

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



METODY ANALYTICKÉ CHEMIE PRO ANALÝZU
BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK, LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ A
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Disertační práce

Školitel: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

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

Hradec Králové 2024

PharmDr. Kristýna Mrštná

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě děkuji svým školitelkám, doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D., za její odborné vedení a podporu, bez jejíž pomoci, pozitivní energie a trpělivosti by tato disertační práce ani jiné publikace neměly šanci vzniknout. Stejně tak jsem vděčná své druhé školitelce doc. PharmDr. Ludmile Matysové Ph.D., za její podporu a přátelské jednání, které mi usnadnily mé studium.

Zvláštní uznání patří prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr.h.c. za to, že mi poskytl možnost pracovat ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové a zapojit se do různých výzkumných projektů. Jsem vděčná za spolupráci s prof. PharmDr. Přemyslem Mladěnkou, Ph.D. a jeho týmem, díky kterému mohla vzniknout značná část této práce.

Děkuji celému kolektivu Katedry analytické chemie za možnosti vzdělávání u nás i v zahraničí a také za vytváření příznivé a přátelské atmosféry v laboratoři i mimo ni. Mé upřímné poděkování patří také všem studentům doktorského studia, s nimiž jsem měla tu čest spolupracovat. Mimořádné poděkování patří současným i bývalým členům Výzkumné laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové, mezi něž patří RNDr. Lenka Javorská Ph.D., RNDr. Dorota Turoňová Ph.D., RNDr. Andrea Vernerová Ph.D., MSc. Chaweewan Suwanvecho, Mgr. Nikola Přívratká, Filip Hátle a Iveta Svobodová. Zvláště jsem vděčná PharmDr. Kateřině Matoušové Ph.D. za její neutuchající podporu a povzbuzování v průběhu celého mého doktorského studia.

Jsem vděčná doc. Renatě Wietecha-Posluszny za zprostředkování mé stáže v Laboratoři forenzní chemie na Fakultě chemie Jagellonské univerzity v Krakově. A samozřejmě děkuji i prof. Fioně Reagan a jejímu týmu za zprostředkování stáže na Water Institute na chemické fakultě Dublin City University v Dublinu. Členové týmu, mezi něž patří Chloe Richards Ph.D., Sean Power Ph.D., BSc. Stefania Scurtu., MSc. Adrián Delgado Ph.D., MSc. Martin Nolan a Dylan O'Flynn Ph.D. mi nejen pomohli rozvinout mé analytické znalosti, ale vytvořili pro mě nezapomenutelnou vzpomínku, za což jsem jim velmi vděčná.

Děkuji za podporu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 662), bez které by tato práce nemohla vzniknout. Pro můj výzkum a zahraniční konference byla nedocenitelná finanční podpora z grantových projektů AZV MZ ČR (18-03-00130, NU21J-02-00021), projektu GAUK (360221). Děkuji programu Erasmus+ za umožnění dvou

zahraničních stáží. A děkuji za finanční podporu Katedry analytické chemie, která mi umožnila prezentovat svou práci na konferencích a účastnit se vzdělávacích kurzů. Především jsem hluboce vděčná své rodině a svému manželovi Ondrovi, jejichž podpora byla zásadní po celou dobu mého magisterského i doktorského studia.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svých školitelek. Veškerá literatura a 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 10.7.2024

.....

Kristýna Mrštná

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: PharmDr. Kristýna Mrštná

Školitel: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

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

Název disertační práce: Metody analytické chemie pro analýzu biologicky aktivních látek, léčivých přípravků a životního prostředí

Tato práce je zaměřena na využití analytických technik ve farmacii, laboratorní diagnostice a ekologii. Část řešící bioanalýzu se zabývá stanovením endogenních látek v různých biomatricích, jejich vlivem na analýzu a přibližuje problematiku validace bioanalytických metod. Konkrétní experimentální studie se pak orientují na stanovení vitamínu K, jakožto méně prozkoumaného zástupce vitamínů rozpustných v tucích. Stanovení vitamínu K, který hraje klíčovou roli v lidském organismu, je výzvou v mnoha aspektech, zejména díky jeho velmi nízkým koncentracím, obtížnou deproteinací, vlastnosti ulpívat na povrchích a silné fotosenzitivitě. Řešením je použití vhodné úpravy vzorku a jejího spojení s moderními, selektivními a citlivými technikami typu hmotnostní spektrometrie. Naším cílem bylo tedy vyvinout jednoduchou, rychlou a citlivou metodiku, kterou by bylo možné použít pro výzkumní účely, ale i v rutinních laboratořích. Nová UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení různých forem vitamínu K (K1, MK4, MK7, MK9) v lidském a myším séru a lipoproteinových frakcích tyto požadavky splňuje a již byla využita pro několik klinických studií. Dále se experimentální část zabývá analýzou vitamínu A a E v mateřském mléce a zejména ovlivněním jejich hladin během zpracování mateřského mléka různými technikami. Další oblastí, kterou jsme řešili v rešeršní práci, byla problematika stanovení kynureninu – markeru zánětu v různých biologických matricích. Publikace by měla sloužit výzkumníkům, začínajícím s analýzou této látky pro jednodušší orientaci v problematice její analýzy. Práce prezentuje její hladiny

Abstrakt

v jednotlivých matricích a hlavní aspekty jejího stanovení i v návaznosti na klinický význam.

Naopak exogenními látkami – léčivy se zabývá farmaceutická část této disertační práce. V preformulační studii pro stanovení postupného uvolňování terbinafinu jsme řešili nejvhodnější variantu polymerního nosiče. Tato práce zavedla novou metodu využívající bifenylovou kolonu k separaci terbinafinu a jeho rozkladných produktů a potvrdila praktický potenciál polymerních nosičů na bázi kyseliny poly(mléčné a glykolové) pro topické podávání terbinafinu. Dále byla vyvinuta metoda stanovení cyklosporinu, která byla použita při výběru vhodné techniky pro začlenění cyklosporinu do anorganických porézních pomocných látek.

Třetí část, týkající se analýzy životního prostředí, konkrétně kontaminantů ve vodních plochách, věnuje svou pozornost látkám běžně označovaným jako „kontaminanty vzbuzující obavy“. Radíme sem látky ze skupin pesticidů, farmaceutik, látky používané k fotoprotekci a rovněž látky perfluorované nebo polyfluorované známé především pod zkratkou PFAS. Monitorování hladin těchto látek v životním prostředí je nezbytné pro zjištění, v jaké míře jsou již rozšířeny a zda je nutno zavádět případná opatření pro jejich budoucí omezené užití.

V závěru disertační práce je uveden přehled publikačních a ostatních výstupů.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: PharmDr. Kristýna Mrštná

Supervisor: assoc. prof. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

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

Title of Dissertation Thesis: Analytical Chemistry Methods for the Analysis of Biologically Active Substances, Pharmaceuticals and the Environment

This work focuses on the use of analytical techniques in pharmacy, laboratory diagnostics, and ecology. The bioanalysis section deals with the determination of endogenous substances in various biomatrices, their impact on analysis, and addresses the issue of bioanalytical method validation. Specific experimental studies then focus on the determination of vitamin K, a less-studied fat-soluble vitamin. Determining vitamin K, which plays a crucial role in the human body, is challenging in many aspects, particularly due to its very low concentrations, difficult deproteinization, tendency to adhere to surfaces, and strong photosensitivity. The solution lies in the use of appropriate sample preparation, which is also utilized in conjunction with modern, selective, and sensitive techniques such as mass spectrometry. Our goal was to develop a simple, quick, and sensitive methodology that could be used in routine laboratories as well as for research purposes. The new UHPLC-MS/MS method for determining various forms of vitamin K (K1, MK4, MK7, MK9) in human and mouse serum and lipoprotein fractions meets these requirements and has already been used in several clinical studies. Furthermore, the experimental part addresses the analysis of vitamins A and E in breast milk, particularly the impact on their levels during milk processing using various techniques. Another area we addressed in the review work was the issue of determining kynurenine – a inflammation marker in various biological matrices. The publication should serve researchers beginning the analysis of this substance for easier orientation

Abstract

in the issue of its analysis, presenting its levels in individual matrices and the main aspects of its determination in connection with clinical significance.

Conversely, exogenous substances – drugs are the focus of the pharmaceutical part of this dissertation. In a preformulation study for determining the adjustable release of terbinafine, we addressed the most suitable variant of the polymer carrier. This work introduced a new method using a biphenyl column for the separation of terbinafine and its degradation products and confirmed the practical potential of polymer carriers based on poly(lactic-co-glycolic acid) for the topical administration of terbinafine. Furthermore, a method for determining cyclosporine was developed, which was used in selecting the appropriate technique for incorporating cyclosporine into inorganic porous excipients.

The third part, concerning environmental analysis, specifically contaminants in water bodies, focuses on substances commonly referred to as “substances/contaminants of concern.” These include pesticides, pharmaceuticals, photoprotection agents, and perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances known mainly by the abbreviation PFAS. Monitoring the levels of these substances in the environment is essential to determine the extent of their spread and whether measures need to be implemented to limit their future use.

At the end of the dissertation, an overview of publications and other outputs is provided.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	14
1. ÚVOD	16
2. CÍL PRÁCE	17
3. TEORETICKÁ ČÁST	18
3.1. Současné postavení analytické chemie	18
3.2. Problematika analýzy v biologickém materiálu	20
3.2.1. Ovlivnění bioanalýzy fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu	20
3.2.2. Typ a povaha biologické matrice	23
3.2.3. Analýza	25
3.2.4. Validace bioanalytických metod	29
3.2.5. Vybrané analyty stanovované v biologických matricích	34
3.3. Problematika farmakoanalýzy	38
3.3.1. Validace farmakoanalytických metod	38
3.3.2. Vybraná léčiva stanovovaná pomocí UHPLC	41
3.4. Problematika environmentální analýzy	44
3.4.1. Důvody k analýze vody	44
3.4.2. Legislativní normy	45
4. KOMENTÁŘE K PUBLIKOVANÝM VÝSTUPŮM	46
4.1. Komentáře k pracím z oblasti klinické analýzy	46
4.1.1. Rešeršní práce: Vitamín K – zdroje, fyziologická úloha, kinetika, nedostatek, detekce, terapeutické použití a toxicita	46
4.1.2. Analýza vitamínu K ₁ a hlavních variant K ₂ v séru a lipoproteinových frakcích potkanů/lidí pomocí rychlé, jednoduché a citlivé metody UHPLC-MS/MS	49
4.1.3. Síla moderních extrakčních technik: Průlom v extrakci vitamínu K z lidského séra	59
4.1.4. Pokroky v analýze kynureninu	64

Obsah

4.1.5.	Obsah α -tokoferolu a retinolu v pasterizovaném a vysokotlakově zpracovaném lidském mléce během 6 měsíců skladování	68
4.2.	Komentáře k pracím z oblasti farmaceutické analýzy	72
4.2.1.	Analýza terbinafinu v lékových systémech na bázi PLGA pomocí rychlé a citlivé metody UHPLC-DAD	72
4.2.2.	Srovnání „liquisolid“ techniky a techniky společného mletí pro inkorporaci špatně rozpustného léčiva do anorganických porézních pomocných látek.....	78
4.3.	Komentáře k pracím z oblasti životního prostředí	80
4.3.1.	Výskyt léčivých látek vzbuzujících obavy v irských povrchových vodách během a po omezení v rámci COVID 19.	80
4.3.2.	Studie „SOURCE-TO-SEA“ výskytu perfluorovaných a polyfluorovaných látek (PFAS) vzbuzujících obavy v Irsku	82
5.	ZÁVĚR.....	84
6.	LITERATURA	86
7.	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ	90
8.	PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ, GRANTOVÝCH PROJEKTŮ A STÁŽÍ	92
8.1.	Přednášky.....	92
8.2.	Plakátová sdělení	93
8.3.	Řešené grantové projekty	95
8.4.	Absolvované stáže.....	95
9.	PŘÍLOHY	97
9.1.	Příloha 1	97
9.2.	Příloha 2	98
9.3.	Příloha 3	99
9.4.	Příloha 4	100
9.5.	Příloha 5	101
9.6.	Příloha 6	102
9.7.	Příloha 7	103
9.8.	Příloha 8 (plakátové sdělení).....	104

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CECs:	Kontaminanty vzbuzujícími obavy (Contaminants of Emerging Concern)
CSF	Mozkomíšní mok (Cerebrospinal Fluid)
CyA:	Cyclosporin-A
DAD:	Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
EU:	Evropská unie
DPX špičky	Disperzní pipetovací extrakční špičky
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
FCC	Funkcionalizovaný uhlíčan vápenatý (Functionalized Calcium Carbonate)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GvHD:	Graft-versus-Host Disease
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě (High-Density Lipoprotein)
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha (Hydrophilic-Liphophilic Balance)
HPLC:	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HP	Holderova pasterizace
HPP	Vysokotlaké zpracování (High-Pressure Processing)
IDO	Indoleamin 2,3-dioxygenáza
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)
KYN	Kynurenin
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě (Low-Density Lipoprotein)
LC-MS/MS:	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Coupling of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry)
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-Liquid Extraction)

LLOQ	Dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantification)
MK	Menachinony
NEU	Neusilin® US2
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
PFAS:	Perfluorované a polyfluorované látky (Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances)
Phree™ destička	Phree™ destička na odstraňování proteinů
PLGA	Kyselina poly(mléčná a glykolová) (Poly(lactic-co-glycolic acid))
SALLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny za pomoci vysolování (Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction)
SLE	Extrakce do kapaliny podpořená tuhou fází (Solid Supported Liquid-Liquid Extraction)
TDO	Tryptofan 2,3-dioxygenáza
TRP	Tryptofan
ULOQ	Horní mez stanovitelnosti (Upper Limit of Quantification)
UV-Vis spektroskopie	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
VLDL	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (Very-Low-Density Lipoprotein)
WAX	Slabá aniontová výměna (Weak Anion Exchange)

1. ÚVOD

Kapalinová chromatografie nachází uplatnění již řadu let a stala nezbytnou součástí velkého množství laboratoří. Tato disertační práce se zaměřuje na její současné možnosti využití. První část popisuje využití této techniky k výzkumu vitamínů rozpustných v tucích, konkrétně vitamínu K, A a E, a dále možnosti jejího uplatnění při studiích zaměřených na zánětový marker kynurenin, kde jsou mimo jiné porovnávány alternativní techniky k výše zmíněné kapalinové chromatografii.

V druhé části se práce rozšiřuje do oblasti farmakoanalýzy a osvětluje nezastupitelnou úlohu kapalinové chromatografie ve farmaceutickém výzkumu, vývoji a kontrole kvality léčiv a léčivých přípravků. Tato část je zaměřena na výběr nosiče pro postupné uvolňování terbinafinu, a dále na výběr vhodné techniky pro inkorporaci cyklosporinu do anorganických porézních pomocných látek. V obou případech je kontrola hladin léčiva během vývoje nezbytná, a tudíž využití kapalinové chromatografie nezastupitelnou součástí výzkumu.

Třetí část je věnována analýze životního prostředí, kde kapalinová chromatografie slouží jako základní metoda při hodnocení a monitorování znečišťujících látek v našem případě ve vodních plochách. Výsledky z této oblasti hrají zásadní roli pro utváření účinných strategií řízení životního prostředí a zajišťování souladu s legislativními normami.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro určení hladin vitamínu K v lidském a myším séru a lipoproteinových frakcích pro následující výzkum souvislostí tohoto vitamínu s fyziologickými i patologickými projevy v lidském organismu. Dále byly hodnoceny hladiny vitamínu A a E v mateřském mléce pro porovnání různých technik zpracování před uskladněním v Mléčné bance FNHK s cílem vybrat šetrnější metodu zajišťující vyšší procento nutrientů i po jeho zpracování. Vzhledem k stále vyšší rozšířenosti potřeb analýzy zánětlivého markeru kynureninu, bylo též cílem zpracovat přehledový článek, který tuto problematiku shrne a bude tak sloužit k lepší orientaci při správné volbě analýzy.

Pro potřeby vývoje nových lékových forem bylo naším záměrem vyvinout dvě farmakoanalytické metody. První pro analýzu hladin terbinafinu a jeho nečistot a druhou pro analýzu cyklosporinu s následným použitím v praxi.

V neposledním řadě díky využití kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií bylo cílem provést rozsáhlé testování povrchových sladkovodních i mořských vodních ploch ke zjištění možného výskytu kontaminantů vzbuzujících obavy.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Současné postavení analytické chemie

Analytická chemie je obor, který se zaměřuje na identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci chemických látek a jejich vlastností. Zahrnuje vývoj a následné použití různých technik a metod ke zjištění složení a vlastností látek. Hlavním účelem je poskytovat přesné a spolehlivé informace o kvalitativním i kvantitativním složení vzorků různého původu. Tyto informace mají zásadní význam pro řadu vědních oborů, včetně farmaceutického průmyslu, medicíny, ekologie, potravinářství, forenzních věd a mnoha dalších. Analytičtí chemici hrají zásadní roli při zajišťování kvality, bezpečnosti a účinnosti výrobků a procesů v těchto oblastech [1].

V průběhu času se analytická chemie výrazně vyvíjela díky technologickému pokroku a vědeckým poznatkům, zejména v oblasti instrumentace, automatizace, miniaturizace a analýzy dat [2,3].

Tyto pokroky umožnily analýzu nižších koncentrací látek ve složitějších maticích, což vedlo ke zvýšení přesnosti a rozšíření aplikací [4].

Automatizovaná manipulace se vzorky a rychlý sběr dat se stávají samozřejmostí. Automatizované systémy pro manipulaci s kapalinami navíc zajišťují konzistentní a reprodukovatelné zpracování vzorků, minimalizují lidské chyby a tím zvyšují spolehlivost výsledků. Dva nejběžnější přístupy k automatizaci úpravy vzorků jsou robotické systémy a průtokové techniky. Tyto systémy nejen šetří čas, ale také snižují náklady na pracovní sílu a zvyšují výkonnost, což je zvláště výhodné pro rutinní prostředí, které vyžaduje zpracování velkého množství vzorků [5].

Miniaturizace analytických přístrojů umožňuje použití přenosných zařízení pro analýzu i v terénu. Tato kompaktní zařízení poskytují výsledky v reálném čase, což následně umožní rychlé rozhodování a okamžitou zpětnou vazbu, zejména při monitorování životního prostředí či diagnostice/léčbě onemocnění [6,7]. Miniaturizace je ovšem patrná i v rámci samotné laboratoře. Především v úpravě vzorku je snahou zajistit shodné výsledky s co nejnižšími nároky na materiál a čas. Moderní techniky se stále více prosazují oproti tradičním metodám, neboť minimalizují jak spotřebu organických

rozpouštědel, tak objem vzorku. Další častou výhodou je možnost opakovaného použití sorbentů a možnost automatizace jejich připojení k chromatografickým systémům [8]. Analytická chemie stále více využívá multidisciplinární přístupy, neboť integruje koncepty z jiných vědních oborů, jako je biologie, fyzika a materiálové vědy. Do budoucna se s tímto propojením musí počítat jako s jedním z nejdůležitějších cílů, neboť právě tak si analytická chemie bude schopna udržet svou pozici ve světě výzkumu [2]. Nástup potřeby analyzovat velké objemy dat a výpočetních metod změnil také způsob, jakým se zpracovávají a interpretují výsledky. Pokročilé statistické techniky, algoritmy počítačového učení a nástroje pro vizualizaci zlepšily analýzu komplexních souborů dat a umožnily přesnější identifikaci a kvantifikaci chemických složek [2]. Celkově vývoj analytické chemie vedl k přesnějším, citlivějším a účinnějším metodám chemické analýzy.

3.2. Problematika analýzy v biologickém materiálu

Analytická chemie hraje v klinických laboratořích klíčovou roli v lékařské diagnostice, sledování jednotlivých onemocnění a terapeutickém monitorování léčiv. Cílem v této oblasti je identifikace biomarkerů, hormonů, léčiv a toxinů ve vzorcích pacientů i zdravé populace [9]. Podstatnou charakteristikou je preference minimálních objemů vzorků, což přispívá k zvýšení komfortu pro pacienty. Analytický přístup často zahrnuje simultánní analýzu více souvisejících analytů, aby se maximalizovalo získání informací v krátkém časovém horizontu. Důraz na rychlost a jednoduchost se však může lišit v závislosti na zamýšleném účelu metodiky. Volba mezi komplexní analýzou a zjednodušenými metodami závisí na konkrétních cílech. Ve výzkumu zaměřeném na objevování nových markerů nebo zkoumání nových souvislostí je prioritou vyvinout vysoce citlivé a komplexní metodiky schopné analyzovat velké množství látek. Naopak při zavádění metod do rutinní klinické praxe jsou hlavními kritérii časová a nákladová efektivita a jednoduchost. Vývoj každé nové analytické metody vyžaduje důkladné porozumění fyzikálně-chemickým vlastnostem analytů, povaze matrice, dostupným možnostem extrakce a výběru vhodné analytické instrumentace. Tyto úvahy jsou nezbytné pro dosažení požadované rovnováhy mezi citlivostí, komplexností a praktičností v klinických aplikacích.

Je důležité zdůraznit, že při práci se vzorky pacientů je nutné dodržovat stanovená pravidla. Je nezbytné zajistit spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků, a proto musí být všechny používané metody validovány a všechny přístroje musí podléhat povinným auditům, kvalifikacím a bezpečnostně technickým kontrolám [9].

3.2.1. Ovlivnění bioanalýzy fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu

Zkoumané látky se díky své velké heterogenitě často velmi liší v řadě fyzikálně-chemických vlastností, které jsou klíčové pro jejich charakterizaci a analýzu. Tyto vlastnosti, vyplývající z molekulární struktury a složení, zásadně ovlivňují jejich chování v různých analytických technikách a zejména pak v matrici. Důkladné pochopení těchto vlastností je nezbytné pro přesnou identifikaci, kvantifikaci a interpretaci v oblasti analytických věd, ale i klinického výzkumu.

3.2.1.1. Molekulární struktura a velikost

Molekulární struktura analytu ztělesňuje jeho základní uspořádání, které zahrnuje atomy, vazby, funkční skupiny a celkovou geometrii molekuly [10]. Velikost a tvar diktují interakce v jeho prostředí, ovlivňují rozpustnost, rychlost difuze i reaktivitu.

Molekulární struktura a velikost analytu významně ovlivňují jeho detekci. UV-Vis spektroskopie je založena na přítomnosti chromoforů – specifických funkčních skupin v molekulách, které absorbují UV nebo viditelné světlo. Některé molekulární struktury, jako jsou konjugované systémy nebo aromatické kruhy, obsahují chromofory, které vedou k odlišným absorpčním spektrům. Velikost a konjugace těchto struktur ovlivňují vlnovou délku a intenzitu absorpce, což umožňuje identifikaci a kvantifikaci. Fluorescenční spektroskopie detekuje molekuly, které mají fluorofory – skupiny schopné světlo absorbovat a následně ho emitovat. Jako fluorofory mohou sloužit specifické strukturální prvky, jako jsou aromatické kruhy nebo konjugované systémy. Molekulární struktura ovlivňuje emisní spektra, což umožňuje citlivou detekci a kvantifikaci. V hmotnostní spektrometrii ovlivňuje molekulární struktura a velikost účinnost ionizace a fragmentační vzorce analytů. Menší molekuly často ionizují snadněji než větší. Strukturální vlastnosti určují způsoby fragmentace, což napomáhá identifikaci struktury molekuly.

3.2.1.2. Lipofilita

Hodnota Log P představuje logaritmus poměru rovnovážných koncentrací sloučeniny ve dvoufázovém systému obsahujícím oktanol (lipofilní) a vodu (hydrofilní). Tento koeficient kvantifikuje lipofilitu sloučeniny a nabízí možnost predikovat její chování. Log P je vodítkem pro výběr extrakčních rozpouštědel a technik při úpravě vzorků. Znalost lipofilní nebo hydrofilní povahy analytu pomáhá při výběru nejúčinnější extrakční metody, která zajišťuje maximální výtěžnost a citlivost analytických měření. V chromatografických technikách, jako je kapalinová chromatografie, pomáhá log P při výběru vhodných stacionárních fází a složení mobilní fáze. Analyty s jeho různými hodnotami vykazují různou afinitu ke stacionární fázi, což usnadňuje jejich separaci.

Problematické mohou být zejména vysoce lipofilní sloučeniny, se špatnou nebo prakticky žádnou rozpustností ve vodě, což ztěžuje přípravu roztoků nebo dosažení vhodných koncentrací pro analýzu. Tyto sloučeniny mohou mít tendenci nespecificky ulpívat na povrchích, jako jsou nádoby na vzorky, kapiláry nebo jiné součásti analytických přístrojů.

To může mít za následek zkreslenou a nepřesnou kvantifikaci. Lipofilní sloučeniny mohou dále interagovat s komplexními biologickými maticemi, zejména mají tendenci k silné vazbě na bílkoviny, což vede k možným ztrátám nebo interferencím během úpravy a analýzy vzorků [11]. Výběr účinné extrakční metody je tedy zásadní.

