protokol byl získán v čase 0.

Pro výtěžnost byl velmi ovlivňujícím aspektem rovněž i správný výběr typu a množství použitého precipitačního činidla pro pročištění vzorku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s přidavkem čistého acetonitrilu. Vyšších výtěžků a stabilnějších extraktů

bylo zajištěno centrifugací vzorku při 20 °C místo 4 °C. Díky veškeré optimalizaci dosahovala výtěžnost cisplatin 97,2 % a oxaliplatin 92,4 %. Citlivost metody, resp. LLOQ dosáhla v případě cisplatin i oxaliplatin 20 ng/ml.

V mnoha publikacích rovněž zařadili LLE do úpravy vzorku pro zajištění vyšší citlivosti metody [164, 174, 176]. V našem případě jsme však v chromatogramu pozorovali více interferencí.

Plasmatický ultrafiltrát

Pro rozlišení celkové platiny od na bílkoviny nevázané formy byl pro analýzu použit plasmatický ultrafiltrát (PUF). Ten neobsahuje vysokomolekulární komponenty plasmy na které by se platina navázala a tím dochází k omezení její přeměny na neaktivní formu. V minulosti pro separaci PUF z plasmy byly použity centrifugační filtry s různou velikostí pórů membrány [164, 176, 178, 179]. Nicméně bylo prokázáno, že membrána s póry 3 a 30 kDa neovlivňuje kvalitu vzorku [180]. V naší studii byla aplikována membrána s cut-off 10 kDa. Kvůli viskozitě plasmy bylo ovšem obtížné získat dostatečný objem ultrafiltrátu potřebný pro analýzu. Tudíž 200 µL plasmy bylo použito pro ultrafiltraci. Lepšího výtěžku bylo dosaženo bez aktivace filtru. Ultrafiltrát byl poté zpracován klasickým způsobem jako plasma. Přídavek acetonitrilu ke vzorku způsobil dvojnásobný nárůst plochy pod píkem oproti postupu bez jeho přidání. V rámci optimalizace bylo testováno i zařazení LLE do úpravy vzorku. Bohužel tento krok pročištění vzorku nezajistil signifikantnější výtěžnost oproti prostému přidání acetonitrilu, proto jsme raději ponechali extrakci jednodušší bez LLE.

Některé publikace nahradily centrifugační filtry prostým vysrážením proteinů [174, 181]. Bohužel během našich experimentů s různými precipitačními rozpouštědly a přístupy jsme nebyli schopni dosáhnout robustního výsledku.

Bohužel analýza platiny v PUF po derivatizaci s DDTC nemusí dosáhnout úplné selektivity daného postupu, neboť malé molekuly např. methioninu a glutathionu, které projdou filtrem, vyvazují platinu a následně také reagují s DDTC, mohou být v ultrafiltrátu rovněž přítomny. Tudíž se jedná o celkový obsah platiny a ne čistě její volnou formu [148].

Peritoneální laváž

V publikovaných protokolech je možné pozorovat dva typy stanovení platinových léčiv a to analýzu celkové platiny 1) v laváži [154, 182] nebo 2) v ultrafiltrátu peritoneální laváže [162, 183, 184]. V našem případě jsme se rozhodli pro analýzu platiny přímo v laváži. Při kvantifikaci z peritoneální laváže pocházející od pacientů podstupující intraperitoneální chemoterapii čelíme dvěma výzvám: 1) vysoké koncentraci platinového derivátu oproti plasmě a 2) velmi složité matici [85]. Při použití standardního postupu jako v případě plasmy jsme získali velmi nečisté extrakty ovšem intenzivně zbarvené hemoglobinem. Řešením pro jeho eliminaci i snížení maticového efektu způsobujícího nahodilost výsledků analyzovaných hladin bylo 50násobné zředění laváže fyziologickým roztokem v případě cisplatiny a ultračisté milliQ vody v případě oxaliplatiny.

Moč

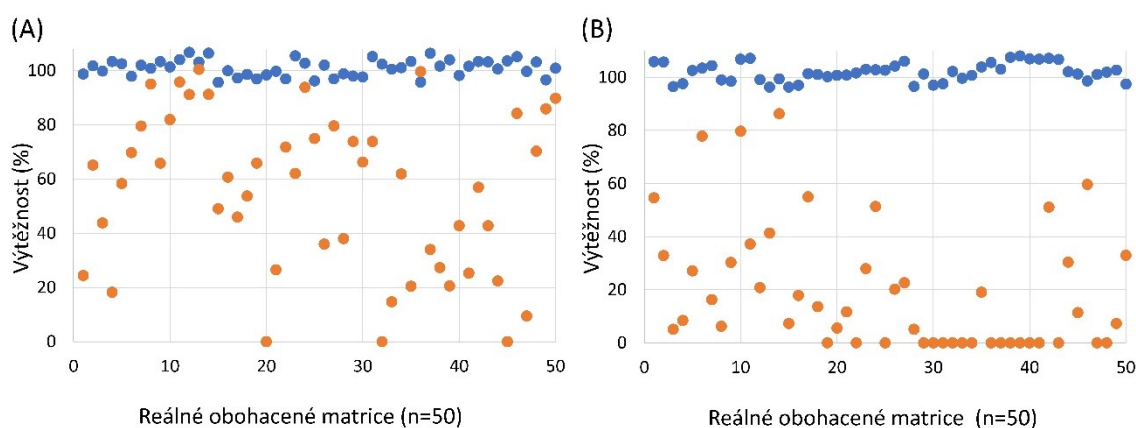
Výsledky experimentů prováděných na moči nebyly v souladu s očekávanou redukcí složitosti matrice. Při použití umělé moči a jejím zpracováním stejným způsobem jako plasma bylo pročištění vzorku velmi efektivní. Nicméně když byly takto zpracovány reálné blankové vzorky moči s následným přidavkem platiny o stejné koncentraci pro všechny odběry, stanovená koncentrace analytu se mezi vzorky lišila. Jiné publikace [173, 175] používající DDTC pro předkolonovou derivatizaci moči a plasmy problém s variabilitou výsledků nezmiňují. Navíc nebyl popsán žádný rozdíl v předúpravě vzorků pro plasmu a moč [173], nebo bylo dokonce zmíněno, že obě matrice byly zpracovány identicky [175]. Dokonce ani Arenas et al [168], kteří modifikovali dříve publikovaný protokol [173], nezaznamenali při použití derivatizace s MS/MS detekcí žádné problémy související s variabilitou matrice. Tento fakt může být ovšem způsoben tím, že ve studiích nebyla zpracována dostatečně velká kohorta pacientů. Při testování zmíněných protokolů jsme nedosáhli stejných hodnot koncentrace v platinou obohacených maticích.

Jednoduché zředění matic vodou ani úprava pH vzorků neposkytlo pozitivní výsledky. Taktéž ani ředění DDTC v roztoku KOH namísto NaOH či použití vyšší koncentrace DDTC nebyly účinné. Pro lepší pročištění vzorku bylo zkoušeno i zařazení LLE do úpravy vzorku, bohužel analyty nebylo možné vůbec zachytit ani po upravení pH před extrakcí. Zvažována byla i možnost rozložení analytu během odpařování vzorku po LLE, ale ani snížením teploty nebyl získán pozitivní výsledek. Aplikací různých

precipitačních činidel a jejich kombinací, ale také použití síranu zinečnatého v kombinaci s organickým činidlem taktéž nebyla patrná konzistence výsledků.

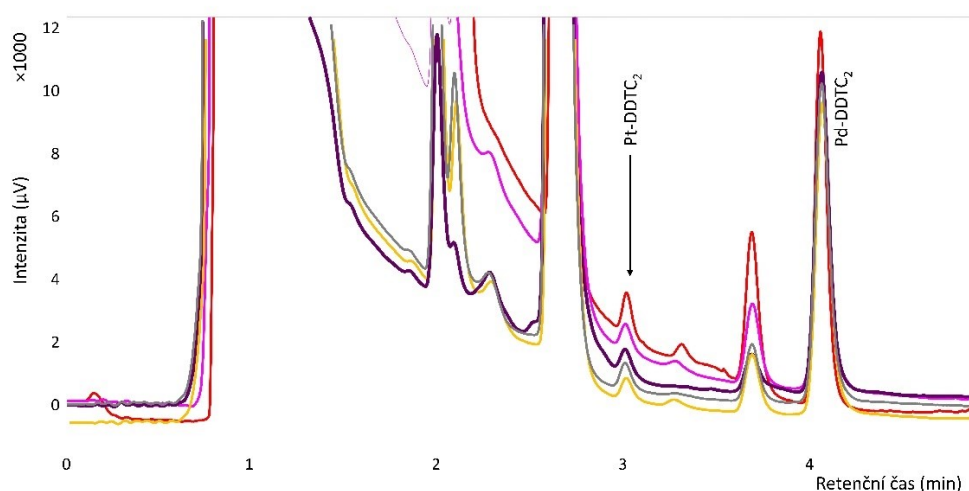
Klíčovým krokem pro získání srovnatelných výsledků z moči testovaných od pacienta k pacientu se ukázalo být přidání K_3EDTA v podobě (nejméně) desetinasobného ředění vzorku roztokem o koncentraci 2 g/l. Teprve ředění s K_3EDTA v navrhovaném poměru poskytlo požadované srovnatelné výsledky mezi maticemi z různých zdrojů. Během experimentů byly testovány různé koncentrace K_3EDTA roztoku, jejich ředící poměry, ale i možnost jeho přidání do roztoku IS či malého přídavku o vysoké koncentraci. Nejuspokojivější a nejstabilnější výsledky mezi vzorky byly získány z (nejméně) desetinasobného ředění roztokem K_3EDTA o koncentraci 2 g/l, ačkoli citlivost metody se v důsledku zvýšeného poměru ředění snížila. Dolní mez kvantifikace pro oba analyty tak dosáhla 200 ng/ml při desetinasobném ředění. Spolehlivost výsledků byla zachována i při 100násobném ředění.

Domníváme se, že ředění s K_3EDTA způsobilo rozpuštění a zředění mikrokrystalů moči, jejichž přítomnost způsobila maskování derivátů platiny při reakci s DDTC v neředěné moči. K prokázání účinku K_3EDTA bylo porovnáno 50 vzorků blankové moči z různých zdrojů, které byly obohaceny zkoumanými analyty. Jak ukazuje obrázek (Obr. 16), desetinasobné ředění 2 g/l K_3EDTA na rozdíl od neředěných vzorků korigovalo nestejný maticový efekt mezi pacienty a poskytlo spolehlivé výsledky.



Obr. 16 Účinek ředění vzorku pomocí K_3EDTA na výtěžnost cisplatiny (A) a oxaliplatiny (B). Po zředění vzorků se hodnoty výtěžnosti v jednotlivých vzorcích moči sjednotily – modré tečky. Oranžové tečky představují stejné matrice, které byly zpracovány bez naředění K_3EDTA .

Po takovém zředění vzorků moči se hodnoty výtěžnosti cisplatinu a oxaliplatinu pohybovaly mezi 95,65 a 106,71 %, resp. 96,29 a 108,02 %. Opakovatelnost našich výsledků byla rovněž ověřena i získáním nízké relativní směrodatné odchylky 2,99 % pro cisplatinu a 3,41 % pro oxaliplatinu. Při porovnávání výsledků neřaděných močí jsme pozorovali značnou variabilitu mezi jednotlivými matricemi. Proto důrazně doporučujeme, aby byla variabilita matric z různých zdrojů řádně testována na větších souborech vzorků, protože má rozhodující vliv na spolehlivost získaných výsledků. Výsledný chromatogram moči ve srovnání s jinými matricemi je uveden na obrázku (Obr.17).



Obr. 17 Porovnání chromatogramů platinou obohacené peritoneální tekutiny na 10 000 ng/l (červená čára), standardního roztoku - 200 ng/l (růžová čára), plasmy - 200 ng/l (fialová čára), standardního roztoku s K_3EDTA - 200 ng/l (šedá čára) a moči s K_3EDTA - 2 000 ng/l (žlutá čára). V čase 2,99 minut byl eluován komplex cisplatinu-DDTC a v čase 4,02 minuty lze pozorovat vnitřní standard jako komplex palladium-DDTC. Zbylé píky pochází z derivatizačního činidla.

4.2.2.5. Aplikace metody

Optimalizovaná metoda byla použita k analýze vzorků získaných od pacientů léčených intravenózní chemoterapií na bázi platiny. Vzorky od pacientů léčených oxaliplatinou byly odebrány na konci dvouhodinové infuze. Vzorky krve a moči od pacientů léčených cisplatinou byly odebrány po ukončení 4hodinové infuze. Následné moč byla odebírána v intervalu 12 a 36 hodin po ukončení podávání chemoterapeutika.

Ve všech vzorcích moči byl rovněž analyzován kreatinin. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 2 a 3).

Tab. 2 Koncentrace celkové oxaliplatin v plasmě, plasmatickém ultrafiltrátu a moči v poměru s kreatininem.

