

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**ANALÝZA INSULINU A JEHO VYBRANÝCH ANALOGŮ  
V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH POMOCÍ KAPALINOVÉ  
CHROMATOGRFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Pavel Šišťík, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

# 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 insulínu 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 insulínu 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<sup>+</sup>). 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 insulínu a insulínu lispro, které se liší pouze uspořádáním dvou aminokyselin a mají stejnou molekulovou hmotnost.

Metoda úpravy vzorků plasmy byla převzata z aplikačního listu (AL) Waters [1] a zahrnovala proteinovou precipitaci (PPT) s následnou mikoextrakcí na tuhou fázi ( $\mu$ SPE) s použitím vícemodálního sorbentu Oasis Max  $\mu$ SPE.

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  $\mu$ m a analytické kolony Cortecs UPLC C18+ 2,1 x 100 mm o velikosti částic 1,6  $\mu$ m s celkovou dobou chromatografické analýzy 11 minut. Mobilní fáze obsahovala vodnou a acetonitrilovou složku s přídavkem 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)

# ABSTRACT

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Bc. Dominika Krestová

**Supervisor:** prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Consultant:** Mgr. Pavel Šišťík, Ph.D.

**Title of Diploma Thesis:** Analysis of insulin and its selected analogues in biological samples by liquid chromatography with mass spectrometry detection

The aim of this thesis was to develop a rapid, simple, specific and sensitive method for the determination of insulin and its selected analogues aspart, lispro, glulisine, glargine, detemir, and degludec in biological matrix, namely plasma. Insulin is a hormonally active peptide involved in maintaining a stable blood glucose concentration. Insulin, together with its structural analogues, is used for the treatment of diabetes mellitus. A limiting factor in the analysis of these substances is their instability and very low concentration in blood samples, which is in the order of pg/ml.

Method development included optimization of mass spectrometry (MS) parameters for the detection of individual analytes and optimization of ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) to ensure separation of the analytes.

Two systems, namely 1D (one dimensional) and 2D (two dimensional) UHPLC, were tested in coupling with tandem mass spectrometry using triple quadrupole (QqQ). Several UHPLC columns, different compositions of mobile phase and additives and gradient elution settings were tested during method development. The aim was to separate the individual insulins while identifying selected reaction monitoring (SRM) transitions for quantification. Mainly focus was put on human insulin and insulin lispro, which have the same molecular weight and their only difference is the arrangement of two amino acids in the structure of these compounds.

The method of plasma sample preparation was adopted from AN (application notes) Waters [1] and involved protein precipitation (PPT) followed

by solid-phase microextraction ( $\mu$ SPE) using a multi-modal Oasis Max  $\mu$ SPE sorbent.

The final 2D-UHPLC-MS/MS method for the analysis of insulin and its structural analogues was performed on a Xevo TQ - XS instrument, using an XBridge C18 2.1 x 20 mm trap column with a particle size of 3.5  $\mu$ m, a Cortecs UPLC C18+ 2.1 x 100 mm analytical column with a particle size of 1.6  $\mu$ m with a total chromatographic analysis time of 11 minutes. The mobile phase contained aqueous and acetonitrile components with the addition of formic acid.

The newly developed method will be used for identification and quantification of insulin and its selected analogues in unexplained deaths for the needs of the Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Ostrava University Hospital.

**Keywords:** insulin and its structural analogues, 2D-UHPLC-MS/MS, method development, optimization

**Acknowledgements:** the study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic-Conceptual Development of Research Organization (29-FNOs/2020).

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

V Hradci Králové 12.9.2024

.....

Bc. Dominika Krestová

## Poděkování

Mé poděkování patří vedoucí prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Pavlu Šišťíkovi, Ph.D. za odborné rady, konzultace a trpělivost při zpracování práce. Poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mě ve studiu podporovali.

# OBSAH

Obsah

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>OBSAH</b> .....	<b>8</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>10</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE</b> .....	<b>13</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>15</b>
3.1 INSULIN .....	15
3.1.1 Struktura insulínu .....	15
3.1.2 Insulinové preparáty .....	16
3.1.3 Syntéza insulínu.....	22
3.1.4 Funkce insulínu.....	23
3.1.5 Poruchy homeostázy glukózy .....	23
3.2 STABILITA INSULINU .....	24
3.2.1 Insulin degradující enzym.....	24
3.2.2 Nespecifické vazby proteinů na povrchy materiálů .....	24
3.3 METODY ÚPRAVY BIOLOGICKÉ MATRICE PRO ANALÝZU INSULINU .....	25
3.3.1 Proteinová precipitace .....	26
3.3.2 Extrakce na tuhou fázi .....	26
3.3.3 Afinity purifikace .....	27
3.4 METODY SEPARACE A DETEKCE INSULINŮ Z BIOLOGICKÉ MATRICE .....	28
3.4.1 Imunoanalytické metody.....	28
3.4.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie .....	29
3.4.3 Chromatografické metody .....	29
3.4.4 Vícerozměrná kapalinová chromatografie .....	30
3.4.5 Hmotnostní spektrometrie.....	34
3.4.6 Spojení UHPLC-MS .....	36
3.5 PUBLIKOVANÉ METODY ZABÝVAJÍCÍ SE ANALÝZOU INSULINU A JEHO ANALOGŮ.....	37
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>41</b>
4.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	41
4.2 STACIONÁRNÍ FÁZE .....	41
4.3 STANDARDY LÁTEK .....	41
4.3.1 Standardy insulínů.....	41
4.3.2 Referenční standard biologických vzorků.....	42
4.4 ROZPOUŠTĚDLA A ADITIVA .....	42
4.5 DALŠÍ POMŮCKY .....	42
4.6 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ .....	42
4.7 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH STANDARDŮ A QC VZORKŮ .....	43
4.8 OPTIMALIZACE NASTAVENÍ MS .....	43



4.8.1	MS sken a výběr prekurzorových iontů .....	43
4.8.2	Nastavení SRM přechodů .....	44
4.8.3	Ověření selektivity SRM přechodů insulinů.....	45
4.8.4	Nastavení parametrů iontového zdroje .....	47
4.8.5	SRM přechody insulinů pro optimalizaci složení MF .....	50
4.8.6	Optimalizace nastavení MS/MS metody .....	51
4.9	OPTIMALIZACE NASTAVENÍ UHPLC METODY .....	52
4.9.1	Volba stacionární fáze .....	52
4.9.2	Optimalizace složení mobilní fáze .....	53
4.9.3	Finální nastavení UHPLC metody .....	54
4.10	ÚPRAVA VZORKŮ PLASMY .....	55
4.10.1	Proteinová precipitace .....	56
4.10.2	Převedení analytů na anionty.....	56
4.10.3	μ-SPE extrakce.....	56
4.11	HODNOCENÍ ADSORPCE ANALYTŮ NA VIALKY.....	56
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>58</b>
5.1	OPTIMALIZACE NASTAVENÍ MS METODY .....	58
5.1.1	MS sken a výběr prekurzorových iontů .....	58
5.1.2	Optimalizace nastavení SRM přechodů.....	62
5.1.3	Ověření selektivity SRM přechodů insulinů.....	63
5.1.4	Nastavení parametrů iontového zdroje .....	66
5.2	NASTAVENÍ METODY UHPLC.....	70
5.2.1	Volba stacionární fáze .....	71
5.2.2	Optimalizace složení mobilní fáze .....	72
5.3	HODNOCENÍ ADSORPCE ANALYTŮ NA VIALKY.....	77
5.4	ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ PLASMY.....	77
5.4.1	Analýza kalibračních standardů.....	77
5.4.2	Analýza vzorků plasmy pacientů .....	78
5.4.3	Analýza QC vzorků .....	78
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>80</b>

## SEZNAM ZKRATEK

1D-LC	jednorozměrná kapalinová chromatografie
2D-LC	dvourozměrná kapalinová chromatografie
AcAc	kyselina octová
ACN	acetonitril
AL	aplikační list
AMK	aminokyselina
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
C18	oktadecylová stacionární fáze
C8	oktylová stacionární fáze
CLIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
CMC	kritická micelární koncentrace
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency)
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Furierovou transformací
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HLA	hlavní histokompatibilní systém člověka
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
ID-LC-MS/MS	izotopově ředěná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
IDE	insulin degradující enzym
IGF-II	růstový faktor podobný insulinu II

IR	insulinová rezistence
IS	vnitřní standard
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
LO	Langerhansovy ostrůvky
LOD	limit detekce
$m/z$	podíl hmotnosti a náboje iontu
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MF	mobilní fáze
MODY	<i>diabetes mellitus</i> charakteru diabetu dospělých vzniklý v mládí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
N/A	nedostupné
NPH	protamin zink insulin
NSB	nespecifická vazba
PDI	proteinová disulfidová izomeráza
PPT	srážení proteinů
Q	kvadrupól
QC	kontrola kvality
QIT	hmotnostní analyzátor se sférickou iontovou pastí
QqICR	kvadrupól s iontovou cyklotronovou rezonancí
QqQ	trojitý kvadrupól
QqTOF	kvadrupól s analyzátozem doby letu
RIA	radioimunoanalýza
SDS	dodecylsírán sodný
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce na tuhou fázi
SRM	monitorování vybrané reakce
TMB	tetramethylbenzidin
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

# 1 ÚVOD

Insulin, peptidový hormon produkovaný slinivkou břišní, hraje klíčovou roli při regulaci hladiny glukózy v krvi tím, že usnadňuje příjem glukózy do buněk, kde slouží jako zdroj energie. Nedostatečná produkce insulinu nebo rezistence na jeho účinky vede k *diabetes mellitus*, chronické metabolické poruše charakterizované vysokou hladinou glukózy v krvi.

Insulinová analoga jsou syntetické deriváty navržené tak, aby replikovaly profil působení přirozeného insulinu a zároveň nabízely lepší farmakokinetické vlastnosti. Tato analoga poskytují výhody, jako je delší trvání účinku, snížené riziko hypoglykémie a pohodlnější dávkovací režimy. Molekula humánního insulinu a jeho analoga mají velmi podobnou strukturu, což vede k podobným fyzikálně chemickým vlastnostem. Například humánní insulin a insulin lispro se liší pouze dvěma aminokyselinami ve své peptidové struktuře. Tyto insuliny mají identickou molekulovou hmotnost, a proto je lze odlišit pouze na základě přítomnosti specifických diagnostických iontů MS/MS (ionty fragmentů  $y_2$ ). Většina současných identifikačních metod se skutečně spoléhá na tyto jedinečné fragmentové ionty pro přesné rozlišení mezi různými insulinovými analogy. Tyto specifické fragmenty jsou využívány ke kvantifikaci samotných insulinů.

Běžnou praxí je analýza insulinu z krve pomocí imunotestů, přičemž je lze využít pouze pro analýzu humánního insulinu, a ne jeho strukturních analogů. Hlavním problémem je zkřížená reaktivita mezi humánním insulinem a insulinovými analogy a také mezi jinými látkami v krvi, což může vést k nepřesným výsledkům.

Insulin a jeho analoga vzbudil pozornost v oblasti soudního lékařství v případech nevysvětlitelných úmrtí. Předávkování insulinem vyvolává život ohrožující stav hypoglykémie a bez léčby může vést ke stavu kómatu, nevratnému poškození mozku a smrti. Náhodné předávkování je často způsobeno chybou pacienta, avšak existují také případy úmyslného předávkování, zejména při pokusech o vraždu či sebevraždu. Vývoj metody, která umožní stanovit insulin a jeho strukturní analoga v rámci jediné analýzy nabízí možnost snížení počtu nevyjasněných úmrtí.

## 2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce byl vývoj metody pro stanovení insulinu a jeho strukturních analogů v biologických vzorcích pomocí ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). Konkrétně se jedná o insulinová analoga aspart, lispro, glulisin, glargin, detemir a degludek. Jako biologický materiál byla z důvodu stability insulinu zvolena plasma. Požadavek na vývoj metody vycházel z Ústavu soudního lékařství FN Ostrava, a to v souvislosti s případy nevyřešených úmrtí. Snahou bylo vytvořit multi-metodu, ve které bude možné stanovit veškerá insulinová analoga v jediné analýze.

Před vývojem metody byla provedena rešerše s cílem získat informace o již existujících vyvinutých metodách, struktuře analytů a jejich fyzikálně chemických vlastnostech. Prvním krokem byla optimalizace podmínek hmotnostního spektrometru, která zahrnovala výběr prekurzorových iontů, následně výběr specifických a selektivních produktových iontů pro daná insulinová analoga. Dále byla provedena optimalizace vybraných parametrů iontového zdroje, jako je hodnota napětí na kapiláře, desolvatační teplota, průtok plynu na vstupním kuželu, průtok desolvatačního plynu a teplota iontového zdroje, s cílem dosáhnout co nejlepší citlivosti metody.

Následovala optimalizace kapalinové chromatografie. Testováno bylo několik typů analytických kolon: Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Waters), Cortecs C18+, 2,1 x 50 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Waters), Luna Omega C18, 150 x 2,1 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex), ACQUITY UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters), Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Phenomenex).

Pro separaci byly testovány mobilní fáze, které obsahovaly vodnou a organickou složku (acetonitril, methanol) a přídavek aditiv (rozdílná koncentrace kyseliny mravenčí). Testovány byly také různé podmínky gradientové eluce. Snahou bylo nastavení podmínek analýzy pro úplné rozdělení všech insulinů, především humánního insulinu a insulinu lispro, kdy se jedná o analyty se stejnou molekulovou hmotností.

Tato diplomová práce navazuje na mou předešlou bakalářskou práci s názvem: „Post mortem analýza insulinu a jeho vybraných analogů z krve

metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí“, která byla obhájena v 2022 [2].

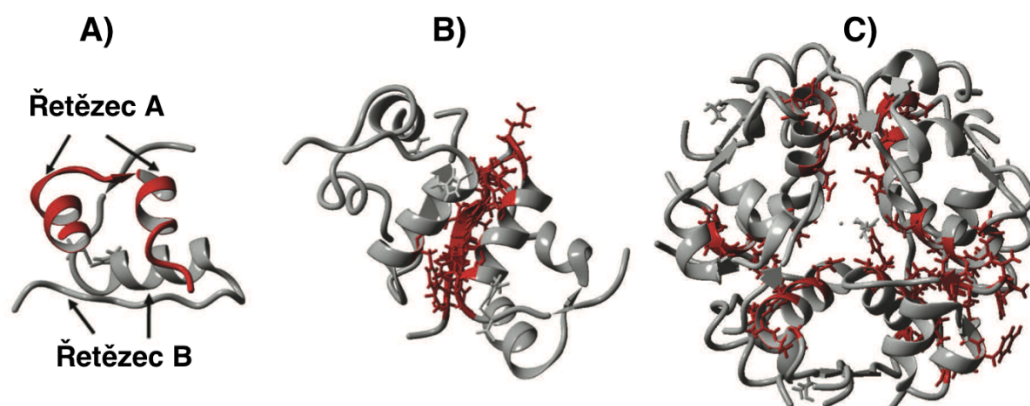
## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Insulin

V roce 2021 proběhlo již sté výročí od objevení insulínu, o které se zasloužil chirurg Frederick Banting spolu se studentem medicíny Charlesem Bestem. Ti roku 1921 provedli podvázání psího pankreatického vývodu pro izolaci vnitřní sekrece pankreatu. Izolovaný sekret měli v úmyslu použít pro léčbu onemocnění *diabetes mellitus* (úplavice cukrová, DM). Prvním pacientem byl čtrnáctiletý Leonard Thompson, který tímto onemocněním trpěl. Podání insulínu mu zachránilo život, čímž došlo ke změně pohledu na DM v chronické a lékařsky zvládnutelné onemocnění [3].

#### 3.1.1 Struktura insulínu

Insulin patří do skupiny proteinových hormonů. Molekulová hmotnost humánního insulínu je 5808 Da. Je to bílá krystalická látka rozpustná ve vodě a těžce rozpustná v nepolárních rozpouštědlech. Biologicky aktivní forma insulínu je monomer, avšak insulin je také schopen vytvářet vyšší oligomerní struktury jako jsou dimery a hexamery (Obr. 1) [4].

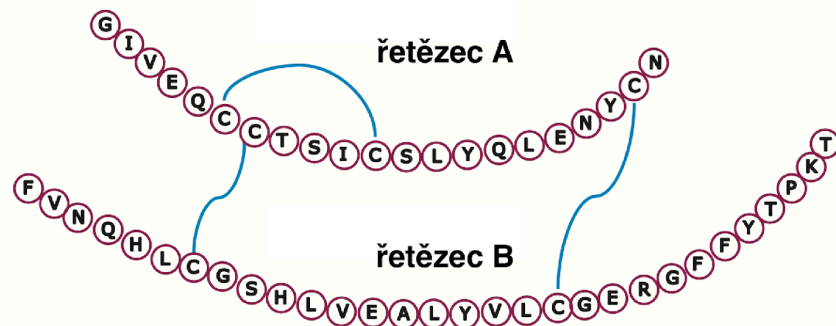


Obr. 1: Trojrozměrná struktura humánního insulínu, A) monomer, B) dimer, C) hexamer (převzato a upraveno ze zdroje [5])

Monomer humánního insulínu je tvořen dvěma polypeptidovými řetězci, které jsou znázorněny na Obr. 1. Struktura humánního insulínu včetně jednopísmenného označení aminokyselin (AMK), které humánní insulin obsahuje

je uvedena na Obr. 2. Zatímco řetězec A má 21 aminokyselin a obsahuje dva  $\alpha$ -helixy v poloze A1 – A8 a A12 – A20 spojené smyčkou, řetězec B s 30 aminokyselinami obsahuje centrální  $\alpha$ -helix v poloze B9 – B19.  $\alpha$ -helix B řetězce je lemovaný dvěma závití a flexibilními oblastmi v obou terminálních koncích. Oba řetězce jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky v poloze A7 – B7 a A20 – B19. Řetězec A zároveň obsahuje intramolekulární disulfidický můstek v místě A6 – A11. Disulfidické můstky mají zásadní vliv na stabilitu molekuly [4].

## HUMÁNNÍ INSULIN



Obr. 2: Struktura peptidových řetězců humánního insulínu (převzato a upraveno ze zdroje [1])

Dimerní forma insulínu je tvořena dvěma monomery, které jsou stabilizovány hydrofobními interakcemi a vodíkovými vazbami. Pro vytvoření hexameru je nutná přítomnost dvou zinečnatých iontů, díky kterým dojde ke spojení tří insulinových dimerů [4].

Hexamerní uspořádání je nesmírně důležité pro tvorbu krystalů, které slouží jako zásobní forma insulínu a jsou uloženy v  $\beta$ -buňkách Langerhansových ostrůvků (LO) [4].

### 3.1.2 Insulinové preparáty

Základní rozdělení insulínů zahrnuje tři skupiny, a to insuliny zvířecí, lidské (humánní) a insulinová analogá [6].



Zvířecí insuliny jsou získávány z pankreatu skotu (hovězí insulin) a prasat (vepřový insulin). Hovězí insulin se od toho humánního liší třemi aminokyselinami, přičemž vepřový pouze jednou. V Tab. 1 jsou uvedena přesná místa změn AMK u zvířecích insulinů v porovnání s insulinem humánním. I přes značnou podobnost humánního insulinu se zvířecími bylo od jejich používání v medicíně upuštěno. Jeden z důvodů, proč zvířecí insuliny již nejsou využívány je vznik imunitních reakcí u užívajících pacientů. Imunitní reakce vedly k nežádoucím účinkům a ke snížení účinnosti léčby [6][7].

Tab. 1: Strukturální změny zvířecích insulinů v porovnání s insulinem humánním [2]

insulin	pozice A8	pozice A10	pozice B30
humánní	threonin	isoleucin	threonin
vepřový	threonin	isoleucin	alanin
hovězí	alanin	valin	alanin

Humánní insuliny mohou být vyráběny semisynteticky či biosynteticky. Semisyntetická výroba spočívá v chemické úpravě řetězce aminokyselin zvířecích insulinů tak, aby složení a počet odpovídal humánnímu insulinu. Biosyntetická výroba představuje techniku rekombinantní DNA, která využívá vložení lidského genu pro proinsulin do kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie *Escherichia coli*. Mikroorganismy poté tvoří insulin jako svůj vlastní produkt, který se následně izoluje a purifikuje [8][9].

Insulinová analoga jsou modifikované molekuly humánního insulinu, které představují neutrální vodné roztoky o vysoké čistotě. Obsahují řadu látek, které slouží k jejich konzervaci a stabilizaci. Dále obsahují látky ovlivňující délku jejich účinku. Výhodou analog je nižší intraindividuální variabilita účinku, což znamená, že jejich léčebný efekt lze lépe předpovídat a lze snáz nastavit léčbu pro získání cílové hodnoty glykémie. Podle délky a nástupu účinku jsou insulinová analoga dělena na rychle působící, středně dlouze působící, dlouhodobě působící insuliny a premixované insulinové přípravky [4][7][10].

Rychle působící insuliny mají rychlý nástup účinku a kratší dobu jeho trvání (Tab. 2). Způsobuje to snížená tendence k tvorbě insulinových hexamerů, rychlejší přeměna insulinu na monomery a rychlejší vstřebávání do krevního řečiště. Bývají

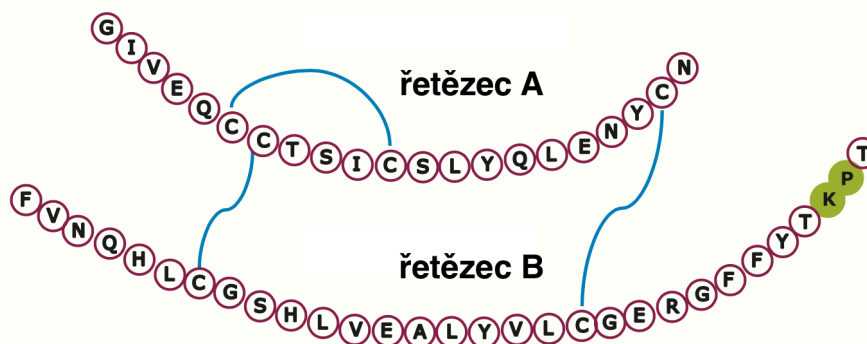
označovány jako prandiální insuliny. Většinou jsou aplikovány před jídlem, v případě potřeby mohou být podány i po jídle a pomáhají s regulací postprandiální hyperglykémie. Řadí se zde insulin lispro, aspart a glulisin [4][9][11].

Tab. 2: Farmakokinetické informace o nástupu, vrcholu a době účinku rychle působících insulinových analog [9][11]

analog	nástup účinku po podání	vrchol účinku po podání	doba trvání účinku
lispro	10-20 min	30-70 min	2-5 hod
aspart	10-20 min	1-3 hod	3-5 hod
glulisin	10-20 min	1 hod	3-5 hod

Insulin lispro se od humánního insulinu liší změnou pořadí aminokyselin B28-lysin a B29-prolin v B-řetězci humánního insulinu (Obr. 3). Dostupný je také insulin lispro s pomocnými látkami, citrátem a treprostinilem, které působí na lokální cévy. Citrát zvyšuje jejich permeabilitu a treprostinil podporuje vazodilataci, čímž je vstřebávání insulinu ještě více urychleno. Farmakokinetické informace o insulinu lispro jsou uvedeny v Tab. 2 [4][9][11].

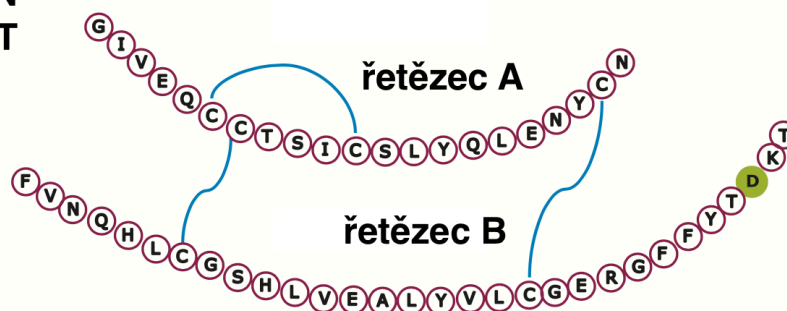
### INSULIN LISPRO



Obr. 3: Struktura peptidových řetězců insulinu lispro (převzato a upraveno ze zdroje [1])

Insulin aspart má ve své struktuře na místě B28-kyseliny asparagovou, místo původního prolinu v humánním insulinu (Obr. 4). Existuje také přípravek s obsahem pomocné látky nikotinamidu, který způsobuje dřívější nástup účinku zhruba o 5 min a zkrácenou dobu účinku o jednu hodinu v porovnání s insulinem aspart bez pomocné látky. Podrobnější farmakokinetické informace o insulinu aspart jsou uvedeny v Tab. 2 [4][9][11].