3.2.1.3. Acidita/Bazicita

Acidobazické vlastnosti analytů, charakterizované jejich hodnotami pK_a , určují jejich chování v různých pH prostředích. Příkladem je extrakce z kapaliny do kapaliny kdy se úpravou pH na úroveň, kdy se látka převede do neionizované formy, zvýší její přenos do organické vrstvy. Obecně platí, že poměr mezi ionizovanou a neionizovanou formou musí být alespoň 1:100. Tohoto se obvykle dosahuje úpravou pH vodného roztoku o 2-3 jednotky pod pK_a kyselého sloučeniny nebo o 2-3 jednotky nad u zásadité.

Informace o pH je nezbytná i v rámci analýzy. V kapalinové chromatografii s reverzní fází je kontrola pH a iontové síly mobilní fáze klíčová, a to hlavně pro metody, které tolerují jen malé odchylky. Kolony na bázi silikagelu fungují dobře v rozmezí pH 2 až 8, zatímco kolony na bázi polymerů jsou stabilní v rozmezí pH 1 až 14. Pro přesné a reprodukovatelné separace je nutné upravit pH vodné složky před smícháním s organickými modifikátory. pH mobilní fáze významně ovlivňuje selektivitu, tvar píku a retenci, zejména u ionizovatelných sloučenin, jako jsou kyseliny nebo zásady. Neutrální nebo nepolární sloučeniny obvykle vykazují minimální změny v rozlišení a retenci vlivem pH [12].

3.2.1.4. Stabilita

Stabilita analytu v bioanalýze má zásadní význam, neboť přímo ovlivňuje přesnost, spolehlivost a proveditelnost jeho stanovení. Stabilita je schopnost analytu zůstat nezměněn neboli zachovat si své chemické a fyzikální vlastnosti v průběhu času za specifických podmínek, jako je skladování, úprava vzorku a analýza. Pokud analyt není stabilní v kterékoli fázi, může to vést k nepřesné kvantifikaci nebo dokonce k nepoužitelnosti vzorku pro analýzu.

Pochopení stability analytu pomáhá určit vhodné podmínky skladování pro zachování jeho integrity. Nesprávné skladování (např. kolísání teploty, vystavení světlu, změny pH) může urychlit degradaci. Během úpravy vzorku (extrakce, filtrace, derivatizace) mohou

nestabilní analyty vyžadovat zvláštní postupy při manipulaci nebo použití přísady pro zachování stability. I volba analytické metody závisí na profilu stability analytu. Pokud je například analyt nestabilní v určitém rozpouštědle nebo reaguje s určitými činidly, může být nutné vyvinout alternativní metodu.

Před každou analýzou tedy musíme zjistit, zda jsou dostupné informace o stabilitě stanovované látky. Tyto údaje nám usnadní práci nejen s vlastní substancí, ale i s matricí, která cílový analyt obsahuje. V průběhu let se našla některá řešení na základní problémy se stabilitou. Běžnou praxí je přidání antioxidačního činidla ke vzorkům náchylným k oxidaci. Příkladem takového činidla je butylovaný hydroxytoulen (používaný v koncentraci 1 mg/ml) či kyselina askorbová (používaná v koncentraci 0,1 mol/l). Pro fotolabilní analyty je pak zvykem používat tmavé jantarové sklo. Vždy, pokud je to možné, volíme u vysoce nestabilních analytů použití vnitřního standardu o stejném chování, který některé problémy se stabilitou vzorku vyřeší.

3.2.2. Typ a povaha biologické matrice

Výběr matric pro analýzu je zásadní otázkou, kterou ovlivňují různé faktory. Mezi nimi hraje klíčovou roli analyt, který je předmětem zájmu, a jeho význam pro cíle výzkumu. Kromě toho jsou základními kritérii, jimiž se výběr matrice řídí, snadnost odběru vzorků, jejich dostupnost a potenciál poskytnout smysluplné poznatky o zkoumaných fyziologických nebo patologických stavech. Nejčastěji používanými matricemi jsou krevní sérum, plazma a moč. Materiály využívané zřídka nebo pro specifické účely lze souhrnně nazvat alternativní matrice. Mezi takové řadíme mozkomíšní mok, vlasy, specifické gynekologické a oftalmologické matrice či alternativní tělní tekutiny jako mateřské mléko, sliny, gingivální krevikulární tekutina, synoviální tekutina, exsudáty z ran, kondenzát vydechovaného vzduchu, žaludeční šťáva, peritoneální tekutina a mnohé další.

Výběr biologického materiálu může být ovlivněn mnoha proměnnými. Jedním ze způsobů, jak se na tuto problematiku podívat, je položit si otázku, jaký analyt a proč chceme analyzovat. Práce s plazmou i sérem, přestože jejich odběr je invazivní, je velmi běžná, protože pacienti jsou na odběr krve zvyklí. Nicméně v některých případech může být odběr špatně proveditelný, zejména u geriatrických či pediatrických pacientů a nesmíme opomenout nezbytnost přítomnosti školeného personálu. Proto je často

volena moč, jejíž hlavní předností je snadná dostupnost v relativně velkém množství, neinvazivní odběr a poskytnutí informace o celkovém stavu organismu.

Mohou však existovat důvody pro volbu jiné matrice, zejména pokud se snažíme pochopit původ onemocnění, či odchylky od fyziologických hladin analytu. Některé z těchto materiálů jsou snadno dostupné a užitečné v reálné praxi. Příkladem jsou sliny, gingivální krevikulární tekutina, mateřské mléko, exsudáty z ran, kondenzát vydechovaného vzduchu a vlasy. Pro testování potenciálních markerů dentálních onemocnění lze vybrat sliny a gingivální krevikulární tekutinu. Výhodou slin je jejich neinvazivní odběr s možností získat je v objemu přibližně 0,5-2 ml [13]. Gingivální krevikulární tekutina se používá méně často, ale její odběr je jednoduchý a trvá zhruba 2 minuty [14]. Analýza lidského mléka slouží jak zdraví kojenců a matek, tak i vědeckému výzkumu a rozvoji zdravotnických postupů [15]. Stanovení látek v tekutině z rány odráží zánětlivou reakci přímo v postiženém místě, kde je jejich koncentrace výrazně vyšší a zjistitelná dříve než v krvi nebo moči [16]. Tato matrice tak může poskytnout důležitá vodítka k imunitním a zánětlivým jevům spojeným s hojením rány. Slibným zdrojem biomarkerů může být také kondenzát vydechovaného vzduchu. Odběr vzorků je neinvazivní a nevyžaduje pozornost pacienta, což je vhodné zejména u hospitalizovaných pacientů [17]. Vlasy jsou využívanou matricí převážně v toxikologii, neboť oproti tradičním materiálům poskytují retrospektivní informace a lze v nich rozlišit například mezi chronickým a nedávným užíváním drog. Snadno se získávají a mají značnou stabilitu po dlouhou dobu [18].

Některé další matrice jsou velmi specifické pro danou aplikaci a jejich získání může být obtížnější. Do této skupiny patří mozkomíšní mok (CSF), gynekologické matrice, buněčné supernatanty, synoviální tekutina, peritoneální tekutina či žaludeční šťáva. CSF musí být získán invazivně lumbální punkcí. Nutnost invazivního odběru vzorků vyvolává otázku, zda je nutné analyzovat látky v CSF, nebo zda by stačila analýza v méně invazivních matricích. To by mohlo být vysvětleno nejistou korelací mezi hladinami v krvi a CSF [19]. Analýza CSF může poskytnout diagnostické informace a umožnit získání podrobností o převážně neurologických onemocněních. Vzhledem k tomu, že některé studie naznačily, že se hladiny markerů liší mezi mateřskou a fetální cirkulací [20], není překvapivé, že pro studie s podrobnějším zaměřením na gynekologickou a prenatální problematiku mohou být upřednostňovány gynekologické matrice před sérem a plazmou. Studie zahrnují

analýzu placenty, vilózní tkáně, cervikálního hlenu i tkáně děložního hrdla. Vzhledem k nutnosti kultivace jsou materiály založené na buňkách/buněčných supernatantech, především nádorových a imunitních, velmi specifické a náročné na získání. Důvodem pro analýzu přímo v buněčných liniích je potřeba získat výsledky týkající se konkrétního nádorového onemocnění nebo reakce imunitního systému, která je předmětem zájmu. Zbylé matrice jako peritoneální tekutina a žaludeční šťáva mají většinou použití velmi specifické například u diagnóz rakoviny žaludku [21,22]. Podobně jako analýza synoviální tekutiny pro septickou artritidu [23].

Zbývající příklady méně běžných matric, jako jsou oční tkáně či tekutiny nebo mozkové tkáně, jsou často použity pouze v akademickém prostředí k pochopení biochemických a patofyziologických procesů. Jejich získání je obtížné a obvykle je nutné odebrat vzorek post mortem. Proto je rozsah studií využívajících tyto materiály omezený.

3.2.3. Analýza

3.2.3.1. Přístupy ke zpracování vzorku – vybrané extrakční postupy

Extrakční postupy vykazují variabilitu v závislosti na zkoumané matrici a analytu. Běžně se používají jednoduché úpravy vzorku, jako je ředění, filtrace a odstředování. Složitějším postupem je pak srážení proteinů. Techniky, jako je extrakce z kapaliny do kapaliny a její modifikace, stejně jako extrakce na pevné fázi a její varianty, vyžadují pro efektivní provedení již značné zkušenosti.

V této disertační práci byla zkoumána celá řada extrakčních postupů. V následující kapitole budou řešeny některé vybrané metodiky.

Extrakce na tuhou fázi

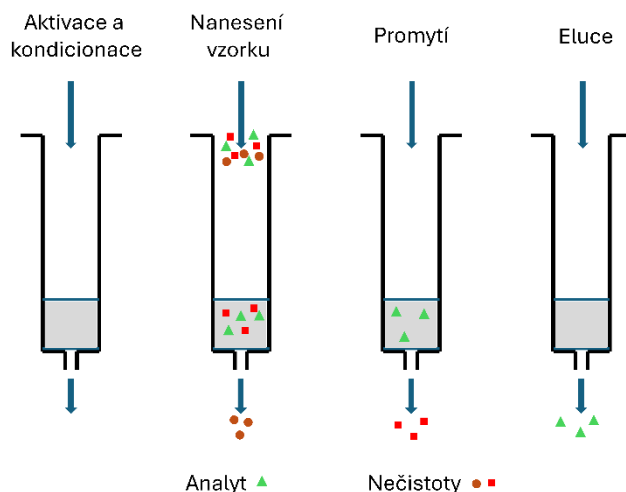
Sorbent s reverzní fází

Kolonky s chemismem C18 vykazují retenci pro nepolární až středně polární sloučeniny díky alkylové vazbě. Tento typ sorbentu se řadí mezi nejběžněji používané. Na trhu jsou dnes k dostání klasické kolonky odlišných velikostí, mikrotitrační destičky, pipetovací špičky, a různé typy vláken. Princip extrakce v nejběžněji používané formě, tedy v kolonkách, je zobrazen na Obrázku 1.

HLB (hydrofilně-lipofilní rovnováha) je moderní univerzální polymerní typ sorbentu. Jelikož je sorbent HLB smáčivý vodou, zachovává si schopnost vyšší retence, která

probíhá převážně na reverzní fázi; protože je však fáze hydrofilně modifikovaná, je vhodná i pro polární sloučeniny.

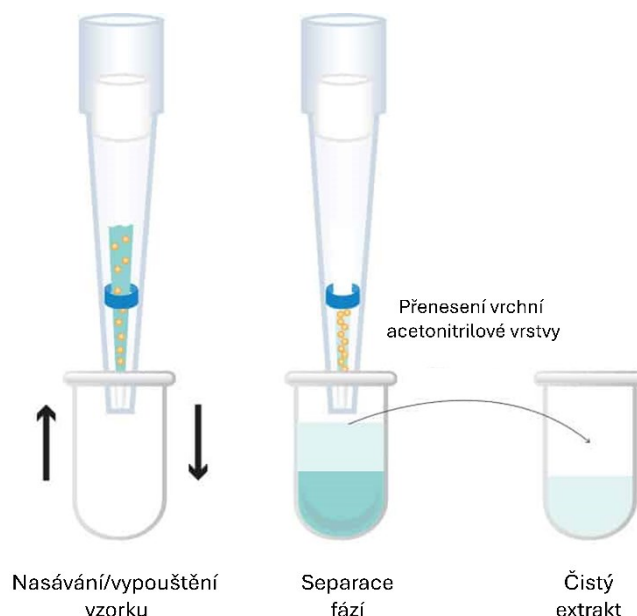
Touto volbou tedy zajistíme extrakci velmi širokého spektra sloučenin z vodných vzorků. Tento typ sorbentu je komerčně dostupný například od firmy Waters™ pod jménem Oasis HLB v mnoha variantách [24].



Obrázek 1 Princip extrakce na tuhou fázi.

Sorbent na bázi iontoměniče v kombinaci se SALLE

Pro potřeby této disertační práce byly využity pipetovací špičky WAX-S od firmy DPX na bázi slabé aniontové výměny (WAX) pro přečištění, navíc s obsahem soli (S) nezbytné pro extrakci z kapaliny do kapaliny za pomoci vysolování (SALLE). Sůl se rozpouští v roztoku během kroku aspirace/vypouštění, a tím dochází díky zvýšené iontové síle k oddělení acetonitrilové vrstvy. Roztok lze analyzovat přímo, případně naředit nebo odpařit rozpouštědlo a rekonstituovat v mobilní fázi v závislosti na pracovním postupu nebo aplikaci. Tento typ sorbentu je ideální pro aplikace, které vyžadují acetonitril pro srážení proteinů a jsou zaměřeny na hydrofobní analyty. Princip této extrakce je uveden na Obrázku 2.

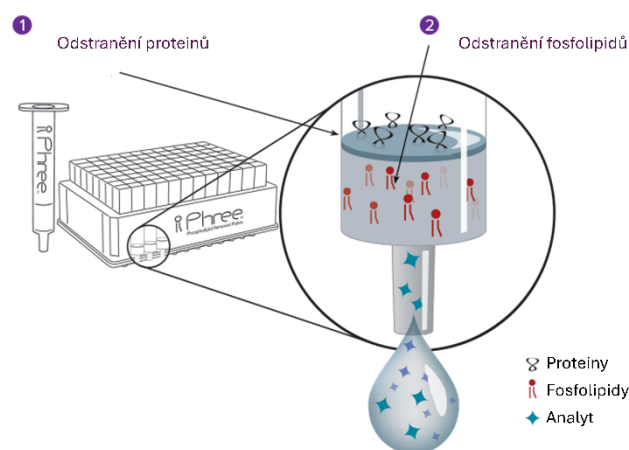


Obrázek 2 Princip extrakce pomocí sorbentu na bázi iontoměniče v kombinaci se solí v pipetovací špičce.

Obrázek upraven a převzat ze zdroje [25].

Sorbenty odstraňující fosfolipidy

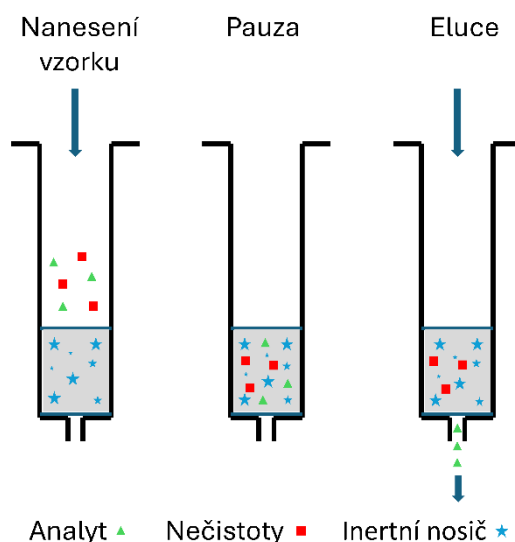
Odstranění proteinů srážením s následnou filtrací je velmi běžnou strategií k přečištění vzorku. Při tomto postupu však vzorek stále obsahuje vysokou koncentraci fosfolipidů. K tomuto účelu byly navrženy destičky a kolonky se sorbentem pro odstranění fosfolipidů poskytující relativně čisté extrakty. Tyto materiály umožňují odstranění precipitovaných proteinů filtrací, zatímco fosfolipidy jsou selektivně zadrženy, viz Obrázek 3. Přítomnost fosfolipidů v extraktu může často ovlivnit nejen citlivost a selektivitu, ale i celkovou čistotu přístroje. Jejich odstranění tak zlepšuje životnost analytické kolony, zabraňuje jejich hromadění během větších sérií nástřiků a zachovává citlivost stanovení. V současné době jsou na trhu produkty mnoha výrobců například: Biotage® pod jménem ISOLUTE® PLD+ [26], Restek pod názvem Resprep PLR [27], Waters™ pod názvem Ostro Protein Precipitation & Phospholipid Removal Plate [28] a Phenomenex™ pod názvem Phree™ Phospholipid Removal Products [29].



Obrázek 3 Princip přečištění vzorku pomocí specifického sorbentu pro odstranění fosfolipidů. Obrázek upraven a převzat ze zdroje [29].

Extrakce z kapaliny do kapaliny

Princip této metody je známý již mnoho let. Omezením v bioanalýze zůstává především možnost extrakce pouze lipofilních látek. Krom klasického provedení se můžeme setkat s jeho miniaturizací, nebo s jeho modifikací extrakce do kapaliny podpořené tuhou fází (SLE), kdy se této výměny navíc účastní i sorbent. SLE je technika založená na kolonkovém nebo destičkovém provedení, která vychází z principů LLE, ale přináší některé klíčové výhody. Extrakce SLE využívá inertní nosič s vysokým povrchem, který slouží jako stacionární fáze pro interakci s vodnými vzorky. Vodný vzorek se nanese na kolonku či desku SLE a nechá se adsorbovat na povrch pevného nosiče. Poté se přes inertní materiál převede nemísitelné organické rozpouštědlo, které eluuje pouze sledované analyty a zanechá nežádoucí matici v nosiči, jak je zobrazeno na Obrázku 4. SLE se liší od SPE, jelikož původní vzorek je umístěn na extrakčním loži a není jeho cílem, aby jím protékal. Protože k interakcím dochází mezi kapalinou a pevnou látkou, nikoli mezi dvěma kapalinami, nevznikají emulze. To zvyšuje účinnost extrakce ve srovnání s tradiční LLE. Kromě toho SLE nevyžaduje míchání vzorků ani krok separace fází, takže je méně časově a manuálně náročná. Díky eliminaci protřepávání lze SLE též snadno automatizovat [30]. Tyto produkty jsou opět na trhu od mnoha výrobců, pro příklad lze uvést od firmy Biotage® pod názvem ISOLUTE® SLE+ [31], od firmy Agilent Technologies pod názvem Chem Elut [32] nebo od firmy Thermo Fisher Scientific pod názvem HyperSep™ SLE [33].



Obrázek 4 Princip podporované extrakce z kapaliny do kapaliny.

3.2.3.2. Volba vnitřního standardu

V oblasti bioanalýzy je výběr vnitřního standardu klíčovým úkolem, zejména kvůli přirozené rozmanitosti matric. Tato úvaha je zvláště důležitá u metodik využívajících hmotnostní detekci, kde matricové efekty představují důležitou problematiku, které je nutno se věnovat. Navzdory možnému zvýšení nákladů zůstává preferovaným přístupem používání značených vnitřních standardů. Jejich širokému rozšíření však často brání omezená dostupnost. Mezi běžné techniky značení patří náhrada ^1H za ^2H nebo použití izotopů, jako jsou ^{13}C , ^{15}N a ^{17}O .

Značené standardy ovšem neřeší problematiku při analýzách využívajících detekci UV-Vis, fluorescenci apod., kde přirozeně se vyskytující látky nebo endogenní metabolity nemohou sloužit jako vnitřní standardy. V takových případech se jako optimální řešení jeví využití syntetických derivátů, které nabízejí alternativní cestu k dosažení přesných a spolehlivých výsledků v bioanalytických studiích.

3.2.4. Validace bioanalytických metod

Normy využívané pro validaci bioanalytických metod byly nejprve vydány americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou lékovou agenturou (EMA). V roce 2018 pak Mezinárodní rada pro harmonizaci postupů (ICH) vytvořila návrh spojující oba tyto dokumenty pod názvem ICH M10. Komplexní přehled relevantních parametrů a přípustných rozsahů, jak je stanovují tyto předpisy, je obsažen v Tabulce 1. Tyto

organizace, známé svými přísnými a celosvětově uznávanými normami, společně přispívají k robustnosti a spolehlivosti jednotlivých procesů validace metod v bioanalýze.

Tabulka 1 Souhrn validačních parametrů pro bioanalytické metod.

Validační parametr	Definice	Provedení a vyhodnocení
Selektivita	schopnost analytické metody rozlišit a stanovit obsah analytu v přítomnosti jiných potenciálně interferujících látek v matrici	nejméně 6 blankových matric v duplikátu (šest vzorků bez přídavku standardu a vnitřního standardu a zbylých šest s přídavkem pouze vnitřního standardu) vyhodnocení: intenzita signálu odpovídající interferenci v retenčním čase analytu ($\leq 20\%$ LLOQ analytu) nebo vnitřního standardu ($\leq 5\%$ intenzity IS)
Specifita	schopnost metody detekovat a rozlišit analyt od ostatních látek, zejména látek podobných analytu	způsob provedení a vyhodnocení obdobně jako u selektivity (intenzita signálu $\leq 20\%$ LLOQ analytu a $\leq 5\%$ intenzity IS)
Matricové efekty	změna (zvýšení nebo snížení) signálu analytu způsobená interferencemi pocházejícími z matrice vzorku	6 různých zdrojů matrice odpovídající té, pro kterou je daná metoda vyvíjena (dvě koncentrační hladiny, které jsou ohraničeny nejvyšším a nejnižším bodem kalibrační křivky, v triplikátu – tedy 36 vzorků) vyhodnocení: přesnost $\pm 15\%$ nominální hodnoty, preciznost RSD $\leq 15\%$
Kalibrační křivka	vztah mezi koncentrací analytu a odezvou detektoru	nejméně 6 koncentračních standardů včetně LLOQ a ULOQ, připraveny přídavkem analytu o známé koncentraci do konkrétní biologické matrice uvedena směrnice a posun na ose y vyhodnocení (zpětná kalkulace): přesnost $\pm 20\%$ na LLOQ; $\pm 15\%$ ostatní; nejméně 75 % kalibračních koncentrací musí splnit tato kritéria
Přesnost a preciznost	přesnost: těsnost shody mezi hodnotou získanou měřením a hodnotou předem vypočtenou, nominální preciznost: těsnost shody mezi opakovanými měřeními analytu (vyjádřeno pomocí RSD)	nejméně 4 koncentrační hladiny (LLOQ, 3xLLOQ, 30-50 % kalibračního rozmezí, 75 % ULOQ) připraveny přidáním známého množství analytu do blankové matrice. Měření probíhá ve dvou fázích – během jednoho dne (within-run) a v rámci více dní (between-run) vyhodnocení: Přesnost $\pm 15\%$ nominální hodnoty a $\pm 20\%$ na LLOQ, Preciznost RSD $\leq 15\%$ a $\leq 20\%$ na LLOQ

IS: vnitřní standard, LLOQ: dolní mez stanovitelnosti, ULOQ: horní mez stanovitelnosti

Tabulka 1 (pokračování) Souhrn validačních parametrů pro bioanalytické metody.

Validační parametr	Definice	Provedení a vyhodnocení
Výtěžnost	poměr koncentrace analytu přidaného ke vzorku před extrakcí ke koncentraci analytu přidaného ke vzorku po extrakci	nejméně 3 koncentrační hladiny, nemusí být 100 %
Přenos analytu	navýšení koncentrace analytu zbytkovým množstvím analytu z předchozího měření	změření záznamu slepého vzorku, který je nastříknut ihned po analýze kontrolního vzorku s vysokou koncentrací vyhodnocení: intenzita signálu ≤ 20 % LLOQ analytu a ≤ 5 % intenzity IS
Integrita ředění	slouží k ověření, že přesnost a preciznost metody není nijak ovlivněna ředěním vzorku, který má koncentraci vyšší, než je kalibrační rozsah metody	kontrolní vzorek s koncentrací vyšší než ULOQ, který se nařadí blankovou maticí (pět opakování) vyhodnocení: přesnost ± 15 % nominální hodnoty, preciznost RSD ≤ 15 %
Stabilita	zajištění, že koncentrace zůstává v čase stejná	vzorky připraveny na dvou koncentračních hladinách v triplikátu pro každé skladovací podmínky i časový interval vyhodnocení: koncentrace ± 15 % nominální hodnoty
Citlivost	odezva analytu by měla být nejméně 5x vyšší než odezva slepého vzorku (LLOQ)	vyhodnocení: LLOQ by měl splnit všechna kritéria, především pro přesnost a preciznost

IS: vnitřní standard, LLOQ: dolní mez stanovitelnosti, ULOQ: horní mez stanovitelnosti

Zvládnutí složitostí validace v biologickém materiálu je klíčové, zejména pokud jde o maticové efekty (ME) a vytváření kalibrační křivky. Přirozená variabilita složení matric v různých vzorcích vyžaduje pečlivý validační proces, aby byla zajištěna správnost cílových analýz. Právě časté spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií činí ověření maticových efektů nezbytným krokem. Pro zjištění ME se používá alespoň 6 různých zdrojů matrice co nejvíce podobné té, pro jaký účel metodu vyvíjíme (onemocnění pacientů, věkové rozmezí, pohlaví apod.). Stanovení ME je uvedené v Tabulce 1. Výsledkem je zjištění, zda dochází k potlačení nebo zesílení signálu vlivem matrice. Důležité je, aby případné potlačení signálu nezabránilo analýze z důvodu nedostačujících limitů detekce, a také aby kritérium pro preciznost bylo splněno s minimální RSD $\leq 15\%$. Pokud potřebujeme ME kompenzovat, využijeme znalosti, že ME jsou způsobeny látkami, které jsou přítomny v iontovém zdroji ve stejnou chvíli jako cílový analyt. Tyto interference můžeme odstranit nejen během úpravy vzorku a matrici od interferencí přečistit, ale i při vývoji chromatografické separace, kdy interference od cílových analytů separujeme. Další alternativou je změna typu polarizace, neboť využití negativního módu může zvýšit selektivitu. Nezbytnou součástí je potom využití výše zmíněných izotopicky značených vnitřních standardů.