Pacient č.	c v plasmě (ng/mL)	c v PUF (ng/mL)	Pt v moči/kreatinin (µg/pmol)
1	2 305	1 033	6,93
2	2 711	1 260	9,88
3	2 519	1 040	24,38
4	2 494	1 232	9,29
5	1 239	467	4450
6	1 853	768	8,80
7	3000	915	10,21
8	2 576	1 229	17,16
9	2 690	1 833	7,89
10	2 691	473	14,51
11	2 740	637	18,31
12	2 358	1 436	7,94
13	1 393	1 367	13,40
14	2 566	1 831	7,27
15	1 870	688	23,99
16	3 557	1 745	33,90
17	1 800	781	1,90
18	3 694	1 670	20,49
19	2 703	628	4,46
20	5 151	385	16,54
21	2 985	1 007	7,53
22	3 561	1 785	20,18
23	2 178	1 009	22,75
24	1 580	417	8,85

Tab. 3 Koncentrace celkové cisplatiny v plasmě, plasmatickém ultrafiltrátu a moči v poměru s kreatininem.

Pacient č.	c v plasmě (ng/mL)	c v PUF (ng/mL)	Pt v moči/kreatinin (µg/pmol)
25	1 038	427	7,31 0,04
26	2 769	744	21,01 0,56 0,23
27	805	32	14,64 *
			0,07
28	588	4,14	5,11 *
			0,05
29	1 395	325	14,63 0,04 0,02
30	1 402	322	25,82 0,31 0,17
31	1 344	291	8,44 0,14
32	1 263	397	7,90 0,01
33	1 324	332	13,83 0,09

*Hodnota koncentrace byla pod kalibračním rozsahem

4.2.3. Závěr

Zejména kvůli složitosti matric může být v bioanalýze stanovení platinových léčiv pomocí kapalinové chromatografie s předkolonovou derivatizací s DDTC obtížné. To může způsobit řadu problémů při analýze, může být ovlivněna citlivost, robustnost a selektivita dané metody. Z tohoto důvodu byla metodika předkolonové derivatizace s DDTC pro LC-DAD analýzu cisplatiny nebo oxaliplatiny pečlivě optimalizována a lze ji použít jako univerzální přístup s minimálními úpravami pro stanovení v různých biologických matricích, jako je plasma, plasmatický ultrafiltrát, peritoneální laváž a také moč. Zejména moč způsobuje silný matricový efekt a nejvyšší variabilitu vzorků. Abychom tomuto jevu předešli, bylo pro získání spolehlivých výsledků nezbytné použít alespoň desetinásobné ředění roztokem K₃EDTA o koncentraci 2 g/l, přičemž jsme získali porovnání výsledků 50 močí z různých zdrojů. Nicméně předkolonová derivatizace pomocí DDTC je jednoduchý, levný, složitou instrumentací nevyžadující přístup, vhodný pro rutinní praxi, který umožňuje zpracování velkých sérií vzorků.

4.3. Biomarkery zánětu a progresse během imunoterapie u pacientů s metastatickým renálním karcinomem

Příloha 3: Biomarkers of Inflammation and Progression During Immunotherapy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma

Martina Spisarová, Bohuslav Melichar, Jarmila Juráňová, Anežka Zemánková, Tomáš Adam, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Lenka Kujovská Krčmová, Dorota Turoňová, Hana Študentová

In Vivo (2023), 37 (1), 393-399

Impakt faktor (IF₂₀₂₂): 2,3 (Q4), Article Influence Score (AIS₂₀₂₂): 0,422 (Q4)

4.3.1. Úvod a cíl

Použití imunoterapie zásadním způsobem změnilo léčbu metastatického karcinomu ledviny (mRCC). Inhibitory kontrolních bodů imunity (ICI), které byly aplikovány u pacientů, u nichž selhávají inhibitory tyrosinkinasy [185, 186], dosáhly nejlepšího účinku jako součást kombinovaných režimů [187, 188]. Navzdory výraznému zlepšení účinnosti léčby, u většiny pacientů léčených imunoterapií dojde nakonec ke zhoršení jejich stavu.

Bohužel ale stále postrádáme postup, kterým lze identifikovat pacienty, u kterých by aplikace imunoterapie pravděpodobně nedosáhla požadovaného efektu a pro které by raději měl být zvolen alternativní postup léčby či experimentální terapie. Vzhledem k tomu, že existuje několik způsobů terapie s různými mechanismy účinku, bylo by velmi zajímavé nalézt vhodné schéma, které by hrálo zásadní roli pro její výběr. Bylo prokázáno, že zvýšené koncentrace markerů aktivity imunitní a zánětlivé odpovědi, jako je C-reaktivní protein (CRP), interleukin-1 a -6, nebo neopterin, jsou spojeny se špatnou prognózou u pacientů s nádorovým onemocněním včetně mRCC [189, 190]. Vysoké koncentrace těchto prediktorů byly rovněž spojeny s nedostatečnou odpovědí na imunoterapii [191].

Cílem této studie bylo zhodnotit souvislost mezi biomarkery imunitní aktivity a výsledkem léčby u pacientů s mRCC léčených ICI.

4.3.2. Výsledky a diskuze

V rámci studie byla analyzována laboratorní a klinická data 79 pacientů s histologicky potvrzeným mRCC léčených imunoterapií založenou na ICI. Padesát pacientů bylo léčeno pouze nivolumabem a 29 pacientům byla podávána kombinace ipilimumabu a nivolumabu s následnou aplikací nivolumabu a to dle stanovené strategie. Nevýhodou souboru byla jeho heterogenita z pohledu linií léčby a použitých režimů. Odpověď na léčbu byla hodnocena standardními radiologickými metodami ve 2 až 3měsíčních intervalech. Léčba byla podávána až do opakovaného potvrzení progresu nebo projevů závažné toxicity.

Z hlediska laboratorní diagnostiky byly vzorky séra a moče zúčastněných pacientů podrobeny hematologickému a biochemickému testování. Hladiny CRP, kreatininu, laktát-dehydrogenázy a albuminu v séru byly stanoveny použitím komerčně dostupných kitů na modulárním analyzátoru Cobas c 8000 (Roche Diagnostics, Německo). Sérový neopterin byl stanoven pomocí kitu pro enzymovou-immunoanalýzu na systému EVOLIS (Bio-Rad Laboratories, USA). V rámci souboru laboratorních výsledků získaných stanovením v rutinních laboratořích FN Olomouc byly rovněž hodnoceny i hematologické parametry krevního obrazu pomocí analyzátoru Sysmex XN (Sysmex, Japonsko). Ve výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK byl metodou HPLC s fluorescenční a UV-VIS detekcí stanoven močový neopterin společně s kreatininem po velmi jednoduché úpravě vzorku neředěním a filtrací a následné separaci na C18 monolitní stacionární fázi [192].

Získaná data byla podrobena statistické analýze a byly studovány korelace mezi jednotlivými parametry.

Pro zhodnocení výsledků, byli všichni pacienti sledováni po dobu minimálně 4 měsíců, kdy se stav 33 pacientů zhoršil nebo došlo k úmrtí a 46 pacientů bylo bez progresu. Pacienti s progresí nebo zemřelí během 4 měsíců měli vyšší prognostické skóre, vyšší sérový CRP, sérový a močový neopterin a nižší sérový albumin, koncentrace hemoglobinu a Charlesonův index komorbidity. Výraznější rozdíl vykazoval poměr sérového neopterinu/kreatininu. Podobný vývoj parametrů byl pozorován po dobu 6, 8 a 12 měsíců.

Po 6 měsících bylo naživu 61 pacientů a 17 pacientů zemřelo. U zemřelých po 6 měsících bylo pozorováno výrazně vyšší skóre vybraných prognostických modelů (IMDC a MSKCC, stav výkonu ECOG), značně zvýšený sérový CRP, sérový a močový neopterin, počet leukocytů, monocytů, neutrofilů, destiček, distribuční šířka erytrocytů

a poměr destiček-lymfocytů, dále byl výrazně nižší sérový albumin a průměrný objem destiček. Největší rozdíl byl opět pozorován u poměru sérového neopterinu/kreatininu a podobný trend rozdílů v parametrech byl zaznamenán při hodnocení celkového přežití pacientů po dobu 4, 8 a 12 měsíců.

4.3.3. Závěr

Biomarkery aktivace imunitní odpovědi, zejména poměr neopterinu a kreatininu v séru koreluje s výsledky terapie u pacientů s mRCC léčených imunoterapií. U pacientů s mRCC by sérová koncentrace neopterinu vyjádřená jako poměr ke kreatininu měla poskytnout přesnější výsledek. Potenciální role neopterinu jako prognostického a prediktivního biomarkeru u mRCC během imunoterapie by však měla být potvrzena na větším souboru pacientů, který by byl více heterogenní z hlediska linií léčby a použitých režimů. Cílem budoucích studií prediktivních biomarkerů by měla být snaha identifikovat pacienty, kteří pravděpodobně budou profitovat z léčby založené na ICI, i ty, kteří z ní pravděpodobně mít prospěch nebudou. Pacientům, kteří pravděpodobně nebudou na tuto léčbu reagovat, by pak mohly být nabídnuty jiné možnosti léčby nebo by mohli být přednostně zařazeni do klinických studií nových látek nebo kombinovaných režimů.

4.4. Neopterin a kynurenin v séru a moči jako prognostické biomarkery u hospitalizovaných pacientů s variantou delta a omicron infekce SARS-CoV-2

Příloha 4: Neopterin and kynurenine in serum and urine as prognostic biomarkers in hospitalized patients with delta and omicron variant SARS-CoV-2 Infection

Lenka Kujovská Krčmová, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Petr Šmahel, Mikuláš Skála, Vladimír Koblížek, Jan Škop, Dorota Turoňová, Markéta Gančarčíková, Bohuslav Melichar

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2023), 37285602

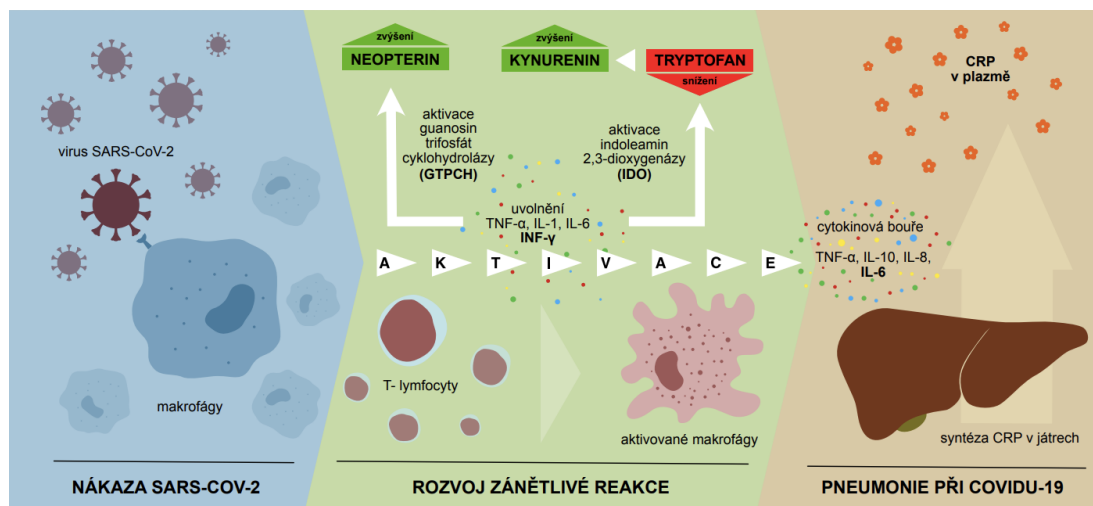
Impakt faktor (IF₂₀₂₂): 6,8 (Q1), Article Influence Score (AIS₂₀₂₂): 1,017 (Q1)

4.4.1. Úvod a cíl

COVID-19 představuje akutní nakažlivé onemocnění způsobené virem SARS-CoV-2. Ve většině případů se infekce projevuje bezpříznakově nebo s mírnými symptomy podobnými běžné chřipce. U některých pacientů může dojít k rozvinutí tzv. cytokinové bouře, kterou následuje rozvoj syndromu akutní respirační tísně. Pacienti s těžkým průběhem mohou velmi často skončit fatálně popř. s následným dlouhodobým poškozením plic.

Produkce interferonu gama, aktivovaná imunitním systémem během virové infekce, může vyvolat zvýšení hladiny neopterinu a degradaci tryptofanu na kynurenin, což se projevuje zvýšeným poměrem kynureninu a tryptofanu. V rámci zánětlivé reakce v průběhu COVID-19 dochází k aktivaci monocytů/makrofágů a uvolňování prozánětlivých cytokinů (Obr. 18). Existuje řada studií, které potvrzují pozitivní korelaci mezi zánětlivými biomarkery, jako je CRP nebo interleukin-6, a závažností onemocnění [193, 194].