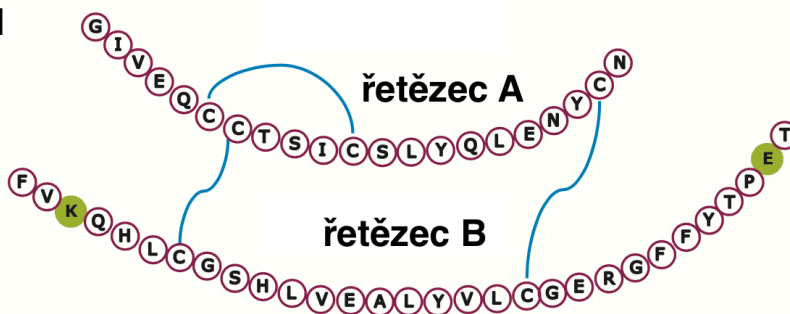
## INSULIN ASPART



Obr. 4: Struktura peptidových řetězců insulínu aspart (převzato a upraveno ze zdroje [1])

Insulin glulisin obsahuje oproti humánnímu insulínu v pozici B3-lysin a B29-kyselinu glutamovou (Obr. 5). Tab. 2 uvádí farmakokinetické informace o insulínu aspart [4][9][11].

## INSULIN GLULISIN



Obr. 5: Struktura peptidových řetězců insulínu glulisin (převzato a upraveno ze zdroje [1])

Středně dlouze a dlouhodobě působící insulínová analoga mají pomalejší nástup účinku a delší dobu jeho trvání (Tab. 3). Jsou nazývány také jako bazální insuliny. Jejich cílem je napodobení endogenní bazální sekrece insulínu a udržování vyrovnané hladiny insulínu v krvi (insulinémie) [11].

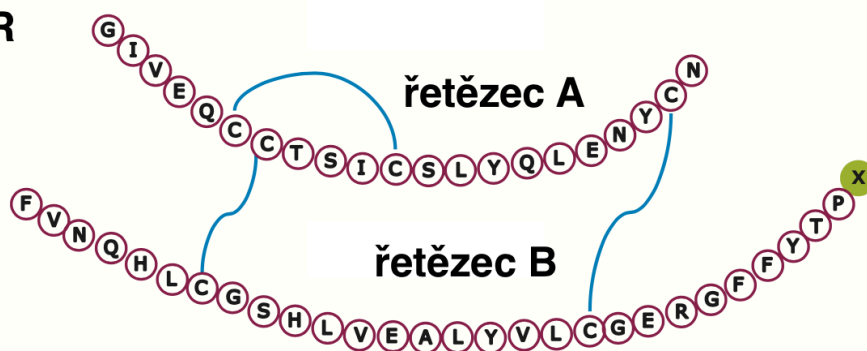
Tab. 3: Farmakokinetické informace o nástupu, vrcholu a době účinku středně dlouze a dlouhodobě působících insulínových analog [11]

analog	nástup účinku po podání	vrchol účinku po podání	doba trvání účinku
isofan	60-120 min	3-12 hod	až 24 hod
detemir	180-240 min	6-8 hod	až 24 hod
glargin	60 min	bezvrcholný průběh	24 hod
degludek	pozvolné uvolňování	pozvolné uvolňování	více než 42 hod

Jediným zástupcem středně dlouze působících insulinů je insulin isofan známý také pod zkratkou NPH insulin (protamin zink insulin). Jeho farmakokinetické informace jsou uvedeny v Tab. 3 [11].

Do skupiny dlouhodobě působících insulinů patří insulin detemir, glargin a degludek. Ve struktuře insulinu detemir je aminokyselina v pozici B30-threonin nahrazena kyselinou myristovou (Obr. 6). Prodloužený účinek insulinu je způsobený shlukováním insulinu v místě podání a vazbou na albumin. Údaje o farmakokinetice insulinu detemir jsou uvedeny v Tab. 3 [11].

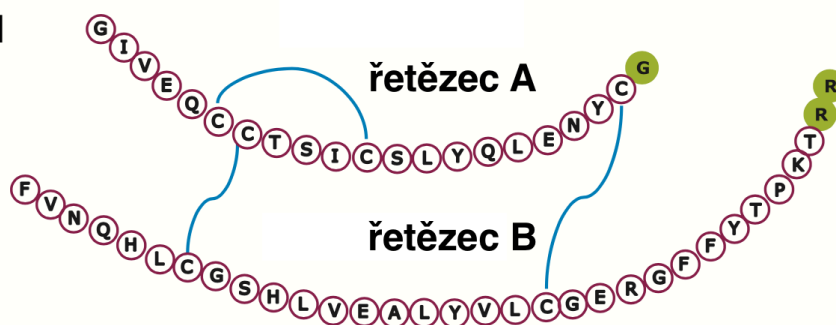
## INSULIN DETEMIR



Obr. 6: Struktura peptidových řetězců insulinu detemir (převzato a upraveno ze zdroje [1])

Insulin glargin se od humánního insulinu liší navázáním dvou argininů na C-konec B-řetězce, tedy v pozici B30-threonin. Změna zde rovněž nastává v řetězci A, a to náhradou původního asparaginu v pozici A21 za glycin (Obr. 7). Tyto změny vyvolávají posunutí izoelektrického bodu směrem k neutralitě. Injekční roztok glargin má kyselé pH, ve kterém je glargin zcela rozpustný. Po aplikaci dochází k neutralizaci a vzniku mikroprecipitátů, ze kterých je glargin postupně uvolňován do krevního oběhu. Podrobnější farmakokinetické údaje jsou v Tab. 3 [9][11].

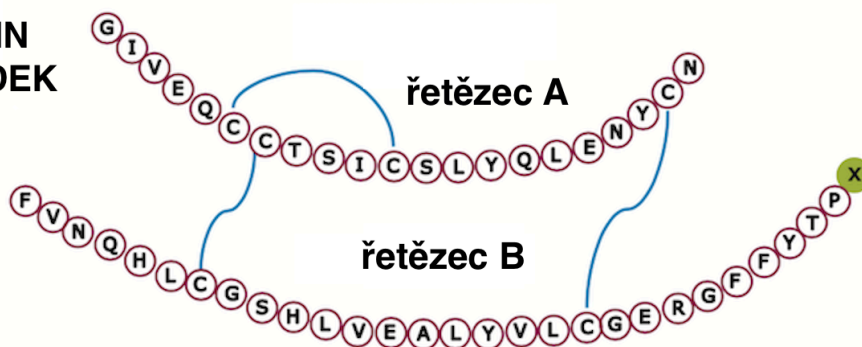
## INSULIN GLARGIN



Obr. 7: Struktura peptidových řetězců insulínu glargin (převzato a upraveno ze zdroje [1])

Délka účinku dlouho působících insulínů je zhruba 24 hod. Výjimkou je insulín degludek, který díky své struktuře účinkuje více než 42 hod (Tab. 3). Degludek je modifikován připojením kyseliny hexandekandiové na B29-lysin. Původní threonin se v pozici B30 nenachází (Obr. 8). Po aplikaci insulínu degludek dojde ke vzniku zásobního depa ve formě multihexamerů, ze kterých se monomery kontinuálně vstřebávají do krevního oběhu, což způsobuje prodloužení doby účinku (Tab. 3) [9][11].

## INSULIN DEGLUDEK



Obr. 8: Struktura peptidových řetězců insulínu degludek (převzato a upraveno ze zdroje [1])

Premixované insulínové přípravky představují zvláštní skupinu insulínů s bifazickým působením. Jsou to směsi rychle působících insulínů se středně dlouze nebo dlouze působícími insuliny. Rychle působící insuliny kontrolují hladinu glukózy v krvi po jídle. Pro správné nastavení léčby dle individuálního metabolického profilu pacienta mohou směsi obsahovat 25 %, 30 % nebo 50 %

rychle působících insulinů. Regulace glykémie v průběhu celého dne je zajišťována středně dlouze nebo dlouze působícími insuliny. Přípravky byly vytvořeny pro lepší napodobení fyziologické endogenní sekrece insulinu. Jedním z příkladů dostupných směsí je kombinace isofan insulinu v roztoku humánního insulinu, protamin insulinu aspart v roztoku insulinu aspart nebo směs roztoků insulinu degludek a aspart. Podle použitých insulinů ve směsi může účinek nastupovat v rozmezí deseti až třiceti minut a trvá sedm až dvacet čtyři hodin (Tab. 4) [11].

Tab. 4: Farmakokinetické informace o nástupu a době účinku premixovaných insulinových přípravků [11]

směs	nástup účinku po podání	doba trvání účinku
isofan + humánní ins.	30 min	7-24 hod
protamin insulin aspart + ins. aspart	10-20 min	14-24 hod

### 3.1.3 Syntéza insulinu

Insulin je syntetizován prostřednictvím  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků. Gen pro tvorbu insulinu je kódován na krátkém rameni 11. chromozomu. Proces začíná syntézou prekurzoru insulinu s názvem preproinsulin v endoplazmatickém retikulu. Preproinsulin se skládá ze signálního peptidu, C-peptidu a insulinového řetězce A a B. Odštěpením signálního peptidu pomocí signální peptidázy vzniká proinsulin. Oxidační prostředí v endoplazmatickém retikulu způsobuje tvorbu disulfidických vazeb. Po vytvoření disulfidických vazeb se proinsulin dostává do sekrečních granul Golgiho aparátu. Posledním krokem úpravy je proteolýza, při které dochází k odstranění C-peptidu a vzniká aktivní forma insulinu. Obě látky, C-peptid a insulin, jsou vylučovány z  $\beta$ -buněk po stimulaci glukózou a jinými podněty. C-peptid nemá žádnou fyziologickou funkci, jeho koncentrace v krvi však může sloužit pro odhad aktivity  $\beta$ -buněk LO a jejich endogenní sekrece insulinu [9][12][13].

### 3.1.4 Funkce insulinu

Insulin patří mezi zástupce anabolických hormonů, které jsou charakteristické tvorbou nových struktur a zásob energie. Dlouhou dobu byla regulace metabolismu sacharidů považována za jedinou funkci insulinu. Insulin bez pochyby hraje klíčovou roli v regulaci homeostázy glukózy. Pro snížení hladiny glukózy v krvi využívá mechanismy jako je glykogeneze a zvýšený transport glukózy do buněk. Dalšími mechanismy je potlačení glykogenolýzy a glukoneogeneze. Insulin se podílí také na metabolismu proteinů a lipidů, kdy jeho účinkem dochází ke stimulaci proteosyntézy a lipogeneze. Insulin působí i na samotnou slinivku břišní, kde podporuje růst  $\beta$ -buněk a sekreci insulinu [14][15][16].

### 3.1.5 Poruchy homeostázy glukózy

Fyziologická hodnota glykémie, která je změřena nalačno, je udržována v rozmezí 3,9 až 5,6 mmol/l. Stav, kdy je glykémie nalačno vyšší než 5,6 mmol/l, se nazývá hyperglykémie. Opačným stavem je hypoglykémie, tedy situace, kdy koncentrace glukózy v krvi klesne pod 3,9 mmol/l [14][17].

Glukóza je jediným zdrojem energie pro centrální nervovou soustavu a erythrocyty. Důležitá je také pro jiné tkáně a orgány, např. pro kosterní svalstvo či srdeční sval. Pro správné fungování všech orgánů a tkání je zásadní udržovat stálou glykémii. Na regulaci glykémie se podílí hormonální a nervová složka. Hormonální složka obsahuje kromě insulinu a glukagonu také např. adrenalin a kortisol. Nervově je glykémie regulována působením parasympatiku, sympatiku a hypothalamu [14][17].

Poruchy homeostázy glukózy nastávají v případě, že některý z mechanismů udržování stálé glykémie selže. Poruchy lze klasifikovat do dvou skupin. Do první z nich patří onemocnění *diabetes mellitus*, zatímco do druhé je řazena hraniční glykémie nalačno a porušená glukózová tolerance [18].

#### 3.1.5.1 *Diabetes mellitus*

*Diabetes mellitus* je chronické heterogenní onemocnění vyvolané absolutním nebo relativním nedostatkem insulinu či jeho nedostatečným účinkem

ve tkáních. Důsledkem tohoto nedostatku je hyperglykémie a komplexní metabolická porucha. Typickými klinickými příznaky je nadměrná žízeň – polydipsie a nadměrné močení – polyurie, často i noční močení. Současná klasifikace rozděluje *diabetes* na čtyři typy, a to *diabetes mellitus I. a II. typu*, gestační *diabetes mellitus* a ostatní specifické typy *diabetu* [15][18].

## **3.2 Stabilita insulínu**

Insulin má v lidském těle velmi krátký biologický poločas. Pohybuje se v rozmezí 4 až 6 minut. Největší podíl na degradaci insulínu má insulin degradující enzym (IDE). Určitou roli v degradaci hraje také proteinová disulfidová izomeráza (PDI) a kyselá proteázy. Informace týkající se působení jiných faktorů na stabilitu insulínu nejsou v odborné literatuře dohledatelné [19].

### **3.2.1 Insulin degradující enzym**

Insulin degradující enzym je zástupce metaloproteáz a ve svém aktivním místě obsahuje  $Zn^{2+}$ . Nachází se především v cytosolu, ale také v mnoha dalších buněčných částech včetně např. mitochondrií a povrchu plazmatických membrán. Skládá se ze dvou částí, IDE-N a IDE-C, o přibližně stejné velikosti 55 kDa. Nejvyšší afinitu má IDE k insulínu, avšak může štěpit i jiné peptidy a proteiny, jako např. glukagon, růstový faktor podobný insulínu II (IGF-II). IDE štěpí insulin na mnohočetné neaktivní insulinové fragmenty [20].

Optimální pH pro aktivitu IDE je v rozmezí 6 až 8,5. Snížení aktivity IDE ve vzorku je možné díky snížení teploty na 4 či  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ke snížení aktivity enzymu lze využít také jeho inhibitory, mezi které se řadí fenylmethansulfonyl chlorid a diamid [20][21].

### **3.2.2 Nespecifické vazby proteinů na povrchy materiálů**

Nespecifická vazba (NSB), také nazývána nespecifická adsorpce, analytů na povrchy materiálů je běžným jevem pro vysokomolekulární látky jako jsou peptidy a proteiny. Vzniká důsledkem chemické afinity analytu k povrchu jak odběrových nádob (zkumavky a další), tak k povrchu materiálů během procesu



úpravy vzorku před analýzou. Běžné mechanismy, které jsou uplatňovány při NSB, jsou iontové interakce a interakce vznikající na základě polaritativy mezi molekulou analytu a povrchem materiálu. Pokud jsou zkoumané látky adsorbovány na povrchy, ať už během procesu úpravy vzorku či během vlastní analýzy, dochází ke snížení koncentrace těchto analytů, což může vést ke snížení citlivosti metody a k nesprávné kvantifikaci analytů [22].

Existují metody pro účinné zmírnění NSB. Příkladem je změna pH roztoku nebo zvýšení podílu organického rozpouštědla v roztoku vzorku. Tyto metody jsou využívány především u jednoduchých malých molekul, u kterých jsou NSB způsobeny jen jedním mechanismem na jediném místě molekuly. Větší molekuly, jako jsou peptidy a proteiny, mohou s povrchem tvořit více heterogenních afinitních interakcí. Z toho důvodu je pro ně využívána jiná metoda zabránění tvorby NSB, a to využití tzv. blokujícího činidla. Blokující činidlo vytvoří bariéru mezi povrchem materiálu a proteiny ve vzorku, a ty se pak nemají kde zachytit. Často jsou jako blokující činidla využívány nosné proteiny, jako např. sérový albumin, polymery a detergenty [22].

Přidáním blokujícího činidla dojde sice k zabránění tvorby NSB, ale obecně tyto látky nemusí být kompatibilní s analytickou instrumentací. Blokující činidla mohou ovlivnit selektivitu chromatografické kolony, jsou obtížně odstraňovány z kolon a systému a celkově způsobují kratší životnost kolony.

Další možností, jak zabránit NSB, je využití nádob s inertním povrchem, jako např. silanizované skleněné nádoby a polypropylenové nádoby s čistě uhlovodíkovým povrchem. Konkrétním příkladem mohou být vialky a extrakční destičky QuanRecovery od společnosti Waters, vyrobené z vysoce čistého polypropylenu a navržené tak, aby potlačovaly hydrofobní NSB [22].

### **3.3 Metody úpravy biologické matrice pro analýzu insulinu**

Insulin a jeho strukturní analoga lze analyzovat v mnoha různých biologických matricích. Plná krev není vhodná z důvodu přítomnosti enzymů a řady jiných látek přispívajících k degradaci insulinu. Zpracovává se pouze v oblasti forenzní analýzy v případě, že není k dispozici žádný jiný další odběr (biologický

materiál). Nejčastěji používanou maticí v klinických laboratořích je plasma [23][24][25]. Pro analýzu je možné použít také sérum [21][26]. Mezi další biologické matrice používané k analýze insulinů patří moč [27][28], nitrooční tekutina [29], mozkomíšní mok a případně další biologické matrice [30].

Koncentrace insulinů se liší v závislosti na typu matrice. V pankreatu jsou očekávané koncentrace v rozmezí 74 až 170  $\mu\text{g/g}$ , zatímco v plasmě či moči, kde se hladina insulinu pohybuje v řádech  $\text{pg/ml}$ . Vzhledem k velmi nízké koncentraci insulinů v biologických tekutinách je nutné zvolit vhodnou metodu úpravy vzorku pro jejich stanovení [31].

K nejběžněji používaným technikám úpravy vzorku před samotnou analýzou patří proteinová precipitace (PPT) [24][25][32], extrakce na tuhou fázi (SPE) [23][25][33] a afinitní purifikace [24][21][28].

### **3.3.1 Proteinová precipitace**

Proteinová precipitace neboli srážení proteinů je rychlá, jednoduchá a levná metoda vhodná pro matrice s velkým obsahem proteinů jako je plasma či sérum. Proteinovou precipitací lze odstranit téměř veškeré plazmatické proteiny [34][35].

Pro analýzu velkého počtu vzorků jsou komerčně dostupné 96-ti jamkové destičky pro PPT. K dispozici jsou v tomto provedení také plně automatizované systémy [34][35].

### **3.3.2 Extrakce na tuhou fázi**

Obecným principem SPE je zachycení analytů z roztoku vzorku na tuhou fázi a následná eluce analytů elučním činidlem. Další možnosti použití SPE je přečištění vzorku, kdy na sorbent mohou být zachyceny možné interferenty obsažené v matrici vzorku, zatímco analyty ne. SPE je prováděna v kolonkách naplněných sorbentem. Výběr použitého sorbentu pro extrakci látek z biologické matrice závisí na vlastnostech sorbentu, struktuře a koncentraci extrahovaných látek, a také na typu biologické matrice. Samotný proces SPE může obecně

zahrnovat pět základních kroků – aktivace a kondicionace kolonky, nanesení vzorku, promytí a eluce analytů [34][35][36].

### **3.3.2.1 Typy SPE sorbentů**

SPE sorbenty mohou být vyrobeny z různých materiálů, které určují jejich fyzikálně chemické vlastnosti. Mezi nejběžnější patří silikagelové sorbenty, polymerní sorbenty nebo sorbenty na bázi aktivního uhlíku a další. Jednotlivé typy SPE sorbentů se liší mechanismem záchytu analytů na jejich povrch a také svou kapacitou [35].

Obecně je možné sorbenty rozdělit do několika základních skupin, a to na sorbenty s vlastnostmi reverzních fází (nepolární sorbenty), normálních fází (polární sorbenty) a iontově výměnné sorbenty [37].

Pro dosažení velmi čistých extraktů a pro extrakci strukturně odlišných látek je možné využít kombinaci více mechanismů retence na vícemodálních sorbentech. Použití vícemodálních sorbentů změní selektivitu a výtěžek extrakce. Jeden z komerčně dostupných vícemodálních sorbentů využívá mechanismus záchytu založený na kombinaci reverzních fází a iontově výměnné funkční skupiny. Příkladem této kombinace vícemodálního sorbentu je fáze typu MAX (mixed-mode anion exchange), která se skládá z kopolymeru s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi, a navíc má iontově výměnnou skupinu pro kyselá látky [37][39].

### **3.3.3 Afinitní purifikace**

Afinitní purifikace je používána pro izolaci fyziologicky významných látek, jako jsou proteiny, enzymy a hormony. Obecným principem afinitní purifikace je interakce analytu se specifickým ligandem, který je navázán na nosiči. Tato vazba musí být silná, ale zároveň reverzibilní pro následnou eluci analytu. Příkladem nosiče může být sefaróza, celulóza nebo polyakrylamidový gel [40].

Jako metody úpravy biologických vzorků pro analýzu insulinu, založených na principu afinitní purifikace, lze využít např. metodu ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a separační metody (např. imunoafinitní chromatografie) [27][28].

Postup provedení afinitní chromatografie je rozdělen do tří kroků. V prvním probíhá ekvibrace pomocí vazebného pufru, který připraví nosič s ligandem na navázání analytu. Následuje aplikace vzorku, kdy dojde k vazbě cílového analytu s ligandem. Ostatní látky ze vzorku prochází nosičem a nejsou zachyceny. Posledním krokem je narušení vazby ligandu a analytu pomocí elučního pufru, čímž je dosaženo eluce cílového analytu. Konkrétně u imunoafinitní purifikace je ligandem protilátka a extrakce analytu je založena na vazbě antigenu a protilátky [28][40][41].

### **3.4 Metody separace a detekce insulinů z biologické matrice**

V klinických laboratořích se pro rutinní analýzu insulinu běžně využívají imunoanalytické a chromatografické metody. Další metodou, kterou lze využít pro stanovení insulinu, je micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, která patří mezi elektroforetické metody. Elektroforetické metody však pro stanovení insulinu nejsou v klinické praxi příliš běžné [42].

Koncentrace insulinu může být uváděna pomocí dvou systémů jednotek. Prvním systémem jsou konvenční jednotky IU/ml nebo jen U/ml, které vyjadřují biologickou aktivitu insulinu. Druhým způsobem vyjádření koncentrace insulinu jsou jednotky SI soustavy (pmol/l), které souvisí s počtem molekul insulinu v daném objemu. Mezi oběma systémy jednotek existují přepočítávací faktory. Problémem však je, že není jasně určen pouze jeden přepočítávací faktor. Zdokonalení přípravy a stabilizace insulinu v historii způsobilo změnu biologické aktivity insulinových přípravků. To vyvolalo vznik nových přepočítávacích faktorů. Při použití nesprávného přepočítávacího faktoru může dojít k podhodnocení výsledků, což může vyvolat významné klinické důsledky [43].

#### **3.4.1 Imunoanalytické metody**

Jednou z původních metod pro stanovení insulinu byla radioimunoanalýza (RIA). V průběhu času byla tato technika nahrazena jinými imunoanalytickými

metodami z důvodu bezpečnostních rizik spojených s použitím radionuklidu jako značeného indikátoru imunochemické reakce. Další nevýhodou RIA metody byla neschopnost detekovat prekurzory insulinu a insulinová analoga [42].

Zlatým standardem v imunoanalýze insulinu je sendvičová ELISA. Komerčně dostupné ELISA kity pro stanovení insulinu v séru dosahují limitu detekce (LOD) v rozmezí 3 až 12 pmol/l. Nevýhodou některých kitů je zkřížená reaktivita s prekurzorem insulinu proinsulinem [42].

Další možností je využití chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA). LOD pro stanovení insulinu pomocí CLIA se pohybuje v rozmezí 0,7 až 12 pmol/l [42].

### **3.4.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie**

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) kombinuje princip elektroforézy s chromatografií, čímž dosahuje efektivnější separace a je schopna separovat i nenabitě molekuly. Nejdostupnějším detekčním systémem pro MEKC je UV-VIS detektor, avšak nevýhodou tohoto spojení při analýze insulinu a jeho strukturních analogů může být nedostatečná selektivita a citlivost stanovení. Mnohem větší citlivost detekce zajišťuje spojení MEKC s hmotnostní detekcí [42][44].