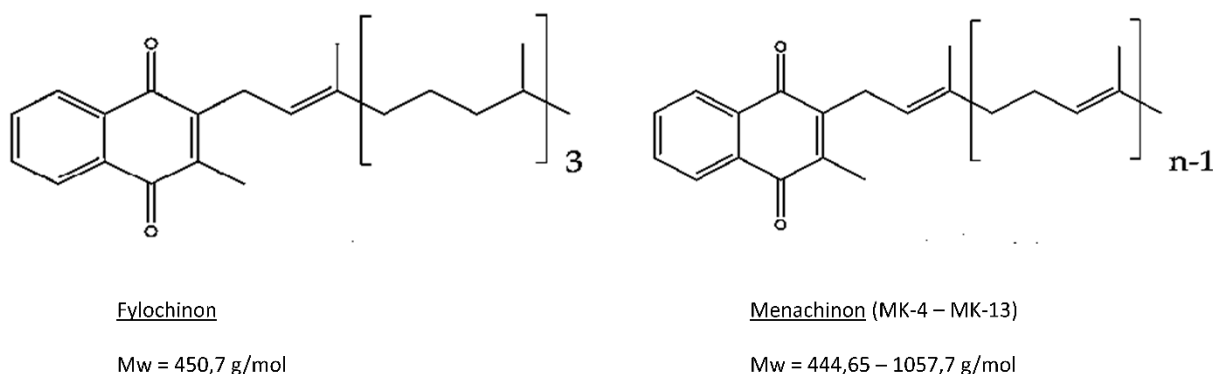
Pokud nelze sestavit kalibrační křivku za využití kalibračních standardů v matrici, například v případě vzácných matric nebo u endogenních analytů je možné vytvořit kalibrační křivku i v náhradní matrici. Existuje několik strategií, například využití náhradních matric jako je umělá moč či umělé sérum, které se nejčastěji skládá ze směsi hovězího nebo lidského sérového albuminu v roztoku fosfátového pufru. Dále se využívají přečištěné matrice například aktivním uhlím. Jednodušší možností za předpokladu splnění všech náležitostí na přesnost a preciznost metody je též použití směsi rozpouštědel.

3.2.5. Vybrané analyty stanovované v biologických matricích

3.2.5.1. Vitamíny rozpustné v tucích

Vitamín K

Termín vitamín K zahrnuje několik látek se shodnou strukturou v podobě 2-methyl-1,4-naftochinonového kruhu s odlišným postranním řetězcem, jak je patrné z Obrázku 5. Lze jej rozdělit na dvě hlavní izoformy: (i) vitamín K1, známý také jako fylochinon, který je hlavní dietní formou, získávanou především ze zelené zeleniny, a (ii) vitamín K2, menachinony (MK), které existují v 10 různých variantách MK-4 až MK-13, kde číslo představuje počet izoprenoidních zbytků v postranním řetězci. Vitamín K2 lze nalézt v řadě živočišných potravin, zejména v sýrech a fermentovaných sójových bobech (natto). Výjimkou je MK-4, který je produktem přeměny K1 v lidském těle [34].



Obrázek 5 Chemická struktura fylochinonu a menachinonů.

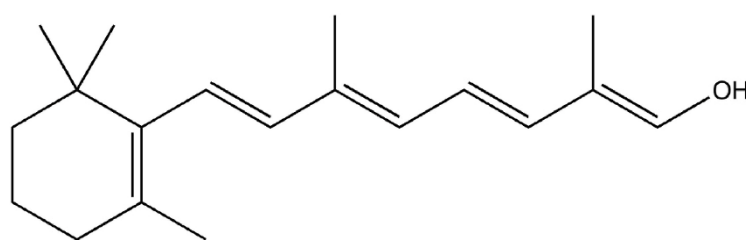
Vitamín K je dobře známý pro svou úlohu při srážení krve. Jeho fyziologická role je však mnohem širší, zahrnuje homeostázu kostí, ektopickou kalcifikaci, diferenciaci a proliferaci buněk [34].

Přestože krevní a tkáňové zásoby obsahují relativně nízké hladiny vitamínu K, v rozmezí nanomolů a méně, klinicky významný nedostatek vitamínu K u dospělých je velmi vzácný a obvykle se omezuje na osoby s poruchami vstřebávání a jinými gastrointestinálními poruchami nebo na osoby užívající léky, které ovlivňují metabolismus vitamínu K [34]. Důležité však nejsou pouze klinicky významné deficity, ale i ty asymptomatické, které mohou mít následné klinické důsledky. Zde jako hlavní příklad lze uvést nezbytnost vitamínu K pro karboxylaci osteokalcinu v kostech, kdy jeho nedostatek může snižovat mineralizaci kostí a přispívat k osteoporóze.

Analýza hladin vitamínu K je nezbytná pro komplexní pochopení jeho klíčové role v prevenci nemocí, patofyziologii a terapeutických intervencích. Stanovení hladin vitamínu K tak poskytuje zásadní poznatky o jeho vlivu na různé fyziologické procesy. Další z oblastí zájmu je studium distribuce v lidském organismu, neboť nové poznatky v této oblasti by mohly otevřít celou řadu možností pro cílené intervence u onemocnění souvisejících s metabolismem lipidů a kardiovaskulárním systémem. Právě nedostatek studií zaměřených na distribuci vitamínu K v jednotlivých lipoproteinových vrstvách, jako jsou vrstvy lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL), nízké hustotě (LDL) a vysoké hustotě (HDL) představuje mezeru ve výzkumu.

Vitamín A

Vitamíny A jsou skupina životně důležitých látek, které jsou v lidské stravě hojně zastoupeny. Produkty živočišného původu jsou bohatým zdrojem retinylesterové formy těchto vitamínů, zatímco zelenina a ovoce obsahují karotenoidy, z nichž většina jsou provitamíny A [35]. Vitamín A hraje klíčovou roli ve správném fungování mnoha fyziologických funkcí a je nezbytný pro syntézu bílkovin, buněčný růst a diferenciaci buněk [35]. Lidský organismus dokáže metabolizovat přírodní formy vitamínu A a jeho provitamínu na biologicky aktivní formy, mezi které patří i retinol [35], jehož struktura je znázorněna na Obrázku 6.



Retinol

Mw = 286,46 g/mol

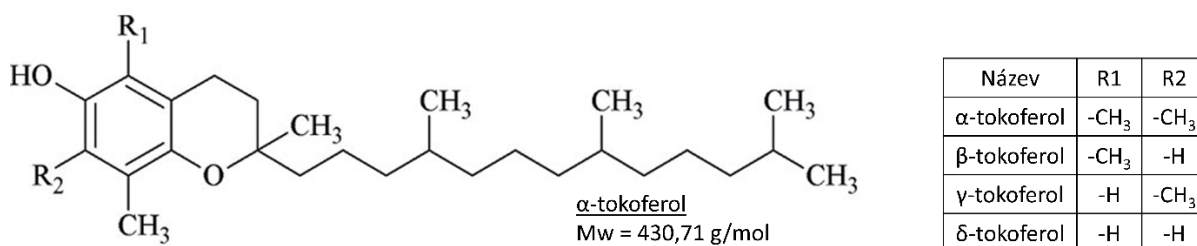
Obrázek 6 Chemická struktura retinolu.

Po narození je hladina vitamínu A obvykle nízká a k jejímu zvýšení dochází až v průběhu kojení, protože mateřské mléko je jeho bohatým zdrojem [36]. Potřeba vitamínu A je u kojících žen logicky zvýšená. U předčasně narozených dětí vitamín A významně ovlivňuje vývoj plic a zraku a bylo také zjištěno, že jeho suplementace může snížit kojeneckou úmrtnost a nemocnost [37]. U dospělých má zásadní význam pro udržení zdravého zraku,

protože je klíčovou složkou bílkoviny rodopsinu, která pomáhá sítnici absorbovat světlo. Podporuje imunitní systém tím, že udržuje zdraví kůže a sliznic, které slouží jako bariéra proti infekcím. Kromě toho hraje vitamín A zásadní roli v buněčném růstu a diferenciaci, čímž přispívá k udržování a obnově tkání [38]. Za nedostatečnou hladinu vitamínu A se považuje hladina retinolu v plazmě pod 0,52 $\mu\text{mol/l}$ nebo koncentrace v játrech nižší než 5-20 $\mu\text{g/g}$. Nedostatek může být primární, způsobený nedostatečným příjmem vitamínu A a karotenoidů z potravy, nebo sekundární, spojený s malabsorpcí lipidů a chronickými onemocněními [35].

Vitamín E

Vitamín E je dalším zástupcem lipofilních vitamínů nacházejícím se v potravinách jako jsou ořechy, semena, rostlinné oleje a listová zelenina. V těle působí jako antioxidant, zejména v buněčných membránách pomáhá chránit buňky před poškozením způsobeným volnými radikály. Důležitou roli hraje také při správné funkci imunitního systému [39]. Termín vitamín E zahrnuje skupinu sloučenin, z nichž alfa-tokoferol je biologicky neaktivnější formou. Jeho struktura je zobrazena na Obrázku 7.

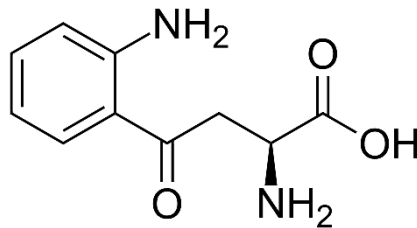


Obrázek 7 Chemická struktura tokoferolu.

Dostatečné hladiny v mateřském mléce jsou pro novorozence velmi důležité, neboť je chrání před onemocněními souvisejícími s oxidací lipidů a bílkovin, jako je hemolytická choroba [40] a bronchopulmonální dysplazie [41]. Referenční rozmezí vitamínu E u dospělých je 5,5-17 $\mu\text{g/ml}$. U dětí je to 3-18,4 $\mu\text{g/ml}$, přičemž významný nedostatek vitamínu E je vzácný [39,42].

3.2.5.2. Kynurenin

Kynurenin (KYN) je produktem metabolismu tryptofanu (TRP) a účastní se kynureninové dráhy. Jedná se o nízkomolekulární, polární sloučeninu. Jeho struktura je znázorněna na Obrázku 8. KYN je v současné době studován v souvislosti s různými fyziologickými a patologickými stavy, včetně neurodegenerativních onemocnění, zánětů, rakoviny a onemocnění COVID-19 [43].



Kynurenin

Mw = 208,22 g/mol

Obrázek 8 Chemická struktura kynureninu.

KYN je katabolický produkt TRP prostřednictvím kynureninové dráhy. TRP je esenciální aminokyselina nezbytná pro biosyntézu bílkovin a je také prekurzorem několika bioaktivních molekul, jako je serotonin, tryptamin a melatonin. Více než 95 % TRP je však metabolizováno na KYN a jeho degradační produkty, které zahrnují důležité redoxní kofaktory. Za fyziologických podmínek je přibližně 90 % TRP metabolizováno tryptofan 2,3-dioxygenázou (TDO) na KYN v játrech a pouze 5-10 % je degradováno mimojaterní indoleamin 2,3-dioxygenázou (IDO). Teprve za patofyziologických stavů, jako je karcinogeneze, záněť a poruchy centrálního nervového systému, nabývá syntéza KYN pomocí IDO na významu, zejména v buňkách imunitního a centrálního nervového systému. TDO a IDO jsou zodpovědné za první rychlost limitující krok degradace TRP. Dysregulace kynureninové dráhy, indikovaná mimo jiné poměrem kynureninu a tryptofanu (KYN/TRP), má klinické důsledky a je zkoumána jako terapeutický cíl [43].

3.3. Problematika farmakoanalýzy

Kapalinová chromatografie je nepostradatelnou součástí farmaceutického výzkumu, vývoje a kontroly kvality a tvoří základ pro zajištění bezpečnosti a účinnosti farmaceutických výrobků. Využívá se ke stanovení čistoty, účinnosti a stability léčiv, spolu s identifikací a kvantifikací nečistot pro splnění přísných regulačních norem. Metodiky jsou vyvíjeny s důrazem na jejich rychlost, účinnost a nákladovou efektivitu, přičemž je kladen velký důraz na jednoduchost provedení a robustnost.

Úprava vzorků při farmaceutické analýze zahrnuje spíše jednodušší techniky, jako je například filtrace, než složitější metody typu je SPE nebo LLE. Existuje mnoho filtrů z různých materiálů, jako je papír, tkanina, bavlněná vata a mnohé další. Membránové filtry jsou obvykle vyrobeny ze syntetických polymerů (např. hydrofilní PTFE, PVDF, nylon, PES) jejich výběr závisí na několika faktorech, včetně: velikosti částic nebo molekul, které mají být odstraněny, chemického složení vzorku, kompatibilitě filtračního média se vzorkem nebo roztokem a viskozitě vzorku.

Je však důležité si uvědomit, že konkrétní použité techniky úpravy vzorků se mohou lišit v závislosti na povaze matrice, analytech, které jsou předmětem zájmu a použité metodě. I když se tedy v určitých scénářích častěji používá filtrace, je nezbytné, aby výzkumní pracovníci zvážili celé spektrum dostupných technik a zvolili nejvhodnější přístup na základě konkrétních potřeb analýzy.

3.3.1. Validace farmakoanalytických metod

Validace metod ve farmaceutické analýze se řídí převážně předpisy vydanými dvěma významnými institucemi. Ucelený přehled parametrů a rozsahů definovaných těmito předpisy je obsažen v následující Tabulce 2. Validací protokoly metod zmiňovaných v této disertační práci jsou primárně v souladu s pokyny stanovenými Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Mezinárodní radou pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (ICH).

Tabulka 2 Souhrn validačních parametrů pro farmakoanalýzu.

Validační parametr	Definice	Provedení a vyhodnocení
Selektivita	schopnost analytické metody rozlišit a stanovit obsah analytu v přítomnosti jiných potenciálně interferujících látek v placebo léčivého přípravku	doložení chromatogramu placebo testovaného přípravku, chromatogramu standardu a chromatogramu vzorku léčivého přípravku analýza nečistot, čistota píku, použití jiné metody
Matricové efekty	změna (zvýšení nebo snížení) signálu analytu způsobená interferencemi pocházejícími z matrice vzorku	nedefinováno (pro detekci analytů hmotnostní spektrometrií – doporučeno zahrnout)
Kalibrační křivka	= linearita – lineární vztah mezi koncentrací analytu a odezvou detektoru má být prokázán v celém kalibračním rozmezí	nejméně 5 kalibračních standardů připravených naředěním zásobního roztoku v rozmezí 80–120 % testované koncentrace uvedena směrnice a úsek na ose y a korelační koeficient ($r \geq 0,999$)
Přesnost a preciznost	presnost: těsnost shody mezi hodnotou získanou měřením a hodnotou předem vypočtenou, nominální preciznost: těsnost shody mezi opakovanými měřeními analytu (vyjádřeno pomocí RSD)	ideálně 3 koncentrační hladiny (80, 100 a 120 % očekávané koncentrace) připraveny přidávkem známého množství analytu k placebo (není-li možné získat placebo, připouští se metoda standardního přídatku či srovnání hodnot s jinou, již validovanou metodou) nutno uvést výtěžnost jako součásti přesnosti náštrik RSD ≤ 5 % pro $n = 10$
Stabilita	zajištění, že koncentrace zůstává v čase stejná	limit nedefinován, stabilita standardů

Tabulka 2 (pokračování) Souhrn validačních parametrů pro farmakoanalýzu.

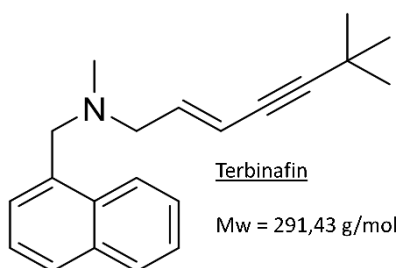
Validační parametr	Definice	Provedení a vyhodnocení
Mez stanovitelnosti	nejnižší koncentrace analytu, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a precizností koncentrací analytu přidávaného ke vzorku po extrakci	nejméně 3 koncentrační hladiny, nemusí být 100 %
Mez detekce	nejnižší koncentrace analytu, která může být spolehlivě detekována a identifikována	změření záznamu slepého vzorku, který je nastříknut ihned po analýze kontrolního vzorku s vysokou koncentrací vyhodnocení: intenzita signálu ≤ 20 % LLOQ analytu a ≤ 5 % intenzity IS
Test způsobilosti systému	zajištění adekvátní účinnosti chromatografického systému	N > 2000 AS ≤ 2 (0,8–1,5) RS > 2 (větší 1,5) opakovatelnost nástříku RSD ≤ 1 % pro $n \geq 6$ ($n \geq 5$)

Ve farmaceutické analýze jsou běžné jednodušší matrice. Klíčovou roli hraje zejména stanovení nečistot, které je důležitým prvkem při hodnocení bezpečnosti, účinnosti a celkové kvality farmaceutických výrobků. Tyto nečistoty lze rozdělit do dvou hlavních skupin: známé nečistoty pocházející z procesu syntézy účinné látky (např. výchozí materiály a meziprodukty) a neznámé nečistoty (včetně degradačních produktů a kontaminantů). Analýza nečistot je navíc úzce spjata s limity stanovení a detekce, což jsou aspekty, které se při analýze farmaceutických látek často přehlíží kvůli předpokladu vyšších koncentračních hladin.

3.3.2. Vybraná léčiva stanovovaná pomocí UHPLC

3.3.2.1. Terbinafin

Terbinafin, chemicky (E)-N,6,6-trimethyl-N-(naftalen-1-ylmethyl)hept-2-en-4-yn-1-amin (Obrázek 9), je fungicidní látka patřící do skupiny allylaminů. Tyto sloučeniny zabraňují biosyntéze ergosterolu, základní složky buněčné membrány hub, tím, že inhibují enzym skvalen epoxidázu. V důsledku blokády enzymu se v buňkách začne hromadit skvalen, prekurzor ergosterolu, který způsobí zvýšení propustnosti membrány a následnou buněčnou smrt. Jako širokospektré antimykotikum působí terbinafin v nízkých koncentracích na dermatofyty a také na *Aspergilly*, dimorfní a vláknité houby. Jeho účinnost byla prokázána také na kvasinky, jako jsou *Candida albicans* a *Pityrosporum* spp. Kromě antimykotické aktivity vykazuje terbinafin také antibakteriální aktivitu vůči některým grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Tento účinek může pomoci i při léčbě koinfekcí [44].



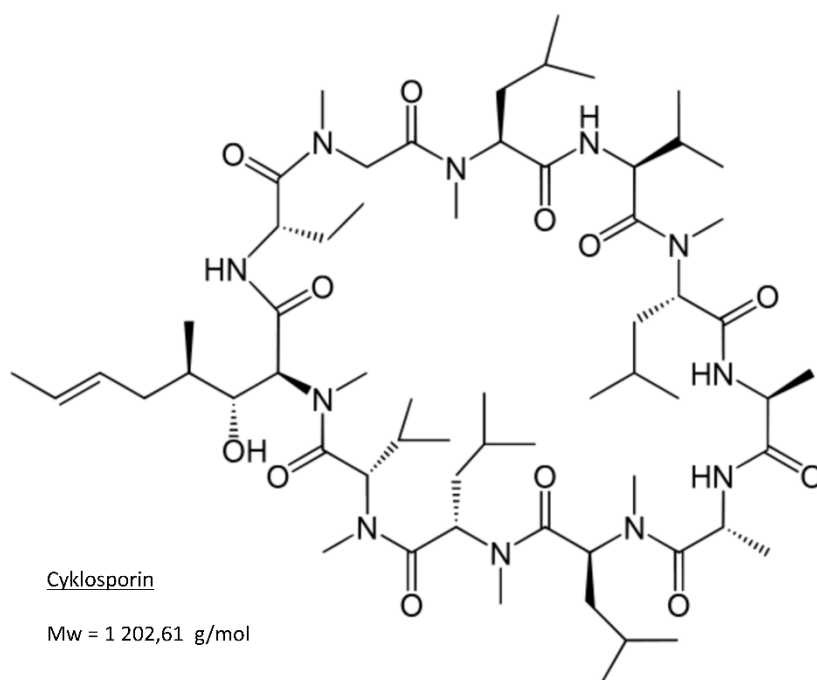
Obrázek 9 Chemická struktura terbinafinu.

Terbinafin hydrochlorid je hlavní formou léčiva používanou pro perorální i lokální podání. Lokálně aplikovaný terbinafin v komerčně dostupném roztoku, krému a gelu je lékem volby u dermatofyty vyvolaných kožních infekcí, jako je tinea pedis, tinea corporis a tinea

cruris. Perorálně podávaný terbinafin ve formě tablet se používá k systémové nebo kombinované léčbě s nejvyšší mírou vyléčení onychomykózy [44].

3.3.2.2. Cyklosporin

Cyklosporin-A (CyA), struktura zobrazena na Obrázku 10, byl původně zkoumán jako antimykotikum, ale až jeho objevené imunosupresivní vlastnosti vedly k medicínskému využití. Tento lipofilní cyklický peptid složený z 11 aminokyselin selektivně inhibuje aktivaci T lymfocytů, aniž by významně ovlivňoval jiné imunitní buňky. Dále moduluje imunitní toleranci a jeho vazba na cyklofiliny v T buňkách inhibuje kalcineurin, čímž omezuje imunitní reakce. Na rozdíl od jiných imunosupresiv nezabíjí CyA imunitní buňky, ale ovlivňuje jejich aktivaci.



Obrázek 10 Chemická struktura cyklosporinu.

Jeho objevení výrazně zvýšilo procento přežití po transplantaci ledvin a jater, což vedlo k jeho rychlému schválení úřadem FDA v roce 1983. Kromě své role v prevenci rejekce orgánů se CyA používá také k léčbě reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) a různých zánětlivých onemocnění, jako je psoriáza, atopická dermatitida, nefrotický syndrom a revmatoidní artritida. Použití CyA je však doprovázeno nežádoucími účinky, včetně nefrotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity, kardiovaskulární toxicity, průjmu, endokrinní a metabolické toxicity.

Dávky CyA mají nejasné hranice – zatímco nad 20 mg/kg jsou považovány za vysoké, nižší dávky nemají přesnou definici. Snaha o snížení dávek CyA má za cíl snížit nežádoucí účinky při zachování účinnosti, což prokazatelně zlepšuje výsledky transplantace.

3.4. Problematika environmentální analýzy

V oblasti analýzy životního prostředí slouží analytická chemie jako nepostradatelný nástroj pro hodnocení a monitorování znečišťujících a kontaminujících látek přítomných ve vzduchu, vodě a půdě. Komplexní porozumění dopadu lidské činnosti na životní prostředí je důležité pro formulování účinných strategií a zajišťování dodržování předpisů. Díky přesným analýzám je umožněno regulačním orgánům prosazovat přísné normy a chránit tak kvalitu životního prostředí.

3.4.1. Důvody k analýze vody

Termín „kontaminanty vzbuzujícími obavy“ (CEC) označuje syntetické nebo přirozeně se vyskytující chemické látky nebo jakýkoli mikroorganismus, který není v životním prostředí běžně sledován, ale má potenciál dostat se do životního prostředí a způsobit známé nebo předpokládané nepříznivé ekologické účinky a/nebo účinky na lidské zdraví [45]. CEC jsou obvykle přítomny ve vodách ve stopových koncentracích, obvykle v ng/l nebo µg/l [46]. Významnými kategoriemi CEC jsou léčiva, kosmetické přípravky, průmyslové chemické látky, zpomalovače hoření, sloučeniny narušující endokrinní systém a pesticidy, nicméně mnoho z nich zůstává neznámých [47]. Tato kombinace stopových koncentrací a rozmanitosti CEC činí z detekce, analýzy a znalosti jejich životního cyklu ve vodních systémech nelehký úkol [46]. Současná infrastruktura odstraňuje nebo degraduje mnoho těchto CEC pouze částečně, což vede k jejich uvolňování do systému povrchových vod [47].

Jednu z velkých kategorií CEC tvoří perfluorované a polyfluorované látky (PFAS), které obsahují alifatický fluorovaný uhlíkový řetězec a používají se od 50. let 20. století. Vazba C-F v perfluoroalkylové části ($-C_nF_{2n+1}$, $n > 1$) je vysoce dipolární a relativně nepolarizovatelná, což propůjčuje fluorovaným sloučeninám polární hydrofobnost [48]. Tato jejich vlastnost vedla k jejich širokému průmyslovému a komerčnímu využití. Podle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) bylo identifikováno více než 4700 sloučenin PFAS [48]. Desítky let rozšířeného celosvětového používání těchto vysoce perzistentních sloučenin vyvolalo obavy z možných dopadů starších i nových generací fluorovaných alternativ na lidské zdraví a životní prostředí. PFAS se mohou bioakumulovat v potravinovém řetězci, jsou všudypřítomné ve vodním prostředí, byly

zjištěny ve vzduchu, půdě, rostlinách a biotě po celém světě. Několik studií o jejich toxicitě prokázalo, že expozice PFAS může mít za následek neurotoxicitu, hepatotoxicitu, vývojovou toxicitu, imunotoxicitu, endokrinní poruchy a karcinogenitu [48].

