

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Dominika Krestová

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Pavel Šišťík, Ph.D.

Název diplomové práce: Analýza insulinu a jeho vybraných analogů v biologických vzorcích pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout rychlou, jednoduchou, specifickou a citlivou metodu pro stanovení insulinu a jeho vybraných analogů aspart, lispro, glulisin, glargin, detemir a degludek v biologické matrici, konkrétně v plasmě. Insulin je hormonálně aktivní peptid podílející se na udržování stálé koncentrace glukózy v krvi. Insulin se spolu s jeho strukturními analogy využívá pro léčbu onemocnění *diabetes mellitus*. Limitujícím faktorem při analýze těchto látek je jejich nestabilita a velmi nízká koncentrace v lidských vzorcích krve, která se pohybuje v řádech pg/ml.

Vývoj metody zahrnoval optimalizaci parametrů hmotnostní spektrometrie (MS) pro detekci jednotlivých analytů a optimalizaci ultravysokoučinné kapalinové chromatografie (UHPLC) pro separaci všech analytů.

Testovány byly dva systémy, a to 1D (jednorozměrná) a 2D (dvourozměrná) UHPLC, ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) s využitím trojitého kvadrupólu (QqQ). Jako iontový zdroj byl použit elektrosprej v pozitivním módu (ESI⁺). Během vývoje metody bylo testováno několik UHPLC kolon, různá složení mobilní fáze a aditiv a nastavení gradientové eluce. Cílem bylo separovat jednotlivé insuliny a zároveň identifikovat specifické přechody pro monitorování vybraných reakcí (SRM) pro jejich kvantifikaci. Zvláštní pozornost byla věnována humánnímu insulinu a insulinu lispro, které se liší pouze uspořádáním dvou aminokyselin a mají stejnou molekulovou hmotnost.

Metoda úpravy vzorků plasmy byla převzata z aplikačního listu (AL) Waters **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** a zahrnovala proteinovou precipitaci (PPT) s následnou mikoextrakcí na tuhou fázi (μSPE) s použitím vícemodálního sorbentu Oasis Max μSPE.

Finální 2D-UHPLC-MS/MS metoda pro analýzu insulinu a jeho strukturních analogů probíhala na přístroji Xevo TQ - XS, za využití záchytné kolony XBridge C18 2,1 x 20 mm o velikosti částic 3,5 μm a analytické kolony Cortecs UPLC C18+ 2,1 x 100 mm o velikosti částic 1,6 μm s celkovou dobou chromatografické analýzy 11 minut. Mobilní fáze obsahovala vodnou a acetonitrilovou složku s přidavkem kyseliny mravenčí.

Nově vyvinutá metoda bude sloužit k identifikaci a kvantifikaci insulinu a jeho vybraných analogů u neobjasněných úmrtí pro potřeby Ústavu soudního lékařství FN Ostrava.

Klíčová slova: insulin a jeho strukturní analoga, 2D-UHPLC-MS/MS, vývoj metody, optimalizace

Poděkování: studie byla podpořena Ministerstvem zdravotnictví ČR-koncepční rozvoj výzkumné organizace (29-FNOs/2020)