### **3.4.3 Chromatografické metody**

S ohledem na stále rostoucí potřebu rozlišit samotný insulin, jeho strukturní analoga a metabolity, byly vyvinuty další metody. Příkladem jsou chromatografické metody, které umožňují separaci těchto analytů před vlastní detekcí. Pro tuto separaci je možno využít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) [42].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je pro analýzu insulinu spojována s hmotnostní spektrometrií, nebo s UV detekcí. UV detekce je však využívána méně často [42].

Spojení HPLC-MS má vyšší specifitu, selektivitu a menší tendenci k interferencím s dalšími látkami obsažených v reálných vzorcích ve srovnání se spektrofotometrickou detekcí. České společnost klinické biochemie navrhuje pro

analýzu insulínu metodu kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. V metodě je pro kvantifikaci využíván izotopově značený standard, např. deuterovaný humánní insulin (ID-LC-MS/MS). Avšak pro stanovení mohou být jako vnitřní standardy použité i jiné látky, jako např. hovězí insulin [21][27][28][30][33][45].

Pro zvýšení rozlišení chromatografické separace v analýze insulínu a jeho strukturních analogů jsou využívány i metody vícerozměrné kapalinové chromatografie. Tato instrumentace může být přínosem pro separaci strukturně podobných látek, jako v případě humánního insulínu a insulínu lispro [42].

#### **3.4.4 Vícerozměrná kapalinová chromatografie**

Multidimenzionální separační metody spojují dva nezávislé separační systémy, což poskytuje širokou škálu kombinací chromatografických a dalších separačních metod [46].

Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC) je jednou z používaných metod pro separaci analytů v biologickém materiálu. Hlavní výhodou dvourozměrného uspořádání je značný nárůst kapacity separace a zvýšení rozlišení, pokud jsou dodržována určitá pravidla:

1. Ortogonalita separačního mechanismu.
2. Účinnost separace, které je dosaženo v první dimenzi by neměla být snížena v dimenzi druhé.
3. Je nezbytné, aby separovaná směs, nebo alespoň její reprezentativní část, prošla oběma separačními dimenzemi [40][47].

Pokud jsou tato pravidla dodržena celková kapacita je rovna součinu dílčích separací [44].

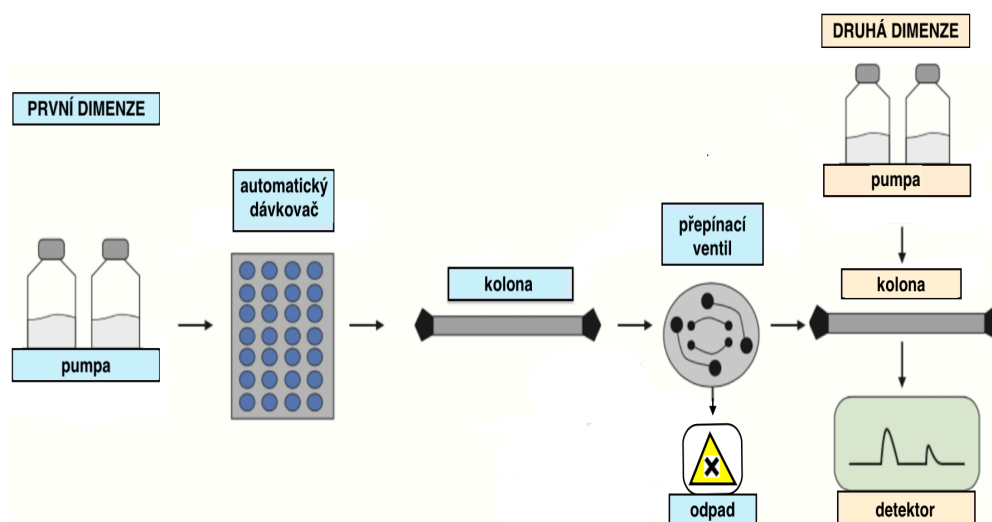
Tato pravidla ovšem nejsou v praxi vždy 100 % dodržena, a proto je výsledná celková kapacita separace mnohem nižší než násobek jednotlivých separací. Důvodem může být nekompatibilita mobilních fází v první a druhé separační dimenzi nebo částečná korelace mechanismů retence analytů v první a druhé dimenzi [44][48][49].

2D-LC našla využití v analýze komplexních směsí, jako např. směsi proteinů, dále ve farmaceutické analýze nebo také ve forenzní vědě [48].

Jednotlivé dimenze separace nemusí být složeny jen z analytických kolon. První analytická kolona může být nahrazena kolonou záchytnou. Jednou z možností zapojení záchytné kolony v 2D-LC systému je záchytná a zpětná eluce (Trap and Back-Flush Elution). Vzorek je jako první nanesen na záchytnou kolonu. Cílové analyty jsou zachyceny na začátku záchytné kolony, přičemž nepotřebné a nekompatibilní látky nejsou zachyceny a jsou unášeny do odpadu. Následuje přepnutí ventilu a zpětná eluce analytů ze záchytné kolony na analytickou kolonu, kde probíhá separace. Výhodou tohoto zapojení je odstranění nekompatibilní části matrice vzorku. Zachycení analytů na začátku záchytné kolony a zpětné vymývání analytů způsobuje zakoncentrování vzorku, což může přispět ke zvýšení citlivosti metody [50].

#### 3.4.4.1 2D-LC instrumentace

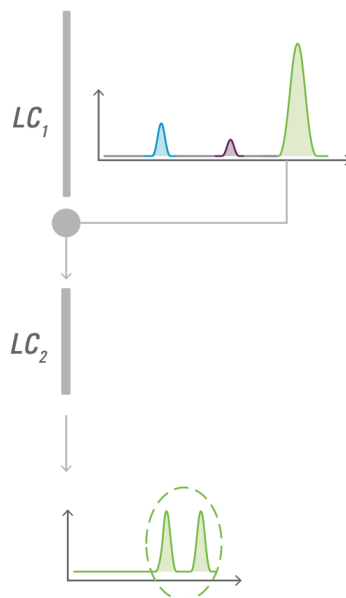
Instrumentace 2D-LC systému vychází z 1D uspořádání. 2D-LC systém navíc obsahuje druhou dimenzi separace složenou z čerpadla a kolony. Přepínání mezi první a druhou dimenzí zajišťuje přepínací ventil. Součástí 2D-LC je stejně jako v 1D-LC automatický dávkovač, detektor, počítač pro vyhodnocování získaných dat a nádoba na odpad (Obr. 9) [44].



Obr. 9: Instrumentace 2D-LC systému

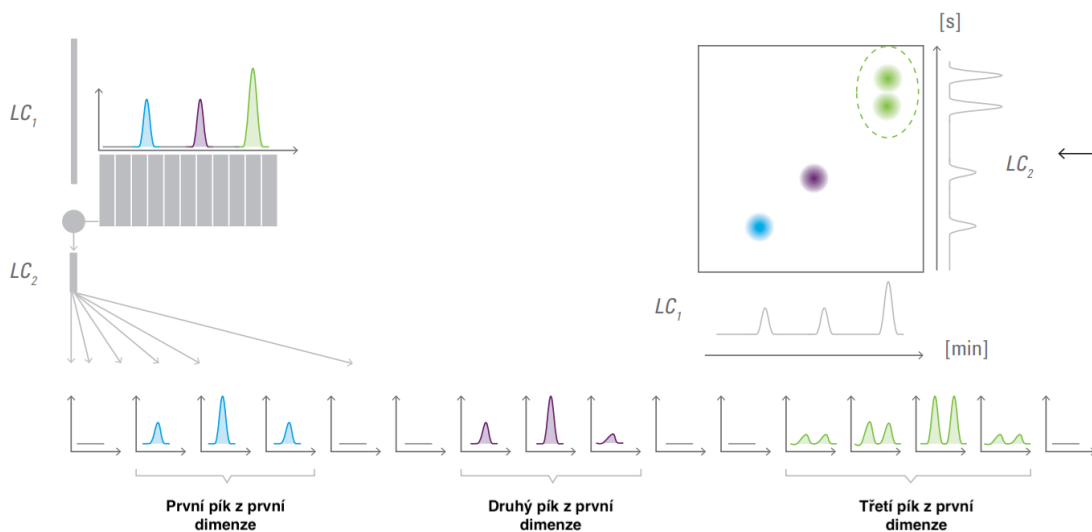
### 3.4.4.2 Módy 2D-LC

Pokud je k 2D-LC přistupováno z hlediska počtu převedených frakcí mezi první a druhou dimenzí, existuje několik režimů. Jedním z nich je částečná, známá také jako frakční, 2D-LC technika, která přenáší pouze jednu frakci (Obr. 10) [44][48].



Obr. 10: Schématické znázornění částečné (frakční) 2D-LC techniky [48]

Další technikou je úplná nebo-li celoeluátová 2D-LC technika, která přenáší kompletní eluát z první kolony (Obr. 11). Obě tyto techniky lze provádět v on-line a off-line režimu [44][48].



Obr. 11: Schématické znázornění úplné (celoeluátové) 2D-LC techniky [48]



V off-line režimu je eluát z první dimenze shromažďován pomocí sběrače frakcí a po ukončení separace jsou jednotlivé frakce dávkovány do druhé dimenze. Výhodou off-line režimu je možnost úpravy jednotlivých frakcí před vpuštěním do druhé dimenze, jako např. jejich zakoncentrování nebo derivatizace. 2D-LC v off-line režimu lze provádět pomocí standardního systému pro jednorozměrnou kapalinovou chromatografii se sběračem frakcí první dimenze, není potřeba žádná speciální instrumentace, což je další výhodou. Nevýhodou může být časová náročnost provedení, obtížná automatizace, reprodukovatelnost a vyšší riziko kontaminace vzorku [47][51].

On-line režim vyžaduje tzv. modulátor, zpravidla ve formě přepínacího ventilu, který slouží jako spojení mezi první a druhou dimenzí. Přepínací ventil přivádí eluát z první dimenze do druhé ihned po jeho nashromáždění, což zajišťuje přenášení eluátu v reálném čase. Hlavní výhodou on-line režimu je automatizace a rychlost provedení [44][47][52].

Mezistupeň mezi off-line a on-line režimem je tzv. stop and go režim, kdy probíhá analýza v jednotlivých dimenzích střídavě. Nejprve je provedena analýza v první dimenzi, po shromáždění eluátu je separace zastavena a následuje separace eluátu v dimenzi druhé [48][52].

Při rozhodování o volbě vhodného 2D-LC režimu analytické metody může hrát významnou roli časová náročnost. V on-line režimu je nezbytné, aby doba analýzy v druhé dimenzi byla kratší nebo maximálně stejně dlouhá jako je doba analýzy v první dimenzi. To je způsobeno potřebou převodu eluátu z jedné dimenze do druhé pomocí přepínacího ventilu, který pracuje v pravidelných cyklech. Během analýzy v první dimenzi je eluát zasílán do jedné ze smyček ventilu, zatímco jiná smyčka ventilu je současně vymývaná pomocí čerpadla a její obsah je dávkován do druhé dimenze. V off-line režimu délka analýzy v druhé dimenzi nehraje tak významnou roli, jelikož vzorek je dávkován nezávisle. Delší čas pro separaci v druhé dimenzi může opět zvýšit rozlišení a účinnost separace [44][52].

### 3.4.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která umožňuje identifikaci a kvantifikaci látek v komplexních směsích, včetně biologických vzorků. Díky své vysoké citlivosti, minimální spotřebě vzorku a rychlosti provedení umožňuje nejen identifikaci a kvantifikaci látek, ale také studium jejich struktury, reaktivity a fyzikálních vlastností. Tato technika má široké spektrum uplatnění a v mnoha případech přímo přispívá ke zlepšení kvality lidského života. Napomáhá k diagnostice onemocnění, kdy je využívána např. pro identifikaci nádorových markerů nebo vrozených metabolických poruch u novorozenců v rámci novorozeneckého screeningu. Dále je MS využívána k vývoji a výrobě léčiv a monitorování jejich terapeutických hladin. Dalšími odvětvími využívající hmotnostní spektrometrii jsou např. toxikologie a forenzní analýza [53][54][55][56].

Principem hmotnostní spektrometrie je separace nabitých částic v plynné fázi na základě jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) díky interakci s elektrickým nebo magnetickým polem, případně kombinace obou. Celý proces analýzy se dá rozdělit do tří kroků:

1. Ionizace – převod molekul nebo atomů analytu na ionty v plynné fázi.
2. Separace – vzniklé ionty jsou separovány podle jejich hodnoty poměru  $m/z$ .
3. Detekce – zaznamenání iontového proudu hmotnostně separovaných iontů [53].

Výsledkem analýzy pomocí MS je hmotnostní spektrum, které zaznamenává intenzitu signálu v závislosti na jejich  $m/z$  [53].

#### 3.4.5.1 Ionizace elektrosprejem

Nejčastěji používaným iontovým zdrojem pro analýzu biologických vzorků, je ionizace elektrosprejem. Umožňuje ionizovat široké spektrum látek, včetně peptidů, proteinů, nukleových kyselin a dalších makromolekul [57].

Principiálně funguje tak, že po výstupu analytu z chromatografické kolony je roztok vzorku přiváděn do iontového zdroje kovovou kapilárou. Na kovovou kapiláru je vkládáno napětí, což způsobuje nabití analytu. Na konci kapiláry vznikají kapky, důsledkem působení zmlžujícího plynu (např. dusík). Z kapek je postupně

odpařováno přebytečné rozpouštědlo a dochází ke kumulaci náboje. V určité chvíli náboje na kapce dosáhnou kritické hustoty tzv. Rayleighova limitu a dojde ke Coulumbické explozi, při které se původní kapka rozdělí na menší kapky a zároveň dojde k rozdělení nábojů. Proces Coulumbické exploze se několikrát opakuje až do uvolnění iontů z kapičky, přičemž ionty pak vstupují do analyzátoru [57][58].

#### **3.4.5.2 Hmotnostní analyzátor**

Hmotnostní analyzátor separuje ionty dle jejich poměru  $m/z$  za vysokého vakua, které se pohybuje v rozmezí  $10^{-3}$  až  $10^{-10}$  Pa. Pro zajištění separace analyzátoři využívají různé fyzikální principy. Separace iontů dle jejich různé stability oscilací za působení stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí využívají kvadrupólové analyzátoři a iontové pasti. Dalším principem, který využívá hmotnostní analyzátor, může být sledování doby letu iontů v oblasti bez pole [59].

Základním parametrem hmotnostního analyzátoru je rozlišovací schopnost, tedy schopnost analyzátoru poskytnout dva různé signály pro ionty s podobným poměrem  $m/z$ . Mezi další parametry charakterizující hmotnostní analyzátor patří hmotnostní rozsah, správnost hmoty, dynamický rozsah a rychlost skenování [53][59].

#### **3.4.5.3 Tandemové uspořádání hmotnostních analyzátorů**

Tandemová hmotnostní spektrometrie představuje spojení dvou a více hmotnostních analyzátorů stejného druhu za sebou. Metoda má velký přínos v oblastech identifikace sloučenin v komplexních směsích, objasnění struktury neznámých sloučenin, znázornění fragmentačních cest a kvantifikace sloučenin v reálných vzorcích [53].

Principem je hmotnostní analýza nabitých iontů v prvním hmotnostním analyzátoru, ze kterého je vybrán proud iontů. Tyto vybrané ionty se nazývají prekurzorové ionty. Následuje jejich fragmentace, při které díky specifickým reakcím, jako např. kolizně indukovaným srážkám iontů s kolizním plynem, dochází ke vzniku fragmentů neboli produktových iontů. Produktové ionty jsou následně podrobeny další hmotnostní analýze. Tandemová hmotnostní

spektrometrie není omezená pouze na dvoustupňovou analýzu. Lze provést také vícestupňové hmotnostní analýzy označované jako  $MS^n$  [53][60].

Instrumentaci pro MS/MS lze rozdělit do dvou skupin, a to na tandemovou hmotnostní spektrometrii v prostoru (MS/MS in-space) a tandemovou hmotnostní spektrometrii v čase (MS/MS in-time). V případě MS/MS instrumentace v prostoru jsou základní kroky tandemové hmotnostní spektrometrie, tedy výběr prekurzorových iontů, fragmentace a analýza produktových iontů, prováděny ve třech hmotnostních analyzátoch. Patří zde např. hmotnostní spektrometry s trojitým kvadrupólem (QqQ) či kvadrupól s analyzátoch doby letu (QqTOF), dva analyzátoch doby letu (TOF/TOF) a kvadrupól s iontovou cyklotronovou rezonancí (QqICR). V případě MS/MS instrumentace v čase jeden analyzátoch provádí postupně v čase výběr prekurzorových iontů, jejich fragmentaci a analýzu produktových iontů. Příkladem může být hmotnostní spektrometr se sférickou iontovou pastí (QIT), lineární iontovou pastí a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) [53][60].

### 3.4.6 Spojení UHPLC-MS

Kombinace separačních vlastností ultravysokoučinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s detekcí ve formě hmotnostní spektrometrie tvoří důležité spojení v analýze biologických vzorků [53].

UHPLC-MS se skládá se tří částí – separačního zařízení ve formě UHPLC systému, rozhraní a hmotnostního spektrometru. Rozhraní zajišťuje převod kapaliny z chromatografického systému do hmotnostního spektrometru. V rámci trendů dnešní doby pro spojení UHPLC-MS je rozhraní vyřešeno využitím ionizačních technik za atmosférického tlaku, nejčastěji elektrosprejem a chemickou ionizací za atmosférického tlaku [53][57].

### 3.5 Publikované metody zabývající se analýzou insulínu a jeho analogů

Přehled publikovaných metod zabývajících se analýzou insulínu a jeho strukturních analogů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí shrnuje Tab. 5.

Jako biologický materiál, ze kterého je stanovován insulin a jeho analoga je využívaná krev [33][61], sérum [24][21][26], plasma [23][24][25], moč [27][28] a nitrooční tekutina [61]. Úprava vzorku nejčastěji zahrnovala imunoafinitní purifikaci, extrakci na tuhou fázi a proteinovou precipitaci.

Nejvyužívanější stacionární fázi pro analytickou kolonu je C18. Autoři článků [24][25][61] využívají pro analýzu také záchytnou kolonu, jejíž stacionární fázi (SF) je C18. Ve většině případů je jako mobilní fáze (MF) použita kombinace vody a acetonitrilu s různou koncentrací kyseliny mravenčí, nejčastěji 0,1% FA v H<sub>2</sub>O a 0,1% FA v ACN. Veškeré uvedené metody využívají gradientovou eluci. Doba analýzy se pohybuje v rozmezí 6 až 30 min.

Pro detekci byla nejčastěji volena tandemová hmotnostní spektrometrie, avšak využita byla také vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) [24][26].

Tab. 5: Publikované metody zabývající se analýzou insulinu a jeho analogů. UHPLC – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie, HRMS – hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, SPE – extrakce na tuhou fázi, N/A – nedostupné, ACN – acetonitril, FA – kyselina mravenčí

technika	detekce	analyty	biologická matrice	příprava vzorku	LOD	vnitřní standard	kolona	mobilní fáze typ eluce	čas (min)	citace (rok)
UHPLC	MS/MS	aspart degludek detemir glargin glargin metabolit glulisin lispro	moč	imunopurifikace	<10 - 150 pg/ml	hovězí ins.	předkolona: Acquity Protein BEH C18, 2,1 x 5 mm kolona: UPLC Peptide BEH C18, 2,1 x 50 mm, 1,7µm	A: 0,2% FA v H <sub>2</sub> O B: 0,2% FA v ACN gradientová eluce	12,1	2018 [27]
HPLC	MS/MS	aspart degludek detemir glulisin humánní ins. lispro	moč	imunopurifikace	0,02 - 0,05 ng/ml	hovězí ins.	Zorbax 300SB-C18, 50 x 1 mm, 3,5 µm	A: 0,1% FA v H <sub>2</sub> O B: 0,1% FA v ACN gradientová eluce	21	2019 [28]
UHPLC	MS/MS	glargin lispro	krev	SPE	N/A	hovězí ins.	L-Column3 C18 Metal free, 150 x 2,1 mm, 3 µm	A: 0,1% FA v H <sub>2</sub> O B: 0,1% FA v ACN gradientová eluce	19	2023 [33]
UHPLC	HRMS	degludek	sérum	imunoprecipitace	120 pM	hovězí ins.	Pro Swift RP-4H LC, 1 x 50 mm	A: 0,2 % FA v H <sub>2</sub> O B: 0,2 %FA v ACN gradientová eluce	7,5	2020 [26]

Tab. 5: Publikované metody zabývající se analýzou insulinu a jeho analogů – pokračování. 2D-UHPLC – dvourozměrná ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie, 2D-LC – dvourozměrná kapalinová chromatografie, LC – kapalinová chromatografie MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie, PPT – proteinová precipitace, SPE – extrakce tuhou fází, N/A – nedostupné, ACN – acetonitril, FA – kyselina mravenčí, AcAc – kyselina octová, TFA – kyselina trifluoroctová

technika	detekce	analyty	biologická matrice	příprava vzorku	LOD *LLOQ	vnitřní standard	kolona	mobilní fáze	čas (min)	citace (rok)
2D-UHPLC	MS/MS	aspart detemir glargin glulisin humánní ins. lispro	plasma	PPT μSPE	*50 – 200 pg/ml	hovězí ins.	záchytná: XBridge C18 IS, 2.1 x 20 mm, 3,5 μm analytická: Cortecs C18+ 2,1 x 50 mm, 1,6 μm	A: 0,1% FA v H <sub>2</sub> O B: 0,1% FA v ACN gradientová eluce	6	2013 [25]
2D-LC	MS/MS	vepřový ins. lispro aspart glulisin glargin	nitrooční tekutina krev	PPT imunopurifikace	N/A	hovězí ins.	záchytná: Symmetry C18, 180 μm x 20 mm, 5 μm analytická: Thermo Easy C18-A2, 75 μm x 100 mm, 3 μm	A: 0,1% FA v H <sub>2</sub> O B: 0,1% FA v ACN gradientová eluce	30	2013 [61]
LC	MS/MS	aspart detemir glargin glulisin humánní ins. lispro	sérum	imunopurifikace	1,0 – 1,8 μU/ml	hovězí ins.	Zorbax Stable Bond guard, 1 x 17 mm, 5 μm analytická: Zorbax 300SB C18, 1 x 50 mm, 3,5 μm	MF A: 0,2% AcAc v H <sub>2</sub> O + 0,1% TFA v H <sub>2</sub> O MF B: 0,04% AcAc v ACN + 0,002% TFA v ACN gradientová eluce	10	2012 [21]

Tab. 5: Publikované metody zabývající se analýzou insulinu a jeho analogů – pokračování. HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie, LC – kapalinová chromatografie, IM-HRMS – hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a iontovou mobilitou, MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie, PPT – proteinová precipitace, SPE – extrakce na tuhou fázi, N/A – nedostupné, ACN – acetonitril, FA – kyselina mravenčí

technika	detekce	analyty	biologická matrice	příprava vzorku	LOD *LLOQ	vnitřní standard	kolona	mobilní fáze typ eluce	čas (min)	citace (rok)
HPLC	IM-HRMS	aspart detemir glargin glargin metabolit glulisin hovězí ins. humánní ins. lispro vepřový ins.	sérum plasma	PPT imunopurifikace	0,1 – 0,8 ng/ml	izotopově značený humánní ins.	záchytná: Symmetry C18, 180 µm x 20 mm, 5 µm analytická: Easy, 2 cm x 100 µm, 5 µm	A: 0,1% FA v H <sub>2</sub> O B: 0,1% FA v ACN gradientová eluce	8	2014 [24]
LC	MS/MS	humánní ins.	psí plasma	SPE	*38,46 pg/ml	glargin	Inter Sustain Bio C18, 100 x 2,1 mm, 1,9 µm)	A: 1% FA v ACN B: 1% FA v H <sub>2</sub> O gradientová eluce	6	2018 [23]
LC	MS/MS	hovězí ins. vepřový ins. aspart lispro detemir glulisin glargin degludek	N/A	ředění	N/A	N/A	Acquity UPLC CSH C18, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm	A: 0,1% FA v H <sub>2</sub> O B: 0,1% FA v ACN gradientová eluce	N/A	2016 [62]



## 4 Experimentální část

### 4.1 Přístrojové vybavení

- kapalinový chromatograf Acquity I-Class Plus: automatický dávkovač, 2x binární čerpadlo, 2x kolonový termostat (Waters, USA)
- hmotnostní spektrometr trojitý kvadrupól XEVO TQ-XS (Waters, USA)
- Positive Pressure – 96 Manifold (Waters, USA)
- analytické váhy Secura 225D-1CEU (Sartorius, Německo)
- ultrazvuková lázeň Kraintek 30 (Kraintek, Česká republika)
- chlazená centrifuga: Hettich zentrifugen, universal 320R (Hettich, Německo)
- vortex: Lab1st Vortex Mixer 3000rpm Fixed Speed Lab Vortex Shaker Touch & Continuous Function (Chromservis, Česká republika)
- software MassLynx ve verzi 4.1 (Waters, USA)

### 4.2 Stacionární fáze

- záchytná kolona: XBridge C18 IS, 2,1 x 20 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters, Irsko)
- analytické kolony:
  - Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Waters, Irsko)
  - Cortecs C18+, 2,1 x 50 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Waters, Irsko)
  - Luna Omega C18, 2,1 x 150 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA)
  - ACQUITY UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters, Irsko)
  - Kinetex C18 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA)

### 4.3 Standardy látek

#### 4.3.1 Standardy insulinů

- insulin lispro (Merck, Německo)
- humánní insulin (TRC, Kanada)
- insulin aspart (LGC, Německo)
- insulin glargin (TRC, Kanada)
- insulin glulisin (léčivý přípravek Apidra, Německo)

- insulin detemir (léčivý přípravek Levemir, Dánsko)
- insulin degludek (léčivý přípravek Tresiba, Dánsko)
- vnitřní standard: vepřový insulin (TRC, Kanada)
- vnitřní standard: hovězí insulin (TRC, Kanada)

#### 4.3.2 Referenční standard biologických vzorků

- syntetická plasma (Artificial Plasma Fluid BZ273, Biochemazone, Kanada)

#### 4.4 Rozpouštědla a aditiva

- demineralizovaná voda (vyráběna stanicí Aqual 300 MB profi, Německo)
- acetonitril, LC-MS čistota (ACN) (VWR, Polsko)
- methanol, LC-MS čistota (MeOH) (VWR, Polsko)
- kyselina mravenčí, LC-MS čistota,  $\geq 99\%$  (FA) (VWR, Polsko)
- kyselina octová, LC-MS čistota,  $\geq 99\%$  (AcAc) (VWR, Polsko)
- 25% hydroxid amonný ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (Sigma-Aldrich, Německo)
- stabilizační činidlo: bovinní albumin frakce V (Serva, Německo)

#### 4.5 Další pomůcky

- automatické piety se špičkami (Eppendorf, Česká republika)
- vialky LCGC Certified Clear Glass (Waters, USA)
- vialky TruView pH Control LC MS Certified Clear Glass (Waters, USA)
- vialky Qiuck Thread, Maximum Recovery (Waters, USA)
- eppendorfky Lo Biond Tube (Eppendorf, USA)
- $\mu\text{SPE}$  kolonky: OASIS MAX uElution 96-well Plate (Waters, USA)
- extrakční destičky Quan Recovery (Waters, Irsko)

#### 4.6 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky standardů insulinů byly připraveny navážením jednotlivých standardů (aspart, lispro, glargin, humánní insulin) a vnitřních standardů (vepřový a hovězí insulin). Insuliny detemir, degludek a glulisin byly připraveny naředěním z insulinových per. Všechny insuliny byly připraveny do DNA LoBind Tube

ependorfek. Výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Výjimkou byl hovězí insulin, který byl připraven o koncentraci 1,275 mg/ml. Injekční roztoky obsahovaly různé množství daného insulinu, což bylo zjištěno z SPC letáku insulinů. Jako rozpouštědlo byla použita 0,02% kyselina mravenčí ve vodě a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v). Rozpouštědlo obsahovalo přídavek stabilizačního činidla bovinního albuminu o koncentraci 5 µg/ml. Takto připravené zásobní roztoky byly okamžitě uskladněny při teplotě -20 °C a -80 °C.