3.4.2. Legislativní normy

Rámcová směrnice EU o vodě (Water Framework Directive) byla poprvé zavedena v roce 2000 s cílem chránit a zlepšovat kvalitu vody ve všech členských státech EU, aby bylo dosaženo vyhovujícího ekologického stavu všech vod. V příloze VIII rámcové směrnice o vodě jsou biocidy a přípravky na ochranu rostlin výslovně uvedeny jako hlavní znečišťující látky [49]. Seznam prioritních látek uvedených v rámcové směrnici o vodě byl v průběhu let měněn a aktualizován podle toho, jak byly zjišťovány další údaje. Pozdější změny legislativy zahrnovaly vytvoření „seznamu sledovaných látek“ (Watch List), na kterém jsou uvedeny znečišťující látky, o nichž je však k dispozici jen omezené množství údajů z monitorování. Nejnovější verze tohoto dokumentu je z 26.7.2022 [50].

Několik členských států EU stanovilo limity pro konkrétní PFAS a skupiny PFAS v pitné vodě. V důsledku těchto regulačních snah začali světoví výrobci vyrábět nové chemické látky, aby nahradili PFAS s dlouhým řetězcem, například sloučeninami s kratším řetězcem nebo nefluorovanými látkami. Některé z těchto nových chemických látek se však ukázaly být stejně environmentálně perzistentní, ještě mobilnější v životním prostředí a obtížněji odstranitelné z pitné vody než jejich protějšky s dlouhým řetězcem. Některé z nich se ukázaly být i toxické [48]

4. KOMENTÁŘE K PUBLIKOVANÝM VÝSTUPŮM

4.1. Komentáře k pracím z oblasti klinické analýzy

4.1.1. Rešeršní práce: Vitamín K – zdroje, fyziologická úloha, kinetika, nedostatek, detekce, terapeutické použití a toxicita

Příloha č. 1: Vitamin K – sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity

*Přemysl Mladěnka, Kateřina Macáková, Lenka Kujovská Krčmová, Lenka Javorská, **Kristýna Mrštná**, Alejandro Carazo, Michele Protti, Fernando Remião, Lucie Nováková*

Nutrition Reviews, 2022, Vol. 80(4):677–698

IF₍₂₀₂₄₎: 6,1 (Q1) AIS₍₂₀₂₄₎:1,639 (Q1)

Rešeršní práce je tvořena několika kapitolami. V první řadě se zabývá zdroji vitamínu K ve stravě, jeho kinetikou a fyziologickou funkcí v lidském těle. Dále se zaměřuje na možné příčiny a důsledky jeho nedostatku. Z našeho pohledu zahrnuje též důležitou kapitolu přibližující detekci vitamínu K a dalších markerů kurčení hladin vitamínu v těle. Následuje rozbor jeho profylaktického a terapeutického potenciálu a práce je zakončena informacemi o možné toxicitě.

Navzdory rozsáhlému výzkumu zůstává přesná denní potřeba vitamínu K nejistá. Současné studie naznačují potenciálně nedostatečné hladiny vitamínu K u starších osob. Vstřebávání vitamínu K se u jeho různých forem liší. Žlučové soli usnadňují vstřebávání lipofilních forem vitamínu K do enterocytů, kde se balí do chylomikronů a lymfatickým systémem se dostávají do krevního oběhu. Vitamín K1 je zadržován především v játrech, odkud je transportován chylomikrony, zatímco formy vitamínu K2 jsou přítomny v lipoproteinech a jsou distribuovány do extrahepatálních tkání. Plazmatické hladiny forem vitamínu K se u různých populací liší, například Japonci konzumující natto mají vyšší hladiny MK-7. Jak vitamín K1, tak K2 procházejí podobnými metabolickými procesy, které nakonec vedou k vylučování metabolitů močí a žlučí. Tyto metabolity pak mohou sloužit jako markery hladin vitamínu K v těle.

Vitamín K funguje jako klíčový koenzym v procesu c-karboxylace. Tento proces vede k aktivaci proteinů, známých jako Gla proteiny. Tyto proteiny, včetně koagulačních faktorů a proteinů podílejících se na mineralizaci pojivové tkáně, hrají zásadní roli při srážení krve, zdraví kostí a ochraně tkání. Vitamín K je během tohoto procesu recyklován, takže fyziologické požadavky organismu jsou relativně nízké. V současné době probíhá výzkum zkoumající další možné funkce vitamínu K, včetně jeho interakce s intracelulárními receptory, interference s enzymy a antioxidační nebo protizánětlivé aktivity. Nedostatek vitamínu K může vést ke spontánnímu krvácení, purpuře a epistaxi. U dospělých se může vyskytnout v důsledku nedostatečného příjmu z potravy, různých zdravotních stavů (např. onemocnění jater nebo malabsorpce) a některých léků, včetně antikoagulancií. Novorozenci jsou rovněž ohroženi kvůli nízkým zásobám a hladinám vitamínu K v mateřském mléce.

Přesné zjištění nedostatku vitamínu K je složité vzhledem k lipofilní povaze vitamínu a jeho nízkým hladinám. Moderní techniky, zejména kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, se staly nezbytnými pro přímé měření vitamínu K. Chromatografické metody jsou široce používány, ale přítomnost více forem vitamínu K a vliv abnormálních lipidových profilů mohou výsledky zkreslovat. Složitá úprava vzorků se bohužel týká i detekčních metod, jako je hmotnostní spektrometrie. Existují i nepřímé metody stanovení. Nedostatek vitamínu K vede ke stavu, kdy Gla proteiny nemohou být karboxylovány, a proto se většinou uvolňují v nekarboxylované formě. Nekarboxylované proteiny vitamínu K tak mohou být alternativními cíli pro kvantifikaci, ale tyto testy zatím nejsou standardizovány. Tyto proteiny byly dříve známy jako PIVKA (proteiny indukované nepřítomností vitamínu K). U dospělých jsou jednoznačně diagnosticky výhodnější než protrombinový čas nebo parciální tromboplastinový čas, které jsou ovlivněny například jaterními chorobami a hematologickými onemocněními. Jejich citlivost při mírném nedostatku vitamínu K je rovněž nízká. Dalším testovaným markerem nedostatečného obsahu vitamínu K v těle, zejména v kostech, je nekarboxylovaný osteokalcin. Hladiny celkového osteokalcinu se liší, proto se jako vhodnější marker jeví procento nekarboxylovaného osteokalcinu. Dostupné údaje to však plně nepotvrzují a vliv může mít i hladina estrogenů.

Ačkoli je vitamín K známý především pro svou roli při srážení krve, má různé možnosti profylaktického a terapeutického využití. Je nezbytný pro prevenci krvácivých

onemocnění u novorozenců a pro nápravu otravy antagonisty vitamínu K. Účinky vitamínu K přesahují rámec koagulace. Byl zkoumán jeho vliv na osteoporózu, zlomeniny, kardiovaskulární onemocnění, rakovinu a kognitivní funkce. Při léčbě osteoporózy vitamín K pozitivně ovlivňuje kosti, zejména v kombinaci s osteokalcinem, a studie naznačují jeho potenciální přínos. Vitamín K, zejména K2, se také slibně uplatňuje v prevenci arteriální kalcifikace, snižuje výskyt ischemické choroby srdeční a celkově snižuje úmrtnost. S definitivními závěry je však nutné počkat na další klinické studie. Některé studie naznačují pozitivní vliv na prevenci rakoviny, zejména u vitamínu K2, ale výsledky nejsou dostatečně průkazné. Vitamín K může mít také mírný vliv na diabetes a nemoci související s věkem. V souvislosti s COVID-19 nedávná studie zjistila, že vitamín K2 může potenciálně ovlivnit vazbu proteinu SARS-CoV-2 na lidské buňky prostřednictvím receptoru ACE2, což naznačuje novou oblast výzkumu. Navzdory těmto slibným zjištěním je pro plné pochopení a využití terapeutického potenciálu vitamínu K u různých zdravotních stavů nezbytný pokračující výzkum a klinické studie.

Přírodní vitamín K způsobuje u lidí nebo zvířat systémovou toxicitu jen zřídka. Obavy z nadměrné koagulace v důsledku vysokého příjmu vitamínu K nebyly významně pozorovány. Studie na zvířatech ukázaly, že masivní dávky mohou způsobit krvácení a anémii. Údaje u lidí ukazují, že dávka 10 mg/den vitamínu K1 po dobu jednoho měsíce je bezpečná. Hlášené nežádoucí účinky jsou většinou lokální, jako jsou drobné gastrointestinální problémy a kožní vyrážky, přičemž intramuskulární vitamín K1 způsobuje bolesti v místě vpichu a modřiny. Nicméně vysoké dávky vitamínu K3 mohou vést k toxickým reakcím, zejména u kojenců.

Závěrem lze říci, že ačkoli je vitamín K tradičně spojován se srážlivostí krve, má ve fyziologii člověka mnoho dalších rolí. Je nezbytný pro posttranslační modifikaci 18 nebo 19 proteinů, z nichž 11 nebo 12 nesouvisí s koagulací. Zejména jeho zapojení do kalcifikace pojivové tkáně podnítilo intenzivní výzkum, i když údaje stále nejsou jednoznačné. Různorodost a rozmanité biologické vlastnosti forem vitamínu K mohou potenciálně vysvětlovat neúspěch dosavadního výzkumu, který jasně stanovil roli, kterou vitamín K u člověka hraje. K objasnění jeho účinků nesouvisejících s koagulací u člověka jsou zřejmě zapotřebí další studie. Bez ohledu na to je suplementace přírodními formami vitamínu K do značné míry bezpečná, a tudíž přijatelná za určitých podmínek, např. při postmenopauzální osteoporóze.

4.1.2. Analýza vitamínu K₁ a hlavních variant K₂ v séru a lipoproteinových frakcích potkanů/lidí pomocí rychlé, jednoduché a citlivé metody UHPLC-MS/MS

Příloha č. 2: Analysis of vitamin K₁ and major K₂ variants in rat/human serum and lipoprotein fractions by a rapid, simple, and sensitive UHPLC-MS/MS method

Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Lenka Kujovská Krčmová, Alejandro Carazo, Jana Pourová, Přemysl Mladěnka, Ludmila Matysová, František Švec

Journal of Chromatography A, 2024, Vol. 1714

IF₍₂₀₂₄₎: 4,1 (Q2) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,533 (Q2)

4.1.2.1. Úvod a cíl práce

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této práce, vitamín K existuje ve více formách a má pro lidský organismus nepochybný význam. Analýza vitamínu K v lidském těle není jednoduchá kvůli jeho nízkým koncentracím a složitým úpravám vzorků. Vzhledem k jeho vysoké lipofilitě, fotosenzitivitě, tendenci ulpívat na povrchích a vysoké vazbě na proteiny jsou současné metody vyvinuté k jeho extrakci časově i manuálně náročné a často využívají vysoké objemy organických rozpouštědel. Bohužel i kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií se potýká s problémy, jako je nízká citlivost, složitost úpravy vzorků a dopad na životní prostředí. Naším cílem bylo vyvinout rychlou a účinnou metodu LC-MS/MS pro detekci vitamínu K₁ a specifických forem K₂ (MK-4, MK-7 a MK-9) v lidském séru a následně tuto metodu kombinovat s ultracentrifugací k analýze distribuce vitamínu K v lipoproteinových frakcích zdravých dobrovolníků a laboratorních potkanů. Hlavním záměrem bylo docílit takového stanovení, které bude snadno použitelné v rutinních laboratořích a umožní tak analýzu vitamínu K v běžné klinické praxi.

4.1.2.2. Výsledky a diskuze

V rámci této práce byla vyvinuta a validována UHPLC-MS/MS metoda pro analýzu vitamínu K ve vzorcích lidského a potkaního séra a z něj získaných lipoproteinových frakcích. Metoda vyvinutá pro kvantifikaci vitamínu K se zaměřuje především na rychlost a jednoduchost.

Získání lipoproteinových frakcí

Lipoproteinové frakce byly extrahovány ze séra izopyknickou ultracentrifugací dle modifikované metody zavedené v laboratoři [51].

Extrakce vitamínu K

Úprava vzorků zahrnovala srážení proteinů s následnou miniaturizovanou extrakcí z kapaliny do kapaliny. U každého vzorku bylo 5 μ l roztoku vnitřního standardu smícháno s 300 μ l lidského nebo potkaního séra nebo lipoproteinové frakce. Pro precipitaci proteinů bylo použito 800 μ l methanolu a vortexováno po dobu 30 s. Po přidání 800 μ l hexanu a kroku vortexování (20 s) byla provedena sonifikace po dobu 1 min pomocí ultrazvukové čisticí lázně DU 100 (Argo lab, Carpi, Itálie) při 25 °C a výkonu 5 (40 kHz). Poté byly vzorky vortexovány po dobu 2 min, aby se umožnil přenos lipofilního vitamínu K do hexanové fáze. Pro oddělení vrstev byly vzorky odstředovány při 21 380 \times g po dobu 5 min. Celá hexanová vrstva, přibližně 800 μ l, byla přenesena do další zkumavky Eppendorf a odpařena při 35 °C po dobu přibližně 15 min. K rekonstituci bylo použito 150 μ l methanolu. 3 μ l tohoto extraktu byly využity pro LC-MS/MS analýzu.

Důraz během vývoje extrakčního postupu byl kladen především na výtěžnost, nízké matricové efekty a detekční limity, které odpovídají sérovým hladinám vitamínu K. Byla testována různá rozpouštědla jak pro srážení proteinů, tak pro extrakci z kapaliny do kapaliny. Tabulka 3 zobrazuje výsledky testovaných extrakcí.

Tabulka 3 Výťažnost a meze detekce zjištěné po použití testovaných metod úpravy vzorků.

Způsob extrakce	Výtěžnost (%)				Mez detekce (nmol/l)			
	K1	MK4	MK7	MK9	K1	MK4	MK7	MK9
klasická LLE	66	92	68	44	N/A	N/A	N/A	N/A
mini-LLE, precipitace s EtOH, jednoduchá LLE	34	47	28	25	0,708	0,865	0,193	0,531
mini-LLE, precipitace s CH ₃ CN, jednoduchá LLE	36	28	32	14	0,747	1,323	0,240	0,514
mini-LLE, precipitace s MeOH, jednoduchá LLE	84	77	64	36	0,208	0,572	0,200	0,377
mini-LLE, precipitace s ledovým MeOH, jednoduchá LLE	76	89	65	36	0,212	0,658	0,154	0,303
mini-LLE, precipitace s MeOH, dvojitá LLE	86	91	72	41	0,260	0,754	0,183	0,313
mini-LLE, precipitace s MeOH, jednoduchá LLE, krok ultrazvukování	107	98	68	51	0,150	0,308	0,122	0,265

LLE: extrakce z kapaliny do kapaliny, EtOH: ethanol, CH₃CN: acetonitril, MeOH: methanol, N/A: neanalyzovalo se

Podmínky UHPLC-MS/MS metody

Chromatografická separace byla provedena na systému Shimadzu Nexera UHPLC (Kjóto, Japonsko). Analyty byly separovány na chromatografické koloně Kinetex C18. Alikvoty vzorků byly eluovány za podmínek průtokového gradientu po dobu 8,5 min. Mobilní fáze byla tvořena směsí rozpouštědel octanem amonným v methanolu s přidavkem kyseliny octové, kyseliny mravenčí a vody. Sloučeniny byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem Shimadzu LCMS 8050 (Kjóto, Japonsko) s elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu. Chod systému, sběr a zpracování dat byly řízeny softwarem LabSolutions 5.188. Optimální napětí kvadrupólu 1 (Q1) a kvadrupólu 3 (Q3), kolizní energie (CE) a přechody vybrané pro MRM experimenty jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 Optimalizované MRM parametry pro K1, MK-4, MK-7, MK-9 a jejich vnitřní standardy.

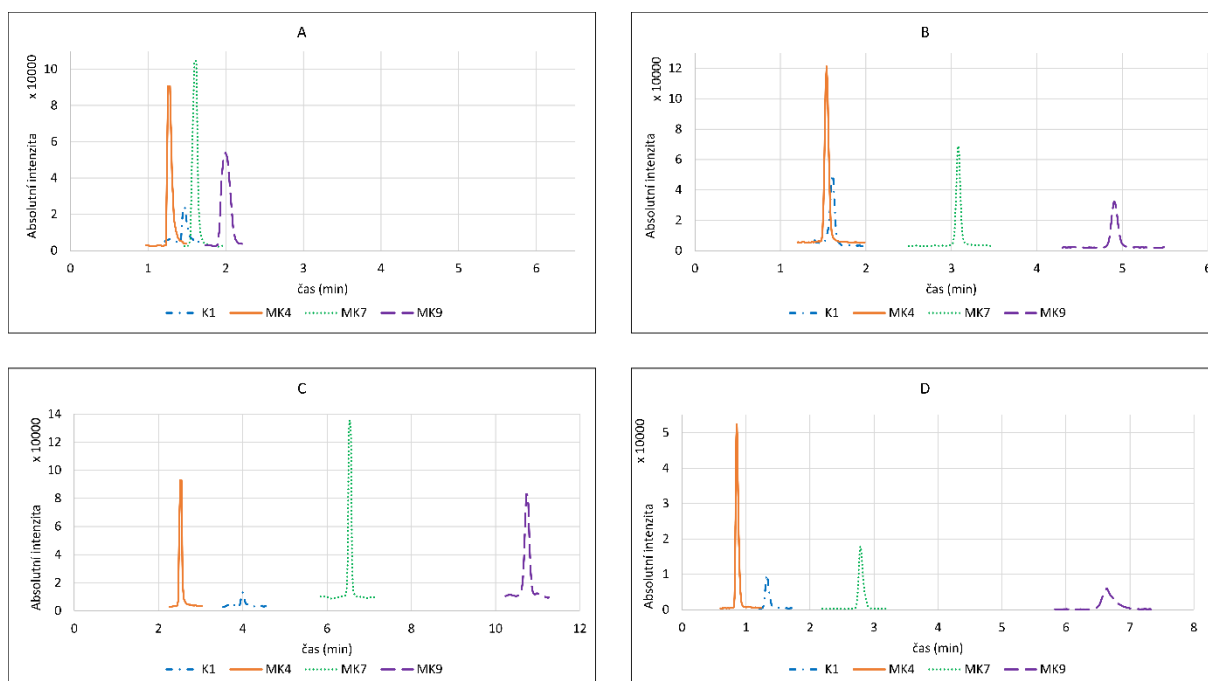
Analyt	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
K1	451,30	186,95	-10,0	-28,0	-22,0
¹³ C ₆ -K1	457,10	193,10	-30,0	-25,0	-25,0
MK-4	445,20	186,90	-12,0	-22,0	-23,0
MK-4-d7	452,10	194,05	-13,0	-23,0	-24,0
MK-7	649,30	186,90	-22,0	-33,0	-13,0
MK-7-d7	656,30	194,00	-24,0	-36,0	-23,0
MK-9	785,50	186,95	-20,0	-46,0	-25,0
MK-9-d7	792,50	194,00	-28,0	-47,0	-22,0

Dwell time (ms) pro všechny analyty byl 100,0.

Optimalizace podmínek metody zahrnovala testování různých mobilních a stacionárních fází, průtoků a aditiv mobilní fáze. Pro optimální ionizaci sloučenin vitamínu K byl rozhodující obsah vody (nepřesahující 5 %) v mobilní fázi. Jako hlavní složka mobilní fáze byl zvolen methanol vzhledem k jeho schopnosti eluovat analyty v krátkých retenčních časech a s dobrou separační účinností. Z aditiv mobilní fáze byly za optimalizovaných podmínek testovány kyselina mravenčí, kyselina octová, mravenčan amonný a octan amonný. Kyselina mravenčí byla účinnější pro ionizaci K1, zatímco kyselina octová pro MK, takže jako ideální byla zvolena kombinace obou. Při porovnání mobilních fází s pufrům a bez něj bylo dosaženo vyšších intenzit s přidavkem pufru, zejména octanu amonného. Byly testovány koncentrace v rozmezí 2,5 až 10 mmol/l, přičemž 5 a 10 mmol/l poskytovaly optimální výsledky. Byla zvolena nižší koncentrace 5 mmol/l, která méně zatěžovala HPLC a MS instrumentaci.

Dále byl hodnocen vliv stacionární fáze na separaci. Za tímto účelem byly testovány kolony Kinetex C18 (100 × 3 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å), Kinetex C18 (50 × 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å), Kinetex PFP (100 × 3 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å) a Kinetex Biphenyl (100 × 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å). Sorbent PFP byl vyřazen jako první i přestože počáteční experimenty se standardy se jeví jako velmi slibné, neboť bylo dosaženo stejných intenzit jako s využitím kolon s fází C18 při zkrácení doby analýzy na čtvrtinu. Problém nastal při analýze biologického materiálu, kdy se matricové interference nepodařilo oddělit ani po úpravě mobilní fáze. Masivní matricové efekty vedly k tomu, že detekční limity byly vyšší než 100 nmol/l. Bifenylová fáze zkrátila analýzu přibližně o 20 % při stejných intenzitách ve srovnání s C18, současně byly odděleny matricové interference, což vedlo k podobným detekčním limitům v nanomolárních

jednotkách jako u fáze C18. Bohužel, její nevýhodou byla nedostatečná robustnost. V porovnání s fází C18 vydržela pouze pětinu počtu nástřiků biologických vzorků, což by její využití v praxi značně prodražilo. Proto byla též vyřazena. Byly testovány dvě kolony s fází C18 různé délky a vnitřního průměru. Kolona o rozměrech 100 × 3 mm poskytla vynikající separaci všech analytů i odstranění interferencí. Pro urychlení analýzy byla vyzkoušena kolona 50 × 2,1 mm, která se ukázala být vhodnější. Časem potřebným k separaci analytů odpovídala bifenylové fázi, a navíc umožnila až 1000 nástřiků biologických vzorků za splnění všech validačních kritérií. Porovnání kolon je zobrazeno na Obrázku 11. Jako poslední byl optimalizován průtokový gradient, což vedlo ke zkrácení analýzy na 8,5 minuty.



Obrázek 11 Chromatogramy obrazující optimalizaci metody pomocí vlivu různých kolon na analýzu.

A) Kinetex PFP (100 × 3 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å), **B)** Kinetex Biphenyl (100 × 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å), **C)** Kinetex C18 (100 × 3 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å), **D)** Kinetex C18 (50 × 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm, 100 Å).

Validace metody

Metoda byla validována v souladu s validačními normami, zahrnující test vhodnosti systému, linearitu, meze detekce a kvantifikace, selektivitu, preciznost a přesnost. Hodnotily se také matricové efekty, stabilita a robustnost metody. Metoda byla validována jak pro sérum, tak pro lipoproteinové frakce a ukázala konzistentní výsledky. Byla hodnocena opakovatelnost s výslednými hodnotami RSD $\leq 0,91$ % pro plochu píku a $\leq 0,21$ % pro retenční čas. Byly vytvořeny matriční kalibrační křivky pro každý analyt, které prokázaly citlivost i pro detekci koncentrací vitamínu K nižších než nanomolárních. Metoda vykazovala dobrou selektivitu a oddělila všechny cílové analyty od interferencí. Přesnost a preciznost splňovaly kritéria EMA, přičemž přesnost se pohybovala v rozmezí 93,00-112,50 % a hodnoty RSD preciznosti mezi 0,56-10,30 %. Přesné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 5 a 6. Tabulka 7 zobrazuje matricové efekty normalizované na vnitřní standard.

Tabulka 5 Test vhodnosti systému, rozsah kalibrace a limity pro K1, MK-4, MK-7 a MK-9. Chromatografické podmínky: Mobilní fáze: 5 mmol/l octan amonný, 0,05 % kyselina mravenčí, 0,05 % kyselina octové, 1 % vody v methanolu. Kolona C18 (50 × 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm , 100 Å). Gradientová eluční separace s použitím průtoku 0,4 ml/min po dobu 0-2 min, 0,6 ml/min po dobu 2-7 min a 0,4 ml/min po dobu 7-8,5 min. Nastříkaný objem vzorku 3 μl . Počet měření 6.

Parametr		K1	MK-4	MK-7	MK-9
Opakovatelnost retenčních časů	SD (STD)	0,002	0,002	0,004	0,005
	%RSD (STD)	0,15	0,21	0,13	0,08
Opakovatelnost ploch píku	SD (STD)	660	742	144	294
	%RSD (STD)	0,69	0,91	0,70	0,56
Opakovatelnost retenčních časů	SD (BIO)	0,002	0,001	0,002	0,008
	%RSD (BIO)	0,12	0,15	0,07	0,12
Opakovatelnost ploch píku	SD (BIO)	0,009	0,013	0,008	0,021
	%RSD (BIO)	0,91	1,68	1,08	2,48
Kapacita píku (BIO)		20,37	21,41	15,17	9,31
Faktor symetrie (BIO)		1,24	1,66	1,22	1,09
Kalibrační rozmezí (nmol/l)		0,25–5	0,5–7	0,2–2	0,5–1,5
Korelační koeficient r^2		0,9999	0,9993	0,9980	0,9978
Mez detekce (nmol/l)		0,15	0,3	0,12	0,3
Spodní limit kvantifikace (nmol/l)		0,25	0,5	0,2	0,5

BIO: biologický materiál

Tabulka 6 Přesnost a preciznost metody.