V souvislosti s COVID-19 nedávno vyvstal potenciál využití neopterinu a poměru kynureninu a tryptofanu jako možných spolehlivých zánětlivých biomarkerů [195]. Podobně jako v minulosti bylo zaznamenáno zvýšení sérového neopterinu u onemocnění SARS [196], tak i v souvislosti s predikcí závažnosti průběhu COVID-19 byl neopterin významným prediktivním markerem [197, 198].



Obr. 18 Patogeneze onemocnění a produkce cytokinů v průběhu covid-19. (IL- interleukin, CRP- C-reaktivní protein, TNF- α - tumor nekrotizující faktor α , INF- γ -interferon γ). Publikováno s dovolením MUDr. Petra Šmahela, Ph.D.

Cílem této studie bylo posoudit korelaci mezi močovými a sérovými biomarkery a ověřit možnost využití moči jako neinvazivního zdroje vzorku. Zároveň se publikace zaměřila na vyhodnocení potenciálu neopterinu, kynureninu a tryptofanu jako prediktorů závažnosti onemocnění u skupiny hospitalizovaných pacientů s COVID-19. Cílem studie bylo také sledovat tyto parametry u obou variant viru (omikron a delta). Hlavním cílem bylo definovat vhodné kombinace vybraných klinických parametrů a těchto nových markerů, které by pomohly lékařům při diferenciaci pacientů během pandemie.

4.4.2. Metodika

Vzorky byly získány od pacientů starších 18 let, kteří byli hospitalizováni v období od listopadu 2021 do dubna 2022 s diagnózou COVID-19 ve FNHK. U skupiny 108 pacientů byl věkový medián 72,5 let. Protokol studie byl schválen institucionální etickou komisí (č. 202011P04) a všichni dobrovolníci podepsali informovaný souhlas.

Sérum a moč byly odebírány 1. až 4. den hospitalizace. Sérový neopterin, kynurenin a tryptofan byly analyzovány metodou HPLC využívající pro separaci C18 monolitní stacionární fázi s následnou fluorescenční a UV-VIS detekcí. Pro úpravu vzorku bylo aplikováno ředění, precipitace proteinů, centrifugace a nakonec filtrace [172]. Ke stanovení močového neopterinu a kreatininu byla použita metoda HPLC s fluorescenční detekcí [18]. Tato metoda má velmi jednoduchou úpravu vzorku, který

jen ředíme mobilní fázi a poté filtrujeme. Abychom analyzovali kompletní spektrum těchto látek i v moči, pro kvantifikaci kynureninu, tryptofanu a kreatininu byla použita UHPLC-MS/MS. Zde separace analytů probíhala na C18 core-shell stacionární fázi s polární modifikací a ionizace analytů byla podpořena mobilní fází obsahující mravenčan amonný a methanol s kyselinou mravenčí.

Během hospitalizace byly sledovány některé rutinní parametry, jako je CRP, dále vstupně virový N-antigen a hodnoty CT (CT- cycle threshold value-prahový cyklus udávající množství virových kopií v průběhu polymerázové řetězové reakce). N-antigen byl stanoven pomocí soupravy pro kvantitativní stanovení SARS-CoV-2 antigenu (fluorescenční imunochromatografií) (Biohit Healthcare, Finsko) a CRP byl měřen pomocí analyzátoru COBAS (Roche Diagnostics, Německo). Kromě toho byly do hodnocení zahrnuty některé parametry, jako je index tělesné hmotnosti (BMI), věk a škála klinické křehkosti (CFS).

Závažnost onemocnění byla vymezena potřebou kyslíkové terapie a pacienti byli rozděleni podle tohoto kritéria do dvou skupin (s a bez následné oxygenoterapie). Prognóza byla hodnocena rozdělením pacientů na základě přežití nebo úmrtí během hospitalizace. Žádný z pacientů nebyl propuštěn s fatální infekcí (tj. všichni pacienti s terminálním stadiem COVID-19 léčení s paliativním záměrem zemřeli v nemocnici).

4.4.3. Výsledky a diskuze

Jedním z hlavních cílů této studie bylo prozkoumat možnost využití moči jako neinvazivní alternativy k séru pro analýzu biomarkerů. Získané výsledky ukázaly významnou korelaci mezi koncentracemi biomarkerů v moči a séru, a to bez ohledu na variantu viru. Výsledky v moči byly vždy korigovány na hodnotu kreatininu.

Značné rozdíly byly pozorovány v sérovém a močovém neopterinu, kynureninu a poměru kynureninu a tryptofanu v závislosti na potřebě následné oxygenoterapie u celé kohorty a u varianty delta, která se klinicky projevovala mnohem agresivněji. Zvýšené hodnoty neopterinu, kynureninu a poměru kynureninu a tryptofanu souvisely tedy se závažností onemocnění. U omicronu výsledky nedosáhly statistické významnosti. V rámci možnosti predikce rozvinutí v závažný stav byly rovněž hodnoceny vstupní parametry CRP a N-antigenu, jejichž hladina byla výrazně vyšší u pacientů, kteří potřebovali následně oxygenoterapii.

Vstupní sérové i močové hladiny biomarkerů byly významně vyšší u pacientů, kteří zemřeli během hospitalizace, ve srovnání s pacienty, kteří přežili v celkovém souboru i v jednotlivých variantách viru. Stejný trend vykazovala i hladina N-antigenu. Vypočteny byly i ROC (receiver operating characteristic) křivky s definovanou citlivostí a specifitou pro předpověď potřeby léčby oxygenoterapií, ale i šance na přežití, které kombinovaly biomarkery s dalšími daty jako je věk pacienta, jeho BMI, hladiny CRP, N-antigenu či CFS, aby bylo dosaženo komplexnějšího porovnání klinických dat.

Velmi důležitou součástí studie bylo i vytvoření cut-off hladin pro šanci na přežití a predikci závažnosti průběhu onemocnění. Bylo nezbytné zachytit všechny pacienty s šancí na přežití se 100% sensitivitou, aby bylo zajištěno, že žádný z přeživších nebyl falešně klasifikován jako zemřelý kvůli rozdílnému přístupu k léčbě z důvodu limitované kapacity péče, kdy přednost pro poskytnutí intenzivní péče je dána pacientům s větší šancí na přežití. Proto bylo kritické dosáhnout nulové hodnoty falešně negativních výsledků u pacientů s šancí na přežití.

4.4.4. Závěr

Získané výsledky naznačují, že neopterin, kynurenin a poměr kynureninu a tryptofanu v séru nebo moči představují perspektivní biomarkery pro zvládnutí léčby COVID-19. Velkým přínosem vypracovaných komplexních rovnic pro predikci rizika potřeby následné oxygenoterapie nebo úmrtí během hospitalizace je možnost poskytnutí cenných informací pro důležitá terapeutická rozhodnutí, která jsou nezbytná činit v krizových situacích, kdy kapacita zdravotnické péče může být limitovaná.

5. ZÁVĚR

Tato disertační práce zaměřující se na využití kapalinové chromatografie v analýze biologického materiálu pro klinický výzkum je souhrnem mé publikované vědecké činnosti na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy.

Celé mé doktorské studium jsem působila ve Fakultní nemocnici Hradec Králové v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, kde pracuje výzkumná skupina Chromed, jejíž jsem byla členkou a měla jsem možnost se zapojit nejen do výzkumu na poli analytické chemie, ale také působit v klinických studiích, které naše metodiky využívají.

Teoretická část je shrnuje postavení vysokoúčinné kapalinové chromatografie vůči ostatním metodám v praxi a diskutuje parametry důležité pro vývoj LC metody, ale i současně trendy používané v praxi. Dále je diskutován odběr vzorku a úprava vzorku před chromatografickou analýzou, a to včetně současných trendů. Součástí kapitoly úpravy vzorku je i část věnující se derivatizacím rovněž i s uplatněním derivatizace v analýze platinových chemoterapeutik, která souvisí s komentářem k publikované práci.

Komentáře k vybraným pracím se zaměřují na oblast úpravy vzorku biologického materiálu a chromatografické analýzy se zaměřením na praktičnost použití v klinickém výzkumu i rutinní praxi. První část je souhrnem přehledového článku diskutujícího využití moderního přístupu mikroextrakce v pipetovacích špičkách pro účely toxikologické analýzy. Ten cílí zejména na praktičnost jednotlivých postupů, jejich výhody a nevýhody a snaží se poukázat na nutnost přepracování konvenčních postupů a jejich nahrazení novými, účinnějšími technikami pro zefektivnění laboratorní diagnostiky.

Druhý rozsáhlejší komentář se věnuje problematice stanovení platinových chemoterapeutik v různých druzích biologických matric při použití předkolonové derivatizace s DDTC. Jelikož HPLC ve spojení s DAD detekcí je jedním z nejběžnějších přístrojů rutinních laboratoří, aplikace předkolonové derivatizace s DDTC umožnila analyzovat stabilní deriváty cisplatiny či oxaliplatiny pomocí separace na C18 reverzní fázi bez drahého přístrojového vybavení. Nejprve byla vyvinuta chromatografická metoda a úprava vzorku pro stanovení celkového obsahu platiny v plasmě. Z důvodu možné aplikace metody pro analýzu biologického materiálu od pacientů podstupující hypertermickou intraperitoneální chemoterapii nebo systémovou léčbu, byla úprava vzorku dále optimalizovaná i pro stanovení celkové

platiny v peritoneální laváži, ale i v moči. Jelikož jsme zřejmě jako první pozorovali nadměrné matricové efekty v moči za použití prezentované metodiky, i přesto byl nalezen způsob úpravy vzorku pro moč eliminující kolísání hladin platinových derivátů způsobené variabilitou matric mezi pacienty. V manuskriptu i zde v části komentářů byla pak popsána úskalí použití předkolonové derivatizace a její vhodnost pro různé matrice jakožto instrumentálně nenáročné, jednoduché a levné metody.

Třetí a čtvrtá komentovaná práce se věnuje klinickým studiím, které probíhaly ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Olomouc, a některými pracovišti Fakultní nemocnice Hradec Králové. Spojujícím prvkem těchto prací byla analýza biomarkerů aktivace imunitní odpovědi. V prvním případě ve vztahu možnosti využití poměru neopterinu a kreatininu v séru jako markeru predikce odpovědi organismu postiženého mRCC na léčbu imunoterapií. V druhém případě studie zaměřená na monitorování pacientů s COVID-19 prokázala, že neopterin, kynurenin a poměr kynureninu a tryptofanu v séru nebo moči představují perspektivní biomarkery pro zvládnutí léčby COVID-19. Obrovským přínosem bylo vypracování i prediktivních rovnic poskytujících klíčové informace pro terapeutická rozhodnutí během pandemie.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WU, Alan H.B. a Deborah FRENCH. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2013, **420**, 4–10. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2012.10.026
- [2] RACEK, Jaroslav, Daniel RAJDL a kol. *Klinická biochemie*. 3. vydání. Praha: Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-545-0.
- [3] CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [4] KOČOVÁ VLČKOVÁ, Hana, Veronika PILAŘOVÁ, Pavlína SVOBODOVÁ, Jiří PLÍŠEK, František ŠVEC a Lucie NOVÁKOVÁ. Current state of bioanalytical chromatography in clinical analysis. *The Analyst* [online]. 2018, **143**(6), 1305–1325. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/C7AN01807J
- [5] MOAL, Valérie, Elisabeth MATHIEU, Pascal REYNIER, Yves MALTHIÈRY a Yves GALLOIS. Low serum testosterone assayed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison with five immunoassay techniques. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2007, **386**(1–2), 12–19. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2007.07.013
- [6] VIETTE, Véronique, Marc FATHI, Serge RUDAZ, Denis HOCHSTRASSER a Jean-Luc VEUTHEY. Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2011, **49**(7), 1091–1103. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2011.182
- [7] KRČMOVÁ, Lenka Kujovská, Bohuslav MELICHAR a František ŠVEC. Chromatographic methods development for clinical practice: requirements and limitations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2020, **58**(11), 1785–1793. ISSN 1437-4331, 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2020-0517
- [8] VAN DEN OUWELAND, Johannes M.W. a Ido P. KEMA. The role of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Journal of Chromatography B* [online]. 2012, **883–884**, 18–32. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.11.044
- [9] AbsoluteIDQ® Stero17 kit. *Biocrates life sciences* [online]. [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://shop.biocrates.com/AbsoluteIDQ-Stero17-kit/20295.1>
- [10] Waters SARS-CoV-2 LC-MS Starter Kit. *Waters Corporation* [online]. [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/id/en/shop/application-kits/176004946-waters-sars-cov-2-lc-ms-starter-kit-ruo.html>
- [11] MassChrom® Amino Acid Analysis in Plasma/Serum with 96 Deep Well Plate - LC-MS/MS. *Chromsystems* [online]. [vid. 2023-04-17]. Dostupné z: <https://chromsystems.com/en/masschromr-amino-acid-analysis-in-plasma-serum-with-96-deep-well-plate-75111-dwp.html>