Pro kvantifikaci insulinu a jeho vybraných analogů byla použita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byla zvolena směs hovězího a vepřového insulinu o koncentraci 100 ng/ml. Směs byla připravena naředěním zásobních roztoků insulinů v rozpouštědle skládajícím se z 0,02% kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v). Rozpouštědlo obsahovalo také přídavek stabilizačního činidla bovinního albuminu o koncentraci 5 µg/ml.

## **4.7 Příprava kalibračních standardů a QC vzorků**

Pro vytvoření kalibračních standardů a QC vzorků bylo nejdříve nutné připravit směs všech insulinů (kromě IS) o koncentraci 100 ng/ml ve směsi obsahující 0,02% kyselinu mravenčí ve vodě a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v) s přídavkem stabilizačního činidla bovinního albuminu o koncentraci 5 µg/ml. Tento roztok byl poté dále ředěný pomocí srážecího činidla obsahujícího 1% AcAc v MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (49,25:49,25:0,5) na požadované koncentrace kalibračních standardů – 2,5; 5; 10; 15; 25; 50; 100; 150; 250; 500; 1000; 1500; 2500; 5000; 10000; 15000 pg/ml a QC vzorků – 200, 800, 2000, 8000 pg/ml.

## **4.8 Optimalizace nastavení MS**

### **4.8.1 MS sken a výběr prekurzorových iontů**

Pro nalezení vhodných prekurzorových iontů byly provedeny MS skeny pro všechny insuliny včetně vnitřních standardů. Jednotlivé analyty byly rozpuštěny a naředěny ve vodě a výsledná koncentrace takto připravených roztoků byla 10 ng/ml. Experiment byl prováděn pomocí 1D chromatografie s MS detekcí na koloně Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6 µm. Jako mobilní fáze byla použita

0,1% kyselina mravenčí ve vodě a 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Podmínky gradientové eluce jsou uvedené v Tab. 6. Nastavení MS je uvedeno v Tab. 7.

Tab. 6: Nastavení gradientové eluce (převzato z AL Waters [1])

čas	průtok (ml/min)	% MF A	% MF B
0	0,250	80	20
2	0,250	35	65
2,1	0,250	2	98
2,6	0,250	2	98
2,7	0,250	80	20
4,6	0,250	80	20

Tab. 7: Nastavení iontového zdroje MS pro nastavení SIM přechodů (převzato z AL Waters [1])

podmínky hmotnostní analýzy, převzato z AL	
polarita	ESI <sup>+</sup>
napětí na vstupním kapiláře (kV)	3,0
desolvatační teplota (°C)	600
průtok plynu na vstupním kuželu (l/hod)	150
průtok desolvatačního plynu (l/hod)	1000

#### 4.8.2 Nastavení SRM přechodů

SRM přechody byly optimalizovány výběrem prekurzorových iontů a proměřením fragmentačních spekter insulinů. Jako kolizní plyn byl použit argon. Kolizní energie pro jednotlivé prekurzorové ionty insulinů byla testována v rozpětí 10 až 100 eV. Jednotlivé analyty byly rozpuštěny a naředěny ve vodě a výsledná koncentrace takto připravených roztoků byla 10 ng/ml. Poté byla použita post kolonová infuze těchto připravených standardů (0,1 ml/min) do průtoku 0,2 ml/min mobilní fáze složky A 0,1% FA v H<sub>2</sub>O a složky B 0,1% FA v ACN 50:50. Pro nalezení nejintenzivnějších SRM přechodů byly fragmentovány všechny prekurzorové ionty uvedené v Tab. 8. Kolizní energie byla optimalizována tak, aby bylo dosaženo co nejintenzivnějšího signálu.

Tab. 8: Nejintenzivnější prekurzorové ionty insulinů určené k fragmentaci pro optimalizaci SRM přechodů

insulin	molekulová hmotnost (Da)	prekurzorový iont (m/z)	typ prekurzoru
aspart	5821,6030	1458	[M+4H] <sup>4+</sup>
		1166	[M+5H] <sup>5+</sup>
		972	[M+6H] <sup>6+</sup>
glargin	6058,8092	1011	[M+6H] <sup>6+</sup>
		867	[M+7H] <sup>7+</sup>
		759	[M+8H] <sup>8+</sup>
hovězí (IS)	5729,5922	1148	[M+5H] <sup>5+</sup>
		956	[M+6H] <sup>6+</sup>
humánní	5803,6288	1163	[M+5H] <sup>5+</sup>
		969	[M+6H] <sup>6+</sup>
lispro	5803,6288	1453	[M+4H] <sup>4+</sup>
		1163	[M+5H] <sup>5+</sup>
		969	[M+6H] <sup>6+</sup>
vepřový (IS)	5773,6183	1157	[M+5H] <sup>5+</sup>
		964	[M+6H] <sup>6+</sup>
glulisin	5818,6284	1165	[M+5H] <sup>5+</sup>
		972	[M+6H] <sup>6+</sup>
detemir	5912,7790	1480	[M+4H] <sup>4+</sup>
		1184	[M+5H] <sup>5+</sup>
		987	[M+6H] <sup>6+</sup>
degludek	6099,8268	1221	[M+5H] <sup>5+</sup>
		1018	[M+6H] <sup>6+</sup>

#### 4.8.3 Ověření selektivity SRM přechodů insulinů

Ověření selektivity SRM přechodů bylo provedeno za účelem zjistit, že SRM přechod, který bude použit pro kvantifikaci je pro daný insulin specifický. Selektivní SRM přechod insulinů neovlivňuje plochu píku dalších insulinů, a tedy nepřispívá ke koncentraci dalších insulinů v multi-metodě analýzy.

Všechny insuliny byly samostatně připraveny do vialek o koncentraci 7 ng/ml a rozpuštěny v roztoku 6,7% kyseliny octové ve směsi vody a methanolu (60:40, v/v) a převedeny do vialky k analýze. Jedná se o složení rozpouštědel po  $\mu$ SPE extrakci, a tedy stejné jako po úpravě reálných vzorků plasmy. Každý insulin byl následně měřen 3x s využitím optimalizovaných SRM přechodů samotného analytu a zároveň s optimalizovanými SRM přechody ostatních insulinů, které však nebyly obsaženy ve vzorku. V Tab. 9 jsou uvedeny použité SRM přechody insulinů v rámci testu selektivity.

Tab. 9: Optimalizované SRM přechody a kolizní energie pro insulin a jeho analoga

insulin	prekurzorový iont (m/z)	produktový iont(m/z)	napětí na vstupním kuželu (V)	kolizní energie (eV)
aspart	1457,2	136,0	30	70
		129,3		90
		110,2		80
	1166,0	136,0		90
		129,0		70
		120,0		90
		110,0		90
		86,0		90
		84,0		90
	972,0	136,0		50
		129,0		20
		120,0		60
		110,0		60
		86,0		50
		84,0		60
glargin	1011,3	1179	60	25
		143,2		60
		136,2		60
		120,2		80
		110,2		80
		86,2		70
	867,0	136,2		40
		120,2		80
		110,1		70
		86,2		70
	758,8	136,1		60
hovězí (IS)	1147,6	226,2	60	40
		136,0		50
		129,1		60
	956,5	1121,0		18
		226,2		40
		136,1		50
humánní	1162,4	226,2	30	47
		136,1		90
		129,0		60
	968,9	226,2		40
		136,1		50
		129,0		60
	120,1	75		
lispro	1452,6	217,2	60	50
		136,2		70
	1162,3	217,2		40
		143,2		70
		136,1		60
	968,8	217,2		40
		136,1		40
		86,2		70

Tab. 9: Optimalizované SRM přechody a kolizní energie pro insulin a jeho analogy - pokračování

insulin	prekurzorový iont (m/z)	produktový iont (m/z)	napětí na vstupním kuželu (V)	kolizní energie (eV)
vepřový (IS)	1156,3	1383,4	60	28
		1378,0		28
		315,2		35
		136,1		70
		86,2		80
	963,8	171,1		40
		143,2		70
		136,2		65
		84,0		70
		glulisin		1165,5
1370,1	20			
1161,8	20			
346,2	26			
120,1	30			
971,5	1370,1		18	
	1141,6		14	
	227,2		30	
	136,1		40	
	120,1		50	
detemir	1480,0	454,4	50	40
	1184,4	1366,7		20
		1180,7		17
		454,4		30
	987,2	454,4		30
		136,1		60
degludek	1221,8	1366,6	30	24
		641,4		32
	1017,4	136,1		60
		120,1		70

#### 4.8.4 Nastavení parametrů iontového zdroje

Optimalizace podmínek iontového zdroje byla provedena tak, aby bylo dosaženo co nejlepší citlivosti stanovení směsi všech insulinů v reálných vzorcích plasmy.

Byly optimalizovány parametry: napětí na vstupní kapiláře, desolvatační teplota, průtok plynu na vstupním kuželu, průtok desolvatačního plynu a teplota iontového zdroje. V Tab. 10 je uveden rozsah hodnot měněných a sledovaných parametrů.

Tab. 10: Rozmezí sledovaných parametrů optimalizace nastavení iontového zdroje

parametr	sledované rozmezí
napětí na vstupní kapiláře (kV)	0,5 – 3,5
desolvatační teplota (°C)	350 – 650
průtok plynu na vstupním kuželu (l/hod)	150 – 350
průtok desolvatačního plynu (l/hod)	600 – 1200
teplota zdroje (°C)	100 – 150

Pro nalezení nejvhodnějších podmínek a dosažení nejlepší citlivosti, byla vytvořena směs insulinů včetně IS: aspart, glargin, glulisin, detemir, degludek, hovězího a vepřového o koncentraci 10 ng/ml v rozpouštědle obsahujícím 6,7% kyselinu octovou ve směsi vody a methanolu (60:40, v/v). Insulin lispro a humánní insulin byly z důvodu vzájemné interference připraveny zvlášť o koncentraci 10 ng/ml do vialek v totožném rozpouštědle. Pro kvantifikaci byly použity SRM přechody uvedené v Tab. 11. Analýza probíhala za využití mobilní fáze složené ze složky A 0,1% FA v H<sub>2</sub>O a složky B 0,1% FA v ACN. Podmínky gradientové eluce jsou uvedeny v Tab. 6. Měření probíhalo 2x vždy postupnou změnou pouze jediného MS parametru v čase.

Tab. 11: Selektivní SRM přechody insulinu a jeho analogů

insulin	prekurzorový iont (m/z)	produktový iont (m/z)	napětí na vstupním kuželu (V)	kolizní energie (eV)
aspart	1166,0	136,0	30	90
		120,0		90
		84,0		90
	972,0	136,0	50	
glargin	1011,3	110,2	60	80
	867,0	136,2		40
		120,2		80
		110,1		70



Tab. 11: Selektivní přechody insulinu a jeho analogů - pokračování

insulin	prekurzorový iont (m/z)	produktový iont (m/z)	napětí na vstupním kuželu (V)	kolizní energie (eV)
humánní	1162,4	136,1	30	90
		129,0		60
	1162,0	226,0	50	40
	968,9	136,1	30	50
120,1		75		
lispro	1162,3	217,2	60	40
		136,1		60
	1162,0	217	50	40
	968,8	136,1	60	40
86,2		70		
glulisin	1165,5	1370,1	30	20
		346,2		26
	971,5	136,1		40
detemir	1184,4	1366,7	50	20
		1180,7		17
		454,4		30
	987,2	136,1		60
degludek	1221,8	1366,6	30	24
		641,4		32
	1027,4	136,1		60
		120,1		70
hovězí (IS)	1147,6	136,0	60	50
		129,1		60
	956,5	226,2		40
		136,1		50
vepřový (IS)	1156,3	136,1	60	70
		86,2		80
	963,8	136,2		65
		84,0		70

#### 4.8.4.1 Porovnání odezvy detektoru při nastavení MS dle AL Waters a manuálního nastavení

Protože hodnoty nastavení MS detektoru uvedené v AL Waters (Tab. 7) byly odlišné od hodnot experimentálně optimalizovaných (Tab. 12) bylo provedeno porovnání odezvy detektoru.

Tab. 12: Optimalizované nastavení podmínek iontového zdroje pro UHPLC-MS analýzu insulinu a jeho analogů

polarita	ESI <sup>+</sup>
napětí na kapiláře (kV)	1,5
desolvatační teplota (°C)	600
průtok plynu na vstupním kuželu (l/hod)	150
průtok desolvatačního plynu (l/hod)	700
teplota zdroje (°C)	150

Důležité je také zmínit, že se jednalo o rozdílné typy detektorů typu trojitých kvadrupólů. Waters v AL využíval Xevo TQ-S a námi nově vyvíjená metoda byla analyzována pomocí XEVO TQ-XS detektoru. Z tohoto důvodu se parametry v nastavení mohou lišit. Příprava vzorku pro toto porovnání probíhala dle popisu v kapitole 4.7.4. Měřeno bylo SRM přechody uvedené v Tab. 8. Analýza probíhala vždy ve třech opakováních.

#### 4.8.5 SRM přechody insulinů pro optimalizaci složení MF

V rámci testování složení MF byly analýzy prováděny za využití vybraných SRM přechodů insulinů uvedených v Tab. 13

Tab. 13: Vybrané SRM přechody insulinů pro optimalizaci složení MF

insulin	prekurzorový iont (m/z)	produktový iont (m/z)	napětí na vstupním kuželu (V)	kolizní energie (eV)
aspart	972,0	136,0	30	50
glargin	867,0	136,2	60	40
humánní	968,9	136,1	30	50
lispro	968,8	136,1	60	40

Tab. 13: Vybrané SRM přechody insulinů pro optimalizaci složení MF - pokračování

insulin	prekurzorový iont (m/z)	produktový iont (m/z)	napětí na vstupním kuželu (V)	kolizní energie (eV)
glulisin	1165,5	1370,1	30	20
detemir	987,2	136,1	50	60
degludek	1027,4	136,1	30	60
hovězí	956,5	136,1	60	50
vepřový	963,8	136,2	14	22

#### 4.8.6 Optimalizace nastavení MS/MS metody

V Tab. 12 jsou uvedeny optimalizované parametry nastavení iontového zdroje. SRM přechody využívané pro identifikaci (tučně nezvýrazněné) a kvantifikaci (tučně zvýrazněné) jednotlivých analytů jsou uvedeny v Tab. 14, společně s nastavením napětí na vstupním kuželu (CV) a kolizní energií (CE).

Tab. 14: SRM přechody pro UHPLC-MS/MS analýzu insulinu a jeho analogů. Tučně zvýrazněné – kvantifikační přechody, tučně nezvýrazněné – identifikační přechody

insulin	molekulová hmotnost (Da)	prekurzorový iont (m/z)	náboj	fragment (m/z)	napětí na vstupním kuželu (V)	kolizní energie (eV)
aspart	5821,6030	<b>972,0</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>136,0</b>	30	50
		972,0	[M+6H] <sup>6+</sup>	661,2		
glargin	6058,8092	<b>867,0</b>	<b>[M+7H]<sup>7+</sup></b>	<b>136,2</b>	60	40
		1011,3	[M+6H] <sup>6+</sup>	1179,0		25
hovězí	5729,5922	<b>956,5</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>136,1</b>	60	50
		<b>956,5</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>1121,0</b>		18
humánní	5803,6288	<b>968,9</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>136,1</b>	30	50
		1162,4	[M+5H] <sup>5+</sup>	226,0		47
lispro	5803,6288	<b>968,8</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>136,1</b>	60	40
		1162,3	[M+5H] <sup>5+</sup>	217,2		40
vepřový	5773,6183	<b>1156,3</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>315,2</b>	60	35

Tab 14: SRM přechody pro UHPLC-MS/MS analýzu insulinu a jeho analogů. Tučně zvýrazněné – kvantifikační přechody, tučně nezvýrazněné – identifikační přechody - pokračování

glulisin	5818,6284	<b>1165,5</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>1370,1</b>	30	20
		1165,5	[M+5H] <sup>5+</sup>	346,2		26
detemir	5912,7790	<b>1184,4</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>454,4</b>	50	30
		1184,4	[M+5H] <sup>5+</sup>	1366,7		20
degludek	6099,8268	<b>1221,8</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>1366,6</b>	30	24
		1221,8	[M+5H] <sup>5+</sup>	641,4		32

## 4.9 Optimalizace nastavení UHPLC metody

V dříve prováděných experimentech v rámci bakalářské práce zabývající se tímto tématem se pomocí 1D chromatografie nepodařila separace všech insulinů a citlivost metody byla nedostačující [2]. Pro dosažení větší citlivosti a docílení separace všech insulinů byl vývoj v této práci metody prováděn pomocí 2D chromatografie využívající záchytnou a analytickou kolonu.

### 4.9.1 Volba stacionární fáze

Pro tyto experimenty byla vytvořena směs insulinů a vnitřních standardů o koncentraci 10 ng/ml. Jako záchytná kolona byla použita vždy XBridge IS C18, 2,1 x 20 mm, 3,5 μm. Pro dosažení separace všech insulinů byly testovány různé analytické kolony. Složení mobilní fáze bylo pro všechny testované kolony stejné, aby bylo možné jednotlivé kolony mezi sebou porovnávat. Složení MF bylo převzato z AL Waters a obsahovalo MF A: 0,1% FA v H<sub>2</sub>O a MF B: 0,1% FA v ACN [1]. Nastavení MS vycházelo z Tab. 12.

V rámci optimalizace chromatografické separace byly testovány tyto analytické kolony:

- Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6 μm (Waters)
- Cortecs C18+, 2,1 x 50 mm, 1,6 μm (Waters)
- Luna Omega C18, 150 x 2,1 mm, 1,6 μm (Phenomenex)
- ACQUITY UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7 μm (Waters)
- Kinetex C18 100 x 2,1 mm, 1,7 μm (Phenomenex)

V rámci dosažení separace bylo testováno také různé nastavení gradientové eluce. Stejně nastavení gradientové eluce bylo vždy aplikováno na všechny kolony,

aby následně bylo možné jednotlivé kolony mezi sebou porovnat. Tab. 15 a Tab. 16 příklad jednoho z nastavení podmínek gradientové eluce.

Tab. 15: Nastavení gradientové eluce  $\alpha$  pumpy pro volbu stacionární fáze

$\alpha$ pumpa			
čas (min)	průtok (ml/min)	% A	% B
0,0	0,1	85	15
2,5	0,1	85	15
4,0	0,1	10	90
6,0	0,1	10	90
6,1	0,1	85	15
8,5	0,1	85	15

Tab. 16: Nastavení gradientu eluce  $\beta$  pumpy pro volbu stacionární fáze

$\beta$ pumpa			
čas (min)	průtok (ml/min)	% A	% B
0,0	0,2	75	25
7,1	0,2	5	95
9,1	0,2	5	95
9,2	0,2	75	25

#### 4.9.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Pro dosažení separace byly postupně připravovány nejrůznější MF s rozdílnou koncentrací kyseliny mravenčí ve vodném i organickém rozpouštědle. Složení testovaných mobilních fází je uvedeno v Tab. 17 a Tab. 18. Optimalizace složení mobilní fáze probíhalo za použití nejlépe hodnocených kolon (nejlepší rozlišení): záchytná kolona XBridge C18, 2,1 x 20 mm, 3,5  $\mu$ m (Waters) a analytická kolona Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu$ m (Waters).

Tab. 17: Složení testovaných vodných mobilních fází (MF A 1-6)

název	složení	aditivum
MF A1	H <sub>2</sub> O	0,1% FA
MF A2	H <sub>2</sub> O	0,2% FA
MF A3	H <sub>2</sub> O	0,3% FA
MF A4	H <sub>2</sub> O	0,5% FA
MF A5	H <sub>2</sub> O	0,7% FA
MF A6	H <sub>2</sub> O	0,8% FA

Tab. 18: Složení testovaných organických mobilních fází (MF B 1-10)

název	složení	aditivum
MF B1	ACN	0,1% FA
MF B2	MeOH:ACN (50:50)	0,1% FA
MF B3	MeOH:ACN (10:90)	0,1% FA
MF B4	MeOH:ACN (1:99)	0,1% FA
MF B5	MeOH:ACN (1:99)	0,2% FA
MF B6	MeOH:ACN (1:99)	0,3% FA
MF B7	MeOH:ACN (1:99)	0,4% FA
MF B8	MeOH:ACN (1:99)	0,5% FA
MF B9	ACN	0,5% FA
MF B10	ACN	0,7% FA

Nastavení gradientové eluce bylo vždy stejné a je uvedeno v Tab. 15 a Tab. 19. Podmínky pro hmotnostní spektrometr byly nastaveny dle Tab. 12 a měřeny byly pouze vybrané SRM přechody uvedené v Tab. 13.