	Předpokládaná koncentrace	Měření v průběhu jednoho dne, within-run, (n = 5)			Měření v rámci více dní, between-run, (n = 3)		
		Změřená koncentrace (průměr)	Preciznost (RSD %)	Přesnost (%)	Změřená koncentrace (průměr)	Preciznost (RSD %)	Přesnost (%)
Vitamin K1							
LLOQ	0,250	0,245	2,89	98,00	0,240	5,89	96,00
Nízký QC	1,750	1,714	2,21	97,94	1,673	7,13	95,62
Střední QC	2,500	2,480	5,88	99,20	2,463	4,76	98,53
Vysoký QC	5,000	4,900	2,60	98,00	4,650	4,87	93,00
Vitamin MK-4							
LLOQ	0,500	0,495	4,29	99,00	0,475	1,49	95,00
Nízký QC	1,125	1,240	2,63	99,20	1,245	2,11	99,73
Střední QC	3,000	3,010	3,59	100,33	2,972	9,59	99,07
Vysoký QC	7,000	7,156	2,23	102,23	6,760	6,80	96,57
Vitamin MK-7							
LLOQ	0,200	0,200	7,07	100,00	0,225	9,43	112,50
Nízký QC	0,525	0,496	2,30	94,48	0,510	5,55	97,14
Střední QC	0,750	0,746	4,60	99,47	0,703	9,32	93,78
Vysoký QC	2,000	2,073	10,30	103,67	2,195	2,26	109,75
Vitamin MK-9							
LLOQ	0,500	0,495	4,29	99,00	0,480	8,84	96,00
Nízký QC	0,750	0,757	7,28	100,89	0,777	2,68	103,56
Střední QC	0,875	0,873	1,75	99,81	0,885	0,56	101,09
Vysoký QC	1,500	1,495	4,26	99,67	1,435	3,45	95,67

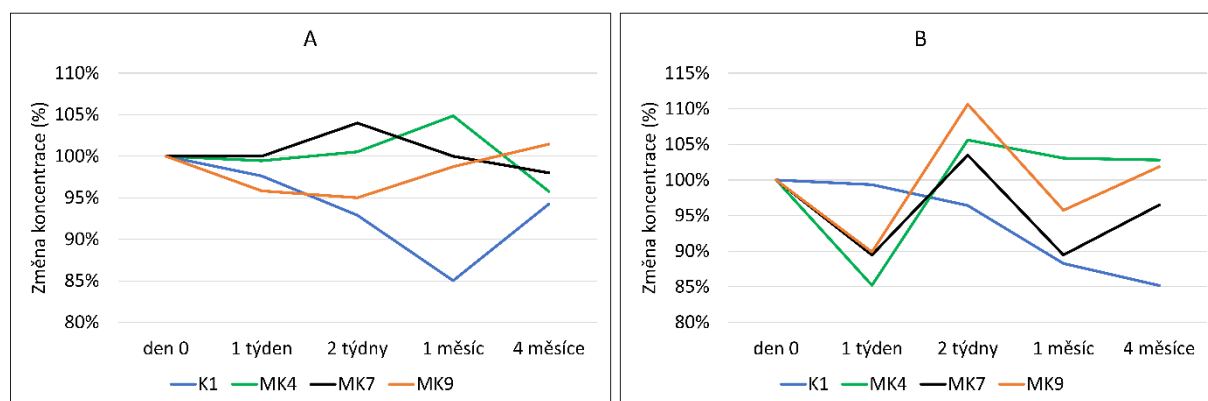
QC – kontrolní vzorek

Tabulka 7 Matricové efekty normalizované na vnitřní standard (IS-nME%) pro K1, MK-4, MK-7 a MK-9 v lidském séru.

Vzorky séra	K1		MK-4		MK-7		MK-9	
	nízký QC	vysoký QC	nízký QC	vysoký QC	nízký QC	vysoký QC	nízký QC	vysoký QC
	1	79,42	82,31	96,53	77,49	89,06	95,72	109,68
2	73,55	75,50	131,43	89,10	80,73	101,32	122,46	115,73
3	64,21	70,82	103,41	92,98	72,78	93,18	86,54	114,16
4	60,18	65,23	125,14	78,27	68,60	97,06	106,25	134,45
5	74,37	70,41	137,13	84,01	73,05	93,17	91,46	115,98
6	87,80	58,17	111,35	82,22	94,40	78,59	106,68	103,50
%RSD	13,70	11,79	13,80	7,24	12,79	8,32	12,53	8,76

QC – kontrolní vzorek

Jak bylo zmíněno, v rámci validace byla testována i stabilita analytu v biologickém materiálu. Bylo zjištěno, že všechny analyty jsou stabilní při 4 °C po dobu maximálně 24 hodin, při -26 °C po dobu minimálně 72 hodin a při -80 °C po dobu minimálně 4 měsíců, jak je uvedeno na Obrázku 12. Vzorky byly stabilní v autosampleru maximálně 24 hodin. Ztráty ve všech případech nepřesáhly 15 %. Stabilita standardu byla minimálně 6 měsíců při -80 °C a nejméně 5 hodin při laboratorní teplotě.



Obrázek 12 Stabilita vitamínu K (K1, MK-4, MK-7, MK-9) v lidském séru skladovaném po dobu 4 měsíců při -80 °C. Stabilita byla testována na dvou koncentračních úrovních, tj. na úrovni LLOQ (A) a na střední kalibrační úrovni (B).

4.1.2.3. Aplikace metody

Nová metoda byla použita k analýze sérových hladin vitamínu K a k analýze vitamínu K v lipoproteinových frakcích lidských a potkaních vzorků. Sérum potkanů vykazovalo vyšší hladiny K1 a MK-4 než lidské sérum, přičemž MK-7 byl v potkaních sérech oproti lidským detekován minimálně. Analýza MK-9 byla vzhledem k nízkým hladinám složitější. Analýza lipoproteinových frakcí odhalila podobné rozložení vitamínu K u obou druhů, přičemž nejvyšší hladiny obsahovaly frakce HDL a LDL. Tabulka 8 shrnuje koncentrace zjištěné v sérech a Obrázek 13 v lipoproteinových frakcích.

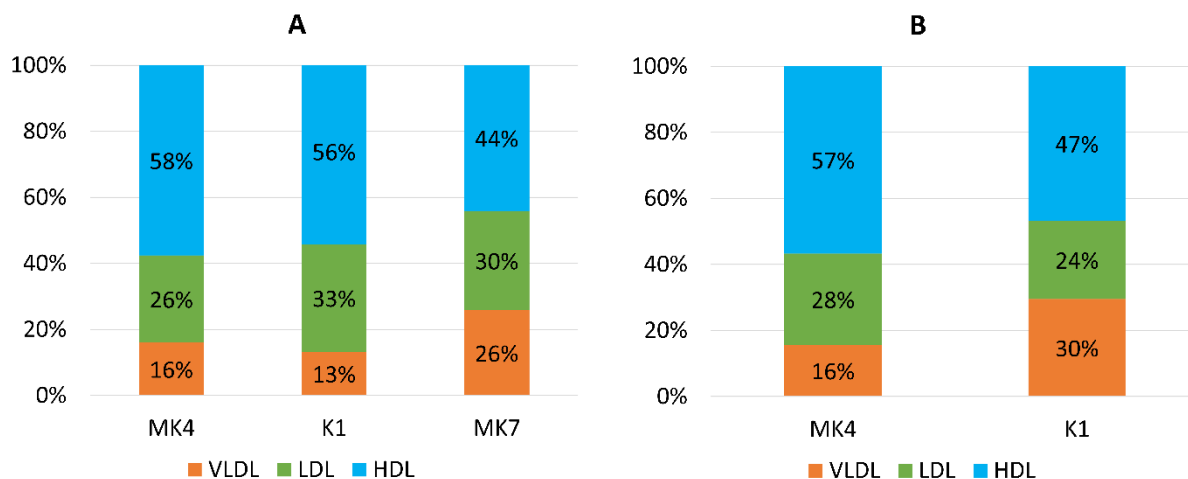
Tabulka 8 Mediány stanovených koncentrací vitamínu K v lidském a potkaním séru.

Vitamin	Lidské sérum – medián (rozsah)	Potkaní sérum – medián (rozsah)
K1 (nmol/l)	1,19 (0,31 – 3,60)	1,74 (0,36 – 3,99)
MK-4 (nmol/l)	2,98 (0,68 – 5,71)	6,75 (3,25 – 8,66)
MK-7 (nmol/l)	0,43 (0,11* – 1,71)	< LOD (N/A – 0,52)
MK-9 (nmol/l)	< LOD (N/A – 0,71)	< LOD

< LOD - pod mezí detekce (K1: 0,15 nmol/l, MK-4: 0,3 nmol/l, MK-7: 0,12 nmol/l, MK-9: 0,3 nmol/l),

* - pod dolní mezí stanovitelnosti (K1: 0,25 nmol/l, MK-4: 0,5 nmol/l, MK-7: 0,2 nmol/l, MK-9: 0,5 nmol/l),

N/A: nezjištěno.



Obrázek 13 **A**: Distribuce vitamínu K1, MK-4 a MK-7 v lidských lipoproteinových frakcích. **B**: Distribuce vitamínu K1, MK-4 v lipoproteinových frakcích potkanů. RSD distribuce jednotlivých vitamínů ve frakcích se pohybovala v rozmezí 11-32 % u lidských a 9-29 % u potkaních vzorků.

4.1.2.4. Shrnutí

Závěrem lze říct, že tato studie představuje novou a účinnou metodu pro simultánní analýzu vitamínu K1, MK-4, MK-7 a MK-9 v séru a lipoproteinových frakcích. Metoda poskytuje rychlou analýzu v pouhých 8,5 minutách, což je výrazně kratší doba než u stávajících metod. Zároveň dosahuje nízkých mezí detekce, pro MK-7 dokonce 0,1 nmol/l, a jako první analyzuje MK-9 v lidských a potkaních matricích. Mohla tak být zkoumána distribuce vitamínu K v lipoproteinových frakcích, z jejichž výsledků vyplývá jeho převaha ve frakcích HDL a LDL. Tento projekt poskytl cenné poznatky pro budoucí výzkumy vztahu mezi hladinami lipoproteinů a koncentracemi vitamínu K a nabízí potenciální využití při diagnostice různých onemocnění.

4.1.3. Síla moderních extrakčních technik: Průlom v extrakci vitamínu K z lidského séra

Příloha č. 3: The power of modern extraction techniques: A breakthrough in vitamin K extraction from human serum

Kristýna Mrštná, Dorota Turoňová, Chaweewan Suwanvecho, František Švec, Lenka Kujovská Krčmová

Microchemical Journal, 2024, Vol. 198

IF₍₂₀₂₄₎: 4,8 (Q1) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,59 (Q2)

4.1.3.1. Úvod a cíl práce

Práce se zabývá problematikou extrakce vitamínu K z lidského séra a porovnává tradiční techniky extrakce z kapaliny do kapaliny či extrakce na tuhou fázi s moderními, jako je extrakce do kapaliny podpořená tuhou fází, známá pod zkratkou SLE, využití Phree™ destičky pro odstranění fosfolipidů (Phree™ destička), miniaturizovaná extrakce z kapaliny do kapaliny (mini-LLE) a mikroextrakce pomocí disperzních pipetovacích extrakčních špiček (DPX špičky). Tradiční extrakční metody mají nedostatky, jako je dlouhá doba zpracování, velké objemy rozpouštědel a nízká citlivost. Moderní techniky nabízejí výhody, jako je rychlejší zpracování, automatizace a menší objemy vzorků, což může zvýšit spolehlivost a účinnost analýzy vitamínu K ze vzorků s omezeným objemem, jako jsou právě biologické matrice.

4.1.3.2. Výsledky a diskuze

Chromatografická separace byla provedena pomocí systému Shimadzu Nexera UHPLC s kolonou Kinetex C18. Všechny formy vitamínu K byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru Shimadzu LCMS 8050 s elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu. Podrobnosti k metodice byly zmíněny v předchozí kapitole.

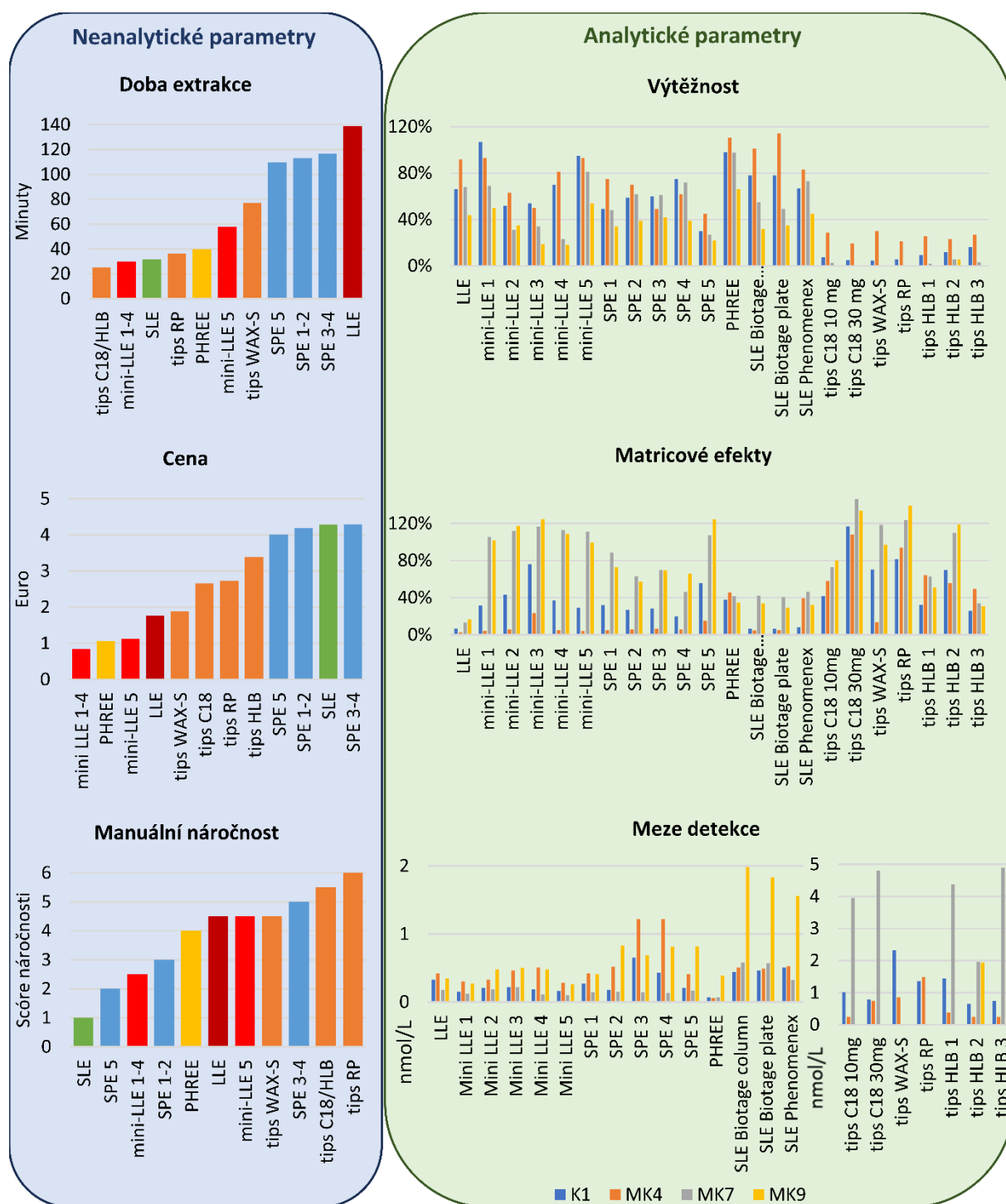
Práce porovnává různé techniky úpravy vzorků pro analýzu vitamínu K v séru s přidavkem standardů. Sérum pro tento výzkum bylo připraveno pomocí UV lampy, kdy byla využita fotolabilita vitamínu K. Sérum od zdravých dobrovolníků bylo osvětleno po dobu 3 hodin k zajištění kompletního rozkladu analytu. Studie zdůraznila hlavní problémy spojené s analýzou vitamínu K, objasnila klíčové překážky a navrhla způsoby jejich odstranění.

Pro každou extrakční metodu bylo použito několik protokolů s cílem optimalizovat jednotlivé kroky extrakce. Postupy zahrnovaly proteinprecipitaci, extrakci a odpaření, po nichž následovala rekonstituce v methanolu a filtrace před analýzou. Všechny protokoly jsou přehledně znázorněny na Obrázku 14.

	Precipitace	Extrakce
Konvenční	LLE Methanol (2 ml)	LLE s 5 ml hexanu s následným třepáním (45 min).
	SPE Methanol (175 µl)	SPE (Oasis® HLB cartridges (1cc/30 mg sorbent; Waters)). Protokoly se liší v krocích aktivace a equilibrace SPE kolonky. Eluce 2 ml MeOH:IPA:hexan (2:1:1)
Moderní	Mini-LLE Methanol (800 µl) Ethanol (800 µl) Acetonitril (500 µl) ZnSO ₄ (4%) + methanol (50 a 400 µl)	Jednoduchá či dvojitá LLE s 800 µl hexanu s následným třepáním (2 min)
	SLE 1:3 isopropanol:hexan (400 µl)	Eluce s 1,1 ml hexanu
	PHREE 1:3 isopropanol:hexan (400 µl)	Eluce s 700 µl hexanu
	špičky methanol (450 µl) ethanol (125 µl) acetonitril (225 µl) 4°C EtOH/MeOH (50:50) (750 µL)	C18 (30 a 10 mg), RP (30 mg), HLB (10 mg), WAX-S tips (5 mg+20 mg salt)

Obrázek 14 Shrnutí použitých extrakčních postupů pro úpravu vzorků séra před analýzou vitamínu K.

Studie hodnotila extrakci vitamínu K s ohledem na již zmíněné analytické aspekty, jako je výtěžnost, vliv matrice a meze detekce. Práce se dále zabývala neanalytickými vlastnostmi každého postupu, jako je čas potřebný pro jeho provedení, náklady a manuální náročnost viz Obrázek 15.

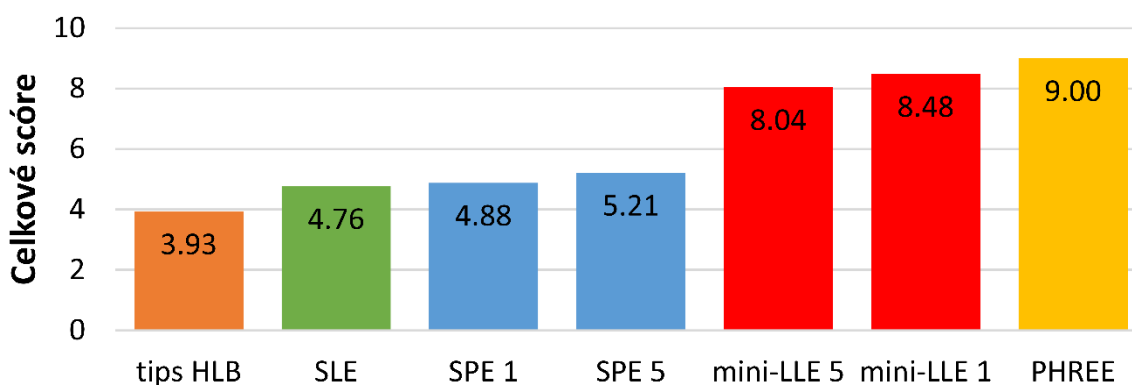


Obrázek 15 Výsledky neanalytického a analytického hodnocení extrakčních postupů.

Z Obrázku 15 je patrné, že mini-LLE a Phree™ destička dosahovaly lepších výsledků v rámci analytických parametrů než ostatní metody. Techniky jako mini-LLE a SLE byly nejméně časově náročné, zatímco LLE a její miniaturizovaný formát byly nákladově nejefektivnější. Phree™ destička navíc nabízí výhody z hlediska možnosti automatizace. SLE lze označit za jednu z nejjednodušších technik z hlediska manuální náročnosti,

zatímco manipulace s DPX špičkami je dle výsledků považována za obtížnou. Studie poskytla podrobné informace o silných stránkách a omezeních jednotlivých metod extrakce vitamínu K ze séra.

Z analytických i neanalytických parametrů byla následně pro každý postup vytvořena skóre, která komplexně porovnávala techniky, jak je patrné z Obrázku 16.

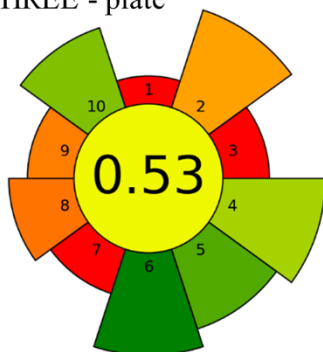


Obrázek 16 Celkové skóre vybraných extrakčních postupů (0 = nejhorší, 10 = nejlepší).

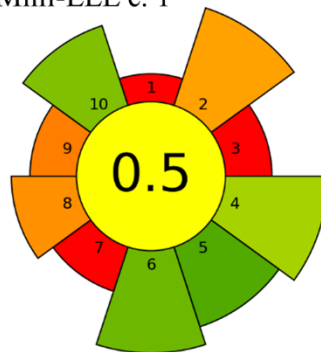
Při kombinaci analytických i neanalytických parametrů vynikly jako nejúspěšnější metody Phree™ destička a mini-LLE s jednoduchou extrakcí hexanem, přičemž Phree™ destička by byla lepší volbou pro svou cenovou dostupnost, krátkou dobu analýzy a nízké meze detekce.

Kromě toho byla hodnocena ekologičnost úpravy vzorků pomocí kritérií založených na zásadách šetrnosti k životnímu prostředí díky volně přístupnému programu AGREEprep [52], dle skóre od 0 do 1 pro dopad každého postupu na životní prostředí, kdy vyšší hodnota představuje více šetrnou metodu (Obrázek 17).

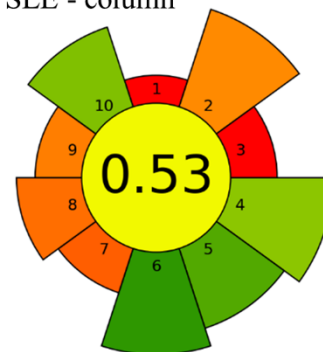
PHREE - plate



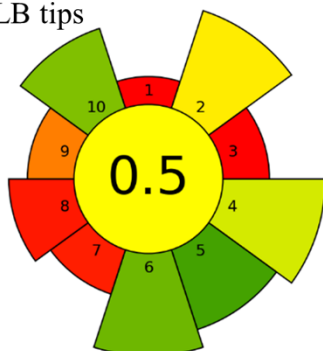
Mini-LLE č. 1



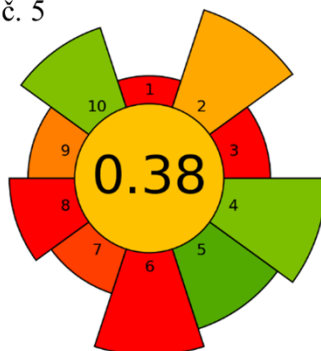
SLE - column



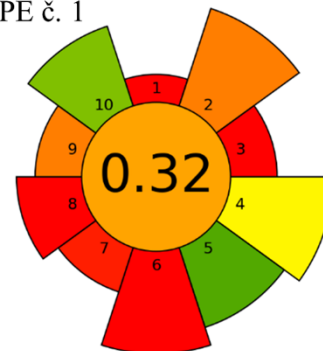
HLB tips



SPE č. 5



SPE č. 1



Obrázek 17 Ekologická náročnost vybraných extrakčních postupů. 1 - upřednostňovat úpravu vzorků in situ, 2 - používat bezpečnější rozpouštědla a činidla, 3 - zaměřit se na udržitelné, opakovaně použitelné a obnovitelné materiály, 4 - minimalizovat množství odpadu, 5 - minimalizovat množství vzorku potřebného k analýze, množství chemikálií a materiálů, 6 - maximalizovat množství zanalyzovaných vzorků, 7 - integrovat jednotlivé kroky a podporovat automatizaci, 8 - minimalizovat spotřebu energie, 9 - zvolit co nejekologičtější uspořádání pro analýzu po úpravě vzorku a 10 - zajistit bezpečné postupy pro pracovníka [52].

Z tohoto testu jako nejšetrnější k životnímu prostředí vyšly Phree™ destičky a protokoly SLE, následované mini-LLE a HLB DPX špičkami.

4.1.3.3. Shrnutí

Práce byla zaměřena na porovnání metod extrakce vitamínu K. Za nejúčinnější techniky označila Phree™ destičku a mini-LLE, které nabízejí nízké meze detekce a zkrácenou dobu zpracování. Tato zjištění jsou cenná pro rozvoj analýzy vitamínu K ve výzkumu a klinických aplikacích.