- [12] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Česká chromatografická škola, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [13] BARANOWSKA, Irena, Sylwia MAGIERA a Jacek BARANOWSKI. Clinical applications of fast liquid chromatography: A review on the analysis of cardiovascular drugs and their metabolites. *Journal of Chromatography B* [online]. 2013, **927**, 54–79. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2013.02.002
- [14] KUČEROVÁ, Barbora, Lenka KRČMOVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ, Jiří PLÍŠEK a Petr SOLICH. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and α -tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography†: Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(14), 2223–2230. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201300242
- [15] PLÍŠEK, Jiří, Markéta KAŠPAROVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ, Lenka KRČMOVÁ, Barbora KUČEROVÁ, Luboš SOBOTKA a Petr SOLICH. Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk. *Talanta* [online]. 2013, **107**, 382–388. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.01.031
- [16] ZACHARIS, C. K. Accelerating the Quality Control of Pharmaceuticals Using Monolithic Stationary Phases: A Review of Recent HPLC Applications. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2009, **47**(6), 443–451. ISSN 0021-9665, 1945-239X. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/47.6.443
- [17] HAYES, Richard, Adham AHMED, Tony EDGE a Haifei ZHANG. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1357**, 36–52. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.05.010
- [18] GOSETTI, Fabio a Emilio MARENGO. Benefits and Drawbacks of Fully Porous sub-2 μ m and Core-Shell Particles. Comparative UHPLC Applications in Food, Environmental, Forensic, Biopharmaceutical and Natural Products Analyses. *Current Chromatography* [online]. 2018, **5**(1), 18–32. ISSN 22132406. Dostupné z: doi:10.2174/2213240605666180226142319
- [19] BRANDES, Hillel. Tips for Maximizing the Performance of Core-Shell Columns. *LC GC NORTH AMERICA* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/tips-for-maximizing-the-performance-of-core-shell-columns>
- [20] L.C. PASSOS, Marieta a M. Lúcia M.F.S. SARAIVA. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement* [online]. 2019, **135**, 896–904. ISSN 02632241. Dostupné z: doi:10.1016/j.measurement.2018.12.045
- [21] SWARTZ, Michael. Hplc Detectors: A Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2010, **33**(9–12), 1130–1150. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2010.484356

- [22] PRAGST, Fritz, Matthias HERZLER a Björn-Thoralf ERXLEBEN. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2004, **42**(11) [vid. 2022-12-17]. ISSN 1437-4331, 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2004.251
- [23] WOLFENDER, Jean-Luc. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. *Planta Medica* [online]. 2009, **75**(7), 719–734. ISSN 0032-0943, 1439-0221. Dostupné z: doi:10.1055/s-0028-1088393
- [24] LIPKA, Emmanuelle a Claude VACCHER. Quantitative analysis of drugs in biological matrices by HPLC hyphenated to fluorescence detection. *Bioanalysis* [online]. 2015, **7**(6), 743–762. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.15.20
- [25] MUHAMMAD, Nadeem, Irshad HUSSIAN, Amjad ALI, Tajamal HUSSAIN, Azeem INTISAR, Iftikhar UL HAQ, Qamar SUBHANI, Mateen HEDAR, Jia-Lun ZHONG, Muhammad ASIF, Dandan GUO, Hairong CUI a Yan ZHU. A comprehensive review of liquid chromatography hyphenated to post-column photoinduced fluorescence detection system for determination of analytes. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2022, **15**(9), 104091. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2022.104091
- [26] GIKA, Helen G., Georgios A. THEODORIDIS, Robert S. PLUMB a Ian D. WILSON. Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **87**, 12–25. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2013.06.032
- [27] BANERJEE, Shibdas. Empowering Clinical Diagnostics with Mass Spectrometry. *ACS Omega* [online]. 2020, **5**(5), 2041–2048. ISSN 2470-1343, 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b03764
- [28] PITT, James J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2009, **30**(1), 19–34. ISSN 0159-8090.
- [29] CHEN, Zhendong, Yuxiong GAO a Dafang ZHONG. Technologies to improve the sensitivity of existing chromatographic methods used for bioanalytical studies. *Biomedical Chromatography* [online]. 2020, **34**(3) [vid. 2022-11-24]. ISSN 0269-3879, 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.4798
- [30] COLLINS, Ryan a Shane NEEDHAM. HPLC Column Technology in a Bioanalytical Contract Research Organization. *LCGC Supplements*. 2016, **34**(4), Special Issues-04-01-2016, 24–27.
- [31] JEMAL, Mohammed a Yuan-Qing XIA. LC-MS Development Strategies for Quantitative Bioanalysis. *Current Drug Metabolism* [online]. 2006, **7**(5), 491–502. Dostupné z: doi:10.2174/138920006777697927
- [32] NÚÑEZ, Oscar, Hctor GALLART-AYALA, Claudia P.B. MARTINS a Paolo LUCCI. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1228**, 298–323. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.10.091

- [33] YONG, Yoong-Soon, Eric Tzyy Jiann CHONG, Hsin-Chang CHEN, Ping-Chin LEE a Yee Soon LING. A Comparative Study of Pentafluorophenyl and Octadecylsilane Columns in High-throughput Profiling of Biological Fluids: Pentafluorophenyl-based Column in Metabolites Profiling. *Journal of the Chinese Chemical Society* [online]. 2017, **64**(6), 699–710. ISSN 00094536. Dostupné z: doi:10.1002/jccs.201600873
- [34] BELL, David S. a A. Daniel JONES. Solute attributes and molecular interactions contributing to “U-shape” retention on a fluorinated high-performance liquid chromatography stationary phase. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1073**(1–2), 99–109. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.08.163
- [35] FIBIGR, Jakub, Dalibor ŠATÍNSKÝ a Petr SOLICH. A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2017, **134**, 203–213. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2016.11.042
- [36] SAHA, Supradip, Suresh WALIA, Khushbu SHARMA a Kaushik BANERJEE. Suitability of stationary phase for LC analysis of biomolecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2020, **60**(17), 2856–2873. ISSN 1040-8398, 1549-7852. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2019.1665494
- [37] Phenomenex Kinetex -Phase Selectivity- Phase Information. *Phenomenex.com* [online]. [vid. 2022-07-07]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/Selectivities>
- [38] KOHLER, Isabelle a Martin GIERA. Recent advances in liquid-phase separations for clinical metabolomics: Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2017, **40**(1), 93–108. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201600981
- [39] REMANE, Daniela, Dirk K. WISSENBACH a Frank T. PETERS. Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. *Clinical Biochemistry* [online]. 2016, **49**(13), Mass Spectrometry, 1051–1071. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010
- [40] FERGUSON, Paul. The Paradox of Sustainability in Separation Science. *LCGC Europe* [online]. 2022, 413–415. ISSN 2767-7095, 1471-6577. Dostupné z: doi:10.56530/lcgc.eu.pf6883s6
- [41] LIPPI, Giuseppe, Jeffrey J. CHANCE, Stephen CHURCH, Paola DAZZI, Rossana FONTANA, Davide GIAVARINA, Kjell GRANKVIST, Wim HUISMAN, Timo KOURI, Vladimir PALICKA, Mario PLEBANI, Vincenzo PURO, Gian Luca SALVAGNO, Sverre SANDBERG, Ken SIKARIS, Ian WATSON, Ana K. STANKOVIC a Ana-Maria SIMUNDIC. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2011, **49**(7) [vid. 2022-11-27]. ISSN 1437-4331, 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2011.600
- [42] PLEBANI, Mario. Quality Indicators to Detect Pre-Analytical Errors in Laboratory Testing. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2012, **33**(3), 85–88. ISSN 0159-8090.

- [43] BARTOŠ, Vladimír, Antonín JABOR, Miroslav ZÁMEČNÍK a SEKK. *Přeanalytická fáze 2005*. Praha: Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP : SEKK, 2005.
- [44] RANA, Satyavati V. No Preanalytical Errors in Laboratory Testing: A Beneficial Aspect for Patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* [online]. 2012, **27**(4), 319–321. ISSN 0970-1915, 0974-0422. Dostupné z: doi:10.1007/s12291-012-0271-2
- [45] GREEN, Sol F. The cost of poor blood specimen quality and errors in preanalytical processes. *Clinical Biochemistry* [online]. 2013, **46**(13–14), 1175–1179. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.06.001
- [46] NAZ, Sumera, Arshad MUMTAZ a Sadaruddin AGHA. Preanalytical Errors and their Impact on Tests in Clinical Laboratory Practice. *Pakistan Journal of Medical Research*. 2012, **51**(1).
- [47] KRŠKA, Zdeněk a kol. *Techniky a technologie v chirurgických oborech: Vybrané kapitoly*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2011. ISBN 978-80-247-7532-6.
- [48] BOWEN, Raffick A.R. a Alan T. REMALEY. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochemia Medica* [online]. 2014, **24**(1), 31–44. ISSN 1330-0962. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2014.006
- [49] MAGNETTE, A., M. CHATELAIN, B. CHATELAIN, H. TEN CATE a F. MULLIER. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thrombosis Journal* [online]. 2016, **14**(1), 49. ISSN 1477-9560. Dostupné z: doi:10.1186/s12959-016-0123-z
- [50] FUNK, Dorothy (Adcock). Sample Integrity and Preanalytical Variables. In: *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2013 [vid. 2022-11-27], s. 45–56. ISBN 978-1-118-54346-7. Dostupné z: doi:10.1002/9781118543467.ch5
- [51] IRJALA, Kerttu M a Paula E GRÖNROOS. Preanalytical and analytical factors affecting laboratory results. *Annals of Medicine* [online]. 1998, **30**(3), 267–272. ISSN 0785-3890. Dostupné z: doi:10.3109/07853899809005854
- [52] SIMUNDIC, Ana-Maria, Geoffrey BAIRD, Janne CADAMURO, Seán J. COSTELLOE a Giuseppe LIPPI. Managing hemolyzed samples in clinical laboratories. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 2020, **57**(1), 1–21. ISSN 1040-8363, 1549-781X. Dostupné z: doi:10.1080/10408363.2019.1664391
- [53] GIAVARINA, Davide a Giuseppe LIPPI. Blood venous sample collection: Recommendations overview and a checklist to improve quality. *Clinical Biochemistry* [online]. 2017, **50**(10–11), 568–573. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.02.021
- [54] BI, Hai, Zhengyang GUO, Xiao JIA, Huiying LIU, Lulin MA a Lixiang XUE. The key points in the pre-analytical procedures of blood and urine samples in metabolomics studies. *Metabolomics* [online]. 2020, **16**(6), 68. ISSN 1573-3890. Dostupné z: doi:10.1007/s11306-020-01666-2

- [55] SALVAGNO, Gian Luca, Elisa DANESE a Giuseppe LIPPI. Preanalytical variables for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of human blood specimens. *Clinical Biochemistry* [online]. 2017, **50**(10–11), 582–586. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.04.012
- [56] PLEBANI, M., L. SCIACOVELLI, A. AITA, A. PADOAN a M.L. CHIOZZA. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2014, **432**, 44–48. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2013.07.033
- [57] MOEIN, Mohammad Mahdi, Aziza EL BEQQALI a Mohamed ABDEL-REHIM. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B* [online]. 2017, **1043**, 3–11. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.09.028
- [58] *FDA-BIO. U.S. Food and Drug Administration - Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* [online]. [vid. 2023-02-02]. Dostupné z: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf
- [59] *EMA. European Medicines Agency - Guideline on bioanalytical method validation* [online]. [vid. 2023-01-23]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500109686%26mid=WC0b01ac058009a3dc
- [60] *ICH-BIO. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - Bioanalytical Method Validation M10* [online]. [vid. 2023-02-02]. Dostupné z: http://www.ich.org/products/guidelines/multidisciplinary/article/multidisciplinary_guidelines.html#10
- [61] KAZA, Michał, Marta KARAŻNIEWICZ-ŁADA, Katarzyna KOSICKA, Anna SIEMIĄTKOWSKA a Piotr J. RUDZKI. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, **165**, 381–385. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.12.030
- [62] WRIGHT, Michael J, Robert WHELLER, Geoff WALLACE a Rachel GREEN. Internal standards in regulated bioanalysis: putting in place a decision-making process during method development. *Bioanalysis* [online]. 2019, **11**(18), 1701–1713. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2019-0169
- [63] WHITE, Stephen, Neil ADCOCK, Walid ELBAST, Jim HILLER, Magnus KNUTSSON, Berthold LAUSECKER, Jeff LONG, Stuart MCDOUGALL, Fabrice SALAVERT, Timothy SANGSTER, Tom VERHAEGHE a Peter van AMSTERDAM. European Bioanalysis Forum: recommendation for dealing with internal standard variability. *Bioanalysis* [online]. 2014, **6**(20), 2767–2774. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.14.221
- [64] SRINIVAS, Nuggehally R. Should commonly prescribed drugs be avoided as internal standard choices in new assays for clinical samples? *Bioanalysis* [online]. 2016, **8**(7), 607–610. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.16.21