Tab. 19: Nastavení gradientové eluce  $\beta$  pumpy pro optimalizaci složení MF

$\beta$ pumpa			
čas (min)	průtok (ml/min)	% A	% B
0,0	0,3	75	25
6,1	0,3	75	25
8,0	0,3	60	40
8,5	0,3	5	95
9,5	0,3	5	95
9,6	0,3	75	25
11,2	0,3	75	25

### 4.9.3 Finální nastavení UHPLC metody

#### Záchytná a analytická kolona

Ve 2D chromatografické separaci byla jako záchytná kolona použita XBridge C18, 2,1 x 20 mm, 3,5  $\mu$ m (Waters) a jako analytická kolona byla zvolena Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu$ m (Waters).

### Mobilní fáze

Mobilní fáze pro gradientovou eluci obsahovala vodnou složku MF A 0,8% kyselinu mravenčí ve vodě a organickou složku MF B složku 0,7% kyselinu mravenčí v acetonitrilu.

### Nastavení chromatografických podmínek

Analyty insulinu jsou nejdříve zachyceny na záchytné koloně po dobu 2 minut a poté dojde k přepnutí ventilu toku MF, což zahájí vymývání analytů ze záchytné kolony na analytickou kolonu, kde probíhá samotná separace.

Nastavení gradientové eluce  $\alpha$  pumpy, která provádí gradient pro záchytnou kolonu, je uvedeno v Tab. 15. Gradient mobilní fáze pro analytickou kolonu v zapojení vymývání ze záchytné kolony na analytickou kolonu udává gradient eluce  $\beta$  pumpy, který je uveden v

Tab. 20. Nastříkováno je 30  $\mu$ l vzorku. Teplota kolony je 60 °C a teplota autosampleru je 6 °C.

Tab. 20: Nastavení gradientové eluce  $\beta$  pumpy. A: 0,8% FA v H<sub>2</sub>O a B: 0,7% FA v ACN

$\beta$ pumpa			
čas (min)	průtok (ml/min)	% A	% B
0,0	0,3	75	25
6,1	0,3	75	25
7,5	0,3	50	50
8,0	0,3	5	95
9,5	0,3	5	95
9,6	0,3	75	25
11,0	0,3	75	25

## 4.10 Úprava vzorků plasmy

Reálné vzorky byly dodány z Ústavu soudního lékařství v Ostravě. Úprava vzorku byla převzata z aplikačního listu Waters [1].

Analýza byla provedena za podmínek pro kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr popsanych v kapitole 4.8.6 a 4.9.3.

#### 4.10.1 Proteinová precipitace

Do eppendorffky bylo napipetováno: 25  $\mu$ l směsi vnitřních standardů a poté bylo dle typu připravovaného vzorku přidáno:

1. vzorek prázdné syntetické plasmy: 250  $\mu$ l komerční syntetické prázdné plasmy, 250  $\mu$ l srážecí směsi obsahující 1% kyselinu octovou v methanolu a acetonitrilu (1% AcAc v MeOH:ACN, 50:50, v/v)

Vzorky kalibračních standardů, QC vzorky a vzorky plasmy pacientů byly přichystány totožným způsobem. Následně byly vzorky krátce vortexovány a centrifugovány 10 min při 13 000 ot./min.

#### 4.10.2 Převedení analytů na anionty

Ze všech eppendorfek připravených v kapitole 4.9.1 bylo odebráno 400  $\mu$ l do nové eppendorfky, která obsahovala 900  $\mu$ l 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  ve vodě. Vzorky byly poté krátce vortexovány.

#### 4.10.3 $\mu$ -SPE extrakce

Sada 96  $\mu$ SPE kolonek Oasis Max byla nejdříve kondicionována 200  $\mu$ l methanolu a ekvilibrována 200  $\mu$ l vody. Dalším krokem bylo nanesení vzorku na kolonky, a to 2x 600  $\mu$ l ze vzorků připravených v kapitole 4.10.2. Následovalo promytí 200  $\mu$ l 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  ve vodě a 200  $\mu$ l 5% MeOH obsahující 1% AcAc. Analyty byly eluovány 2 x 25  $\mu$ l směsi MeOH:H<sub>2</sub>O:AcAc (60:30:10, v/v/v) do extrakční destičky Quan Recovery (Waters). 30  $\mu$ l bylo nastříkováno na záchytnou kolonu a analyzováno pomocí LC-MS/MS za podmínek uvedených v kapitole 4.8.6 a 4.9.3.

#### 4.11 Hodnocení adsorpce analytů na vialky

Cílem těchto experimentů bylo zjistit míru adsorpce insulinů na povrchu tří typů vialek. Pro test byly vybrány 3 druhy vialek (Tab. 21).



Tab. 21: Specifikace testovaných vialek

číslo vialky	název	velikost	objem
1	LCGC Certified Clear Glass (Waters)	12 x 32 mm	2 ml
2	TruView pH Control LC MS Certified Clear Glass (Waters),	12 x 32 mm	2 ml
3	Quick Thread, Maximum Recovery (Waters)	12 x 32 mm	2 ml

Pro testování byla připravena směs všech insulinů o koncentraci 15 ng/ml v rozpouštědle obsahujícím 6,7% kyselinu octovou ve směsi vody a methanolu (60:40, v/v). Následně byla směs přepipetována do 3 výše uvedených vialek (Tab. 21) a analyzována pomocí UHPLC-MS/MS. Tento experiment byl proveden před optimalizací chromatografické metody. Z tohoto důvodu byl humánní insulin a insulin lispro připraveny do vialek samostatně, a nikoliv ve směsi.

Podmínky nastavení hmotnostního spektrometru jsou uvedeny v Tab. 7. Stejná směs insulinů byla měřena pouze SRM přechody humánního insulinu a poté přechody insulinu lispro, aby nedošlo ke koeluci. Jako mobilní fáze byla použita složka A: 0,1% FA v H<sub>2</sub>O a složka B: 0,1% FA v ACN. Nastavení gradientové eluce je popsáno v Tab. 22 a Tab. 23.

Tab. 22: Nastavení isokratické eluce  $\alpha$  pumpy pro test vialek

$\alpha$ pumpa			
čas (min)	průtok	% A	% B
0,0	0,05	80	20

Tab. 23: Nastavení gradientové eluce  $\beta$  pumpy pro test vialek

$\beta$ pumpa			
čas (min)	průtok (ml/min)	% A	% B
0,0	0,2	80	20
2,0	0,2	35	65
2,1	0,2	2	98
2,6	0,2	2	98
3,0	0,2	80	20
5,0	0,2	80	20

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Optimalizace nastavení MS metody

#### 5.1.1 MS sken a výběr prekurzorových iontů

Výběr prekurzorových iontů byl proveden na základě proměření MS skenu jednotlivých standardů insulinů, jak je popsáno v kapitole 4.8.1. Skenování bylo prováděno vždy v rozpětí hodnot 50 až 1500  $m/z$ . U všech analytů byly v MS spektru pozorovány několikanásobně nabitě ionty. Přehled všech několikanásobně nabitých iontů, včetně jejich hodnot  $m/z$ , uvádí Tab. 24. Pro insulin lispro a humánní insulin byly nalezeny stejné hodnoty  $m/z$  prekurzorových iontů, konkrétně  $m/z = 1453 [M+4H]^{4+}$ ,  $m/z = 1163 [M+5H]^{5+}$  a  $m/z = 969 [M+6H]^{6+}$ . Totožný prekurzorový iont byl nalezen také pro dvojici insulinů aspart a glulisin, kdy se jedná o hodnotu  $m/z = 972 [M+6H]^{6+}$ . Pro dvojici insulinu lispro a humánního insulinu je to způsobeno stejnou molekulovou hmotností látek. MS skeny pro jednotlivé insuliny jsou uvedeny na Obr. 12 až Obr. 15.

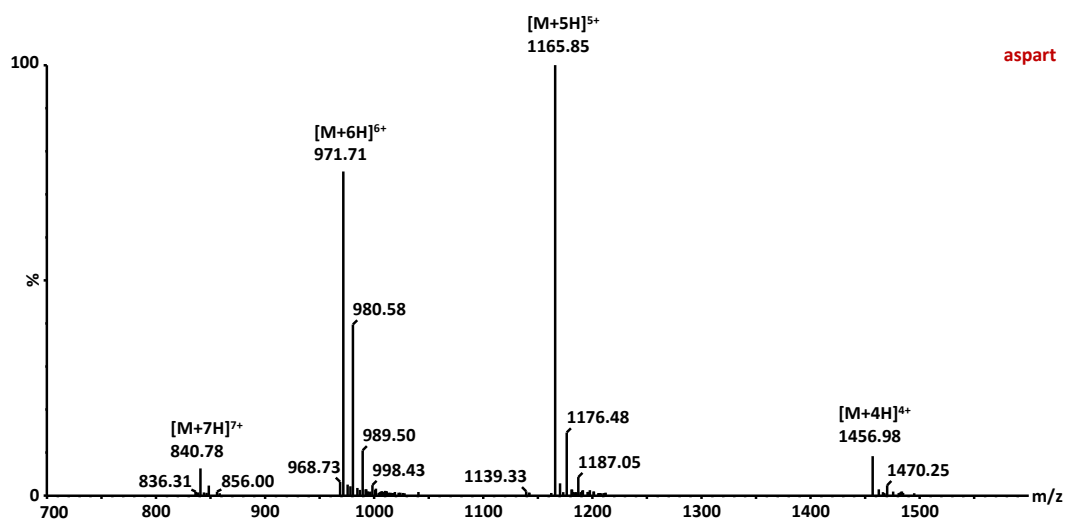
Tučně zvýrazněné prekurzorové ionty v Tab. 24 představují 2 až 3 neintenzivnější prekurzorové ionty, pro které byla optimalizována hodnota napětí na vstupním kuželu. Výsledné hodnoty tohoto napětí se pohybovaly v rozmezí 30 až 60 V pro jednotlivé insuliny a jsou uvedeny také v Tab. 24. Tučně zvýrazněné prekurzorové ionty byly následně fragmentovány pro volbu fragmentů pro SRM přechody.

Tab. 24: Experimentálně nalezené prekurzorové ionty insulinu a jeho analogů

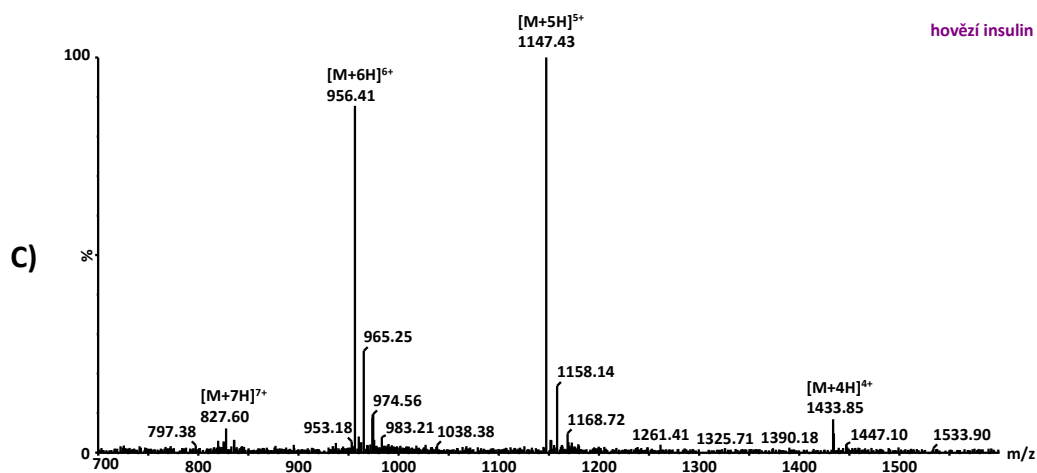
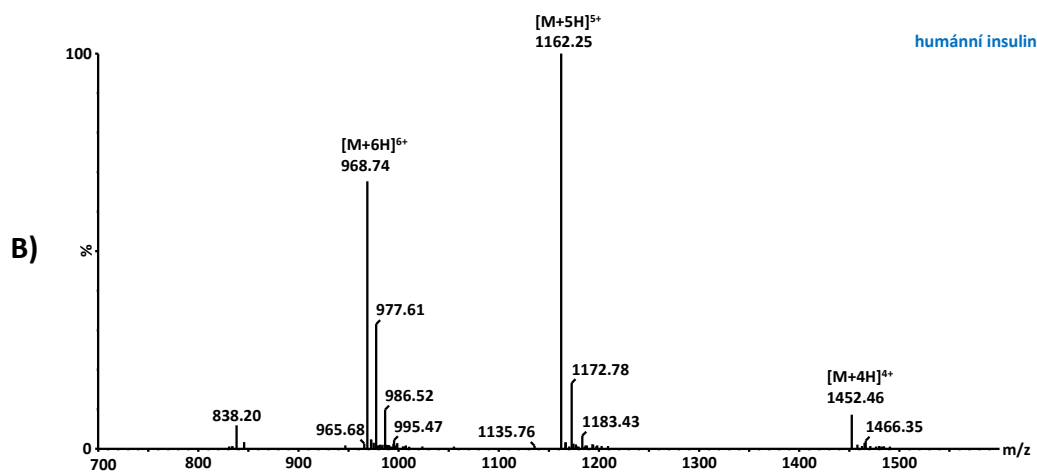
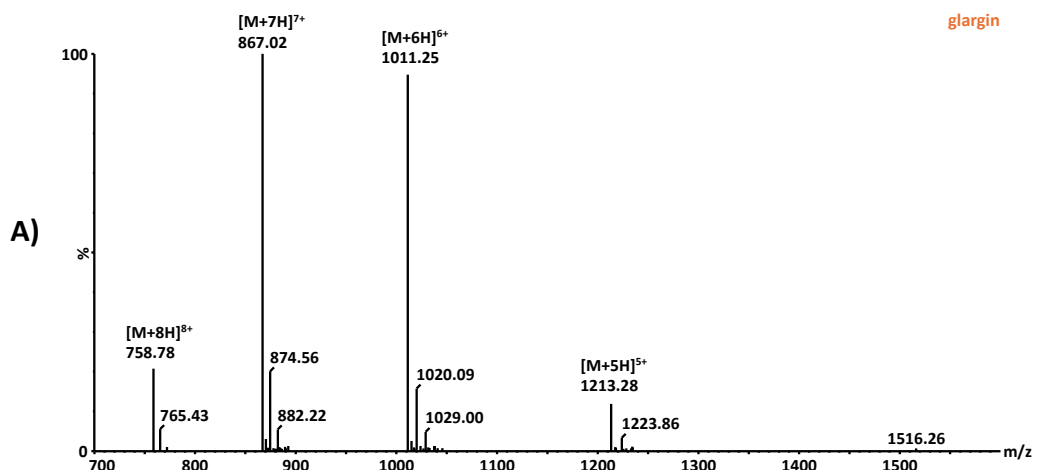
insulin	molekulová hmotnost (Da)	prekurzorový iont ( $m/z$ )	typ prekurzoru	intenzita	napětí na vstupním kuželu (V)
aspart	5821,6030	<b>1458</b>	<b><math>[M+4H]^{4+}</math></b>	<b><math>1,07 \times 10^7</math></b>	30
		<b>1166</b>	<b><math>[M+5H]^{5+}</math></b>	<b><math>1,01 \times 10^8</math></b>	
		<b>972</b>	<b><math>[M+6H]^{6+}</math></b>	<b><math>2,34 \times 10^8</math></b>	
		841	$[M+7H]^{7+}$	$1,11 \times 10^7$	
glargin	6058,8092	1213	$[M+5H]^{5+}$	$2,37 \times 10^6$	60
		<b>1011</b>	<b><math>[M+6H]^{6+}</math></b>	<b><math>1,44 \times 10^7</math></b>	
		<b>867</b>	<b><math>[M+7H]^{7+}</math></b>	<b><math>3,28 \times 10^7</math></b>	
		<b>759</b>	<b><math>[M+8H]^{8+}</math></b>	<b><math>1,01 \times 10^7</math></b>	

Tab. 26: Experimentálně nalezené prekurzorové ionty insulinu a jeho analogů - pokračování

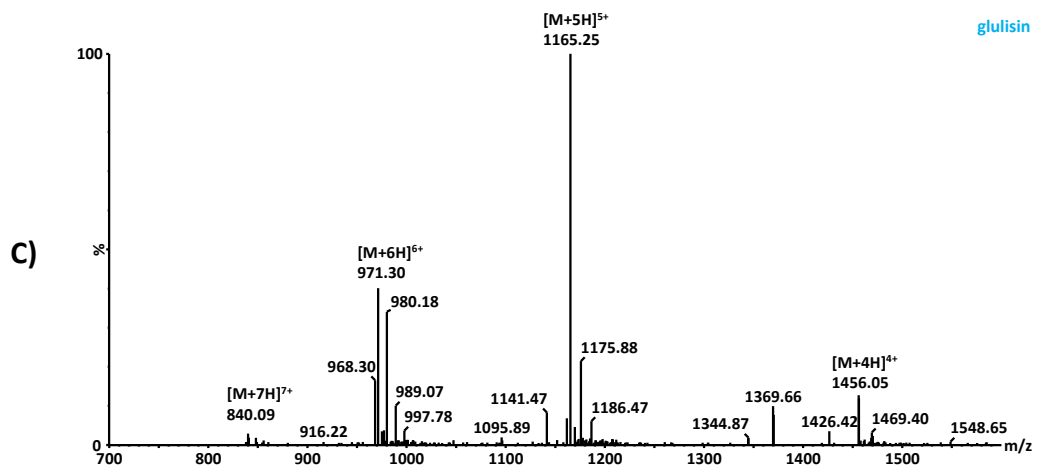
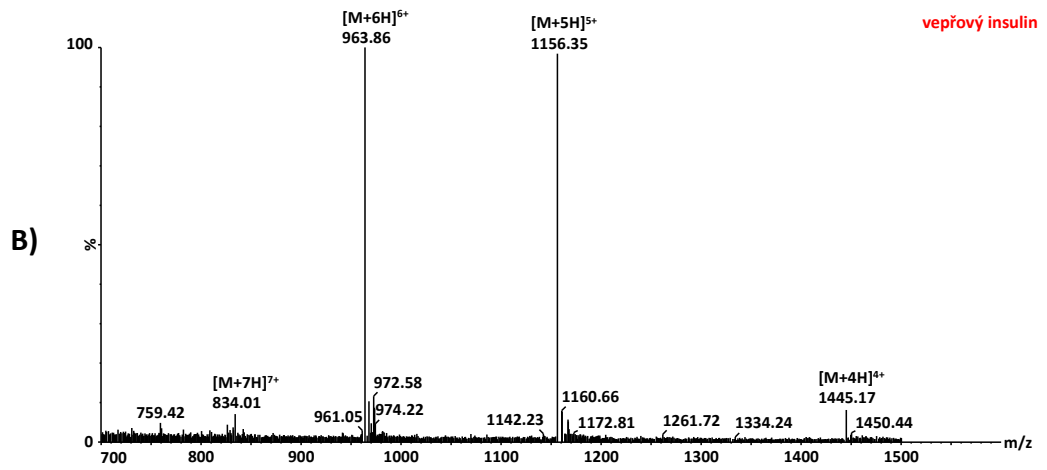
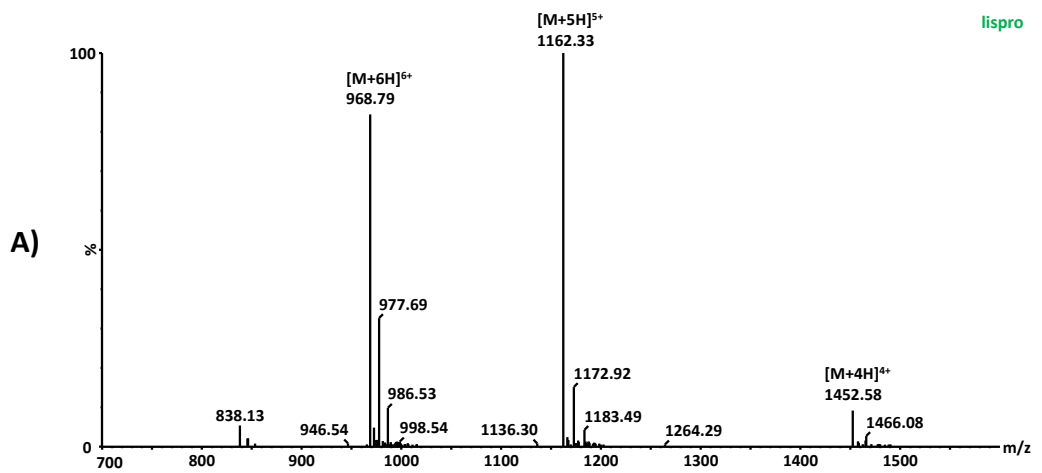
insulin	molekulová hmotnost (Da)	prekurzorový iont (m/z)	typ prekurzoru	intenzita	napětí na vstupním kuželu (V)
hovězí	5729,5922	1434	[M+4H] <sup>4+</sup>	4,44 x 10 <sup>6</sup>	60
		<b>1148</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>1,01 x 10<sup>8</sup></b>	
		<b>956</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>8,26 x 10<sup>7</sup></b>	
		827	[M+7H] <sup>7+</sup>	6,03 x 10 <sup>6</sup>	
humánní	5803,6288	1453	[M+4H] <sup>4+</sup>	2,17 x 10 <sup>6</sup>	30
		<b>1163</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>5,06 x 10<sup>7</sup></b>	
		<b>969</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>3,54 x 10<sup>7</sup></b>	
		837	[M+7H] <sup>7+</sup>	2,68 x 10 <sup>6</sup>	
lispro	5803,6288	<b>1453</b>	<b>[M+4H]<sup>4+</sup></b>	<b>4,01 x 10<sup>6</sup></b>	60
		<b>1163</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>4,36 x 10<sup>7</sup></b>	
		<b>969</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>6,34 x 10<sup>7</sup></b>	
vepřový	5773,6183	1445	[M+4H] <sup>4+</sup>	3,12 x 10 <sup>6</sup>	60
		<b>1157</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>4,67 x 10<sup>7</sup></b>	
		<b>964</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>4,19 x 10<sup>7</sup></b>	
		834	[M+7H] <sup>7+</sup>	4,40 x 10 <sup>6</sup>	
glulisin	5818,6284	1457	[M+4H] <sup>4+</sup>	4,60 x 10 <sup>6</sup>	30
		<b>1165</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>7,01 x 10<sup>7</sup></b>	
		<b>972</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>6,96 x 10<sup>7</sup></b>	
		841	[M+7H] <sup>7+</sup>	6,95 x 10 <sup>6</sup>	
detemir	5912,7790	<b>1480</b>	<b>[M+4H]<sup>4+</sup></b>	<b>9,08 x 10<sup>6</sup></b>	50
		<b>1184</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>6,30 x 10<sup>7</sup></b>	
		<b>987</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>2,69 x 10<sup>7</sup></b>	
degludek	6099,8268	<b>1221</b>	<b>[M+5H]<sup>5+</sup></b>	<b>9,51 x 10<sup>7</sup></b>	30
		<b>1018</b>	<b>[M+6H]<sup>6+</sup></b>	<b>1,21 x 10<sup>7</sup></b>	



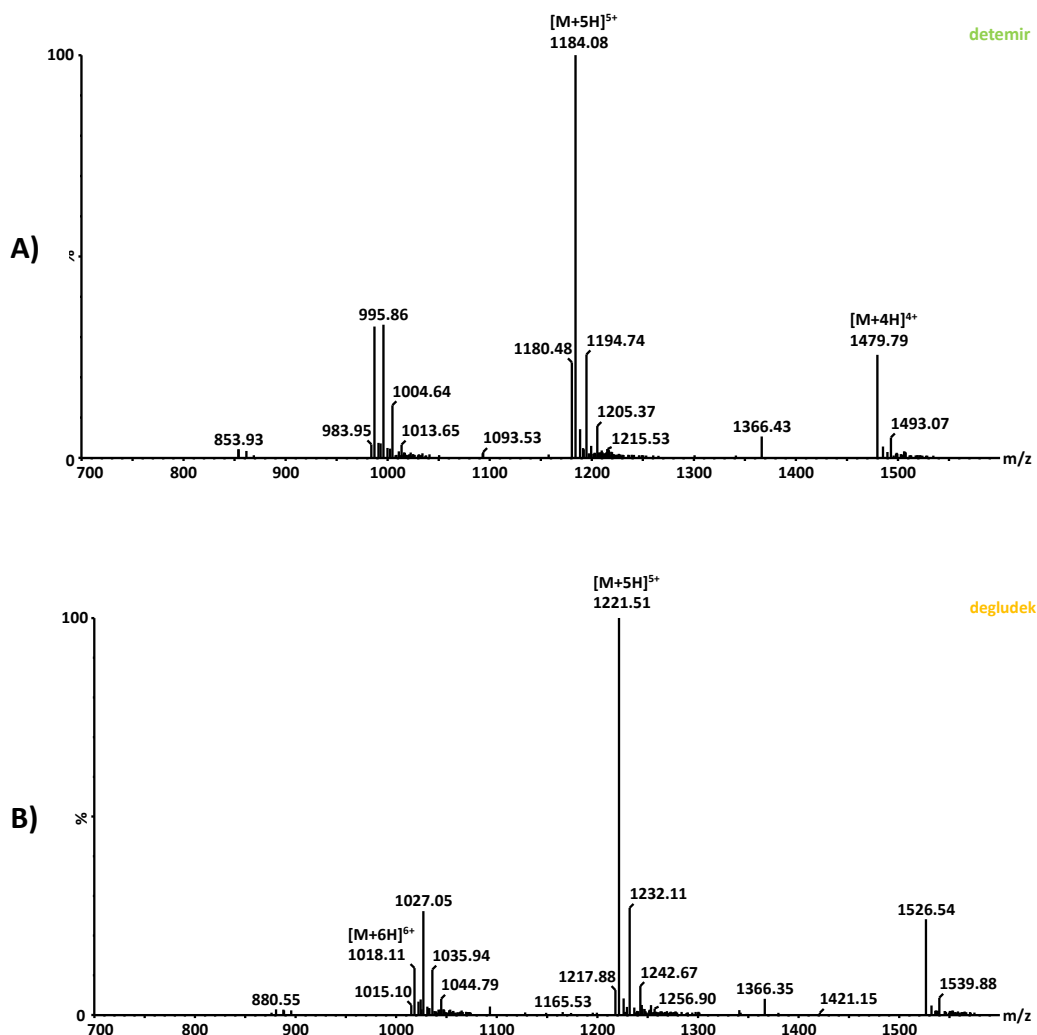
Obr. 12: MS sken insulinu aspart



Obr. 13: MS sken insulinu: A) glargin, B) humánního insulinu, C) hovězího insulinu



Obr. 14: MS sken insulinu: A) lispro, B) vepřového insulinu, C) glulisin



Obr. 15: MS sken insulinu: A) detemir, B) degludek

### 5.1.2 Optimalizace nastavení SRM přechodů

Optimalizace SRM přechodů probíhala výběrem nejintenzivnějších prekurzorových iontů insulinů (Tab. 8) a následným proměřením jejich fragmentačních spekter. Pro každý SRM přechod byla optimalizována také kolizní energie, jak je popsáno v kapitole 4.8.2. Tab. 9 obsahuje veškeré nalezené SRM přechody jednotlivých insulinů společně s hodnotami kolizních energií produktových iontů.