4.1.4. Pokroky v analýze kynureninu

Příloha č. 4: Advances in kynurenine analysis

Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová, František Švec

Clinica Chimica Acta, 2023, Vol, 547

$IF_{(2024)}$: 5,0 (Q1) $AIS_{(2024)}$: 0,826 (Q2)

4.1.4.1. Úvod do problematiky

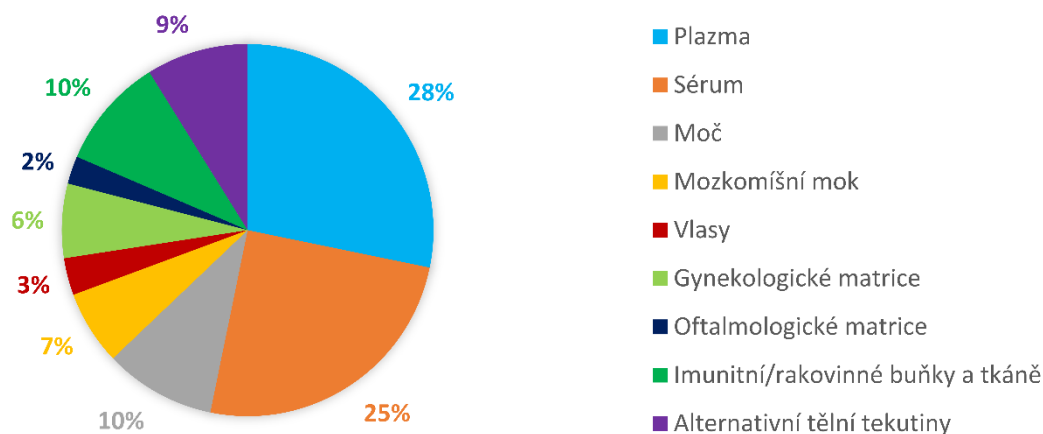
Kynurenin, první produkt degradace tryptofanu kynureninovou cestou, se v posledních letech stal jedním z nejčastěji zmiňovaných biomarkerů. Dysregulace kynureninové dráhy, indikovaná mimo jiné poměrem kynureninu a tryptofanu (KYN/TRP), je zkoumána u neurodegenerativních onemocnění, zánětu, rakoviny a onemocnění COVID-19. Lidské sérum a plazma jsou hlavními matricemi používanými k hodnocení hladin KYN a kapalinová chromatografie je dominantní instrumentální technikou pro jeho stanovení. Koncentrace tohoto markeru v krvi však ne vždy odpovídají hladinám v jiných matricích získaných od stejného pacienta. Je proto důležité rozhodnout, kdy je vhodné analyzovat KYN v alternativních matricích a zda je kapalinová chromatografie pro tuto analýzu tou nejlepší volbou. Za tímto účelem byl sepsán přehledový článek, který představuje další alternativy ke stanovení KYN a shrnuje detaily, které je třeba před samotnou analýzou zvážit.

4.1.4.2. Hlavní část práce

V první části se přehledový článek zabývá možnými analytickými přístupy. Dominantní technikou je kapalinová chromatografie v kombinaci s UV-Vis detekcí nebo hmotnostní spektrometrií. V posledních letech převládá hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem, která sice umožňuje současnou analýzu více analytů, ale vyžaduje pečlivé zvážení vlivu matrice. Fluorescenční a elektrochemická detekce jsou alternativní metody, přičemž fluorescence dosahuje citlivosti vhodné pro fyziologické koncentrace, ale vyžaduje derivatizaci. Elektromigrační metody, konkrétně kapilární elektroforéza, nabízejí výhody, jako je nízká spotřeba rozpouštědel a srovnatelné LOD s chromatografickými metodami. Imunoanalýzy jsou vhodné pro sérum, plazmu, moč a buněčné supernatanty. Bohužel jsou citlivé na interference matrice a mají často dlouhé

doby inkubace (vznik komplexu antigen-protilátka). Sensory, které jsou trendem poslední doby, nabízejí výhody, jako je nízká cena, snadný transport a vysoká citlivost. Byly vyvinuty senzory založené na různých principech, které poskytují slibné alternativy pro detekci KYN v reálném čase. Na druhou stranu je třeba vzít v úvahu několik problémů, jako je jejich selektivita, nedostatečná komerční dostupnost, potřeba větších objemů vzorků a omezená schopnost analyzovat více látek současně.

Druhá část je zaměřena na postupy výběru metody pro analýzu KYN, dle typu matrice. Zmiňuje všechny doposud použité matrice pro analýzu KYN a důvody proč by měla být právě daná matrice vybrána. Přehled matric, ve kterých je KYN analyzován, je zobrazen na Obrázku 18. Sérum a plazma jsou běžně vybírány vzhledem k jejich dostupnosti a významu u různých onemocnění, jako jsou virové infekce, neurologické poruchy a rakovina. Moč je upřednostňována pro svůj neinvazivní odběr a snadnou analýzu. Méně běžné matrice, jako jsou sliny, mateřské mléko, exsudáty z ran, kondenzát vydechaného vzduchu, vlasy a mnohé další nabízejí specifické poznatky o nemocech a biologických procesech v místě poruchy. Dále je v této části řešen výběr správné náhradní matrice, který je zejména pro kalibraci zásadní, a stabilita KYN v různých biologických matricích.



Obrázek 18 Zastoupení lidských matric použitých pro analýzu KYN. Alternativní tělní tekutiny zahrnují mateřské mléko, sliny, gingivální krevikulární tekutinu, synoviální tekutinu, exsudáty z ran, kondenzát vydechaného vzduchu, žaludeční šťávu a peritoneální tekutinu.

Nezbytnou součástí tohoto přehledového článku je sekce zaměřena na specifika extrakce dle typu matrice a problematiku analýzy KYN s ohledem na použitý typ detekce. Proces úpravy vzorku významně ovlivňuje analýzu KYN, a proto je velmi důležité zvolit vhodnou techniku. Různé matrice vyžadují specifické zpracování. Shrnutí hlavních postupů úpravy vzorku je v Tabulce 9.

Tabulka 9 Extrakční techniky používané pro nejběžnější matrice před analýzou KYN.

Matrice	Nejčastěji využívaná technika	Možné alternativy
LC-UV		
Sérum, plazma, buněčný supernatant	precipitace kyselinou chloristou	SPE: SPE kolonky Oasis® MCX, (Waters®, Massachusetts, USA)
Moč	precipitace	ředění
Mozkomíšní mok	precipitace kyselinou trichloroctovou	
Tkáň	homogenizace + precipitace kyselinou chloristou	
Mléko	precipitace kyselinou chloristou	+ ultracentrifugace
Sliny	filtrace	precipitace kyselinou chloristou
LC-MS		
Sérum, plazma, buněčný supernatant	precipitace methanolem + inkubace při -20 °C po dobu alespoň 30 min	SPE: SPE k Oasis® MCX, SPE kolonky Oasis® HLB, SPE kolonky Oasis® MAX, (Waters®, Massachusetts, USA)
Moč	ředění v mobilní fázi	precipitace acetonitrilem + inkubace při -20 °C po dobu alespoň 20 min
Mozkomíšní mok	precipitace methanolem/acetonitrilem + inkubace při -20 °C po dobu alespoň 30 min	ředění
Mléko	LLE + precipitace methanolem + inkubace při -4 °C po dobu 30 min	

Porovnání hlavních technik používaných k analýze KYN je zobrazeno v Tabulce 10. HPLC-MS a imunoanalytické metody vyžadují pro analýzu pouze malé objemy vzorků, což je výhodné pro matrice s omezenými objemy i pro pacienty. Senzory mají tu výhodu, že pracují velmi rychle bez nutnosti úpravy vzorku, ale nejsou prozatím komerčně dostupné. Techniky založené na reakci antigen-protilátka rovněž pracují bez nutnosti úpravy vzorku, ale jsou časově náročné. Separační metody vynikají svou univerzálností a selektivitou, vyžadují ovšem úpravou vzorku, jejíž náročnost závisí na typu matrice.

Tabulka 10 Srovnání různých přístupů ke stanovení hladin KYN v plazmě/séru.

	LC-UV	LC-FLD	LC-MS	CE	imunoanalýza	senzory
Čas	pomalé	pomalé	rychlé	pomalé	velmi pomalé	velmi rychlé
LODs (median $\mu\text{mol/l}$)	nízké (0,07)	nízké (0,04)	velmi nízké (0,0042)	dostatečné (0,15)	dostatečné (0,22)	nízké (0,05)
Úprava vzorku	vícerozkroková	vícerozkroková	vícerozkroková	vícerozkroková	žádná	žádná
Cena	vysoká	vysoká	velmi vysoká	vysoká	střední	nízká
Selektivita	vysoká	vysoká	vysoká	vysoká	špatná	špatná
Potřebné množství vzorku	střední	střední	nízké	střední	nízké	vysoké
Množství odpadu	vysoké	vysoké	střední	velmi malé	střední	malé

Na závěr článek zmiňuje narůstající význam stanovení KYN v matricích získaných z různých částí lidského těla, protože rutinní stanovení hladin KYN pouze v séru a plazmě často neodráží některé aspekty pro detailní pochopení daného onemocnění. Výběr metody pro analýzu KYN musí zohlednit specifičnost účelu, pro který se hladiny KYN analyzují, a výběr příslušné matrice. Dalším krokem je posouzení fyziologických koncentrací v matrici a výběr vhodné techniky. Jako nejlepší metoda pro stanovení KYN se jeví HPLC-MS. Umožňuje simultánní analýzu celé řady sloučenin, je však cenově náročnější. Na rozdíl od HPLC-MS je HPLC s UV detekcí cenově dostupnější alternativou a je zcela vhodná pro rutinní analýzy séra a plazmy, kde jsou očekávané hladiny KYN vyšší.

4.1.4.3. Závěr

Tento přehledový článek shrnuje výsledky dosažené v oblasti stanovení KYN s důrazem na rozdíly ve stanovení s ohledem na dostupnou biologickou matrici. Očekáváme, že tento přehled bude užitečný pro orientaci ve složité oblasti analýzy KYN a pomůže upřesnit, které detaily je třeba vzít v úvahu před zavedením nové metody.

4.1.5. Obsah α -tokoferolu a retinolu v pasterizovaném a vysokotlakově zpracovaném lidském mléce během 6 měsíců skladování

Příloha č. 5: α -tocopherol and retinol content in Holder pasteurized versus high-pressure processed human milk during 6 months of storage

Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová, Chaweewan Suwanvecho, Miroslava Jandová, Eliška Kovaříková, Jan Strohalm, Radomír Hyšpler, Dagmar Solichová, František Švec

Journal of Food Composition and Analysis, 2024, Vol.133

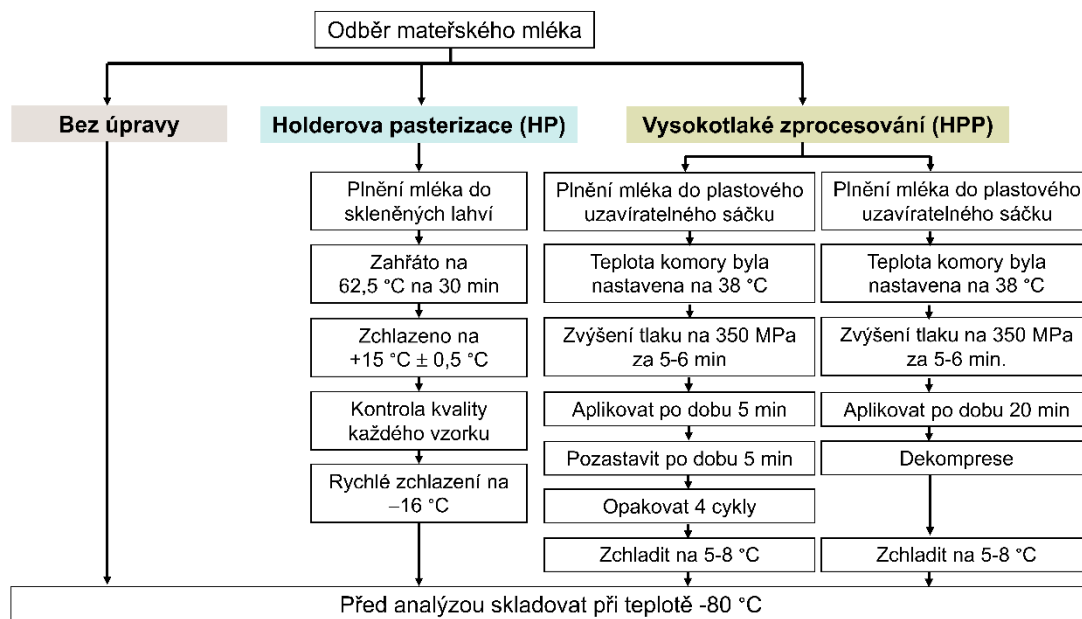
IF₍₂₀₂₄₎: 4,3 (Q2) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,563 (Q1)

4.1.5.1. Úvod a cíl práce

V této studii byl zkoumán vliv různých metod zpracování na obsah základních vitamínů rozpustných v tucích, retinolu (vitamínu A) a α -tokoferolu (vitamínu E), v mateřském mléce. Studie porovnávala tradiční Holderovu pasterizaci (HP) s vysokotlakým zpracováním (HPP), což je nová metoda, která ke konzervaci mléka používá místo vysoké teploty vysoký tlak.

4.1.5.2. Výsledky a diskuze

Vzorky mléka od 12 zdravých dárcyň byly odebrány a rozděleny do čtyř skupin, vzorky bez úpravy, vzorky ošetřené Holderovou pasterizací a vzorky zpracované pomocí dvou protokolů vysokotlakým zpracováním. Podrobný přehled je zobrazen na Obrázku 19.



Obrázek 19 Grafické znázornění způsobů zpracování vzorků. (n=12 pro každý postup, 48 vzorků dohromady).

Extrakce vitamínu A a E

Úprava vzorků byla provedena podle dříve publikované metodiky. Stručně popsáno, do skleněné zkumavky bylo přeneseno 500 μ l mléka a byly přidány 2 ml ethanolu pro vysrážení bílkovin. Krok zmýdelnění byl proveden pomocí 1 ml kyseliny askorbové (0,1 mol/l) a 1 ml hydroxidu draselného (10 mol/l). Poté byl přidán 1 ml redestilované vody a 2 ml hexanu pro extrakci z kapaliny do kapaliny. Vzorky byly 10 min protřepány a poté 10 min odstředovány při $1900 \times g$, 4 °C. Z horní vrstvy hexanu bylo 1,5 ml převedeno do další zkumavky a odpařeno při 45 °C. Na závěr byly vzorky rekonstituovány ve 375 μ l methanolu.

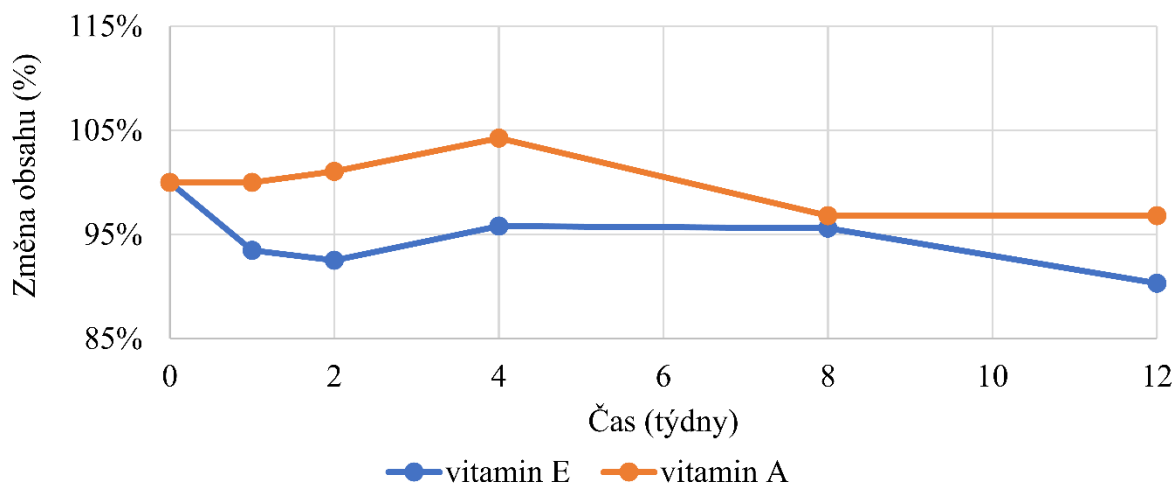
Instrumentace a HPLC analýza

Byla použita metodika již zavedená v laboratoři. Chromatografická analýza byla prováděna na systému Shimadzu Prominence HPLC (Kjóto, Japonsko). Analyty byly separovány na monolitické koloně Chromolith Performance RP-18e (100 \times 4,6 mm) od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Mobilní fázi tvořil 100% methanol při průtoku 2,5 ml/min. Hladiny retinolu a α -tokoferolu byly stanoveny detektorem s diodovým

polem Shimadzu SPD-M20A (Kjóto, Japonsko) při 325 nm a 295 nm. Celková doba analýzy byla 2 min.

Stabilitní studie

Stabilita vitamínu A a E v neošetřeném mléce byla sledována po dobu 12 týdnů skladování vzorků při -80 °C. Jak ukazuje Obrázek 20, bylo zjištěno, že koncentrace obou vitamínů jsou stabilní, hodnoty neklesly vitamínů o více než 10 %.



Obrázek 20 Stabilita α -tokoferolu (vitamínu E) a retinolu (vitamínu A) v lidském mléce skladovaném po dobu 12 týdnů při -80 °C.

Vliv různých způsobů ošetření mléka na hladiny vitamínů A a E

Studie zjistila, že metody HP i HPP vedly ke snížení hladiny retinolu a α -tokoferolu ve srovnání s neošetřeným mlékem. Konkrétně HP způsobila 22% snížení obsahu retinolu a 46% snížení α -tokoferolu. HPP s použitím dvou různých protokolů rovněž vedla k významnému snížení hladin vitamínů. Nicméně metoda HPP s kumulativním tlakem 350 MPa po dobu 20 minut měla nejmenší dopad, neboť koncentrace α -tokoferolu klesla pouze o 26 % namísto více než 40 %. Konkrétní data jsou uvedena v Tabulce 11.

Tabulka 11 Mediány celkového obsahu retinolu a α -tokoferolu ve 12 vzorcích lidského mléka.

	N median ± SD	HP median ± SD	HPP 1 median ± SD	HPP 2 median ± SD
Retinol ($\mu\text{mol/l}$)	0,77 ± 0,36	0,60 ± 0,20*	0,43 ± 0,27*	0,59 ± 0,34*
α -tokoferol ($\mu\text{mol/l}$)	7,52 ± 3,08	4,09 ± 2,28*	4,40 ± 2,18*	5,53 ± 1,99**

N: neošetřeno, HP: Holderova pasterizace, HPP 1: vysokotlaké zpracování za použití tlaku 350 MPa v cyklech, HPP 2: vysokotlaké zpracování za použití kumulativního tlaku.

* Významně odlišná koncentrace od neošetřených vzorků ($p < 0,05$)

** Významně odlišná koncentrace od neošetřených vzorků a od ostatních technik zpracování ($p < 0,05$)

4.1.5.3. Shrnutí

Mléko je vždy před použitím a skladováním ošetřeno z důvodu eliminace případných mikrobů, z tohoto hlediska dosahují obě metodiky srovnatelných výsledků. Ovšem zjištění vyplývající z této studie naznačuje, že HPP může zachovat vyšší hladiny základních živin v lidském mléce ve srovnání s tradičními metodami pasterizace.

4.2. Komentáře k pracím z oblasti farmaceutické analýzy

4.2.1. Analýza terbinafinu v lékových systémech na bázi PLGA pomocí rychlé a citlivé metody UHPLC-DAD

Příloha č. 6: Analysis of terbinafine in PLGA-based drug delivery systems by a fast and sensitive UHPLC-DAD method

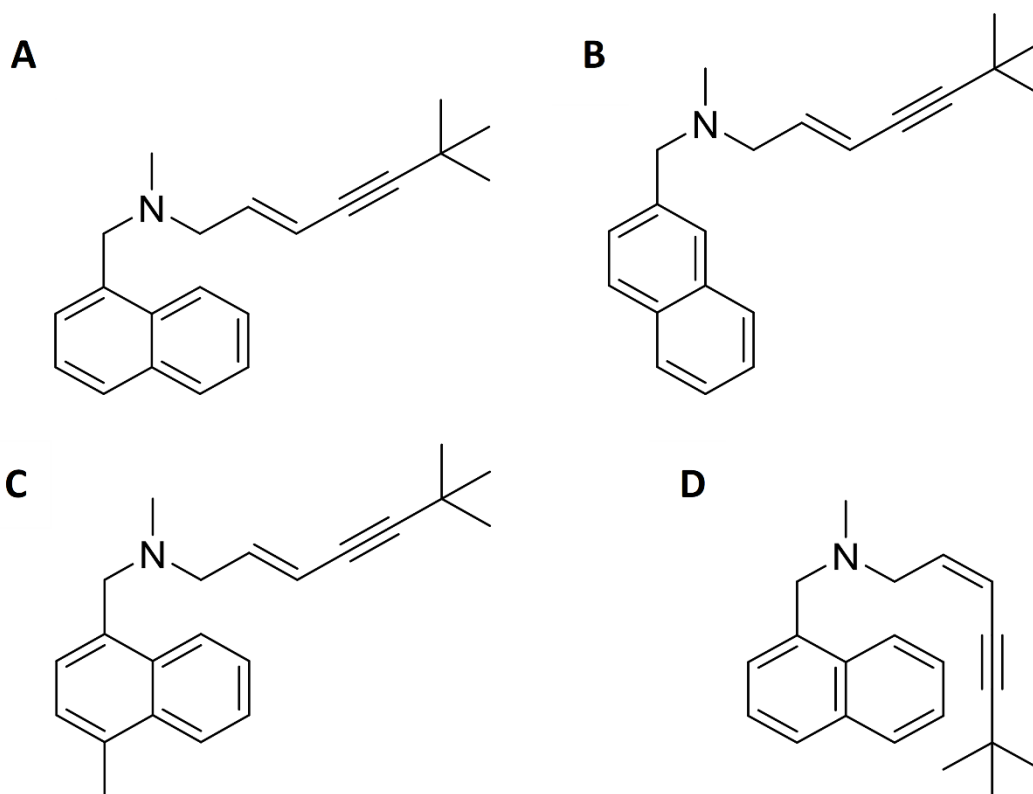
Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Petr Matouš, Ludmila Matysová, František Švec, Eva Šnejdrová, Lenka Kujovská Krčmová

Analytical Methods, 2023, Vol. 15, 2823-2832

IF₍₂₀₂₄₎: 3,1 (Q2) *AIS*₍₂₀₂₄₎: 0,450 (Q2/Q3)

4.2.1.1. Úvod a cíl práce

Práce je zaměřena na vývoj nové lékové formy pro topické pozvolné uvolňování antimykotika terbinafinu. Tato snaha vyplývá z nutnosti prodloužení účinnosti léčiva v místě aplikace. Jednou z možností ovlivnění uvolňování je využití systémů pro podávání léčiv na bázi kyseliny poly(mléčné a glykolové) (PLGA). Pro výzkum zaměřený na výběr vhodné varianty PLGA nosiče, bylo zapotřebí vyvinout analytickou metodu, která umožní detekovat terbinafin i s jeho rozkladnými produkty (β -terbinafin, (Z)-terbinafin a 4-methylterbinafin), které mohou potenciálně vznikat během tvorby lékové formy. Struktury terbinafinu a jeho rozkladných produktů jsou zobrazeny na Obrázku 21.



Obrázek 21 Chemická struktura terbinafinu (A), β -terbinafinu (B), 4-methylterbinafinu (C) a (Z)-terbinafinu (D).

Cílem této práce bylo vyvinout a plně validovat metodu využívající UHPLC ve spojení s DAD detekcí pro rychlou a citlivou analýzu terbinafinu a jeho degradačních produktů v léčivých přípravcích. Metoda by měla být vhodná pro praktické aplikace včetně hodnocení kvality farmaceutických výrobků.

4.2.1.2. Výsledky a diskuze

V tomto článku je představena UHPLC-DAD metoda pro stanovení terbinafinu a jeho tří hlavních nečistot: β -terbinafinu, (Z) terbinafinu a 4-methylterbinafinu, s jejím následným použitím pro hodnocení nových lékových forem na bázi pevných disperzí. Bifenylová kolona poskytla nejlepší separaci a umožnila analýzu všech analytů v méně než 5 minutách. Analýzou pomocí této metody byly následně porovnány dva polymery na bázi PLGA z hlediska jejich schopnosti ovlivnit rychlost a průběh uvolňování léčiva. Tato studie ukazuje, že pevné disperze mají praktický potenciál jako nový systém podávání léčiv, protože mohou prodloužit účinek léčiva, aniž by narušily stabilitu terbinafinu.

Syntéza derivátů PLGA a včlenění terbinafinu

Jako nosiče terbinafinu byly použity nekomerční deriváty PLGA rozvětvené buď na tripentaerythritol (T), nebo na poly(akrylovou kyselinu) (A). Pro jejich syntézu byla použita dříve popsaná metoda přímé polykondenzace taveniny. Stručně řečeno, monomery kyselina glykolová a kyselina DL-mléčná v poměru 1:1 byly smíchány společně s větvicím činidlem a postupně zahřívány na 160 °C za řízeného zvyšování vakua. U výsledných syntetizovaných polyesterů byly charakterizovány molární hmotnostní distribuce a větvení.