- [65] KHAMIS, Mona M., Darryl J. ADAMKO a Anas EL-ANEED. Strategies and challenges in method development and validation for the absolute quantification of endogenous biomarker using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2021, **40**(1), 31–52. ISSN 0277-7037, 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21607
- [66] MISHRA, Sonam, Niraj RAJPUT, Tarang JADAV, Amit Kumar SAHU, Rakesh K. TEKADE a Pinaki SENGUPTA. Advancement in Analytical Strategies for Quantification of Biomarkers with a Special Emphasis on Surrogate Approaches. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2022, **0**(0), 1–16. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2022.2035210
- [67] Synthetic Urine Archives. *Synthetic Life Sciences* [online]. [vid. 2023-07-06]. Dostupné z: <https://cleansynthetics.com/product-category/synthetic-urine/>
- [68] 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), Advanced MS Analysis of Metabolites and Degradation Products - I, 924–933. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2008.09.002
- [69] HESS, Cornelius, Konrad SYDOW, Theresa KUETING, Michael KRAEMER a Alexandra MAAS. Considerations regarding the validation of chromatographic mass spectrometric methods for the quantification of endogenous substances in forensics. *Forensic Science International* [online]. 2018, **283**, 150–155. ISSN 0379-0738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2017.12.019
- [70] VESPER, Hubert W, W Gregory MILLER a Gary L MYERS. Reference Materials and Commutability. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2007, **28**(4), 139–147. ISSN 0159-8090.
- [71] FRIEDECKÝ, B. a J. KRATOCHVÍLA. Nové pojetí referenčních materiálů. *Klin. Biochem. Metab.* 2006, (14 (35)), 168–170.
- [72] MassCheck® 25-OH-Vitamin D3/D2 and 3-epi-25-OH-Vitamin D3 Serum Controls. *Chromsystems* [online]. [vid. 2023-07-06]. Dostupné z: <https://chromsystems.com/en/masscheckr-3-epi-25-oh-vitamin-d3-d2-and-25-oh-vitamin-d3-d2-serum-controls-0310-0311-0312.html>
- [73] KAMIL, Kalina a kol. *Klinická adiktologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2015. ISBN 978-80-247-9791-5.
- [74] BECKER, Horst D. *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2005. ISBN 978-80-247-0720-4.
- [75] VAUGHT, Jimmie a Marianne HENDERSON. Biological sample collection, processing, storage and information management. *IARC scientific publications*. 2012, 23–42.
- [76] LIU, Guowen a Anne-Françoise AUBRY. Best Practices in Biological Sample Preparation for LC-MS Bioanalysis. In: *Handbook of LC-MS Bioanalysis* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2013 [vid. 2022-12-27], s. 165–184. ISBN 978-1-118-67127-6. Dostupné z: doi:10.1002/9781118671276.ch14

- [77] BD Vacutainer Blood Testing. *Vestaplas* [online]. [vid. 2023-05-14]. Dostupné z: <https://www.vestaplas.com/v3660all.html>
- [78] PAWULA, Maria, Glen HAWTHORNE, Graeme T. SMITH a Howard M. HILL. Best Practice in Biological Sample Collection, Processing, and Storage for LC-MS in Bioanalysis of Drugs. In: *Handbook of LC-MS Bioanalysis* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2013 [vid. 2023-05-14], s. 139–164. ISBN 978-1-118-67127-6. Dostupné z: doi:10.1002/9781118671276.ch13
- [79] KELNAROVÁ, Jarmila a kol. *Ošetřovatelství pro střední zdravotnické školy – 2. ročník - 2. díl*. Praha: Grada Publishing a.s., 2009. ISBN 978-80-247-3106-3.
- [80] SEEMAN, Tomáš a Jan JANDA. *Dětská nefrologie: 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing a.s., 2021. ISBN 978-80-271-3283-6.
- [81] ŠPINAR, Jindřich, Ondřej LUDKA a kol. *Propedeutika a vyšetřovací metody vnitřních nemocí: 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing a.s., 2013. ISBN 978-80-247-8375-8.
- [82] Urine Monovette pro odběr moči. *asker.cz* [online]. [vid. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://www.asker.cz/zkumavky-pro-odber/urine-monovette-pro-odber-moci/>
- [83] Nádoby na moč VWR. *VWR* [online]. [vid. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://cz.vwr.com/store/product/10637141/vwr-nadoby-na-moc>
- [84] THEMES, U. F. O. Peritoneal Fluid Collections, Peritonitis, and Peritoneal Abscess. *Radiology Key* [online]. 22. leden 2019 [vid. 2023-05-14]. Dostupné z: <https://radiologykey.com/peritoneal-fluid-collections-peritonitis-and-peritoneal-abscess/>
- [85] TARN, A C a R LAPWORTH. Biochemical analysis of ascitic (peritoneal) fluid: what should we measure? *Annals of Clinical Biochemistry* [online]. 2010, **47**(5), 397–407. ISSN 0004-5632. Dostupné z: doi:10.1258/acb.2010.010048
- [86] BRÜCHER, Björn L.D.M., Pompiliu PISO, Vic VERWAAL, Jesus ESQUIVEL, Marcello DERRACO, Yutaka YONEMURA, Santiago GONZALEZ-MORENO, Jörg PELZ, Alfred KÖNIGSRÄINER, Michael STRÖHLEIN, Edward A. LEVINE, David MORRIS, David BARTLETT, Olivier GLEHEN, Alfredo GAROFALO a Aviram NISSAN. Peritoneal Carcinomatosis: Cytoreductive Surgery and HIPEC—Overview and Basics. *Cancer Investigation* [online]. 2012, **30**(3), 209–224. ISSN 0735-7907, 1532-4192. Dostupné z: doi:10.3109/07357907.2012.654871
- [87] WITKAMP, Arjen J, Eelco DE BREE, R VAN GOETHEM a Frans A.N ZOETMULDER. Rationale and techniques of intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews* [online]. 2001, **27**(6), 365–374. ISSN 03057372. Dostupné z: doi:10.1053/ctrv.2001.0232
- [88] VELGHE, Sofie, Rani DE TROYER a Christophe STOVE. Dried blood spots in therapeutic drug monitoring and toxicology. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. 2018, **14**(1), 1–3. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1080/17425255.2018.1414181

- [89] ENDERLE, Yeliz, Kathrin FOERSTER a Jürgen BURHENNE. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2016, **130**, Review Issue 2016, 231–243. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2016.06.026
- [90] NYS, Gwenaël, Miranda G.M. KOK, Anne-Catherine SERVAIS a Marianne FILLET. Beyond dried blood spot: Current microsampling techniques in the context of biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, **97**, 326–332. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2017.10.002
- [91] PROTTI, Michele, Roberto MANDRIOLI a Laura MERCOLINI. Quantitative microsampling for bioanalytical applications related to the SARS-CoV-2 pandemic: Usefulness, benefits and pitfalls. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2020, **191**, 113597. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113597
- [92] VERVERI, Christina, Marco VINCENTI a Alberto SALOMONE. Recent advances in the detection of drugs of abuse by dried blood spots. *Biomedical chromatography: BMC* [online]. 2022, e5555. ISSN 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.5555
- [93] WADA. With dried blood spot analysis, anti-doping science is pushing the boundaries at Beijing 2022 and beyond. *World Anti Doping Agency* [online]. 15. únor 2022 [vid. 2023-05-20]. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/news/dried-blood-spot-analysis-anti-doping-science-pushing-boundaries-beijing-2022-and-beyond>
- [94] FERREIRA, Helena Beatriz, Inês M. S. GUERRA, Tânia MELO, Hugo ROCHA, Ana S. P. MOREIRA, Artur PAIVA a M. Rosário DOMINGUES. Dried blood spots in clinical lipidomics: optimization and recent findings. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2022, **414**(24), 7085–7101. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-022-04221-1
- [95] MEESTERS, Roland Jw a Gero P HOOFF. State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(17), 2187–2208. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.13.175
- [96] HENION, Jack, Regina V OLIVEIRA a Donald H CHACE. Microsample analyses via DBS: challenges and opportunities. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(20), 2547–2565. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.13.197
- [97] NIEMIEC, Agnieszka. Dried Blood Spot in Toxicology: Current Knowledge. *Separations* [online]. 2021, **8**(9), 145. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations8090145
- [98] DELAHAYE, Lisa, Herman VEENHOF, Birgit C. P. KOCH, Jan-Willem C. ALFFENAAR, Rafael LINDEN a Christophe STOVE. Alternative Sampling Devices to Collect Dried Blood Microsamples: State-of-the-Art. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2021, **43**(3), 310. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0000000000000864

- [99] KOLE, Prashant Laxman, Gantala VENKATESH, Jignesh KOTECHA a Ravi SHESHALA. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography* [online]. 2011, **25**(1–2), 199–217. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1560
- [100] NAMERA, Akira a Takeshi SAITO. Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(8), 915–932. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.13.52
- [101] DROUIN, Nicolas, Serge RUDAZ a Julie SCHAPPLER. *New Trends in Sample Preparation for Bioanalysis* [online]. [vid. 2022-12-26]. Dostupné z: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/182917-New-Trends-in-Sample-Preparation-for-Bioanalysis/>
- [102] DROUIN, Nicolas, Serge RUDAZ a Julie SCHAPPLER. Sample preparation for polar metabolites in bioanalysis. *The Analyst* [online]. 2018, **143**(1), 16–20. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/C7AN01333G
- [103] POLSON, Cara, Pratibha SARKAR, Bev INCLEDON, Vanaja RAGUVARAN a Russell GRANT. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, **785**(2), 263–275. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(02)00914-5
- [104] GAO, Hong, John WILLIAMS, Scott CARRIER a Christopher L BRUMMEL. Bioanalytical solutions to acetonitrile shortages. *Bioanalysis* [online]. 2010, **2**(9), 1627–1640. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.10.76
- [105] ISOLUTE® PLD+. *Biotage.com* [online]. [vid. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.biotage.com/phospholipid-removal>
- [106] HybridSPE®-Phospholipid 96-well Plate. *Sigma Aldrich* [online]. [vid. 2022-12-28]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/>
- [107] Ostro Protein Precipitation & Phospholipid Removal Plate. *Waters Corporation* [online]. [vid. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/ie/en/shop/sample-preparation--filtration/186005518-ostro-protein-precipitation--phospholipid-removal-plate-25-mg-1-.html>
- [108] 0.45um PTFE Syringe Filter With Outer Ring Manufacturers, Suppliers and Factory - Wholesale Products. *ALWSCI Technologies Co.* [online]. [vid. 2023-07-06]. Dostupné z: <https://www.alwsci.com/ptfe-syringe-filter-with-outer-ring>
- [109] GVS SEPARA 32 mm Syringeless Filter Vial - Filters and Filtration, Syringeless and Syringe Filters. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [vid. 2023-07-07]. Dostupné z: <https://www.fishersci.com/shop/products/separa-32-mm-syringeless-filter-vial-10/10486205>
- [110] Filtration microplates, Agilent filter microplates. *Agilent* [online]. [vid. 2023-07-07]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/product/microplates/standard-custom-microplates/filter-microplates-740873>

- [111] Microcon-10kDa Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane. *Merck Millipore* [online]. [vid. 2023-07-07]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Microcon-10kDa-Centrifugal-Filter-Unit-with-Ultracel-10-membrane,MM_NF-MRCPRT010
- [112] JOSHI, Vivek a Elena CHERNOKALSKAYA. Filtration as a Sample Preparation Technique Prior to Mass Spectrometry: Selecting the Right Filtration Device. In: Alexander R. IVANOV a Alexander V. LAZAREV, ed. *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011 [vid. 2023-01-10], s. 61–75. ISBN 978-94-007-0758-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-0828-0_4
- [113] MAJEKODUNMI, Stephen Olaribigbe. A Review on Centrifugation in the Pharmaceutical Industry. *American Journal of Biomedical Engineering*. 2015.
- [114] OSHIMA, Kotaro, Kentaro NAKAMURA, Haixin GUO a Richard Lee SMITH. Mini-review on application of analytical centrifugation, ultracentrifugation and centrifugal devices to phase equilibria and separation processes. *Fluid Phase Equilibria* [online]. 2022, **558**, 113457. ISSN 03783812. Dostupné z: doi:10.1016/j.fluid.2022.113457
- [115] JONES, Sabra, Courtney MCGOWAN, Sarah BOYLE, Yiling KE, Chi Hin Marco CHAN a Hajin HWANG. An overview of sample preparation in forensic toxicology. *WIREs Forensic Science* [online]. 2022, **4**(2) [vid. 2023-01-10]. ISSN 2573-9468, 2573-9468. Dostupné z: doi:10.1002/wfs2.1436
- [116] LI, Wenkui, Wenying JIAN a Yunlin FU. Basic Sample Preparation Techniques in LC-MS Bioanalysis. In: *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2019 [vid. 2023-01-08], s. 1–30. ISBN 978-1-119-27431-5. Dostupné z: doi:10.1002/9781119274315.ch1
- [117] TUROŇOVÁ, Dorota, Lenka KUJOVSKÁ KRČMOVÁ a František ŠVEC. Application of microextraction in pipette tips in clinical and forensic toxicology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2021, **143**, 116404. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2021.116404
- [118] LI, Kong M., Laurent P. RIVORY a Stephen J. CLARKE. Solid-Phase Extraction (SPE) Techniques for Sample Preparation in Clinical and Pharmaceutical Analysis: A Brief Overview. *Current Pharmaceutical Analysis* [online]. 2006, **2**(2), 95–102. Dostupné z: doi:10.2174/157341206776819346
- [119] ARMENTA, Sergio, Salvador GARRIGUES a Miguel DE LA GUARDIA. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **71**, 2–8. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.12.011
- [120] ALAMPANOS, Vasileios a Victoria SAMANIDOU. Current trends in green sample preparation before liquid chromatographic bioanalysis. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* [online]. 2021, **31**, 100499. ISSN 2452-2236. Dostupné z: doi:10.1016/j.cogsc.2021.100499
- [121] ZHENG, Naiyu, Hao JIANG a Jianing ZENG. Current advances and strategies towards fully automated sample preparation for regulated LC-MS/MS bioanalysis. *Bioanalysis* [online]. 2014, **6**(18), 2441–2459. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.14.161