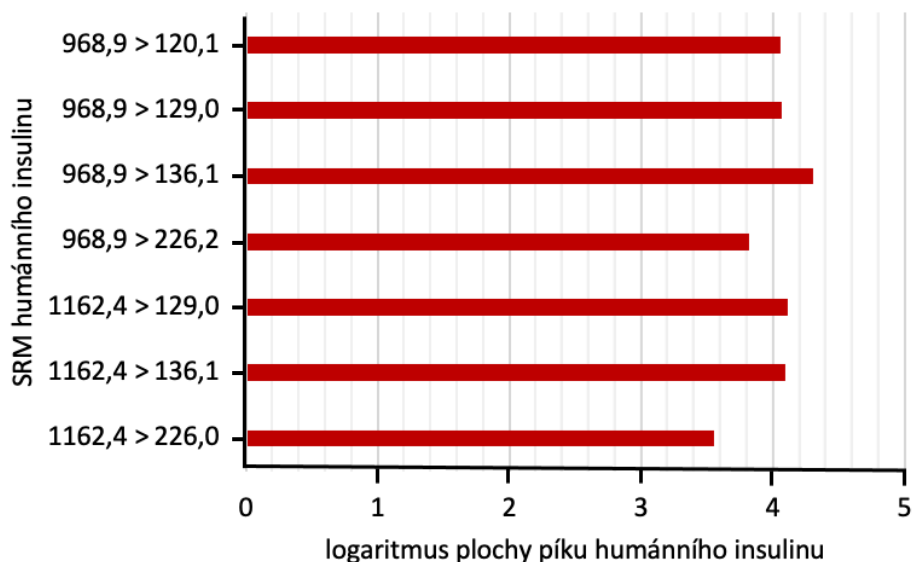
Pro všechny insuliny byly nalezeny, mimo jiné, stejné fragmenty prekurzorových iontů insulinů. V MS/MS spektrech se vyskytovaly produktové ionty o hodnotě  $m/z = 136, 120, 110, 86, 84$  a další (Tab. 9). Dvojice insulinu lispro a humání jsou isomery, mají stejné prekurzorové ionty o  $1162,4, 968,9 m/z$  a i

neintenzivnější produktový ionty 136,1  $m/z$  je totožný pro oba analyty. To může ovlivnit kvantifikaci a správnost výsledků. Pro nalezení selektivních přechodů a vyloučení interference s jinými insuliny, bylo provedeno ověření selektivity jednotlivých SRM přechodů.

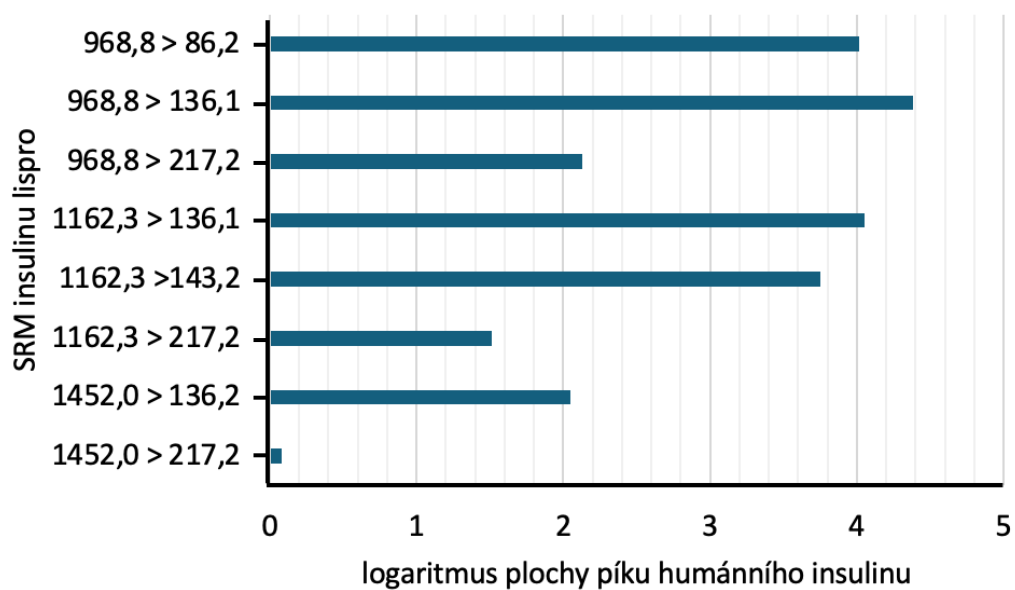
### 5.1.3 Ověření selektivity SRM přechodů insulinů

Ověření selektivity SRM přechodů insulinů probíhalo dle popisu v kapitole 4.8.3. Analyzovány byly všechny insuliny. Pro příklad je zde uvedena dvojice insulinu lispro a humánního insulinu, jejichž SRM přechody vykazovaly největší vzájemnou interferenci.

Obr. 16 představuje logaritmické hodnoty naměřených ploch píku humánního insulinu měřeného SRM přechody humánního insulinu (Tab. 9). Obr. 17 znázorňuje logaritmické plochy píku humánního insulinu měřeného nalezené přechody insulinu lispro (Tab. 9). V případě selektivity SRM přechodů pro humánní insulin by neměla být pozorována žádná plocha píku při analýze této látky s SRM přechody insulinu lispro. Z Obr. 17 je však možné pozorovat naměřené plochy píků. SRM přechody humánního insulinu nejsou pro tuto látku selektivní a hrozí možná interference těchto analytů v případě jejich vzájemné přítomnosti ve vzorku. Aby bylo možné se interferenci vyhnout, je nutná chromatografická separace na koloně anebo použití selektivního SRM přechodu pro každý z těchto dvou insulinů.



Obr. 16: Plocha píku humánního insulinu měřeného s optimalizovanými SRM přechody humánního insulinu

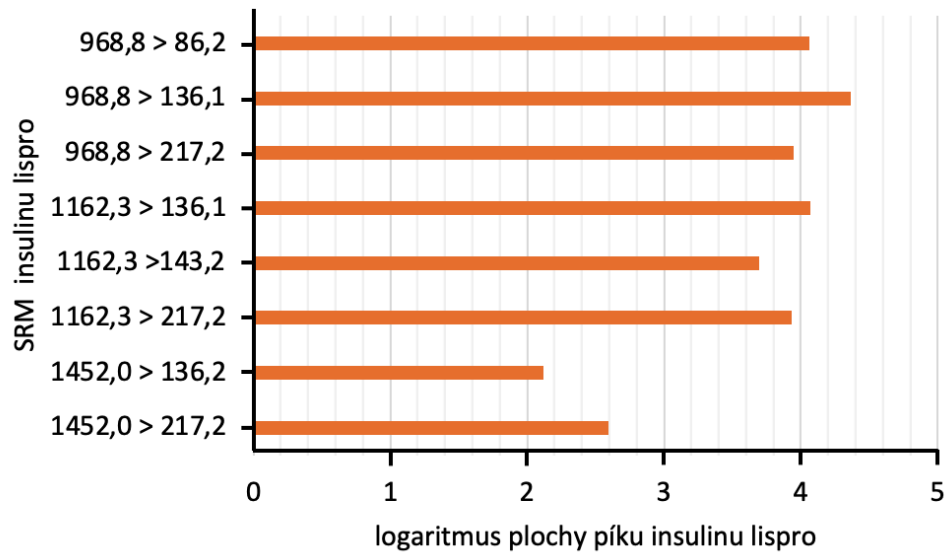


Obr. 17: Plochy píku humánního insulinu měřeného s optimalizovanými SRM přechody insulinu lispro

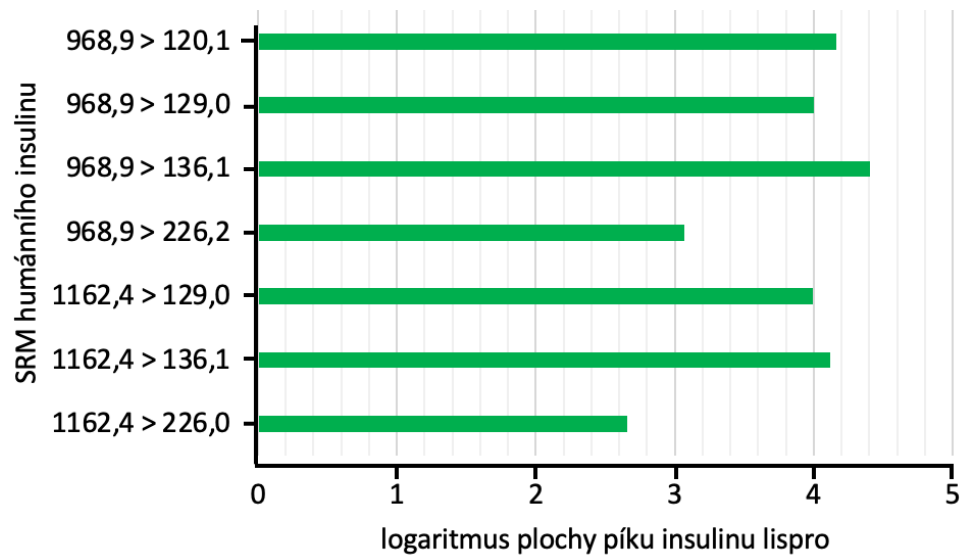
Stejné výsledky byly dosaženy i v opačném případě. Obr. 18 znázorňuje logaritmické hodnoty plochy píku insulinu lispro měřeného SRM přechody insulinu lispro (Tab. 9). Zároveň byl insulin lispro analyzován pomocí MS s optimalizovanými SRM přechody humánního insulinu (Tab. 9), kdy získané plochy píků jsou uvedeny na Obr. 19. Z výsledných hodnot je možné sledovat interferenci



v případě těchto dvou insulinů a neselektivitu SRM přechodů, což vzhledem ke stejným strukturám dvojice insulinů lispro a humánního bylo předpokládáno.



Obr. 18: Plochy píku insulínu lispro měřeného s optimalizovanými SRM přechody insulínu lispro



Obr. 19: Plochy píku insulínu lispro měřeného s optimalizovanými SRM přechody humánního insulínu

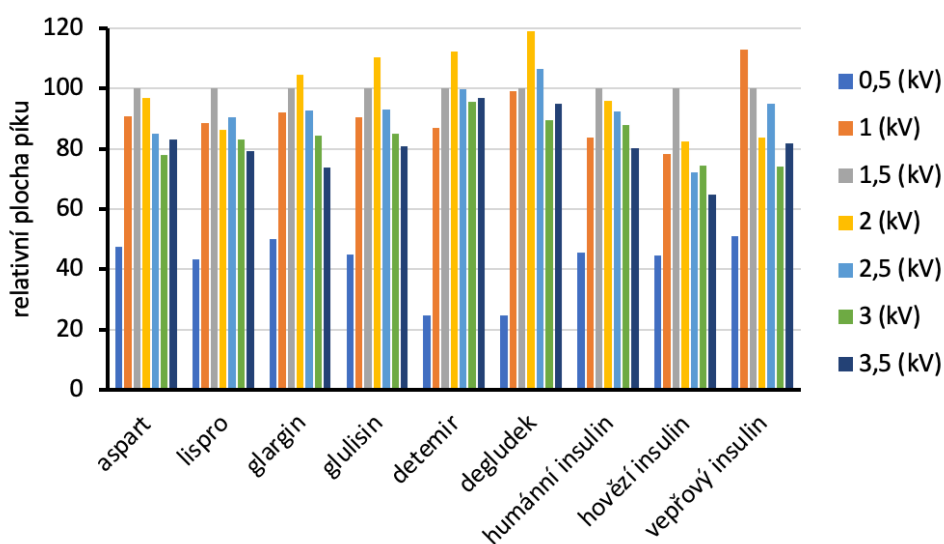
Po zhodnocení všech získaných ploch píků (selektivity SRM přechodů) byly vybrány pro každý insulin 4 až 5 selektivních SRM přechody. Ty jsou uvedeny v Tab. 11.

### 5.1.4 Nastavení parametrů iontového zdroje

Optimalizace parametrů iontového zdroje probíhala postupem, který je popsán v kapitole 4.8.4. Parametry iontového zdroje byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co největší odezvy MS s ohledem na insuliny degludek a glargin, které vykazovaly nejmenší odezvy detektoru v uvedených experimentech. Tab. 12 shrnuje optimalizované parametry iontového zdroje.

#### 5.1.4.1 Optimalizace napětí na kapiláře

Při optimalizaci napětí na kapiláře analyty poskytovaly dva typy chování s výjimkou vepřového insulínu (Obr. 20). První skupině analytů, kde je zařazen insulin aspart, lispro, humánní a hovězí, nejvíce vyhovovalo nastavení napětí na kapiláře na hodnotu 1,5 kV. Druhá skupina analytů, kde patří glargin, detemir a degludek vykazovala největší odezvu detektoru při nastavení napětí na kapiláře na hodnotu 2 kV. Výjimkou je vepřový insulin, pro který bylo nejvhodnější nastavení napětí na kapiláře 1 kV. Finální hodnota napětí na kapiláře byla optimalizována na 1,5 kV..

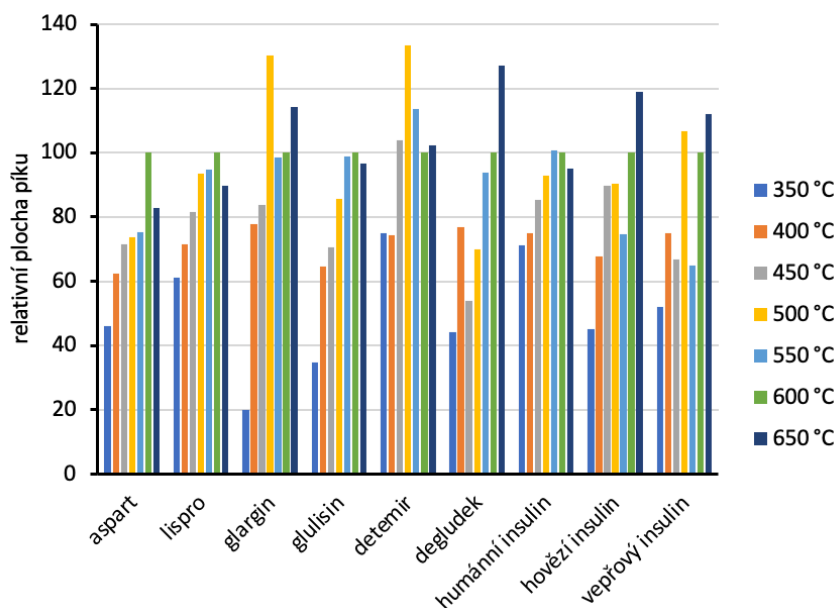


Obr. 20: Závislost odezvy detektoru na napětí na kapiláře

#### 5.1.4.2 Optimalizace desolvatační teploty

Z Obr. 21 vyplývá, že nejlepší odezvy detektoru dosahovaly analyty při nastavení desolvatačních teplot v rozmezí 500 až 650 °C. Hodnota desolvatační

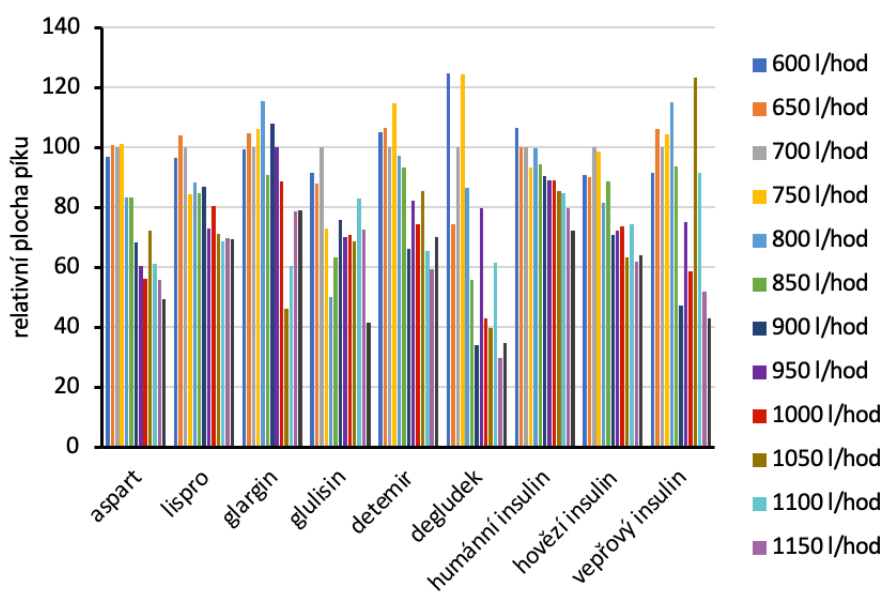
teploty byla optimalizována na 600 °C, protože vykazovala největší odezvu detektoru pro nejvíce analytů.



Obr. 21: Závislost odezvy detektoru na desolvatační teplotě

### 5.1.4.3 Optimalizace průtoku desolvatačního plynu

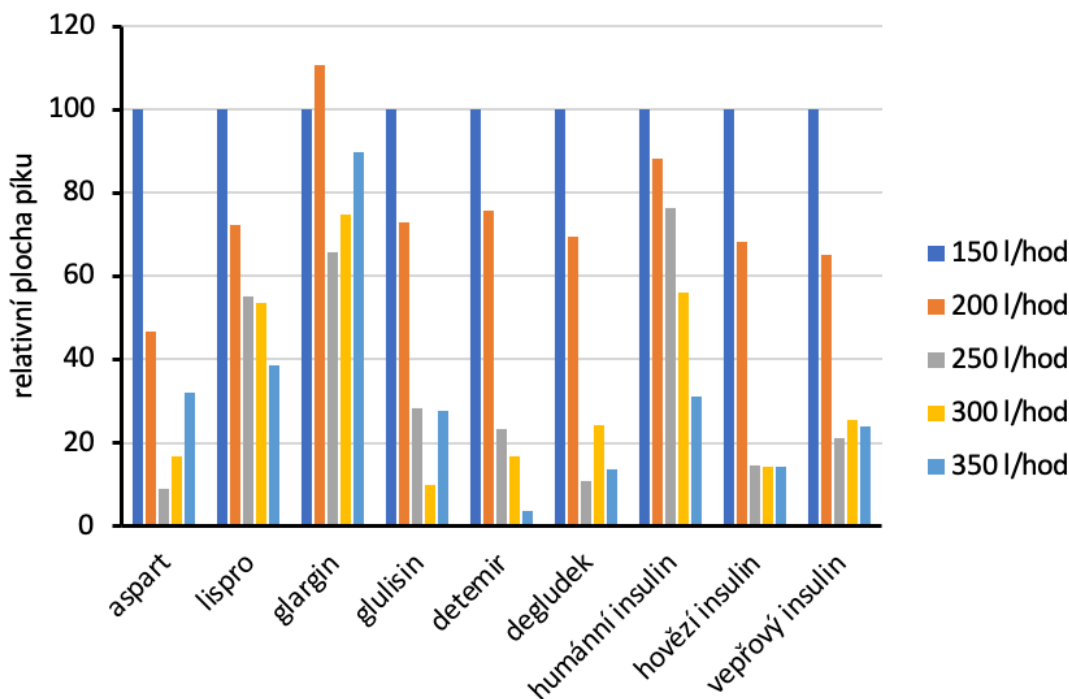
Výsledky optimalizace průtoku desolvatačního plynu vykazovaly největších změn v odezvě detektoru (Obr. 22). Nejlepší hodnoty v nastavení tohoto parametru se pro jednotlivé insuliny pohybovaly v rozmezí 600 až 1050 l/hod. Výsledná hodnota průtoku desolvatačního plynu byla optimalizována na 700 l/hod.



Obr. 22: Závislost odezvy detektoru na průtoku desolvatačního plynu

#### 5.1.4.4 Optimalizace průtoku plynu na vstupním kuželu

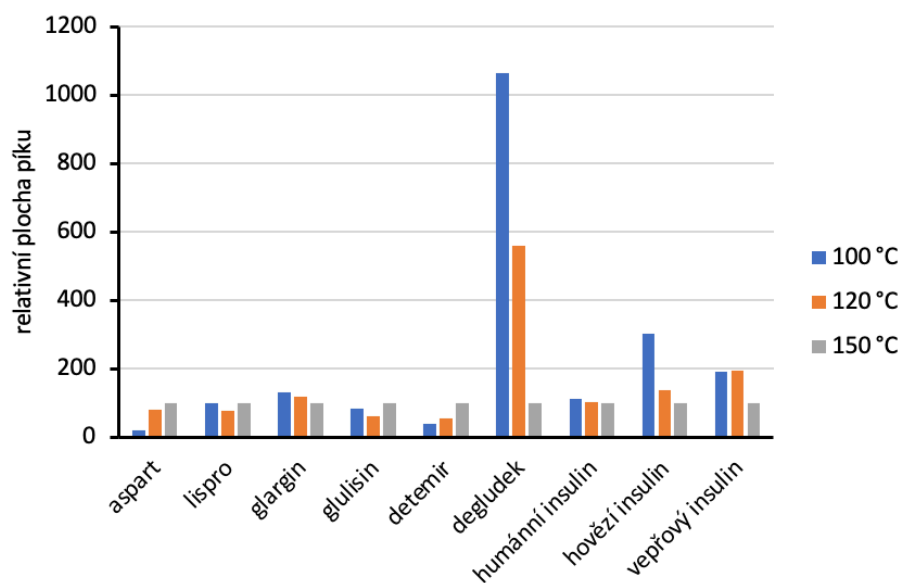
Hodnota průtoku plynu na vstupním kuželu v nastavení 150 l/hod byla nejvhodnější pro všechny insuliny, krom insulinu glargin, pro který byla vhodnější hodnota 200 l/hod (Obr. 23). Finální hodnota průtoku plynu na vstupním kuželu byla optimalizována na 150 l/hod, jelikož toto nastavení bylo nejvhodnější pro většinu analytů.