Rozvětvené deriváty PLGA byly roztaveny při teplotě do 90 °C, poté byl přidán terbinafin hydrochlorid v množství, které umožňovalo dosáhnout 10% obsahu v polymeru, a následovala důkladná homogenizace.

Disoluční studie terbinafinu

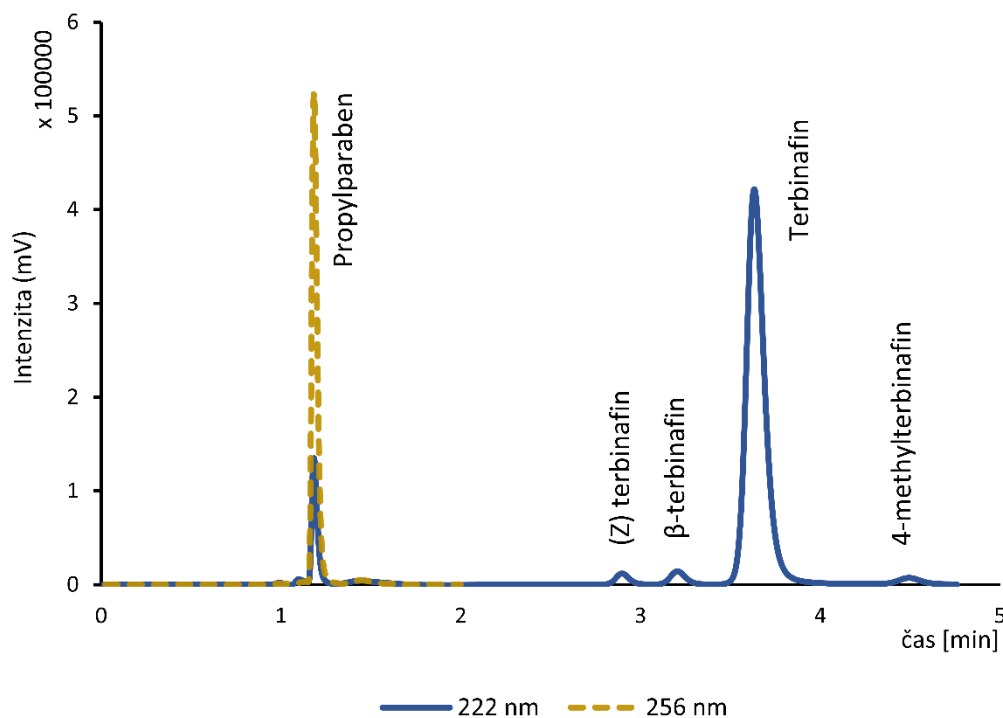
K zjištění profilu uvolňování terbinafinu z odlišných nosičů byly provedeny disoluční testy. Přesně odvážené množství derivátu PLGA s inkorporovaným terbinafinem bylo rozetřeno na ploché dno lahvíček tak, aby se vytvořil 200 µm tenký film o konstantní ploše, a bylo přidáno 15,0 ml fosfátového pufru o pH 5,5. Disoluční test probíhal za použití třepací vodní lázně, nastavené na teplotu 32 °C. V předem stanovených časových intervalech bylo médium odebráno, nahrazeno čerstvým a analyzováno pomocí vyvinuté metody. Disoluční testy byly prováděny po dobu 24 dní vždy ve třech opakováních.

Úprava vzorků před analýzou a podmínky UHPLC-UV analýzy

Úprava vzorků spočívala ve spikování vzorků vnitřním standardem (propylparabenem) a filtrací roztoku bez nutnosti složitých extrakčních postupů.

Chromatografické separace byly provedeny na bifenylové koloně. Byly testovány různé kombinace složek mobilní fáze a optimální separaci zajistila směs obsahující 0,01 mol/l citrátového a 0,02 mol/l fosfátového pufru v poměru 1:1, pH 5, (eluent A) a methanol (eluent B). Gradient průtoku v metodě byl upraven tak, aby se zlepšila separace a intenzita píků. Optimalizovaná metoda dosáhla celkové doby analýzy kratší než 5,0 minut, přičemž retenční časy propylparabenu, (Z) terbinafinu, β-terbinafinu, terbinafinu a 4-methylterbinafinu byly 1,17, 2,91, 3,24, 3,75 a 4,65 minut. Metoda má ve srovnání s dříve publikovanými pracemi několik výhod, kromě výrazně kratší doby

analýzy také nižší spotřebu rozpouštědel, vyšší citlivost a úplnou separaci terbinafinu a jeho hlavních nečistot. Separace látek je zobrazena na Obrázku 22.



Obrázek 22 Chromatogram směsi standardního roztoku terbinafinu, β -terbinafinu, (Z)-terbinafinu, 4-methylterbinafinu a vnitřního standardu. Separace bylo dosaženo pomocí bifenylové kolony ($50 \times 2,1$ mm, $1,7 \mu\text{m}$) a mobilní fáze se skládala z 25 : 75 (v/v) 0,01 mol/l citrátového a 0,02 mol/l fosfátového pufru v poměru 1:1 a methanolu. Gradientová eluce.

Validace metody

Metoda byla validována podle pokynů ICH, včetně testů vhodnosti systému, selektivity, linearity, přesnosti, preciznosti, robustnosti a stability.

Test vhodnosti systému potvrdil opakovatelnost s hodnotami RSD $\leq 0,80$ % pro plochy píků a $\leq 0,15$ % pro retenční časy. Bylo zjištěno, že meze detekce terbinafinu a jeho degradačních produktů jsou dostatečně nízké a pohybují se od 0,16 do 1,37 ng/ml. U všech analytů bylo dosaženo linearity s korelačním koeficientem nad 0,995 v koncentračním rozmezí zobrazeném v Tabulce 12. Přesnost a preciznost byly v definovaných limitech, přičemž výtěžnost terbinafinu se pohybovala mezi 96,28 % a 98,75 % a hodnoty RSD byly nižší než 1 %. Testy krátkodobé stability ukázaly, že degradační produkty podléhají rychlému rozkladu v zásobních roztocích standardů již během 24 hodin, což bylo zohledněno vždy čerstvě připravenými roztoky před analýzou.

Tabulka 12 Test vhodnosti systému a validační parametry (LOD, LOQ, linearita, přesnost a správnost) pro terbinafin (ter), (Z)-terbinafin, β-terbinafin a 4-methylterbinafin.

	Ter	(Z)-ter	β-ter	4-methylter
Test vhodnosti systému				
Opakovatelnost – Tr (% R.S.D)	0,15	0,14	0,13	0,13
Opakovatelnost – A (% R.S.D)	0,19	0,49	0,67	0,80
Kapacita separace	14,16	18,24	15,95	11,09
Faktor symetrie	1,29	1,13	1,15	1,11
Rozlišení	2,20	2,53	2,02	3,95
Validační parametry				
Mez detekce (ng/ml)	0,59	1,37	0,16	0,29
Mez kvantifikace (ng/ml)	1,97	4,55	0,54	0,98
Linearita (korelační koeficient r²)	0,995	0,999	0,997	0,995
Linearita (rovnice)	$y = 0,053x - 0,1663$	$y = 0,0358x - 2 \times 10^{-5}$	$y = 0,0442x - 0,0008$	$y = 0,033x - 0,0009$
Přesnost – plocha (% R.S.D)	0,75	0,51	1,12	1,82
Přesnost – plocha (% R.S.D)				
Nízký QC	0,29	0,83	0,84	4,91
Střední QC	0,18	0,32	2,76	5,00
Vysoký QC	1,00	0,88	1,23	1,95
Přesnost (% výtěžnost)				
Nízký QC	97,49	96,17	118,35	115,22
Střední QC	96,28	101,99	92,03	95,79
Vysoký QC	98,75	95,48	98,89	98,86

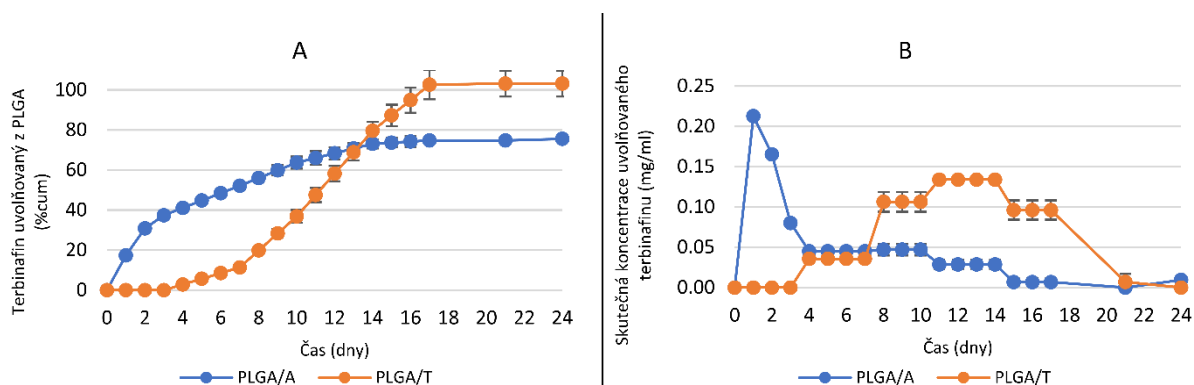
QC – kontrolní vzorek

Porovnání polymerů použitých jako nosiče léčiva

Nově vyvinutá metoda byla použita k analýze terbinafinu a jeho degradačních produktů v rozvětvených PLGA nosičích (PLGA/T a PLGA/A), které jsou součástí inovativních formulačních strategií v lokální antimykotické terapii. Tyto systémy jsou hydrolyticky degradovatelné a bioadhezivní, což zajišťuje delší kontakt v místě aplikace ve srovnání s běžnými roztoky, krémy a gely.

Studie zjistila, že profil uvolňování terbinafinu je ovlivněn vlastnostmi použitého polymeru. PLGA/T uvolnil téměř všechny terbinafin za přibližně 17 dní, zatímco PLGA/A uvolnil za stejnou dobu pouze 75 %, přičemž zbytek zůstal inkorporován v polyesteru i po 24 dnech. PLGA/A vykazoval časný nástup uvolňování první den, po kterém následovalo pomalé uvolňování, což z něj činí vhodnější volbu pro dlouhodobou léčbu

mykotických onemocnění. Oba deriváty PLGA vykázaly kapacitu pro včlenění léčiva vyšší než 90 %, přičemž u PLGA/A to bylo 91,80 % a u PLGA/T 94,00 %. Pro lepší představu jsou profily uvolňování znázorněné na Obrázku 23.



Obrázek 23 Graf A ukazuje uvolňování terbinafinu z polymerů. PLGA/T byl schopen uvolnit veškeré inkorporované léčivo, zatímco PLGA/A pouze 75 %. Graf B ukazuje aktuální průběh uvolňování terbinafinu v čase (mg/ml).

Studie navíc potvrdila, že terbinafin zůstal v obou polymerech stabilní i po vystavení vysokým teplotám během přípravy lékové formy a během 24denního procesu uvolňování. Nepřítomnost degradačních produktů v chromatogramech naznačovala stabilitu terbinafinu během doby uvolňování, což by zajistilo účinnost léčby a minimalizovalo možné nežádoucí účinky.

4.2.1.3. Shrnutí

Cílem studie bylo analyzovat terbinafin a jeho nečistoty v polyesterových nosičích z hlediska stability a schopnosti pozvolna uvolňovat léčivo. Stávající chromatografické metody byly nevyhovující vzhledem k jejich zdlouhavé analýze a nedostatečnému zkoumání degradačních produktů. Tato práce vyvinula novou metodu využívající bifenylovou kolonu, která nabízí rychlou analýzu do 5,0 minut a nízké detekční limity (0,59 ng/ml). Použitelnost metody byla prokázána v preformulační studii, která je nezbytná pro vývoj lékové formy. Výzkum potvrdil praktický potenciál polymerních nosičů na bázi PLGA pro topické podávání terbinafinu, přičemž PLGA/A vykazoval pomalé uvolňování po dobu 17 dnů, což jej činí vhodným pro topické aplikace.

4.2.2. Srovnání „liquisolid“ techniky a techniky společného mletí pro inkorporaci špatně rozpustného léčiva do anorganických porézních pomocných látek

Příloha č. 7: Comparison of the liquisolid technique and co-milling for loading of a poorly soluble drug in inorganic porous excipients

*Chiazor Ugo Ogadah, **Kristýna Mrštná**, Ludmila Matysová, Anette Müllertz, Thomas Rades, Andreas Niederquell, Zdenka Šklubalová, Barbora Vraníková*

International Journal of Pharmaceutics, 2024, Vol. 650

IF₍₂₀₂₄₎: 5,8 (Q1) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,715 (Q2)

4.2.2.1. Úvod a cíl práce

V této studii byly porovnávány liquisolid systémy a metody společného mletí pro zabudovávání cyklosporinu A (CyA) do mezoporézních nosičů (Neusilin® US2 (NEU) a funkcionalizovaný uhlíčitán vápenatý (FCC)) za účelem zvýšení uvolňování a rozpouštění léčiva. Nosiče byly analyzovány a ke sledování morfologických změn byla použita rentgenová prášková difrakce a skenovací elektronová mikroskopie. Cílem studie bylo pochopit, jak vlastnosti nosičů ovlivňují inkorporaci a uvolňování léčiva.

4.2.2.2. Výsledky a diskuze

Klíčová zjištění studie

V rámci studie bylo zjištěno, že NEU má větší specifický povrch a objem pórů ve srovnání s FCC. V rámci morfologie byly pozorovány změny velikosti a tvaru částic po mletí. Částice NEU se zmenšily, zatímco částice FCC vykazovaly aglomeraci. Rentgenové práškové difraktogramy potvrdily, že CyA zůstal po inkorporaci do nosičů v amorfním stavu. Stabilitní studie po dobu 20 týdnů neodhalily žádné významné změny vlastností CyA. Všechny přípravky zůstaly v amorfní formě, což svědčí o jejich stabilitě za podmínek skladování, ačkoli u některých společně mletých přípravků byly pozorovány mírné změny, které naznačují možný vliv na disoluční vlastnosti.

Studie uvolňování léčiva in vitro

Uvolňování CyA z mesoporézních nosičů bylo porovnáno s rozpouštěním rozemletého CyA. Pokusy s rozpouštěním byly prováděny na automatickém rozpouštěcím přístroji USP2 (Sotax AT 7 Smart, Sotax AG, Basilej, Švýcarsko) při rychlosti otáčení lopatek 100 ot/min. Vzorky (5 ml) byly odebírány pomocí automatického vzorkovacího systému (s následnou výměnou média) v předem stanovených časových intervalech (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180 a 240 min). Vzorky byly analyzovány pomocí validované metody UHPLC-UV.

Uvolňování léčiva z liquisolid systémů bylo rychlejší než ze společně mletého CyA. Liquisolid systémy na bázi NEU vykazovaly vyšší celkové uvolňování léčiva než liquisolid systémy na bázi FCC v důsledku většího specifického povrchu NEU. Rychlost rozpouštění se snižovala se zvyšující se náplní léčiva ve společně mletých formulacích.

UHPLC-UV metoda pro stanovení cyklosporinu

Chromatografická analýza byla provedena pomocí systému Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Japonsko). Chromatografické separace bylo dosaženo pomocí kolony Kinetex™ C18 2,1 × 50 mm, 1,7 μm (Phenomenex, USA) při 60 °C. Mobilní fáze byla tvořena ultračistou vodou upravenou na pH 2,4 s 85% kyselinou fosforečnou (A) a směsí acetonitril: methanol v poměru 10:90 (B). Byla využita lineární gradientová eluce s rychlostí průtoku 0,5 ml/min, která začínala na 70 % B, poté se zvýšila na 100 % B během 3,5 min a následně se vrátila na 70 % B ve 3,51 min pro ekvilibraci kolony, která byla dokončena v 6 min. CyA byl detekován při vlnové délce 210 nm pomocí UV-Vis detektoru (SPD-M30A).

4.2.2.3. Shrnutí

Liquisolid systémy vykazovaly výrazně lepší uvolňování léčiva než společně mleté formulace a samotný mletý CyA. Formulace na bázi mezoporézního nosiče Neusilin® US2 předčily formulace na bázi funkcionalizovaného uhličitanu vápenatého díky většímu specifickému povrchu a objemu pórů nosiče Neusilin® US2. Stabilní amorfní stavy se udržely po dobu 20 týdnů, což zdůrazňuje potenciál mezoporézních nosičů pro zlepšení rozpouštění léčiv rozpustných ve vodě, podmíněný pečlivým výběrem metody a nosiče.

4.3. Komentáře k pracím z oblasti životního prostředí

4.3.1. Výskyt léčivých látek vzbuzujících obavy v irských povrchových vodách během a po omezení v rámci COVID 19.

Pozn.: Příloha není přiložena ani anglický název není uveden z důvodu budoucího recenzního řízení.

Dylan O'Flynn, Imogen Hands, Kristyna Mrstna, Adnana Scurtu, Jenny Lawler, Anne ParleMcDermott, Denise Harold, Thomas Mc Cloughlin, Linda Holland, Blánaid White, Fiona Regan

4.3.1.1. Úvod a cíl práce

Farmaceutické přípravky mohou být škodlivé pro ekosystémy povrchových vod a lidské zdraví. Navzdory stále rostoucímu počtu výzkumů, údaje z nich stále neposkytují tvůrcům legislativy informace o tom, jak řešit velké územní oblasti. V období od září 2020 do března 2022 byly odebrány vzorky povrchové vody ze 4 řek v Irsku v šesti časových bodech. Tato období odběru vzorků se shodují s časem, kdy platila nejvyšší ochranná opatření během pandemie COVID 19. Opatření zahrnovala omezení pohybu, sociálních interakcí, uzavření obchodů a podniků. Celkem 15 léčivých látek (metformin, gabapentin, trimetoprim, karbamazepin, azitromycin, erytromycin, klaritromycin, ciprofloxacin, sulfametoxazol, gemfibrozil, diklofenak, venlafaxin a jeho metabolit desmethylvenlafaxin) bylo vybráno vzhledem k jejich výskytu v evropských a světových povrchových vodách a jejich neúčinné eliminaci v běžných čistírnách odpadních vod. Kromě toho byly tyto látky zahrnuty v mnoha publikovaných studiích o prioritách a/nebo jsou na „seznamu sledovaných látek“ rámcové směrnice o vodě nebo jsou kandidátem na aktualizovaný „seznam sledovaných látek“.

4.3.1.2. Extrakce vzorků povrchových vod

Zpracování vzorků zahrnovalo filtraci rozmražených vzorků vody pro odstranění pevných částic a přidání 0,1 mol/l EDTA. K extrakci bylo 100 ml vzorku nanášeno na sorbent SPE kolonek Oasis® HLB (6 cc, 200 mg, Waters®, Massachusetts, USA). Po extrakci byly vzorky odpařeny do sucha pod mírným proudem dusíku a následně rekonstituovány v 1 ml směsi voda/acetónitril (95/5, v/v) (0,1% kyselina mravenčí) pro LC-MS/MS analýzu.

4.3.1.3. Podmínky LC-MS/MS metody

Vybraná léčiva byla kvantifikována metodou LC-MS/MS pomocí přístroje Agilent HPLC s trojitým kvadrupólem (Agilent Technologies, Cheshire, UK). Detektor MS byl vybaven elektrosprejovou ionizací. Chromatografické separace bylo dosaženo pomocí kolony C18 (50 × 2,1 mm, velikost částic 1,8 µm) při 30 °C. LC-MS/MS byla řízena a data byla shromažďována pomocí softwaru MassHunter Data Acquisition. Analýza povrchové vody byla provedena dvěma metodami. Mobilní fáze metody 1 se skládala z 5 mmol/l mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí v H₂O (mobilní fáze A) a 0,1 % kyseliny mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B) při průtoku 0,4 ml/min. Pro separaci byl použit gradient. Byl zvolen objem nástřiku 30 µl. Mobilní fáze metody 2 se skládala z 1 mmol/l fluoridu amonného v H₂O (mobilní fáze A) a acetonitrilu (mobilní fáze B) s průtokem 4 ml/min. Pro separaci byl použit gradient. Byl zvolen injekční objem 100 µl.

4.3.1.4. Shrnutí

Celkem bylo zjištěno 14 z 15 léčivých látek, přičemž sulfamethoxazol vykazoval 100% výskyt. Kromě toho hladiny antidepressivních léčiv vykazovaly od března 2021 do března 2022 po zmírnění omezení COVID-19 nárůst koncentrací, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšenou preskripcí těchto léčiv.

4.3.2. Studie „SOURCE-TO-SEA“ výskytu perfluorovaných a polyfluorovaných látek (PFAS) vzbuzujících obavy v Irsku

Příloha č. 8: A study of the SOURCE-TO-SEA occurrence of poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) of emerging concern in Ireland

Pozn.: Jako příloha je uvedeno pouze plakátové sdělení, neboť publikace je v průběhu recenzního řízení.

*Chloe Richards, Brendan McHugh, Evin McGovern, Ciprian Briciu-Burghina, Belinda Huerta, **Kristyna Mrstna** and Fiona Regan*

4.3.2.1. Úvod a cíl práce

Perfluorované a polyfluorované látky jsou skupinou syntetických organických povrchově aktivních látek, které se staly celosvětovým problémem kvůli své toxicitě a širokému rozšíření ve vodním prostředí a organismech. Kombinované účinky PFAS jsou prozatím relativně neznámé. Biologické hodnocení pitné vody a zejména mořské vody se v současné době provádí pouze minimálně. Tento projekt zkoumá přítomnost některých cílových PFAS ve vodách v Dublinu (sladká a mořská voda) s cílem identifikovat nebo seskupit zdroje těchto chemických kontaminantů.

4.3.2.2. Zpracování a analýza vzorků

Extrakce byla provedena pomocí SPE. Všechny extrakty byly analyzovány pomocí HPLC systému Agilent HPLC s trojitým kvadrupólem (Agilent Technologies, Cheshire, UK), vybaveným elektrosprejovou ionizací v negativním módu. Deset mikrolitrů bylo vstříknuto do kolony Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (3,0 x 50 mm; 1,8 µm). Mobilní fáze byly (A): 2 mmol/l kyselina mravenčí/mravenčan amonný (pH 3,2) a (B): methanol při průtoku 0,4 ml/min. Eluční gradient byl: 0-1,5 min, 90-45 % A; 1,5-7,0 min, 45-10 % A; 7,0-8,5 min, 10-0 % A; 8,5-10 min, 0 % A; 10-11 min návrat k výchozím podmínkám; 11-12 min, ekvilibrace kolony.

4.3.2.3. Shrnutí

Byly zjištěny koncentrace v rozmezí od ng/l do µg/l. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny u sloučeniny PFUDA (kyselina perfluoroundekanová), a to až 1,8 µg/l. PFOA (kyselina perfluoroktanová) byla zjištěna téměř ve všech vzorcích a dosáhla maximální

koncentrace 1,2 µg/l. Téměř ve všech vzorcích byl trvale detekován PFBS (perfluorobutansulfonát), při koncentracích až 0,8 µg/l. Jako potenciální zdroje vypouštějící PFAS byly identifikovány letiště, požární stanice, antropogenní vlivy (např. čistírny odpadních vod, zařízení pro nakládání s odpady) a průmysl, zejména chemický, energetický, papírenský, dřevozpracující apod.

5. ZÁVĚR

Disertační práce je rozdělena do třech tematických celků, které spojuje využití analytické chemie v tomto případě techniky kapalinové chromatografie. První část je věnována analýze látek v biologickém materiálu, kdy teoretická část shrnuje hlavní aspekty, které je třeba před a během analýzy zvážit. Mezi ně patří možnosti ovlivnění fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu, typ a povaha biologické matrice, přístupy ke zpracování vzorku a validace bioanalytických metod. Hlavními cílovými analyty v rámci této části byly vitamíny rozpustné v tucích, vitamín K, A a E a biomarker zánětu kynurenin. Byla vyvinuta nová UHPLC-MS/MS metoda a extrakční postup pro stanovení vitamínu K v lidském a myším séru a lipoproteinových frakcích. Největším úskalím vývoje celé metody bylo nalézt vhodné chromatografické ale především extrakční podmínky vzhledem k jeho vysoké lipofilitě, fotosenzitivitě, afinitě k povrchům a vysoké vazbě na proteiny. Separace analytů byla nakonec provedena na C18 stacionární fázi v kombinaci s mobilní fází složenou z methanolu s přidavkem kyseliny mravenčí, kyseliny octové, octanu amonného a vody. Pro detekci byla zvolena hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem, elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu, aby bylo dosaženo co největší citlivosti. Extrakční metoda byla vyvíjena s důrazem na jednoduchost, rychlost, nízkou spotřebu vzorku a vhodnost pro velké série vzorků. Na základě srovnání moderních a konvenčních přístupů se jako optimální techniky ukázaly Phree™ destičky a miniaturizovaná extrakce z kapaliny do kapaliny, které se vyznačují svou jednoduchostí a účinností. Validace proběhla v souladu s doporučeními EMA, FDA a ICH. Metoda je v současné době zavedena do skupiny rutinně využívaných metod ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Studie nutričního profilu α -tokoferolu a retinolu v mateřském mléce potvrdila možnost pro potenciální nahrazení běžného způsobu zpracování mléka pomocí Holderovy pasterizace vysokotlakým zpracováním. Ošetření mléka je nezbytné kvůli odstranění případných mikrobů. Z tohoto hlediska dosahují obě metody srovnatelných výsledků, ale z nutričního pohledu je dle našich výsledků preferováno vysokotlaké zpracování. Součástí této disertační práce je i komplexní přehledový článek věnující se stanovení kynureninu v biologických matricích, který má za cíl usnadnit budoucí rozhodování před analýzou

tohoto biomarkeru a nabídnout univerzální postupy pro řešení podobných analytických problémů.