- [122] HUSSAIN, Chaudhery Mustansar, Chaudhery Ghazanfar HUSSAIN a Rüstem KEÇILI. White analytical chemistry approaches for analytical and bioanalytical techniques: Applications and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2023, **159**, 116905. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2022.116905
- [123] ABDEL-REHIM, Mohamed, Stig PEDERSEN-BJERGAARD, Abbi ABDEL-REHIM, Rafael LUCENA, Mohammad Mahdi MOEIN, Soledad CÁRDENAS a Manuel MIRÓ. Microextraction approaches for bioanalytical applications: An overview. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020, **1616**, 460790. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.460790
- [124] CUDJOE, Erasmus, Barbara BOJKO, Paul TOGUNDE a Janusz PAWLISZYN. *In vivo* solid-phase microextraction for tissue bioanalysis. *Bioanalysis* [online]. 2012, **4**(21), 2605–2619. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.12.250
- [125] KABIR, Abuzar, Marcello LOCATELLI a Halil ULUSOY. Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation. *Separations* [online]. 2017, **4**(4), 36. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations4040036
- [126] SEIDI, Shahram, Mohammad TAJIK, Mahroo BAHARFAR a Maryam REZAZADEH. Micro solid-phase extraction (pipette tip and spin column) and thin film solid-phase microextraction: Miniaturized concepts for chromatographic analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **118**, 810–827. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.06.036
- [127] HE, Yi a Marta CONCEIRO-GUISAN. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomedical Chromatography* [online]. 2019, **33**(1), e4444. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.4444
- [128] PEREIRA, J., J. GONÇALVES, V. ALVES a J.S. CÂMARA. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends. *Sample Preparation* [online]. 2013, **1** [vid. 2023-01-23]. ISSN 2299-677X. Dostupné z: doi:10.2478/sampre-2013-0005
- [129] LI, Wenkui a Francis L. S. TSE. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography* [online]. 2010, **24**(1), 49–65. ISSN 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1367
- [130] SHARMA, Abhisheak, Swati JAISWAL, Mahendra SHUKLA a Jawahar LAL. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2014, **6**(5), 399–414. ISSN 1942-7611. Dostupné z: doi:10.1002/dta.1646
- [131] LONDHE, Vaishali a Madhura RAJADHYAKSHA. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2020, **182**, 113102. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113102

- [132] SADONES, Nele, Sara CAPIAU, Pieter Mm DE KESEL, Willy E LAMBERT a Christophe P STOVE. Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. *Bioanalysis* [online]. 2014, **6**(17), 2211–2227. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.14.156
- [133] MEDVEDOVICI, Andrei, Elena BACALUM a Victor DAVID. Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques. *Biomedical Chromatography* [online]. 2018, **32**(1), e4137. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.4137
- [134] DENG, Pan, Yan ZHAN, Xiaoyan CHEN a Dafang ZHONG. Derivatization methods for quantitative bioanalysis by LC–MS/MS. *Bioanalysis* [online]. 2012, **4**(1), 49–69. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.11.298
- [135] DAVID, Victor, Serban C. MOLDOVEANU a Toma GALAON. Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomedical Chromatography* [online]. 2021, **35**(1) [vid. 2023-01-31]. ISSN 0269-3879, 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.5008
- [136] DANIELSON, Neil D., Patricia A. GALLAGHER a James J. BAO. Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2006 [vid. 2023-07-05]. ISBN 978-0-470-02731-8. Dostupné z: doi:10.1002/9780470027318.a1905
- [137] CARDINAEL, Pascal, Hervé CASABIANCA, Valerie PEULON-AGASSE a Alain BERTHOD. Sample Derivatization in Separation Science. In: Veronica PINO, Jared L ANDERSON, Alain BERTHOD a Apryll M STALCUP, ed. *Analytical Separation Science* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015 [vid. 2023-01-31], s. 063–063. ISBN 978-3-527-67812-9. Dostupné z: doi:10.1002/9783527678129.assep063
- [138] RAYNIE, Douglas. Analyte Derivatization as an Important Tool for Sample Preparation. *LCGC Europe*. 2018, **31**(1), LCGC Europe-01-01-2018, 42–45.
- [139] JONES, Andrew, Sercan PRAVADALI-CEKIC, Gary R. DENNIS a R. Andrew SHALLIKER. Post column derivatisation analyses review. Is post-column derivatisation incompatible with modern HPLC columns? *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **889**, 58–70. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.07.003
- [140] ROTTENBERG, Sven, Carmen DISLER a Paola PEREGO. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2021, **21**(1), 37–50. ISSN 1474-175X, 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/s41568-020-00308-y
- [141] DILRUBA, Shahana a Ganna V. KALAYDA. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2016, **77**(6), 1103–1124. ISSN 0344-5704, 1432-0843. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-016-2976-z
- [142] OUN, Rabbab, Yvonne E. MOUSSA a Nial J. WHEATE. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions* [online]. 2018, **47**(19), 6645–6653. ISSN 1477-9226, 1477-9234. Dostupné z: doi:10.1039/C8DT00838H

- [143] VENTURA, Giovanni, Cosima Damiana CALVANO, Ilario LOSITO, Giuliana BIANCO, Raffaella PASCALE, Francesco PALMISANO a Tommaso R.I. CATALDI. Effect of pH and mobile phase additives on the chromatographic behaviour of an amide-embedded stationary phase: Cyanocobalamin and its diamine monochloro-platinum(II) conjugate as a case study. *Journal of Separation Science* [online]. 2019, **42**(6), 1155–1162. ISSN 1615-9306, 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201801060
- [144] VOELKER, Troy a Min MENG. LC-MS Bioanalysis of Platinum Drugs. In: Wenkui LI, Jie ZHANG a Francis L.S. TSE, ed. *Handbook of LC-MS Bioanalysis* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc., 2013 [vid. 2022-08-28], s. 629–637. ISBN 978-1-118-67127-6. Dostupné z: doi:10.1002/9781118671276.ch49
- [145] RAUDENSKA, Martina, Jan BALVAN, Michaela FOJTU, Jaromir GUMULEC a Michal MASARIK. Unexpected therapeutic effects of cisplatin. *Metallomics* [online]. 2019, **11**(7), 1182–1199. ISSN 1756-5901, 1756-591X. Dostupné z: doi:10.1039/c9mt00049f
- [146] LEMMA, Tibebe, Rupasri MANDAL, Xing-Fang LI a Janusz PAWLISZYN. Investigation of interaction between human hemoglobin A0 and platinum anticancer drugs by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2008, **31**(10), 1803–1809. ISSN 16159306, 16159314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200700418
- [147] HEMSTRÖM, Petrus, Yvonne NYGREN, Erik BJÖRN a Knut IRGUM. Alternative organic solvents for HILIC separation of cisplatin species with on-line ICP-MS detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2008, **31**(4), 599–603. ISSN 16159306, 16159314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200700480
- [148] XIE, Feifan, Pieter COLIN a Jan VAN BOCXLAER. Zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry with HybridSPE-precipitation for the determination of intact cisplatin in human plasma. *Talanta* [online]. 2017, **174**, 171–178. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.06.002
- [149] BELL, Deanna N., Johnson J. LIU, Malcolm D. TINGLE a Mark J. MCKEAGE. Specific determination of intact cisplatin and monohydrated cisplatin in human plasma and culture medium ultrafiltrates using HPLC on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2006, **837**(1–2), 29–34. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.063
- [150] VERSCHRAAGEN, Miranda, Kasper VAN DER BORN, T. H. Ursula ZWIERS a Wim J. F. VAN DER VIJGH. Simultaneous determination of intact cisplatin and its metabolite monohydrated cisplatin in human plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 2002, **772**(2), 273–281. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(02)00108-3
- [151] ANDERSSON, Anita, Jan FAGERBERG, Rolf LEWENSOHN a Hans EHRSSON. Pharmacokinetics of Cisplatin and Its Monohydrated Complex in Humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1996, **85**(8), 824–827. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1021/js960037a

- [152] HANN, S., G. KOELLENSPERGER, Zs. STEFÁNKA, G. STINGEDER, M. FÜRHACKER, W. BUCHBERGER a R. M. MADER. Application of HPLC-ICP-MS to speciation of cisplatin and its degradation products in water containing different chloride concentrations and in human urine. *J. Anal. At. Spectrom.* [online]. 2003, **18**(11), 1391–1395. ISSN 0267-9477, 1364-5544. Dostupné z: doi:10.1039/B309028K
- [153] XIE, Feifan, Colin PIETER a Van Bocxlaer JAN. Electrospray ionization mass spectrometry for the hydrolysis complexes of cisplatin: implications for the hydrolysis process of platinum complexes: Electrospray ionization mass spectrometry for the hydrolysis complexes of cisplatin. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2017, **52**(7), 434–441. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.3940
- [154] LEMOINE, Lieselotte, Elsy THIJSEN, Jean-Paul NOBEN, Peter ADRIAENSENS, Robert CARLEER a Kurt Van der SPEETEN. A validated inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the quantification of total platinum content in plasma, plasma ultrafiltrate, urine and peritoneal fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **152**, 39–46. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.01.033
- [155] RUDNEV, Alexander V., Svetlana S. ALEKSENKO, Olga SEMENOVA, Christian G. HARTINGER, Andrei R. TIMERBAEV a Bernhard K. KEPPLER. Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method. *Journal of Separation Science* [online]. 2005, **28**(2), 121–127. ISSN 1615-9306, 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200401930
- [156] EHRSSON, H., I. WALLIN a J. YACHNIN. Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* [online]. 2002, **19**(4), 261–265. ISSN 1357-0560. Dostupné z: doi:10.1385/MO:19:4:261
- [157] FALTA, Thomas, Gunda KOELLENSPERGER, Alexander STANDLER, Wolfgang BUCHBERGER, Robert M. MADER a Stephan HANN. Quantification of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in spiked human plasma samples by ICP-SFMS and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) combined with ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2009, **24**(10), 1336. ISSN 0267-9477, 1364-5544. Dostupné z: doi:10.1039/b907011g
- [158] BROUWERS, E. E. M., M. M. TIBBEN, H. ROSING, M. J. X. HILLEBRAND, M. JOERGER, J. H. M. SCHELLENS a J. H. BEIJNEN. Sensitive inductively coupled plasma mass spectrometry assay for the determination of platinum originating from cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in human plasma ultrafiltrate. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2006, **41**(9), 1186–1194. ISSN 1096-9888. Dostupné z: doi:10.1002/jms.1087
- [159] MARTINČIČ, Anže, Maja CEMAZAR, Gregor SERSA, Viljem KOVAČ, Radmila MILAČIČ a Janez ŠČANČAR. A novel method for speciation of Pt in human serum incubated with cisplatin, oxaliplatin and carboplatin by conjoint liquid chromatography on monolithic disks with UV and ICP-MS detection. *Talanta* [online]. 2013, **116**, 141–148. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.05.016