Obr. 23: Závislost odezvy detektoru na průtoku plynu na vstupním kuželu

#### 5.1.4.5 Optimalizace teploty iontového zdroje

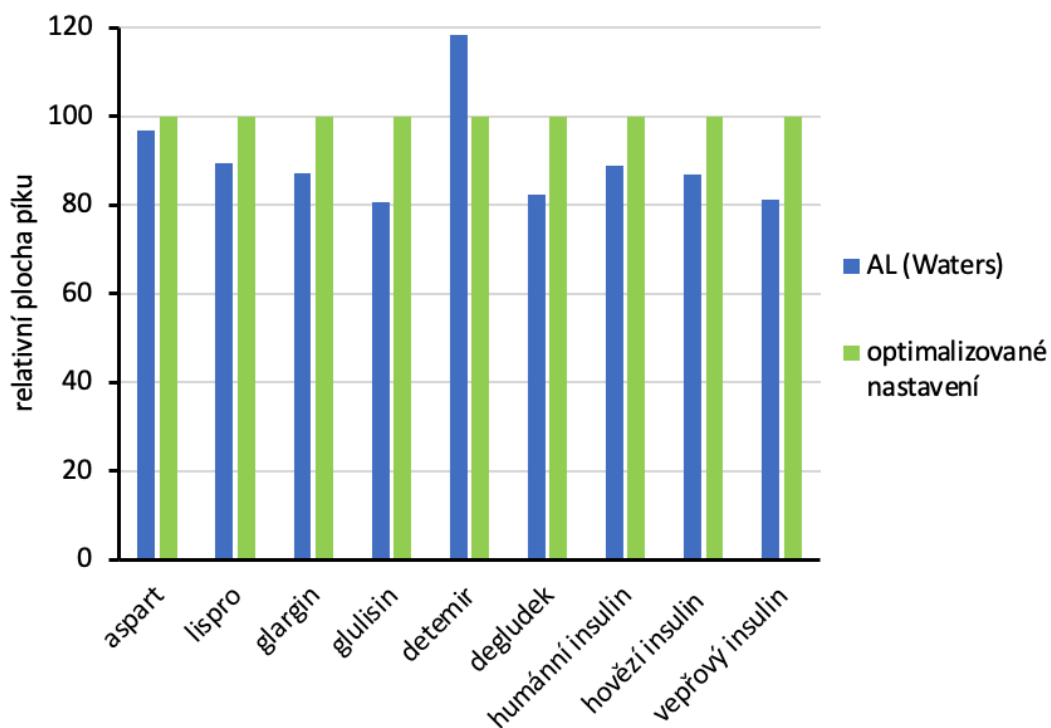
Pro insulin glargin, degludek, humánní a hovězí insulin byla nejlepší odezva detektoru dosažena při nastavení teploty zdroje na 100 °C. Insulin lispro vykazoval velmi podobnou odezvu detektoru při nastavení teploty zdroje na 100 a 150 °C. Teplota zdroje 150 °C byla optimální pro insulin aspart a detemir. Vepřový insulin byl jediný, který vykazoval největší odezvu MS při nastavení teploty zdroje na 120 °C (Obr. 24). Optimalizovaná hodnota teploty iontového zdroje byla 150 °C.



Obr. 24: Závislost odezvy detektoru na teplotě iontového zdroje

#### 5.1.4.6 Porovnání odezvy hmotnostního spektrometru při nastavení MS dle AL Waters a optimalizovaného nastavení

Porovnání odezvy hmotnostního spektrometru při různém nastavení probíhalo dle kapitoly 4.8.4.1. Získané hodnoty plochy píků byly zprůměrovány a vneseny do Obr. 25. Pro vyhodnocení byla porovnávána plocha píků jednotlivých insulinů. Z Obr. 25 je patrné, že analýza těchto látek poskytuje větší plochy píků insulinů při optimalizovaném nastavení MS parametrů (zelený sloupec), kromě tedy insulinu detemir, ve srovnání s nastavením MS převzatých z AL Waters (modrý sloupec). Změna nastavení MS parametrů představovala nejmenší rozdíl pro insulin aspart, jehož plochy píku s optimalizovanými MS podmínkami a s podmínkami pro MS z AL Waters jsou téměř totžné. Výjimkou je insulin detemir, který poskytoval větší odezvu detektoru při nastavení MS dle AL Waters. Ačkoliv jsou rozdíly u všech insulinů do 20% a jsou tedy zanedbatelné, vzhledem k nízkým koncentracím analytů v plasmě bylo pro další experimenty zvoleno optimalizované nastavení MS (Tab. 12).



Obr. 25: Porovnání odezvy detektoru při optimalizovaném nastavení MS a nastavení MS vycházejícího z AL Waters [1]

## 5.2 Nastavení metody UHPLC

Cílem optimalizace metody kapalinové chromatografie bylo dosažení separace analytů. Separace je kritická zejména u párů humánního insulinu a insulinu lispro. Tyto látky z důvodu strukturní podobnosti vykazují velmi podobnou retenci na koloně. Insulin lispro a humánní insulin mají většinu SRM přechodů stejných. V případě současné přítomnosti insulinu lispro a humánního insulinu ve vzorku je zde riziko koeluce a falešné positivity koncentrací (není možné je rozlišit).

V publikacích je uveden specifický přechod pro insulin lispro a humánní insulin (lispro  $1162 > 217$   $m/z$ , humánní ins.  $1162 > 226$   $m/z$ ) [1][25][21]. Tyto přechody vykazují minimální příspěvek k ploše píku druhého insulinu a byly využívány i v případě, kdy nebylo dosaženo separace kritického páru insulinů lispro a humánního insulinu [25][21]. Tyto specifické SRM přechody však nejsou tolik intenzivní jako jiné vhodnější přechody insulinu lispro a humánního insulinu (lispro  $968,8 > 136,1$ , humánní ins.  $968,9 > 136,1$ ). SRM přechody s větší intenzitou však nemohou být použity za podmínek stejné retence látek z důvodu interference

SRM přechodů u insulinu lispro a humánního insulinu. Aby bylo možné využít pro kvantifikaci SRM přechody s větší odezvou, a dosáhnout zvýšení citlivosti oproti dříve publikovaným metodám v analýze těchto látek ve vzorcích plasmy pacientů, byla nezbytná separace insulinu lispro a humánního insulinu.

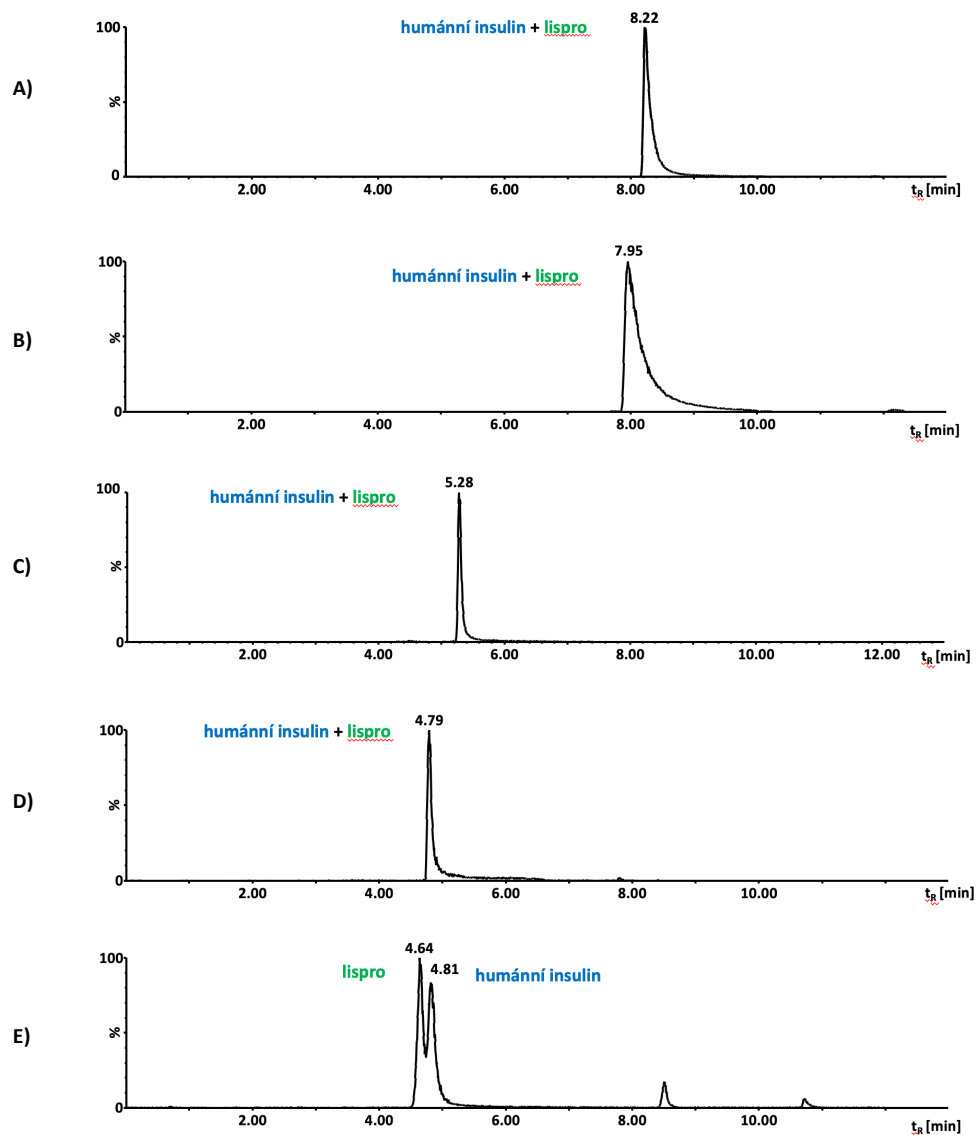
### 5.2.1 Volba stacionární fáze

Na Obr. 26 je znázorněna analýza insulinu lispro a humánního insulinu pomocí kolony:

- A) ACQUITY UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters)
- B) Kinetex C18 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)
- C) Luna Omega C18, 150 x 2,1 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)
- D) Cortecs C18+, 2,1 x 50 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Waters)
- E) Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Waters).

Analýza probíhala za podmínek popsaných v kapitole 4.9.1.

S využitím kolon A, B a C nedošlo k separaci dvojice insulinů lispro a humánního insulinu (Obr. 26). Kolona Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  přinesla výrazné zlepšení v oblasti separace analytů (část E Obr. 26). Při použití kolony Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  je na chromatogramu pozorován náznak separace humánního insulinu a insulinu lispro. Tato kolona vykazovala nejúspěšnější separaci isomerních insulinů, a proto byla vybrána a následně testována pro analýzu se změnou složení mobilní fáze.

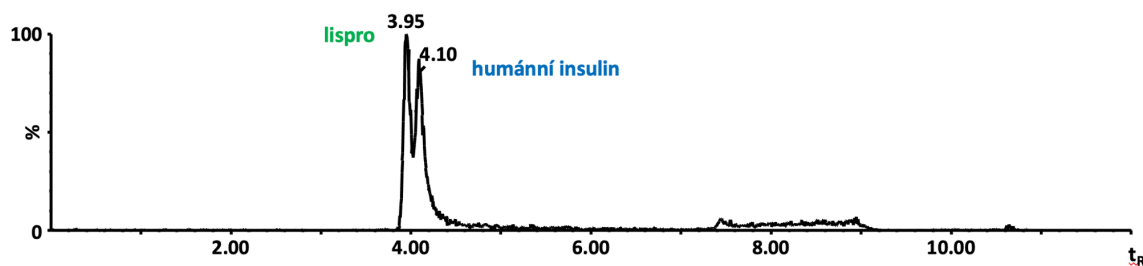


Obr. 26: Chromatogram humánního insulinu a insulinu lispro za použití kolony: A) ACQUITY UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, 1,7  $\mu$ m, B) Kinetex C18 100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m, C) Luna Omega C18, 150 x 2,1 mm, 1,6  $\mu$ m, D) Cortecs C18+, 2,1 x 50 mm, 1,6  $\mu$ m, E) Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu$ m. Nastavení gradientové eluce v kapitole 4.9.1.

## 5.2.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Počátečním chromatografickým záznamem byla analýza směsi insulinu za použití MF převzaté z AL Waters (Obr. 27). MF byla složena ze složky A 0,1% FA v  $H_2O$  a složky B z 0,1% FA v ACN. Na záznamu je vidět náznak separace insulinu lispro a humánního.





Obr. 27: Chromatogram humánního insulinu a insulinu lispro za použití kombinace MF A1 (0,1% FA v H<sub>2</sub>O) a MF B1 (0,1% FA v ACN)

### Optimalizace složení organické složky MF

V průběhu optimalizace organické složky MF byla zachována vždy stejná vodná složka MF, a to 0,1% FA v H<sub>2</sub>O. Využitím směsi methanolu a acetonitrilu jako organické složky MF pro analýzu insulinů došlo, dle očekávání, k výraznému prodloužení retenčních časů oproti acetonitrilové MF. Příkladem je Obr. 28 část A, kdy byla použita směs MeOH:ACN (50:50) (Tab. 18), kde bylo pozorováno zvýšení retence a tedy k prodloužení retenčních časů o 4 až 5 min. Nastavením těchto experimentálních podmínek nebylo dosaženo separace dvou kritických insulinů humánní a lispro. Oba byly eluovány ve stejném retenčním čase 9,12 min.

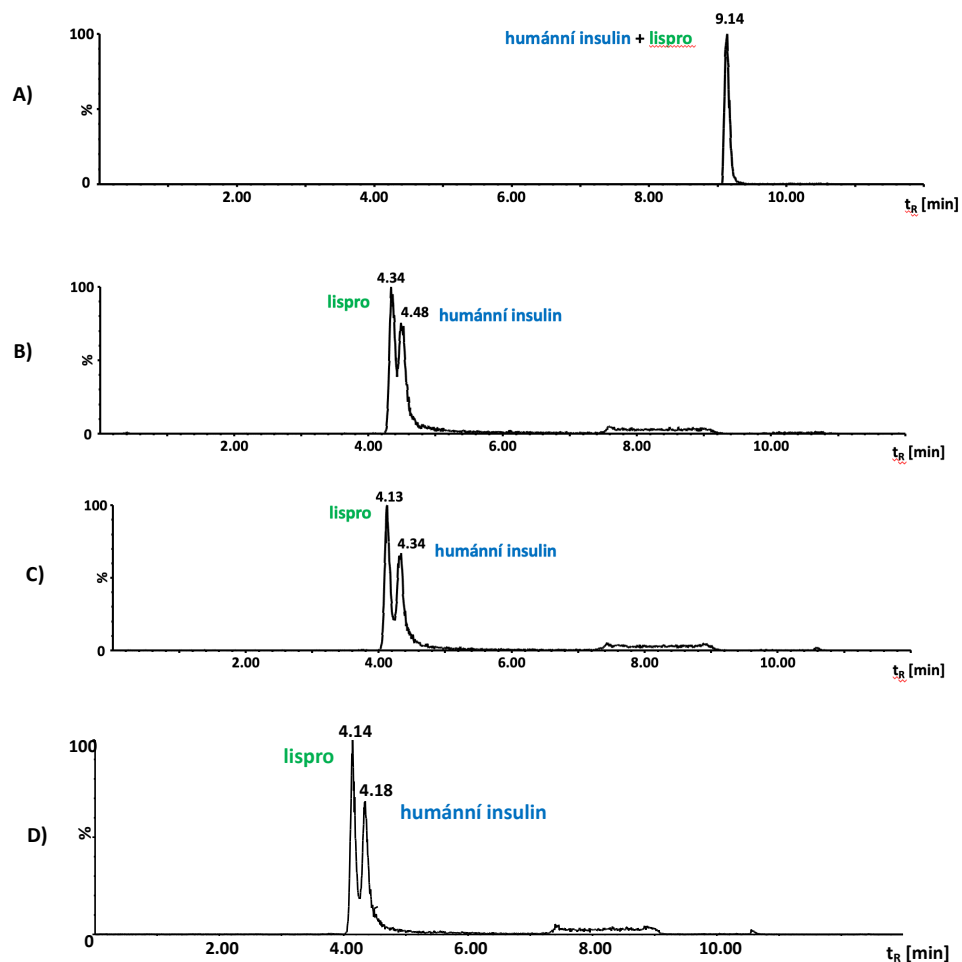
Následovala separace insulinů za použití směsi organické složky MF obsahující 10 % methanolu a 90 % ACN (MeOH:ACN, 10:90, v/v, Tab. 18). Tato změna vedla ke zrychlení eluce všech analytů, nicméně separace kritického páru analytů nebylo dosaženo.

Dalším testovaným složením mobilní fáze byla směs s obsahem methanolu a acetonitrilu 1:99 (Tab. 18). Zde byl pozorován „náznak“ separace humánního insulinu a insulinu lispro (Obr. 28 část B).

V nastavení dalších experimentů byly připravovány a následně testovány organické složky mobilní fáze s různou koncentrací kyseliny mravenčí, jak je uvedeno v Tab. 18. Obsah kyseliny mravenčí byl postupně zvyšován. Jako příklad je na Obr. 28 část C uveden chromatogram analýzy s využitím směsi obsahující 0,5% FA v MeOH:ACN (1:99), kde tato změna složení vedla ke zlepšení separace humánního insulinu a insulinu lispro se zvyšující se koncentrací kyseliny mravenčí.

Připravena a testována byla také okyselená acetonitrilová fáze (0,5% FA v ACN) (část D Obr. 28) (Tab. 18). Výsledky byly porovnány s organickou složkou

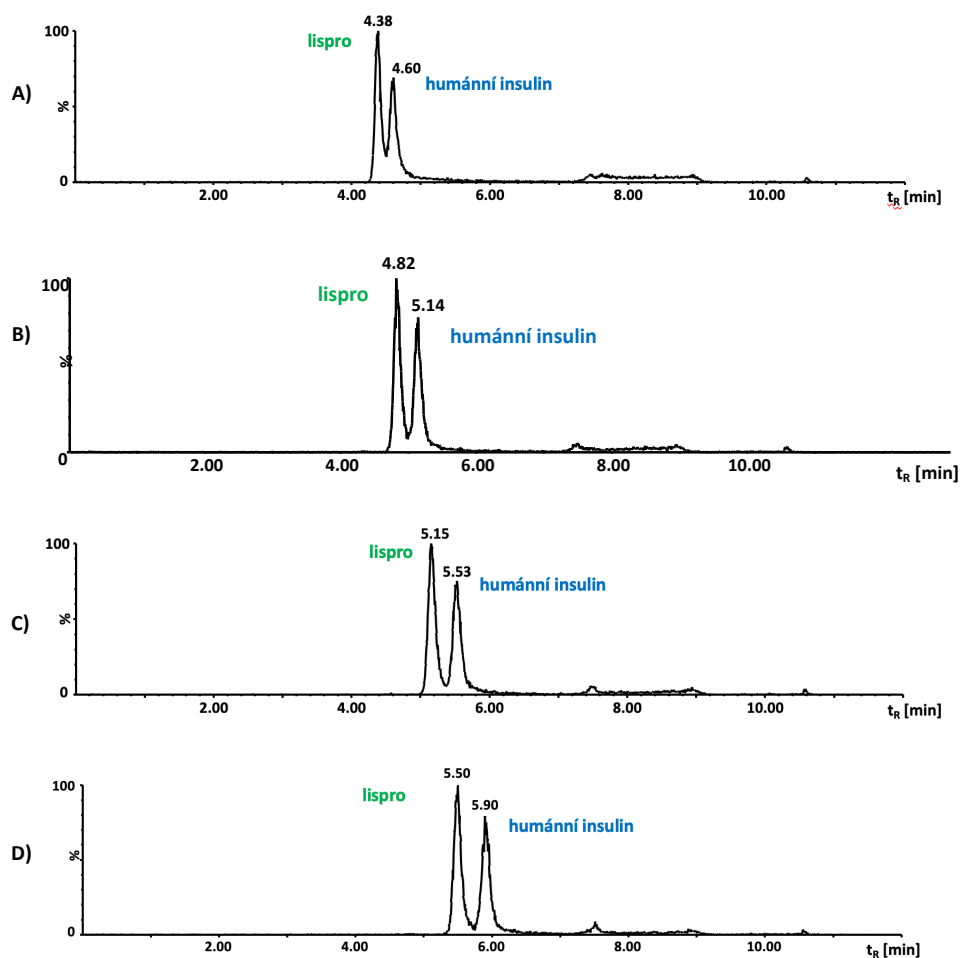
MF obsahující směs 0,5% FA v MeOH:ACN (1:99). Za použití ACN MF s obsahem 0,5% FA došlo ke zrychlení eluce analytů. Separace byla téměř totožná. Jelikož bylo snahou vyvinout rychlou metodu, v dalších experimentech byl jako organická složka MF použita 0,5% FA v acetonitrilu.



Obr. 28: Chromatogram humánního insulinu a insulinu lispro za použití mobilní fáze: vodná složka 0,1% FA v H<sub>2</sub>O a organická složka A) 0,1% FA ve směsi MeOH:ACN, 50:50, v/v, B) 0,1% FA ve směsi MeOH:ACN, 1:99, v/v, C) 0,5% FA ve směsi MeOH:ACN, 1:99, v/v, D) 0,5% FA v ACN

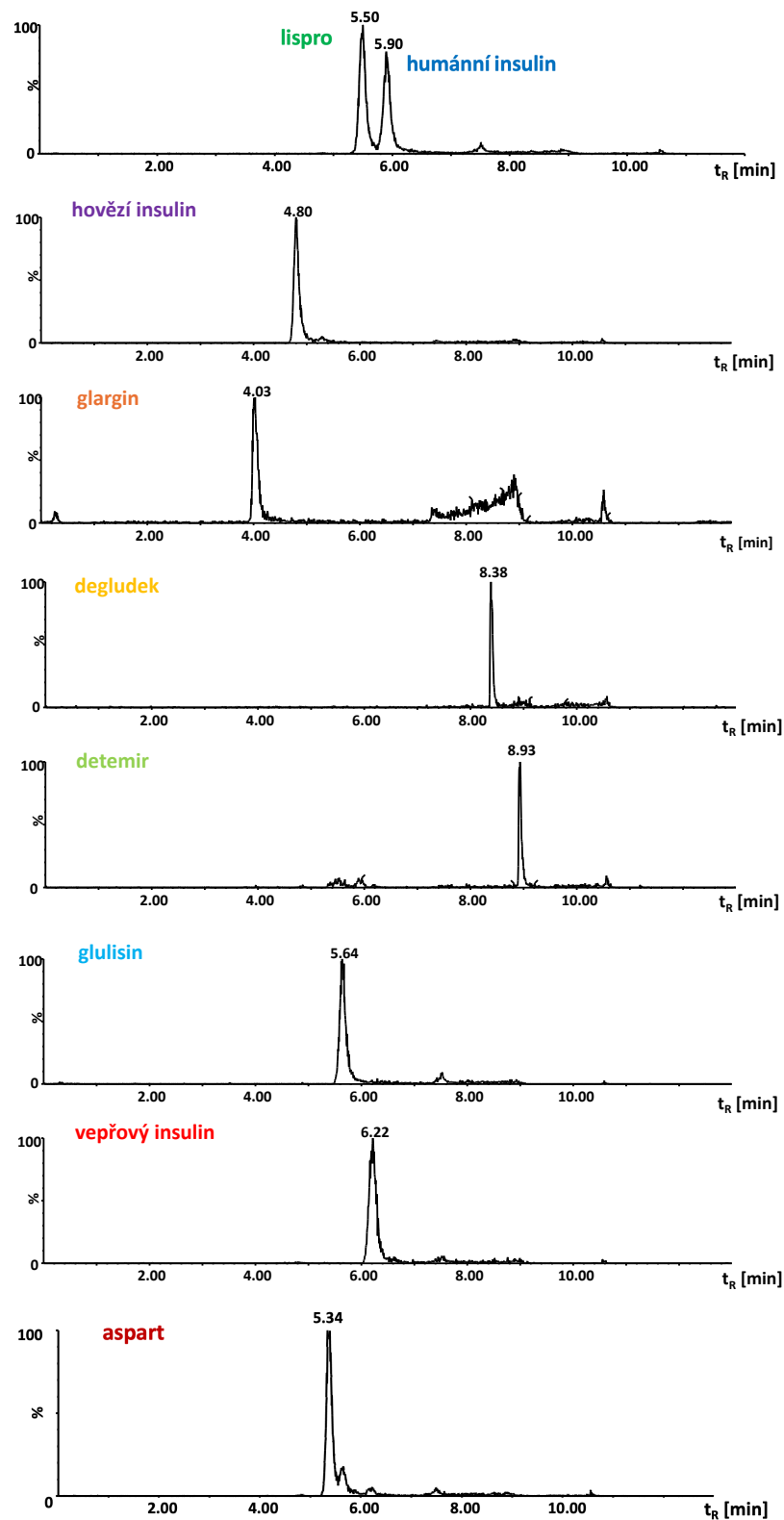
### Optimalizace složení vodné složky MF

V následující experimentu bylo měněno složení vodné složky a její koncentrace FA. Experiment byl prováděn za stálého použití organické složky, a to 0,5% FA v ACN. Na Obr. 29 jsou zobrazeny chromatogramy se zvyšující se koncentrací FA ve vodné složce MF. Zvýšení koncentrace FA ve vodné složce MF vedlo ke zlepšení separace kritického páru insulinů lispro a humánního.