Druhá část disertační práce je věnována stanovení exogenních látek. V teoretické části je přiblížena problematika validací a jsou charakterizována léčiva studovaná v rámci této disertační práce. V experimentální části je představena nově vyvinutá UHPLC-DAD metoda pro stanovení terbinafinu a jeho hlavních nečistot, která využívá pro separaci bifenylovou kolonu v kombinaci s mobilní fází složenou z fosfátového pufru, citrátového pufru a methanolu. Tato metoda byla využita v praxi během analýzy jeho hladin v rámci preformulační studie. Výzkum prokázal praktický potenciál polymerních nosičů založených na PLGA pro lokální aplikaci terbinafinu. PLGA/A vykazovalo pozvolné uvolňování po dobu 17 dnů, což z něj činí ideálního kandidáta pro topické aplikace. Další nově zavedená metoda na analýzu cyklosporinu poskytla informace při rozhodování o strategiích pro zvýšení rozpustnosti cyklosporinu. V rámci tohoto výzkumu bylo zjištěno, že jako vhodné se jeví formulace na bázi mezoporézního nosiče Neusilin® US2.

Třetí sekce je věnována problematice kontaminantů vody a odhaluje složitost jejich analýzy z důvodu stopových koncentrací a různorodého složení. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí je v tomto případě nezbytným nástrojem pro odhalení rozsahu kontaminace životního prostředí.

Dva přehledové články a všechny experimentální práce byly publikovány v časopisech s impakt faktorem.

6. LITERATURA

- [1] D.A. Skoog, *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th Ed, Cengage - Brooks/Cole, Belmont, CA, 2012.
- [2] F. Adams, M. Adriaens, *The metamorphosis of analytical chemistry*, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 3525–3537. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02313-z>.
- [3] S. Thomas, ed., *Micro- and Nanotechnology Enabled Applications for Portable Miniaturized Analytical Systems*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2022.
- [4] N. Vervoort, K. Goossens, M. Baeten, Q. Chen, *Recent advances in analytical techniques for high throughput experimentation*, *Anal. Sci. Adv.* 2 (2021) 109–127. <https://doi.org/10.1002/ansa.202000155>.
- [5] D.A. Vargas Medina, E.V.S. Maciel, F.M. Lanças, *Modern automated sample preparation for the determination of organic compounds: A review on robotic and on-flow systems*, *TrAC Trends Anal. Chem.* 166 (2023) 117171. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117171>.
- [6] N.A. Guzman, D.E. Guzman, T. Blanc, *Advancements in portable instruments based on affinity-capture-migration and affinity-capture-separation for use in clinical testing and life science applications*, *J. Chromatogr. A* 1704 (2023) 464109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464109>.
- [7] W.R. De Araujo, T.M.G. Cardoso, R.G. Da Rocha, M.H.P. Santana, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, T.R.L.C. Paixão, W.K.T. Coltro, *Portable analytical platforms for forensic chemistry: A review*, *Anal. Chim. Acta* 1034 (2018) 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.014>.
- [8] D. Wianowska, M. Gil, M. Olszowy, *Miniaturized methods of sample preparation*, in: *Handb. Miniaturization Anal. Chem.*, Elsevier, 2020: pp. 99–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819763-9.00005-2>.
- [9] M.L. Bishop, E.P. Fody, L.E. Schoeff, eds., *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations*, 7th ed, Wolters Kluwer Health/Hippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
- [10] A. Haaland, *Molecules and models: the molecular structures of main group element compounds*, 1. publ. in paperback, Oxford Univ. Press, Oxford, 2012.
- [11] E. Croom, *Metabolism of Xenobiotics of Human Environments*, in: *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, Elsevier, 2012: pp. 31–88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9>.
- [12] L. Nováková, M. Douša, P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, 2. přepracované a rozšířené vydání, Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, Brno, 2021.
- [13] A. Mahmood Nawfal, A. Hasan Najat, K. Abduljabbar Uday, *Salivary Levels of Neurotoxic Versus Neuroprotective Indices Underpin the Aberrant Response to Psychological Stress in Schizophrenic Patients*, *Int. J. Med. Res. Health Sci.* 7 (2018) 15–34.
- [14] A. Vernerová, L. Kujovská Krčmová, O. Heneberk, V. Radochová, F. Švec, *Liquid chromatography method with tandem mass spectrometry and fluorescence detection for determination of inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid as a tool for diagnosis of periodontal disease*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 212 (2022) 114644. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114644>.

- [15] L.H. Allen, D.K. Dror, Introduction to Current Knowledge on Micronutrients in Human Milk: Adequacy, Analysis, and Need for Research, *Adv. Nutr.* 9 (2018) 275S–277S. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy018>.
- [16] L. Kujovska Krcmova, B. Cervinkova, D. Solichova, L. Sobotka, L. Hansmanova, B. Melichar, P. Solich, Fast and sensitive HPLC method for the determination of neopterin, kynurenine and tryptophan in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates, *Bioanalysis* 7 (2015) 2751–2762. <https://doi.org/10.4155/bio.15.175>.
- [17] J. Hunt, Exhaled Breath Condensate: An Overview, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 27 (2007) 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2007.09.001>.
- [18] J. Barbosa, J. Faria, F. Carvalho, M. Pedro, O. Queirós, R. Moreira, R.J. Dinis-Oliveira, Hair as an alternative matrix in bioanalysis, *Bioanalysis* 5 (2013) 895–914. <https://doi.org/10.4155/bio.13.50>.
- [19] S. Aeineband, P. Brenner, S. Ståhl, M. Bhat, M.D. Fidock, M. Khademi, T. Olsson, G. Engberg, J. Jokinen, S. Erhardt, F. Piehl, Cerebrospinal fluid kynurenines in multiple sclerosis; relation to disease course and neurocognitive symptoms, *Brain. Behav. Immun.* 51 (2016) 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.016>.
- [20] M. Broekhuizen, A.H.J. Danser, I.K.M. Reiss, D. Merkus, The Function of the Kynurenine Pathway in the Placenta: A Novel Pharmacotherapeutic Target?, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (2021) 11545. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111545>.
- [21] J.M. Choi, W.S. Park, K.Y. Song, H.J. Lee, B.H. Jung, Development of simultaneous analysis of tryptophan metabolites in serum and gastric juice - an investigation towards establishing a biomarker test for gastric cancer diagnosis: Biomarker investigation for a diagnostic test in gastric cancer, *Biomed. Chromatogr.* 30 (2016) 1963–1974. <https://doi.org/10.1002/bmc.3773>.
- [22] I. Sadok, K. Jędruchiewicz, K. Rawicz-Pruszyński, M. Staniszevska, UHPLC-ESI-MS/MS Quantification of Relevant Substrates and Metabolites of the Kynurenine Pathway Present in Serum and Peritoneal Fluid from Gastric Cancer Patients—Method Development and Validation, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 6972. <https://doi.org/10.3390/ijms22136972>.
- [23] T.T. Lögters, M.D. Laryea, M. Jäger, M. Schädel-Höpfner, J. Windolf, S. Flohé, J. Altrichter, M. Scholz, A.N. Paunel-Görgülü, Kynurenine inhibits chondrocyte proliferation and is increased in synovial fluid of patients with septic arthritis, *J. Orthop. Res.* 28 (2010) 1490–1496. <https://doi.org/10.1002/jor.21158>.
- [24] Waters (TM), Oasis Sample Extraction Products, (2024). <https://www.waters.com/nextgen/ie/en.html>.
- [25] DPX Technologies, Combining Dispersive Pipette XTRaction + SALLE (Salt Assisted Liquid-Liquid Extraction) for a novel cleanup mechanism, (2024). <https://dpxtechnologies.com/dpx-salle/>.
- [26] Biotage®, ISOLUTE® PLD+, (2024). <https://www.biotage.com/isolute-pld>.
- [27] Restek, Resprep PLR, (2024). <https://www.restek.com/global/en/p/28301>.
- [28] Waters (TM), Ostro Protein Precipitation & Phospholipid Removal Plate, (2024). <https://www.waters.com/nextgen/ie/en/shop/sample-preparation--filtration/186005518-ostro-protein-precipitation--phospholipid-removal-plate-25-mg-1-.html>.

- [29] Phenomenex (TM), Phree (TM) Phospholipid Removal Products, (2024). <https://www.phenomenex.com/products/phree-phospholipid-removal-products>.
- [30] Agilent Technologies, Supported Liquid Extraction (SLE), (2024). <https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/supported-liquid-extraction-sle>.
- [31] Biotage®, ISOLUTE® SLE+ Supported Liquid Extraction Products, (2024). <https://www.biotage.com/isolute-sle-supported-liquid-extraction-products#:~:text=ISOLUTE%20AE%20SLE%2B%20Supported%20Liquid%20Extraction%20plates%20and%20columns%20are,develop%2C%20and%20automation%20is%20simple>.
- [32] Agilent Technologies, Supported Liquid Extraction (SLE) - Chem Elut (Diatomaceous Earth), (2024). <https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/supported-liquid-extraction-sle/diatomaceous-earth-chem-elut>.
- [33] Thermo Fisher Scientific, Solid Support Liquid-Liquid Extraction Columns and Plates, (2024). <https://www.thermofisher.com/search/browse/category/us/en/90126129>.
- [34] K. Mrštná, K. Matoušová, L. Kujovská Krčmová, A. Carazo, J. Pourová, P. Mladěnka, L. Matysová, F. Švec, Analysis of vitamin K1 and major K2 variants in rat/human serum and lipoprotein fractions by a rapid, simple, and sensitive UHPLC-MS/MS method, *J. Chromatogr. A* 1714 (2024) 464548. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464548>.
- [35] A. Carazo, K. Macáková, K. Matoušová, L. Kujovská Krčmová, M. Protti, P. Mladěnka, Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity, *Nutrients* 13 (2021) 1703. <https://doi.org/10.3390/nu13051703>.
- [36] S. Kositamongkol, U. Suthutvoravut, N. Chongviriyaphan, B. Feungpean, P. Nuntnarumit, Vitamin A and E status in very low birth weight infants, *J. Perinatol.* 31 (2011) 471–476. <https://doi.org/10.1038/jp.2010.155>.
- [37] H. Mactier, Vitamin A and preterm infants: what we know, what we don't know, and what we need to know, *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 90 (2005) F103–F108. <https://doi.org/10.1136/adc.2004.057547>.
- [38] A. Sommer, Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview, *J. Nutr.* 138 (2008) 1835–1839. <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.1835>.
- [39] U.S. Department of Health & Human Services, Vitamin E - Fact Sheet for Health Professionals, (2024). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/>.
- [40] E. Gomez-Pomar, E. Hatfield, K. Garlitz, P. Westgate, H. Bada, Vitamin E in the Preterm Infant: A Forgotten Cause of Hemolytic Anemia, *Am. J. Perinatol.* 35 (2018) 305–310. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1607283>.
- [41] C.A. Stone Jr., C.T. McEvoy, J.L. Aschner, A. Kirk, C. Rosas-Salazar, J.M. Cook-Mills, P.E. Moore, W.F. Walsh, T.V. Hartert, Update on Vitamin E and Its Potential Role in Preventing or Treating Bronchopulmonary Dysplasia, *Neonatology* 113 (2018) 366–378. <https://doi.org/10.1159/000487388>.
- [42] J. Lopez, Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns (eds): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis* (5th edition): Elsevier, St. Louis, USA, 2012, 2238 pp, 909 illustrations. ISBN: 978-1-4160-6164-9, *Indian J. Clin. Biochem.* 28 (2013) 104–105. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0287-7>.

- [43] K. Mrštná, L. Kujovská Krčmová, F. Švec, Advances in kynurenine analysis, *Clin. Chim. Acta* 547 (2023) 117441. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117441>.
- [44] K. Mrštná, K. Matoušová, P. Matouš, L. Matysová, F. Švec, E. Šnejdrová, L. Kujovská Krčmová, Analysis of terbinafine in PLGA-based drug delivery systems by a fast and sensitive UHPLC-DAD method, *Anal. Methods* 15 (2023) 2823–2832. <https://doi.org/10.1039/D3AY00506B>.
- [45] V. Dulio, B. Van Bavel, E. Brorström-Lundén, J. Harmsen, J. Hollender, M. Schlabach, J. Slobodnik, K. Thomas, J. Koschorreck, Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations, *Environ. Sci. Eur.* 30 (2018) 5. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0135-3>.
- [46] Y. Luo, W. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem, F.I. Hai, J. Zhang, S. Liang, X.C. Wang, A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* 473–474 (2014) 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>.
- [47] M. Salimi, A. Esrafil, M. Gholami, A. Jonidi Jafari, R. Rezaei Kalantary, M. Farzadkia, M. Kermani, H.R. Sobhi, Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP technologies, *Environ. Monit. Assess.* 189 (2017) 414. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6097-x>.
- [48] B. Huerta, B. McHugh, F. Regan, Development and application of an LC-MS method to the determination of poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking, sea and surface water samples, *Anal. Methods* 14 (2022) 2090–2099. <https://doi.org/10.1039/D2AY00300G>.
- [49] European Union, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, (2000). <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2000/60/oj>.
- [50] European Union, Commission Implementing Decision (EU) 2022/1307 of 22 July 2022 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2022) 5098), (2022). https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2022/1307/oj.
- [51] D. Solichova, M. Blaha, J. Aufartova, L. Kujovska Krcmova, J. Plisek, B. Honegrova, E. Kasalova, M. Lanska, L. Urbanek, L. Sobotka, The Effect of LDL-Apheresis and Rheohaemapheresis Treatment on Vitamin E, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 61 (2015) 105–112. <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.105>.
- [52] F. Pena-Pereira, M. Tobiszewski, W. Wojnowski, E. Psillakis, A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation, *Adv. Sample Prep.* 3 (2022) 100025. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100025>.

7. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ

1. Vitamin K – sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity

*Přemysl Mladěnka, Kateřina Macáková, Lenka Kujovská Krčmová, Lenka Javorská, **Kristýna Mrštná**, Alejandro Carazo, Michele Protti, Fernando Remião, Lucie Nováková*

Nutrition Reviews, 2022, Vol. 80(4):677–698

IF₍₂₀₂₄₎: 6,1 (Q1) AIS₍₂₀₂₄₎:1,639 (Q1)

2. Analysis of vitamin K1 and major K2 variants in rat/human serum and lipoprotein fractions by a rapid, simple, and sensitive UHPLC-MS/MS method

***Kristýna Mrštná**, Kateřina Matoušová, Lenka Kujovská Krčmová, Alejandro Carazo, Jana Pourová, Přemysl Mladěnka, Ludmila Matysová, František Švec*

Journal of Chromatography A, 2024, Vol. 1714

IF₍₂₀₂₄₎: 4,1 (Q2) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,533 (Q2)

3. The power of modern extraction techniques: A breakthrough in vitamin K extraction from human serum

***Kristýna Mrštná**, Dorota Turoňová, Chaweewan Suwanvecho, František Švec, Lenka Kujovská Krčmová*

Microchemical Journal, 2024,

IF₍₂₀₂₄₎: 4,8 (Q1) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,59 (Q2)

4. Advances in kynurenine analysis

***Kristýna Mrštná**, Lenka Kujovská Krčmová, František Švec*

Clinica Chimica Acta, 2023, Vol, 547

IF₍₂₀₂₄₎: 5,0 (Q1) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,826 (Q2)

5. α-tocopherol and retinol content in Holder pasteurized versus high-pressure processed human milk during 6 months of storage

***Kristýna Mrštná**, Lenka Kujovská Krčmová, Chaweewan Suwanvecho, Miroslava Jandová, Eliška Kovaříková, Jan Strohalm, Radomír Hyšpler, Dagmar Solichová, František Švec*

Journal of Food Composition and Analysis, 2024, Vol.133

IF₍₂₀₂₄₎:4,3 (Q2) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,563 (Q1)

6. Analysis of terbinafine in PLGA-based drug delivery systems by a fast and sensitive UHPLC-DAD method

Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Petr Matouš, Ludmila Matysová, František Švec, Eva Šnejdrová, Lenka Kujovská Krčmová

Analytical Methods, 2023, Vol. 15, 2823-2832

IF₍₂₀₂₄₎: 3,1 (Q2) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,450 (Q2/Q3)

7. Comparison of the liquisolid technique and co-milling for loading of a poorly soluble drug in inorganic porous excipients

Chiazor Ugo Ogadah, ***Kristýna Mrštná***, Ludmila Matysová, Anette Müllertz, Thomas Rades, Andreas Niederquell, Zdenka Šklubalová, Barbora Vraníková

International Journal of Pharmaceutics,

IF₍₂₀₂₄₎: 5,8 (Q1) AIS₍₂₀₂₄₎: 0,715 (Q2)

8. PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ, GRANTOVÝCH PROJEKTŮ A STÁŽÍ

8.1. Přednášky

1. **Development and validation of UHPLC method for the monitoring of target active substances and their releasing from solid dispersions**

Kristýna Arnoltová, Lenka Kujovská Krčmová, Ludmila Matysová

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

2. **Development of UHPLC method for analysis of vitamin K in serum**

Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová, Ludmila Matysová

11. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference FAF UK; Hradec Králové, Česká republika; 27.–28.1.2021

3. **Optimization of UHPLC MS/MS method for determination of vitamin K in serum**

Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová, Ludmila Matysová

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

4. **Distribution of individual forms of vitamin K in lipoprotein layers determined with a combination of ultracentrifugation and UHPLC-MS/MS**

Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Ludmila Matysová, Lenka Kujovská Krčmová

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

5. **Study of the Influence of Seasonal Conditions on the Occurrence of Pharmaceuticals in Irish Surface Waters**

Dylan O'Flynn, Blanaid White, Imogen Rose Hands, Anne Parle-McDermott, Denise Harold, Thomas McCloughlin, Linda Holland, Stefania Scurtu, Jenny Lawler, Kristyna Mrstna and Fiona Regan

Setac Europe 33rd Annual Meeting; Dublin, Irsko; 30.4.–4.5. 2023

8.2. Plakátová sdělení

- 1. Optimization of UHPLC method for analysis of vitamin K in plasma and serum**
Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová, Ludmila Matysová
Česká chromatografická škola - HPLC.cz 2021; Zaječí, Česká republika; 19.–22.9.2021
- 2. Mass Spectrometry in Clinical Laboratory Research: The Fat Soluble Vitamins Determination**
Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Lenka Kujovská Krčmová
Prague Meeting on Historical Perspectives of Mass Spectrometry; Praha, Česká republika; 13.-14.10.2021
- 3. 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
- 4. Sample preparation in clinical practice – feasibility and challenges of microextraction techniques**
Kateřina Matoušová, Kristýna Mrštná, Lenka Javorská, Dorota Turoňová, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová
HPLC 2022; San Diego, USA; 18.-23.6.2022
- 5. 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
- 6. Establishing The Effects of Aquatic Pharma-Pollution on Female Daphnia magna Strauss 1820 Biological Organization**
Stefania Scurtu, Kristyna Mrstna, Thomas McCloughlin, Dylan O'Flynn, Linda Holland, Denise Harold, Blanaid White, Jenny Lawler, Anne Parle-McDermott, Fiona Regan
Setac Europe 33rd Annual Meeting; Dublin, Irsko; 30.4.–4.5. 2023

7. A study of the SOURCE-TO-SEA occurrence of Poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) of emerging concern in Ireland

Chloe Richards, Brendan McHugh, Evin McGovern, Ciprian Briciu-Burghina, Belinda Huerta, Kristýna Mrstna and Fiona Regan

Setac Europe 33rd Annual Meeting; Dublin, Irsko; 30.4.–4.5. 2023

8. 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 (2023); Hradec Králové, Česká republika; 1.-3.6.2023

9. Application of monolithic and core-shell columns in clinical research and practise

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

HPLC 2023; Düsseldorf, Německo; 18.-22.6.2022

10. Analysis of lipophilic vitamin levels in hospitalized patients with COVID-19

Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Lenka Javorská, Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová

12th Aegean Analytical Chemistry Days 2023; Istanbul, Turecko; 19.-22.10.2023

11. Neopterin, kynurenine, and tryptophan as new prognostic markers in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection

Dorota Turoňová, Lenka Kujovská Krčmová, Kristýna Mrštná, Lenka Javorská, Kateřina Matoušová, Mikuláš Skála, Petr Šmahel

12th Aegean Analytical Chemistry Days 2023; Istanbul, Turecko; 19.-22.10.2023

12. Post-COVID syndrome in patients hospitalized with SARS-CoV infection – new prognostic markers evaluation

Lenka Kujovská Krčmová, Lenka Javorská, Kateřina Matoušová, Kristýna Mrštná, Dorota Turoňová, Mikuláš Skála, Petr Šmahel

12th Aegean Analytical Chemistry Days 2023; Istanbul, Turecko; 19.-22.10.2023

8.3. Řešené grantové projekty

1. AZV č.: 18-03-00130 (90-16)

Název projektu: Studium specifických faktorů ovlivňujících toxicitu hypertermické intraperitoneální chemoterapie

Člen týmu (2020-2021)

2. Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK) č 3602/2021

Název projektu: Moderní preanalýza jako nástroj pro řešení komplikací při stanovení vitamínu K

Hlavní řešitel (2021-2023)

Projekt obdržel hodnocení „mimořádně dobrý“

3. AZV reg č.: NU21J-02-00021 (9028)

Název projektu: Rozdíly v parametrech agregace krevních destiček a koagulace krve mezi zdravými osobami a pacienty s metabolickými chorobami

Člen týmu (2021-2022)

4. AZV č.: NU22-A-108 (93-01)

Název projektu: Stanovení potenciálních prognostických laboratorních markerů u pacientů s COVID-19

Člen týmu (2022-2023)

8.4. Absolvované stáže

1. Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Krakow, Polsko (program Erasmus+)

01.03.2022 - 30.04.2022 (2 měsíce)

pracoviště: Laboratory for Forensic Chemistry, Department of Analytical Chemistry

supervisor: Dr hab. Renata Wietecha-Posłuszny

2. Dublin City University / Ollscoil Chathair Bhaile Átha Cliath, Dublin, Irsko (program Erasmus+)

01.09.2022 - 30.06.2023 (10 měsíců)

pracoviště: DCU Water Institute, School of Chemical Sciences

supervisor: Professor Fiona Regan

9. PŘÍLOHY

9.1. Příloha 1

Vitamin K – sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity

Přemysl Mladěnka, Kateřina Macáková, Lenka Kujovská Krčmová, Lenka Javorská,

Kristýna Mrštná, Alejandro Carazo, Michele Protti, Fernando Remião, Lucie Nováková

Nutrition Reviews, 2022, Vol. 80(4):677–698

9.2. Příloha 2

Analysis of vitamin K₁ and major K₂ variants in rat/human serum and lipoprotein fractions by a rapid, simple, and sensitive UHPLC-MS/MS method

Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Lenka Kujovská Krčmová, Alejandro Carazo, Jana

Pourová, Přemysl Mladěnka, Ludmila Matysová, František Švec

Journal of Chromatography A, 2024, Vol. 1714

9.3. Příloha 3

The power of modern extraction techniques: A breakthrough in vitamin K extraction

from human serum

Kristýna Mrštná, Dorota Turoňová, Chaweewan Suwanvecho, František Švec, Lenka

Kujovská Krčmová

Microchemical Journal, 2024, Vol. 198

9.4. Příloha 4

Advances in kynurenine analysis

Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová, František Švec

Clinica Chimica Acta, 2023, Vol. 547

9.5. Příloha 5

α -tocopherol and retinol content in Holder pasteurized versus high-pressure processed human milk during 6 months of storage

Kristýna Mrštná, Lenka Kujovská Krčmová, Chaweewan Suwanvecho, Miroslava Jandová, Eliška Kovaříková, Jan Strohalm, Radomír Hyšpler, Dagmar Solichová, František Švec

Journal of Food Composition and Analysis, 2024, Vol.133

9.6. Příloha 6

Analysis of terbinafine in PLGA-based drug delivery systems by a fast and sensitive

UHPLC-DAD method

Kristýna Mrštná, Kateřina Matoušová, Petr Matouš, Ludmila Matysová, František Švec,

Eva Šnejdrová, Lenka Kujovská Krčmová

Analytical Methods, 2023, Vol. 15, 2823-2832

9.7. Příloha 7

Comparison of the liquisolid technique and co-milling for loading of a poorly soluble drug in inorganic porous excipients

Chiazor Ugo Ogadah, Kristýna Mrštná, Ludmila Matysová, Anette Müllertz, Thomas Rades, Andreas Niederquell, Zdenka Šklubalová, Barbora Vraníková

International Journal of Pharmaceutics, 2024, Vol. 650

9.8. Příloha 8 (plakátové sdělení)

A study of the SOURCE-TO-SEA occurrence of poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) of emerging concern in Ireland

Chloe Richards, Brendan McHugh, Evin McGovern, Ciprian Briciu-Burghina, Belinda Huerta, Kristyna Mrstna and Fiona Regan