- [160] MARTÍN, Julia, Dolores CAMACHO-MUÑOZ, Juan L. SANTOS, Irene APARICIO a Esteban ALONSO. Simultaneous determination of a selected group of cytostatic drugs in water using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry: Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2011, **34**(22), 3166–3177. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201100461
- [161] BROUWERS, E. E. M., M. M. TIBBEN, M. JOERGER, O. VAN TELLINGEN, H. ROSING, J. H. M. SCHELLENS a J. H. BEIJNEN. Determination of oxaliplatin in human plasma and plasma ultrafiltrate by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2005, **382**(7), 1484–1490. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-005-3302-5
- [162] DE JONG, Loek A. W., Fortuné M. K. ELEKONAWO, Marie LAMBERT, Jan Marie DE GOOYER, Henk M. W. VERHEUL, David M. BURGER, Johannes H. W. DE WILT, Etienne CHATELUT, Rob TER HEINE, Philip R. DE REUVER, Andre J. A. BREMERS a Nielka P. VAN ERP. Wide variation in tissue, systemic, and drain fluid exposure after oxaliplatin-based HIPEC: results of the GUTOX study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2020, **86**(1), 141–150. ISSN 0344-5704, 1432-0843. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-020-04107-y
- [163] CHALRET DU RIEU, Quentin, Mélanie WHITE-KONING, Laetitia PICAUD, Isabelle LOCHON, Sabrina MARSILI, Laurence GLADIEFF, Etienne CHATELUT a Gwenaël FERRON. Population pharmacokinetics of peritoneal, plasma ultrafiltrated and protein-bound oxaliplatin concentrations in patients with disseminated peritoneal cancer after intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion of oxaliplatin following cytoreductive surgery: correlation between oxaliplatin exposure and thrombocytopenia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2014, **74**(3), 571–582. ISSN 0344-5704, 1432-0843. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-014-2525-6
- [164] TANG, Caiming, Chao LI, Caixing TANG, Wei ZHAN, Hai ZHENG a Xianzhi PENG. Quantitative determination of platinum derived from cisplatin in human plasma ultrafiltrate using derivatization with diethyldithiocarbamate and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* [online]. 2013, **5**(24), 7117. ISSN 1759-9660, 1759-9679. Dostupné z: doi:10.1039/c3ay41649f
- [165] ZHANG, Wenjiang, Lesley SEYMOUR a Eric X. CHEN. Determination of intact oxaliplatin in human plasma using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2008, **876**(2), 277–282. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2008.10.055
- [166] ITO, Hajime, Hiroaki YAMAGUCHI, Asuka FUJIKAWA, Nobuaki TANAKA, Ayako FURUGEN, Kazuaki MIYAMORI, Natsuko TAKAHASHI, Jiro OGURA, Masaki KOBAYASHI, Takehiro YAMADA, Nariyasu MANO a Ken ISEKI. A full validated hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of oxaliplatin in human plasma ultrafiltrates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2012, **71**, 99–103. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2012.08.010

- [167] Metabocard for Cisplatin (HMDB0014656). *The Human Metabolome Database*, <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0014656> [online]. Dostupné z: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0014656#spectra>
- [168] ARENAS, Marina, Julia MARTÍN, Juan Luis SANTOS, Irene APARICIO, Omar FERNÁNDEZ-SANFRANCISCO a Esteban ALONSO. Comparison of Different Techniques for the Determination of Platinized Cytostatic Drugs in Urine Samples. *Molecules* [online]. 2022, **27**(23), 8139. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27238139
- [169] SAMANIDOU, Victoria, Leda KOVATSI, Domniki FRAGOU a Konstantinos RENTIFIS. Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. *Bioanalysis* [online]. 2011, **3**(17), 2019–2046. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.11.168
- [170] BARROSO, Mário, Ivo MORENO, Beatriz DA FONSECA, João António QUEIROZ a Eugenia GALLARDO. Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology. *Bioanalysis* [online]. 2012, **4**(14), 1805–1826. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.12.139
- [171] SCHROEDER, J. L., L. J. MARINETTI, R. K. SMITH, W. E. BREWER, B. L. CLELLAND a S. L. MORGAN. The Analysis of 9-Tetrahydrocannabinol and Metabolite in Whole Blood and 11-Nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Urine Using Disposable Pipette Extraction with Confirmation and Quantification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. 2008, **32**(8), 659–666. ISSN 0146-4760, 1945-2403. Dostupné z: doi:10.1093/jat/32.8.659
- [172] KRČMOVA, Lenka, Dagmar SOLICHOVA, Bohuslav MELICHAR, Marketa KASPAROVA, Jiri PLISEK, Luboš 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
- [173] GERINA-BERZINA, A., S. HASNERE, A. KOLESOV, S. UMBRASHKO, R. MUCENIECE a I. NAKURTE. Determination of cisplatin in human blood plasma and urine using liquid chromatography-mass spectrometry for oncological patients with a variety of fatty tissue mass for prediction of toxicity. *Experimental Oncology*. 2017.
- [174] KAUSHIK, K. Harish, Vijay K. SRIPURAM, Satish BEDADA, Narsimha Y. REDDY, G. Indira PRIYADARSHINI a Krishna R. DEVARAKONDA. A simple and sensitive validated HPLC method for quantitative determination of cisplatin in human plasma. *Clinical Research and Regulatory Affairs* [online]. 2010, **27**(1), 1–6. ISSN 1060-1333, 1532-2521. Dostupné z: doi:10.3109/10601330903490462
- [175] SHAIK, Abdul Naveed, Deborah A. ALTOMARE, Lawrence J. LESKO a Mirjam N. TRAME. Development and validation of a LC–MS/MS assay for quantification of cisplatin in rat plasma and urine. *Journal of Chromatography B* [online]. 2016, **1046**, 243–249. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.11.027
- [176] LOPEZ-FLORES, A., R. JURADO a P. GARCIA-LOPEZ. A high-performance liquid chromatographic assay for determination of cisplatin in plasma, cancer

- cell, and tumor samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2005, **52**(3), 366–372. ISSN 10568719. Dostupné z: doi:10.1016/j.vascn.2005.06.005
- [177] YAROSHENKO, D. V., A. V. GRIGORIEV, A. A. SIDOROVA a L. A. KARTSOVA. Determination of cisplatin in blood plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2013, **68**(2), 156–160. ISSN 1061-9348, 1608-3199. Dostupné z: doi:10.1134/S1061934813020160
- [178] OTSUKI, Yasutaka, Akira KOTANI a Fumiyo KUSU. Capillary liquid chromatography with UV detection using N,N-diethyl dithiocarbamate for determining platinum-based antitumor drugs in plasma. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2012, **60**(5), 665–669. ISSN 1347-5223. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.60.665
- [179] AUGEY, V., M. COCIGLIO, M. GALTIER, R. YEAROO, V. PINSANI a F. BRESSOLLE. High-performance liquid chromatographic determination of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in plasma ultrafiltrate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1995, **13**(9), 1173–1178. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/0731-7085(95)01544-U
- [180] BROUWERS, Elke EM, Alwin DR HUITEMA, Jos H BEIJNEN a Jan HM SCHELLENS. Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Clinical Pharmacology* [online]. 2008, **8**(1), 7. ISSN 1472-6904. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6904-8-7
- [181] MA, Jianguo, Gerrit STOTER, Jaap VERWEIJ a J. H. M. SCHELLENS. Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 1996, **38**(4), 391–394. ISSN 1432-0843. Dostupné z: doi:10.1007/s002800050501
- [182] MIKKELSEN, Mette Schou, Jan BLAAKAER, Lone Kjeld PETERSEN, Luise Gram SCHLEISS a Lene Hjerrild IVERSEN. Pharmacokinetics and toxicity of carboplatin used for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in treatment of epithelial ovarian cancer. *Pleura and Peritoneum* [online]. 2020, **0**(0) [vid. 2022-10-09]. ISSN 2364-768X, 2364-7671. Dostupné z: doi:10.1515/pp-2020-0137
- [183] MIYAGI, Yasunari, Keiichi FUJIWARA, Junzo KIGAWA, Hiroaki ITAMOCHI, Shoji NAGAO, Eriko AOTANI, Naoki TERAKAWA a Ichiro KOHNO. Intraperitoneal carboplatin infusion may be a pharmacologically more reasonable route than intravenous administration as a systemic chemotherapy. A comparative pharmacokinetic analysis of platinum using a new mathematical model after intraperitoneal vs. intravenous infusion of carboplatin—A Sankai Gynecology Study Group (SGSG) study. *Gynecologic Oncology* [online]. 2005, **99**(3), 591–596. ISSN 0090-8258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2005.06.055
- [184] ROYER, Bernard, Delphine DELROEUX, Emmanuel GUARDIOLA, Marielle COMBE, Guillaume HOIZEY, Damien MONTANGE, Jean-Pierre KANTELIP, Bruno CHAUFFERT, Bruno HEYD a Xavier PIVOT. Improvement in intraperitoneal intraoperative cisplatin exposure based on pharmacokinetic

- analysis in patients with ovarian cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2008, **61**(3), 415–421. ISSN 1432-0843. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-007-0484-x
- [185] MOTZER, Robert J., Brian I. RINI, David F. MCDERMOTT, Bruce G. REDMAN, Timothy M. KUZEL, Michael R. HARRISON, Ulka N. VAISHAMPAYAN, Harry A. DRABKIN, Saby GEORGE, Theodore F. LOGAN, Kim A. MARGOLIN, Elizabeth R. PLIMACK, Alexandre M. LAMBERT, Ian M. WAXMAN a Hans J. HAMMERS. Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2015, **33**(13), 1430–1437. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2014.59.0703
- [186] MOTZER, Robert J., Bernard ESCUDIER, Saby GEORGE, Hans J. HAMMERS, Sandhya SRINIVAS, Scott S. TYKODI, Jeffrey A. SOSMAN, Elizabeth R. PLIMACK, Giuseppe PROCOPIO, David F. MCDERMOTT, Daniel CASTELLANO, Toni K. CHOUËIRI, Frede DONSKOV, Howard GURNEY, Stéphane OUDARD, Martin RICHARDET, Katriina PELTOLA, Ajjai S. ALVA, Michael CARDUCCI, John WAGSTAFF, Christine CHEVREAU, Satoshi FUKASAWA, Yoshihiko TOMITA, Thomas C. GAULER, Christian K. KOLLMANNSBERGER, Fabio A. SCHUTZ, James LARKIN, David CELLA, M. Brent MCHENRY, Shruti Shally SAGGI a Nizar M. TANNIR. Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial. *Cancer* [online]. 2020, **126**(18), 4156–4167. ISSN 1097-0142. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.33033
- [187] UEDA, Kosuke, Shigetaka SUEKANE, Hirofumi KUROSE, Naoki ITO, Naoyuki OGASAWARA, Tasuku HIROSHIGE, Katsuaki CHIKUI, Kazuhisa EJIMA, Keiichiro UEMURA, Makoto NAKIRI, Kiyoaki NISHIHARA, Mitsunori MATSUO a Tsukasa IGAWA. Improved Survival of Real-world Japanese Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma Treated With Immuno-oncology Combination Therapy. *Anticancer Research* [online]. 2022, **42**(9), 4573–4580. ISSN 0250-7005, 1791-7530. Dostupné z: doi:10.21873/anticancer.15960
- [188] MOTZER, Robert J., Nizar M. TANNIR, David F. MCDERMOTT, Osvaldo ARÉN FRONTERA, Bohuslav MELICHAR, Toni K. CHOUËIRI, Elizabeth R. PLIMACK, Philippe BARTHÉLÉMY, Camillo PORTA, Saby GEORGE, Thomas POWLES, Frede DONSKOV, Victoria NEIMAN, Christian K. KOLLMANNSBERGER, Pamela SALMAN, Howard GURNEY, Robert HAWKINS, Alain RAVAUD, Marc-Oliver GRIMM, Sergio BRACARDA, Carlos H. BARRIOS, Yoshihiko TOMITA, Daniel CASTELLANO, Brian I. RINI, Allen C. CHEN, Sabeen MEKAN, M. Brent MCHENRY, Megan WIND-ROTOLO, Justin DOAN, Padmanee SHARMA, Hans J. HAMMERS a Bernard ESCUDIER. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [online]. 2018, **378**(14), 1277–1290. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1712126
- [189] MONTERO, A. J., C. M. DIAZ-MONTERO, R. E. MILLIKAN, J. LIU, K. -A. DO, S. HODGES, E. JONASCH, B. W. MCINTYRE, P. HWU a N. TANNIR. Cytokines and angiogenic factors in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with interferon- α : association of pretreatment serum levels with survival. *Annals of Oncology* [online]. 2009, **20**(10), 1682–1687. ISSN 0923-7534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdp054