Obr. 29: Chromatogram humánního insulinu a insulinu lispro za použití mobilní fáze: organická složka 0,5% FA v ACN a vodná složka A) 0,2% FA v H<sub>2</sub>O, B) 0,5% FA v H<sub>2</sub>O, C) 0,7% FA v H<sub>2</sub>O, D) 0,8% FA v H<sub>2</sub>O

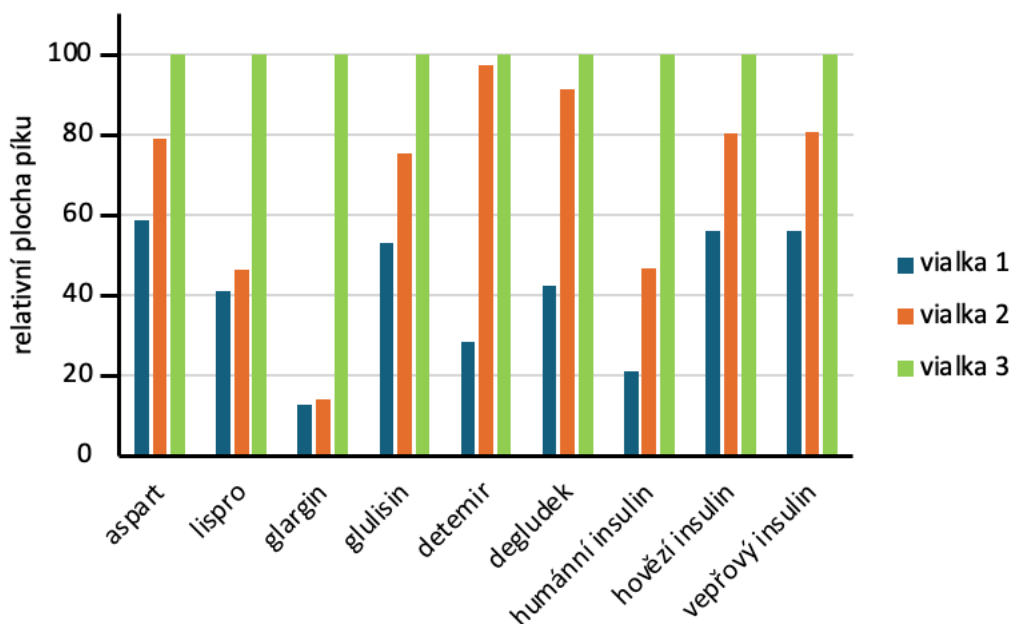
Posledním experimentem pro optimalizaci složení MF bylo další zvýšení koncentrace FA v organické a MF (Obr. 30). Kombinací organické složky obsahující 0,7% FA v ACN a vodné složky skládající se z 0,8% FA v H<sub>2</sub>O bylo dosaženo nejlepší chromatografické separace. Obr. 30 zobrazuje optimalizované chromatografické záznamy jednotlivých insulinů.



Obr. 30: Chromatogram insulinu a jeho analogů za použití MF skládající se ze složky A 0,8% FA v H<sub>2</sub>O a složky B 0,7% FA v ACN

### 5.3 Hodnocení adsorpce analytů na vialky

Obr. 31 ukazuje výsledky testování různých typů vialek (Tab. 21). Analýza probíhající z vialky 3 vykazuje největší plochu píků. U vialek typu 1 a 2 pravděpodobně docházelo k NSB analytů, což vyvolalo snížení ploch píků u všech insulinů. Z tohoto důvodu nebyly vialky typu 1 a 2 vhodné pro další experimenty. Pro veškeré další experimenty byly používány výhradně vialky typu 3. Pro stanovení insulinu a jeho strukturních analogů z biologické matrice po  $\mu$ SPE extrakci byla použita Quan Recovery extrakční destička, u které výrobce deklaruje minimální adsorpci těchto látek na tomto typu materiálu (viz. kapitola 3.2.2).



Obr. 31: Vliv typu vialky na odezvu detektoru

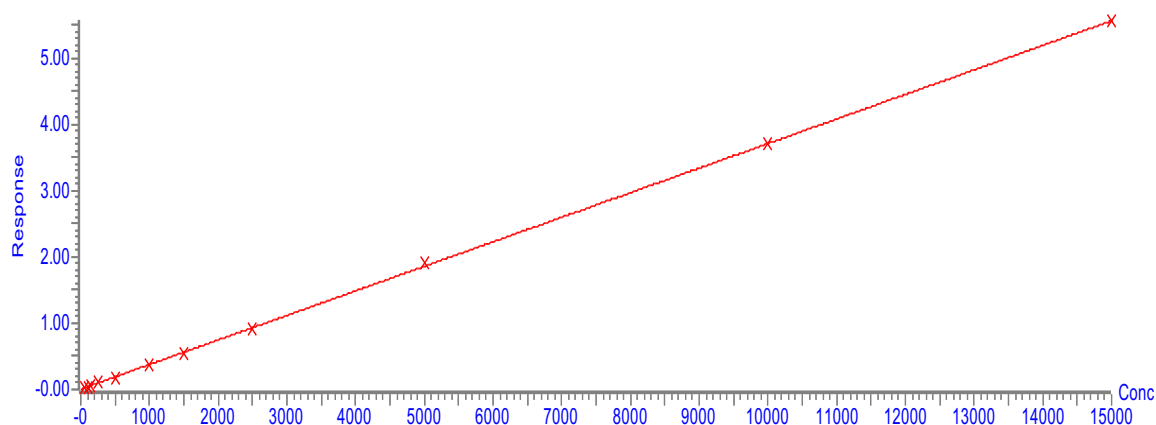
### 5.4 Analýza reálných vzorků plasmy

#### 5.4.1 Analýza kalibračních standardů

Pro sestavení kalibračních křivek bylo připraveno 16 kalibračních roztoků insulinů v rozmezí koncentrací 2,5 až 15 000 pg/ml. Koncentrace kalibračních standardů byly zvoleny tak, aby odpovídaly očekávané koncentraci v reálných vzorcích. Kvantifikace probíhala metodou vnitřního standardu, kde byla použita směs hovězího a vepřového insulinu.

Pro sestrojení kalibračních křivek bylo nakonec využito pouze 11 kalibračních bodů. Kalibrační křivky jsou v rozmezí koncentrací od 50 pg/ml do 15 000 pg/ml pro každý insulin. Nejnižší naměřená koncentrace byla 50 pg/ml. Pro příklad je na Obr. 32 uvedena kalibrační křivka pro insulin degludek, která byla sestrojena pomocí vážení  $1/x$ .

Compound name: Degludec  
Correlation coefficient:  $r = 0.999849$ ,  $r^2 = 0.999698$   
Calibration curve:  $0.000370361 * x + 0.00588686$   
Response type: Internal Std ( Ref9 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



Obr. 32: Kalibrační křivka pro insulin degludek

#### 5.4.2 Analýza vzorků plasmy pacientů

Kvantifikace insulinů v plasmě byla provedena odečtením ze sestrojené kalibrační křivky. Ve vzorku plasmy bylo nalezeno 7486,3 pg/ml insulinu degludek.

#### 5.4.3 Analýza QC vzorků

QC vzorky byly připraveny dle kapitoly 4.7. Analýza probíhala za podmínek SRM metody uvedených v kapitole 4.8.6 a podmínek UHPLC metody uvedených v kapitole 4.9.3. Povolené rozmezí výsledných koncentrací QC vzorků bylo určeno na  $\pm 20\%$  koncentrační hladiny a veškeré výsledky QC vzorků spadaly do tohoto rozmezí.

## 6 Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout jednoduchou, rychlou a citlivou metodu pro stanovení humánního insulinu a jeho 6 strukturních analogů aspart, lispro, glulisin, glargin, detemir, degludek v lidské plasmě pomocí UHPLC-MS/MS. Požadavek pro vývoj metody vycházel z Ústavu soudního lékařství ve FN Ostrava pro vysvětlení nevyjasněných úmrtí nejen u diabetických pacientů.

Nejlepší separace analytů bylo dosaženo za použití kombinace záchytné kolony XBridge C18, 2,1 x 20 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters) a analytické kolony Cortecs C18+, 2,1 x 100 mm, 1,6  $\mu\text{m}$  (Waters). Pro tyto kolony bylo dále optimalizováno složení mobilní fáze. Jako finální MF byla vybrána vodná složka A obsahující 0,7% FA v  $\text{H}_2\text{O}$  a organická složka B obsahující 0,8% FA v ACN. Po optimalizaci profilu gradientu bylo dosaženo separace všech insulinových analogů.

Z důvodu strukturní podobnosti humánního insulinu a jeho analogů byla testována selektivita optimalizovaných SRM přechodů. Jelikož bylo dosaženo separace všech analytů, včetně dvojice insulinu lispro a humánního insulinu, bylo možné pro kvantifikaci vybrat jen ty nejcitlivější SRM přechody insulinů, a tím tedy zvýšit citlivost stanovení.

Úprava biologické matrice (plasmy) byla převzata z AL Waters. Zahrnovala proteinovou precipitaci a mikroextrakci na tuhou fázi za použití vícemodálního Oasis Max  $\mu\text{-SPE}$  sorbentu.

V současné době probíhá validace metody. Po validaci bude metoda využívána na Ústavu soudního lékařství FN Ostrava pro analýzu vzorků plasmy u nevyjasněných případů s podezřením na intoxikaci insulinem.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHAMBERS, E. a K. FOUNTAIN. Simultaneous Analysis of Intact Human Insulin and Five Analogs in Human Plasma Using  $\mu$ Elution SPE and a CORTECS UPLC Column. In: Waters: The Science of What's Possible [online]. USA: Waters Corporation, 2019 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2019/720004727/720004727-en.pdf>
- [2] KRESTOVÁ, D., 2022. *Post mortem analýza insulinu a jeho vybraných analogů z krve metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí*. Ostrava. Bakalářská práce. Ostravská univerzita.
- [3] SIMS, E., A. CARR, R. ORAM, L. DIMEGLIO a C. EVANS-MOLINA, 2021. 100 years of insulin: celebrating the past, present and future of diabetes therapy. *Nature medicine*. **27**(7), 1154–1164.
- [4] GUPTA, A., 2021. *Understanding Insulin and Insulin Resistance*. Elsevier. ISBN 978-0-12-820234-0.
- [5] SELIVANOVA, O. M., S. Yu. GRISHIN, A. V. GLYAKINA, A. S. SADGYAN, N. I. USHAKOVA a O. V. GALZITSKAYA, 2018. Analysis of Insulin Analogs and the Strategy of Their Further Development. *Biochemistry* [online]. **83**(1), 146 - 162 [cit. 2024-07-19]. Dostupné z: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v83/pdf/BCMS146.pdf>
- [6] MORAVEC, V., 2001. Inzulinová léčba diabetu. *Sanquis* [online]. **1**(16), 46 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.sanquis.cz/index1.php?linkID=art886>
- [7] BARTÁŠKOVÁ, D., 2009. Moderní způsoby inzulinoterapie pacientů s diabetem 2. typu. *Interní medicína* [online]. **11**(5), 224-227 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/05/07.pdf>
- [8] LANDGRAF, W. a J. SANDOW, 2016. Recombinant Human Insulins – Clinical Efficacy and Safety in Diabetes Therapy. *European Endocrinology* [online]. **12**(1), 12-17 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: [doi:http://doi.org/10.17925/EE.2016.12.01.12](http://doi.org/10.17925/EE.2016.12.01.12)



- [9] Insulin- Pharmacology, Therapeutic Regimens and Principles of Intensive Insulin Therapy, 2023. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2024-07-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278938/>
- [10] BARÁK, L., 2005. Inzulín - stále jediná záchrana pre ľudí s diabetom I. typu. *Via practica* [online]. **2**(5), 240-242 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.solen.sk/storage/file/article/Barak.pdf>
- [11] Farmakoterapeutické informácie: Inzulínoterapie a inzulínové prípravky, 2023. In: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2024-07-18]. Dostupné z: [https://www.sukl.cz/file/102702\\_1\\_1](https://www.sukl.cz/file/102702_1_1)
- [12] FU, Z., E. R. GILBERT a D. LIU, 2013. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews* [online]. **9**(1), 25 - 53 [cit. 2024-07-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934755/>
- [13] GANONG, W. F., 2005. *Přehled lékařské fyziologie*. Galén. ISBN 80-7262-311-7.
- [14] DRŠATA, J., 1983. *Patobiochemie pro farmaceuty*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- [15] PELIKÁNOVÁ, T., V. BARTOŠ a kol., 2018. *Praktická diabetologie*. 6. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-80-7345-559-0.
- [16] HOLEČEK, Milan, 2006. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1562-7.
- [17] BOUŠOVÁ, I. a J. DRŠATA. *Regulace glykemie a její poruchy; diabetes mellitus*.
- [18] ŠKRHA, J., 2014. *Cesta diabetologie, aneb, Jak vše začíná a končí?: [průvodce pro každodenní praxi]*. Praha: Maxdorf. Současná diabetologie. ISBN 978-80-7345-385-5.
- [19] Insulin Degradation: Progress and Potential, 1998. *Endocrine Reviews* [online]. **19**(5), 608–624 [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1210/edrv.19.5.0349>
- [20] HULSE, R. E., L. A. RALAT a T. WEI-JEN, 2009. Structure, Function, and Regulation of Insulin-Degrading Enzyme. *Vitamins and hormones* [online].

Elsevier, **80**, 635-648 [cit. 2024-07-17]. ISBN 9780123744081. Dostupné z: doi:10.1016/S0083-6729(08)00622-5

- [21] HESS, C., A. THOMAS, M. THEVIS, B. STRATMANN, W. QUESTER, D. TSCHOEPE, B. MADEA a F. MUSSHOFF, 2012. Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **404**(6-7), 1813-1822 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6271-5
- [22] JUNG, M. C. Achieving Maximum Protein and Peptide Recovery, Sensitivity, and Reproducibility using QuanRecovery Vials and Plates. In: *Waters* [online]. [cit. 2024-07-30]. Dostupné z: <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006571en.pdf&ved=2ahUKEwj8ylaUls6HAXWAGxAHX6-GGqQFnoECBYQAQ&usg=AOvVaw08FaVfcOyVitzw6WdPSi8P>
- [23] LIU, Ch., S. DONG, D. SI, G. WEI a Y. ZENG. Determination of human insulin in dog plasma by a selective liquid chromatography - tandem mass spectrometry method: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B* [online]. 2018, 85-91 [cit. 2022-04-24]. ISSN 15700232.
- [24] THOMAS, A., W. SCHÄNZER a M. THEVIS, 2014. Determination of human insulin and its analogues in human blood using liquid chromatography coupled to ion mobility mass spectrometry (LC-IM-MS). *Drug Testing and Analysis* [online]. **6**(11-12), 1125-1132 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1002/dta.1710
- [25] CHAMBERS, E., K. FOUNTAIN, N. SMITH, L. ASHRAF, J. KARALLIEDDE, D. COWAN a C. LEGIDO-QUIGLEY, 2014. Multidimensional LC-MS/MS Enables Simultaneous Quantification of Intact Human Insulin and Five Recombinant Analogs in Human Plasma. *Analytical Chemistry* [online]. **86**(23), 694-702 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/ac403055d>
- [26] REVERTER-BRANCHAT, G., M. GROESSL, C. NAKAS, J. PROST, K. ANTWI, E. NIEDERKOFER a L. BALLY, 2020. Rapid quantification of insulin degludec by immunopurification combined with liquid chromatography high-resolution

- mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **412**(30), 8351-8359 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-020-02971-4
- [27] JUDÁK, P., P. VAN EENOO a K. DEVENTER, 2018. Utilizing ELISA-plate based immunopurification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the urinary detection of short- and long acting human insulin analogues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **41**(153), 76-81 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://core.ac.uk/download/pdf/153398756.pdf>
- [28] MAZZARINO, M., M. SENOFONTE, F. MARTINELLI, X. DE LA TORRE a F. BOTRÈ, 2019. Detection of recombinant insulins in human urine by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry after immunoaffinity purification based on monolithic microcolumns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **411**(30), 8153-8162 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-019-02203-4
- [29] THEVIS, M., A. THOMAS, W. SCHÄNZER, P. ÖSTMAN a I. OJANPERÄ, 2012. Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis* [online]. **4**(1), 53-56 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1002/dta.368
- [30] FRIEDECKÝ, B., J. KRATOCHVÍLA, D. SPRINGER, M. PRÁZNÝ, T. PELIKÁNOVÁ, T. ZIMA a J. RACEK, 2020. Diabetes mellitus – laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů. In: *Česká společnost klinické biochemie* [online]. [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: [https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2020/11/DM\\_doporuceni-revize-2020.pdf](https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2020/11/DM_doporuceni-revize-2020.pdf)
- [31] HENQUIN, J., M. M. IBRAHIM a J. RAHIER, 2017. Insulin, glucagon and somatostatin stores in the pancreas of subjects with type-2 diabetes and their lean and obese non-diabetic controls. *Scientific Reports* [online]. **7**(1) [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-10296-z
- [32] BOTTINELLI, C., R. NICOLI, F. BÉVALOT, et al., 2021. Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS. *Talanta* [online]. **63**(225), 1-9 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122047

- [33] NAGASAWA, S., R. YAMAGUCHI, F. CHIBA, S. TORIMITSU a H. IWASE, 2023. Identification, measurement, and evaluation of blood concentrations of insulin glargine and insulin lispro by UPLC–MS–MS in a dead body suspected of insulin overdose. *Journal of Forensic Sciences* [online]. **68**(2), 704-710 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: doi:10.1111/1556-4029.15219
- [34] STONE, J., 2017. In: *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory: Chapter 3 - Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory* [online]. Elsevier, s. 37 - 62 [cit. 2024-07-17]. ISBN 978-0-12-800871-3. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128008713000031>
- [35] HANSEN, S. a S. PEDERSEN-BJERGAARD, 2015. *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*. Wiley. ISBN 9781118716830
- [36] NOVÁKOVÁ, L., 2021. *Moderní trendy v přípravě vzorku pro analýzu separačními technikami, Studijní materiál pro předmět Pokročilé instrumentální metody oboru Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, FAF UK.*
- [37] RAYNIE, D. E., 2014. Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. *LCGC North America* [online]. **32**(12), 908–915 [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-1>
- [38] Chromatography Columns and Supplies Catalog, 2023 - 2024. In: *Waters* [online]. [cit. 2024-07-30]. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007439en.pdf>
- [39] Waters Oasis SPE kolonky. In: *LCMS LabRulez* [online]. [cit. 2024-07-30]. Dostupné z: <https://lcms.cz/products/215>
- [40] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA, 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [41] Overview of Affinity Purification, 2009. In: *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>

- [42] SHEN, Y., W. PRINYAWIWATKUL a Z. XU, 2019. Insulin: a review of analytical methods. *Analyst* [online]. **144**, 4139-4148 [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1039/C9AN00112C>
- [43] KNOPP, J. L., L. HOLDER-PEARSON a J. G. CHASE, 2019. Insulin Units and Conversion Factors: A Story of Truth, Boots, and Faster Half-Truths. *Journal of Diabetes Science and Technology* [online]. **13**(3), 597-600 [cit. 2024-07-17]. ISSN 1932-2968. Dostupné z: doi:10.1177/1932296818805074
- [44] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA, 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [45] STÖCKLIN, R., L. VU, L. VADAS, F. CERINI, A. D. KIPPEN, R. E. OFFORD a K. ROSE, 1997. A Stable Isotope Dilution Assay for the In Vivo Determination of Insulin Levels in Humans by Mass Spectrometry. *Diabetes* [online]. **46**(1), 44-50 [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: doi:10.2337/diab.46.1.44
- [46] STOLL, D. R. a P. W. CARR, 2022. *Multi-Dimensional Liquid Chromatography: Principles, Practice, and Applications*. CRC Press. ISBN 036754766X.
- [47] PANDOHEE, J., P. STEVENSON, X. ZHOU, M. SPENCER a O. JONES, 2015. Multi-Dimensional Liquid Chromatography and Metabolomics, Are Two Dimensions Better Than One? *Current Metabolomics* [online]. **3**(1), 10-20 [cit. 2024-07-17]. ISSN 2213235X. Dostupné z: doi:10.2174/2213235X03666150403231202
- [48] *Two-dimensional liquid chromatography: Principles, practical implementation and applications*, 2015. Agilent Technologies. ISBN 5991-2359EN.
- [49] Dvourozměrná chromatografie 2D HPLC. In: *HPLC* [online]. [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Tip/2D\\_HPLC.htm](http://www.hplc.cz/Tip/2D_HPLC.htm)
- [50] Improving Assay Robustness and Increasing Sensitivity with Trap and Back-Flush Elution using an ACQUITY UPLC System with 2D Technology. In: *Waters* [online]. [cit. 2024-09-03]. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/library-details.html?documentid=720004396&t=waters->

Improving Assay Robustness and Increasing Sensitivity with Trap and Back Flush Elution using an ACQUITY UPLC System with 2D Technology-720004396

- [51] Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications, 2008. *Journal of Chromatography A* [online]. **1184**(1-2), 353 - 368 [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.074>
- [52] CAÑO-CARRILLO, I., B. GILBERT-LÓPEZ, L. MONTERO, A. B. MARTÍNEZ-PIERNAS, J. F. GARCÍA-REYES a A. MOLINA-DÍAZ, 2023. Comprehensive and heart-cutting multidimensional liquid chromatography–mass spectrometry and its applications in food analysis. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 1 - 41 [cit. 2024-07-17]. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21845
- [53] DASS, Ch., 2007. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Wiley. ISBN 978-047-1682-295.
- [54] DE HOFFMANN, E. a V. STROOBANT, 2007. *Mass spectrometry: principles and applications*. Third edition. Wiley. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [55] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. **20**(3), 152-157 [cit. 2024-07-11]. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- [56] NEDVĚD, J.; HAJDÚCH, M.; LEMR, K. a PAVLÍČEK, V., 2011. Hmotnostní spektrometrie v nádorové diagnostice. Online. *Chemické listy*. Roč. 105, č. 5, s. 356 - 360. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_05\\_356-360.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_05_356-360.pdf). [cit. 2024-07-14].
- [57] KOČOVÁ VLČKOVÁ, H., 2020. *Ionizační techniky za atmosférického tlaku, Studijní materiál pro předmět Hmotnostní spektrometrie oboru Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, FAF UK*.
- [58] Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárně elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí, 2013. Online. *Chemické listy*. Roč. 107, č. 12, s. 949 - 955. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_12\\_949-955.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013_12_949-955.pdf). [cit. 2024-07-14].

- [59] NOVÁKOVÁ, L., 2020. *Hmotnostní analyzátory, Studijní materiál pro předmět Hmotnostní spektrometrie oboru Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, FAF UK.*
- [60] GROSS, J., 2014. *Mass Spectrometry: A Textbook.* 2nd Edition. Springer. ISBN 9783642423468.
- [61] OJANPERÄ, I., A. SAJANTILA, L. VINOGRADOVA, A. THOMAS, W. SCHÄNZER a M. THEVIS. Post-mortem vitreous humour as potential specimen for detection of insulin analogues by LC-MS/MS. *Forensic Science International* [online]. 2013, 233(1), 328-332 [cit. 2022-04-19]. ISSN 0379-0738
- [62] VANHEE, C., S. JANVIER, G. MOENS, E. DECONINCK a P. COURSELLE. A simple dilute and shoot methodology for the identification and quantification of illegal insulin. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, 6(5), 326- 334 [cit. 2022-04-24]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2016.04.006