- [190] YASUDA, Yosuke, Kazutaka SAITO, Takeshi YUASA, Shinichi KITSUKAWA, Shinji URAKAMI, Shinya YAMAMOTO, Junji YONESE, Shunji TAKAHASHI a Iwao FUKUI. Prognostic impact of pretreatment C-reactive protein for patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. *International Journal of Clinical Oncology* [online]. 2013, **18**(5), 884–889. ISSN 1437-7772. Dostupné z: doi:10.1007/s10147-012-0454-0
- [191] ISHIHARA, Hiroki, Hidekazu TACHIBANA, Toshio TAKAGI, Tsunenori KONDO, Hironori FUKUDA, Kazuhiko YOSHIDA, Junpei IIZUKA, Hirohito KOBAYASHI, Masayoshi OKUMI, Hideki ISHIDA a Kazunari TANABE. Predictive Impact of Peripheral Blood Markers and C-Reactive Protein in Nivolumab Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Targeted Oncology* [online]. 2019, **14**(4), 453–463. ISSN 1776-260X. Dostupné z: doi:10.1007/s11523-019-00660-6
- [192] CERMANOVÁ, Melanie, Bohuslav MELICHAR, Dagmar SOLICHOVÁ, Milan BLÁHA, Vladimír BLÁHA, Martin BLAZEK, Vladimír MAŠÍN, Jaroslav CERMAN a Zdeněk ZADÁK. Urinary Neopterin and Microalbuminuria in Patients Treated by Low-density Lipoprotein Apheresis. *Pteridines* [online]. 2005, **16**(4), 174–183. ISSN 2195-4720. Dostupné z: doi:10.1515/pteridines.2005.16.4.174
- [193] HENRY, Brandon Michael, Maria Helena Santos de OLIVEIRA, Stefanie BENOIT, Mario PLEBANI a Giuseppe LIPPI. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2020, **58**(7), 1021–1028. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2020-0369
- [194] BONETTI, Graziella, Filippo MANELLI, Andrea PATRONI, Alessandra BETTINARDI, Gianluca BORRELLI, Gianfranco FIORDALISI, Antonio MARINO, Annamaria MENOLFI, Sara SAGGINI, Roberta VOLPI, Adriano ANESI a Giuseppe LIPPI. Laboratory predictors of death from coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the area of Valcamonica, Italy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2020, **58**(7), 1100–1105. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2020-0459
- [195] FUCHS, Dietmar a Magnus GISSLEN. Laboratory diagnostic value of neopterin measurements in patients with COVID-19 infection. *Pteridines* [online]. 2021, **32**(1), 1–4. ISSN 2195-4720. Dostupné z: doi:10.1515/pteridines-2021-0001
- [196] ZHENG, Bojian, Kai-Yuan CAO, Cangel P. Y. CHAN, Junet W. Y. CHOI, Wingman LEUNG, Manfai LEUNG, Zhao-Hui DUAN, Yang GAO, Ming WANG, Biao DI, Jörg M. HOLLIDT, Andreas BERGMANN, Matthias LEHMANN, Ilka RENNEBERG, John S. L. TAM, Paul K. S. CHAN, George W. H. CAUTHERLEY, Dietmar FUCHS a Reinhard RENNEBERG. Serum neopterin for early assessment of severity of severe acute respiratory syndrome. *Clinical Immunology* [online]. 2005, **116**(1), 18–26. ISSN 1521-6616. Dostupné z: doi:10.1016/j.clim.2005.03.009
- [197] RASMI, Yousef, Nadia HEIDARI, Kevser KÜBRA KIRBOĞA, Shima HATAMKHANI, Burcu TEKIN, Shahryar ALIPOUR, Roya NADERI, Yeghaneh FARNAMIAN a Ilknur AKCA. The importance of neopterin in COVID-19: The prognostic value and relation with the disease severity. *Clinical Biochemistry*

[online]. 2022, **104**, 1–12. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2022.03.002

- [198] BELLMANN-WEILER, Rosa, Lukas LANSER, Francesco BURKERT, Stefanie SEIWALD, Gernot FRITSCHE, Sophie WILDNER, Andrea SCHROLL, Sabine KOPPELSTÄTTER, Katharina KURZ, Andrea GRIESMACHER a Günter WEISS. Neopterin Predicts Disease Severity in Hospitalized Patients With COVID-19. *Open Forum Infectious Diseases* [online]. 2021, **8**(1), ofaa521. ISSN 2328-8957. Dostupné z: doi:10.1093/ofid/ofaa521

7. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ

1. Application of microextraction in pipette tips in clinical and forensic toxicology

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, František Švec
Trends in Analytical Chemistry (2021), 143, 116404
Impakt faktor (IF₂₀₂₁): 14,908 (D1)
Article Influence Score (AIS₂₀₂₁): 1,976 (D1)

Podíl autorky: rešerše literatury zaměřující se na použití mikroextrakce v pipetovacích špičkách, příprava a revize manuskriptu

2. Using HPLC for the determination of platinum drugs in biological matrixes after derivatization with diethyldithiocarbamate

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, Milan Vošmik, Bohuslav Melichar, František Švec
Journal of Separation Science (2023), doi: 10.1002/jssc.202300392 (v tisku)
Impakt faktor (IF₂₀₂₂): 3,1; podle IF: Q2
Article Influence Score (AIS₂₀₂₂): 0,371; podle AIS: Q3

Podíl autorky: experimentální práce – vývoj metody a její optimalizace pro další biologické matrice, zpracování dat, příprava a revize manuskriptu

3. Biomarkers of Inflammation and Progression During Immunotherapy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma

Martina Spisarová, Bohuslav Melichar, Jarmila Juráňová, Anežka Zemánková, Tomáš Adam, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Lenka Kujovská Krčmová, Dorota Turoňová, Hana Študentová
In Vivo (2023), 37 (1), 393-399
Impakt faktor (IF₂₀₂₂): 2,3; podle IF: Q4
Article Influence Score (AIS₂₀₂₂): 0,422; podle AIS: Q4

Podíl autorky: experimentální práce realizovaná ve výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK – úprava a analýza odebraných vzorků od pacientů postižených renálním karcinomem podstupujících imunoterapii ve FNOL, zpracování výsledků analýz, revize manuskriptu

4. Neopterin and kynurenine in serum and urine as prognostic biomarkers in hospitalized patients with delta and omicron variant SARS-CoV-2 Infection

Lenka Kujovská Krčmová, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Petr Šmahel, Mikuláš Skála, Vladimír Koblížek, Jan Škop, Dorota Turoňová, Markéta Gančarčíková, Bohuslav Melichar

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2023), 37285602

Impakt faktor (IF₂₀₂₂): 6,8; podle IF: Q1

Article Influence Score (AIS₂₀₂₂): 1,071; podle AIS: Q1

Podíl autorky: experimentální práce realizovaná ve výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK – úprava a analýza odebraných vzorků od pacientů postižených virem SARS-CoV-2 v rámci studie probíhající ve FNHK, zpracování výsledků analýz, revize manuskriptu

8. PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ

8.1. Přednášky

1. The method development for the determination of cisplatin in human plasma

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová

10. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference; Hradec Králové, Česká republika; 22.-23.1.2020

2. Determination of platinum drugs in human plasma after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová

11. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference; Hradec Králové, Česká republika; 27.1.-28.1.2021

3. Application of derivatization in analysis of platinum compounds

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová

12. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference; Hradec Králové, Česká republika; 1.-2.2.2022

-cena vědecké komise za sdělení formou prezentace

4. Microsampling for cocaine analysis - the future or just a fairy tale?

Dorota Turoňová, Michele Protti, Lenka Kujovská Krčmová, Laura Mercolini

EBF 8th Young Scientist Symposium; Hasselt, Belgie; 19.-20.5.2022

5. Advanced microsampling strategies based on dried blood spot in illicit drug analysis

Dorota Turoňová, Michele Protti, Laura Mercolini, Lenka Kujovská Krčmová

13. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference; Hradec Králové, Česká republika; 1.-2.2.2023

8.2. Plakátová sdělení

Prezentující autor

1. Challenges and pitfalls of in-situ derivatization in bioanalysis

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová

*Česká chromatografická škola-HPLC 2021; Zaječí, Česká republika;
19.-22.9.2021*

2. Challenges in sample preparation for cytostatic toxicity evaluation in various matrices after HIPEC

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová

*5th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2021;
Caparica, Portugalsko; 15.-18.11.2021*

-cena vědecké komise za posterové sdělení - Excellent Poster Presentation Prize

3. Evaluation of a New Microfluidic DBS Technology for Cocaine Analysis

Dorota Turoňová, Marco Cirrincione, Lenka Kujovská Krčmová, Roberto Mandrioli, Michele Protti, Laura Mercolini

*26th International Symposium on Separation Sciences; Ljubljana, Slovinsko;
28.6.-1.7.2022*

4. Application of monolithic and core-shell columns in clinical research and practice

Dorota Turoňová, Chaweewan Suwanvecho, Kateřina Matoušová, Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová

51th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Düsseldorf, Německo, 18.-22.6.2023

Spoluautor

- 1. A modern UHPLC-MS/MS method for the determination of vitamin K in serum/plasma**
Kristýna Mrštná, Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, Ludmila Matysová
5th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2021; Caparica, Portugalsko; 15.-18.11.2021
- 2. Analysis of Vitamin K in Human Plasma and Serum with UHPLC-MS/MS**
Kristýna Mrštná, Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, Ludmila Matysová
26th International Symposium on Separation Sciences; Ljubljana, Slovinsko; 28.6.-1.7.2022
- 3. Sample preparation in clinical practice-feasibility and challenges of microextraction techniques**
Kateřina Matoušová, Kristýna Mrštná, Lenka Javorská, Dorota Turoňová, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová
50th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, San Diego, USA, 18.-23.6.2022
- 4. The importance of vitamin K serum levels and its distribution in lipoprotein fractions**
Kristýna Mrštná, Dorota Turoňová, Kateřina Matoušová, Lenka Kujovská Krčmová
XXXIX. MEZINÁRODNÍ KONGRES SKVIMP; Hradec Králové, Česká republika; 1.-3.6.2023
- 5. Miniaturized sample preparation for determination of retinol in COVID-19 patients using pipette-tip microextraction**
Chaweewan Suwanvecho, Dorota Turoňová, Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Lenka Kujovská Krčmová
51th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Düsseldorf, Německo, 18.-22.6.2023

8.3. GRANTOVÉ PROJEKTY

- 1. Grant Ministerstva zdravotnictví ČR NV 18-03-00130 (2018-2022)**
Faktory ovlivňující toxicitu hypertermické intraperitoneální chemoterapie
-členka řešitelského kolektivu od roku 2019

- 2. Grant Interní soutěže Fakultní nemocnice v Hradci Králové 81-28 (2022)**
Stanovení jednotlivých forem vitamínu K pomocí kombinace moderních separačních technik UHPLC-MS/MS a ultracentrifugace pro budoucí testování rozdílů v parametrech koagulace krve mezi zdravými osobami a pacienty s metabolickými chorobami
-členka řešitelského kolektivu

- 3. Grant grantové agentury UK (GAUK) 215016 (2021-2022)**
Moderní preanalýza jako nástroj pro řešení komplikací při stanovení vitamínu K
-spoluřešitelka grantu

- 4. Grant Ministerstva zdravotnictví ČR - Junior NU21J-02-00021 (2021-2024)**
Rozdíly v parametrech agregace krevních destiček a koagulace krve mezi zdravými osobami a pacienty s metabolickými chorobami
-členka řešitelského kolektivu od roku 2022

- 5. Grant Interní soutěže Fakultní nemocnice v Hradci Králové (2023)**
Microsampling a mikroextrakce jako nástroj pro efektivnější a dostupnější laboratorní diagnostiku
-členka řešitelského kolektivu

- 6. Grant Ministerstva zdravotnictví ČR- NU22-A-108 (2022-2023)**
Stanovení potenciálních prognostických laboratorních markerů u pacientů s COVID-19
-členka řešitelského kolektivu od roku 2023

8.4. STÁŽ

1-7/2022

Zahraniční stáž v laboratoři farmako-toxikologických analýz (PTA Lab) na Fakultě Farmacie a biotechnologie Boloňské univerzity (Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum – University of Bologna), Boloňa, Itálie (Erasmus mobility program, 3014521)

9. PŘÍLOHY

9.1. Příloha 1

Application of microextraction in pipette tips in clinical and forensic toxicology

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, František Švec

Trends in Analytical Chemistry (2021), 143, 116404

9.2. Příloha 2

Using HPLC for the determination of platinum drugs in biological matrixes after derivatization with diethyldithiocarbamate

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, Milan Vošmik, Bohuslav Melichar, František Švec

Journal of Separation Science (2023), doi:10.1002/jssc.202300392 (v tisku)

9.3. Příloha 3

Biomarkers of Inflammation and Progression During Immunotherapy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma

Martina Spisarová, Bohuslav Melichar, Jarmila Juráňová, Anežka Zemánková, Tomáš Adam, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Lenka Kujovská Krčmová, Dorota Turoňová, Hana Študentová

In Vivo (2023), 37 (1), 393-399

9.4. Příloha 4

Neopterin and kynurenine in serum and urine as prognostic biomarkers in hospitalized patients with delta and omicron variant SARS-CoV-2 infection

Lenka Kujovská Krčmová, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Petr Šmahel, Mikuláš Skála, Vladimír Koblížek, Jan Škop, Dorota Turoňová, Markéta Gančarčíková, Bohuslav Melichar

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2023), 37285602