

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra Analytické chemie



Diplomová práce

Využití kapalinové chromatografie pro stanovení vybraných  
aminokyselin a agmatinu v biologickém materiálu

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Niké Hazuková

## Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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

.....

Podpis studentky

## Poděkování

Velice ráda bych poděkovala paní doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, PhD. za její odborné vedení, trpělivost, vstřícnost, čas a odborné rady, které mi během vypracování mé diplomové práce věnovala. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Javorské za ochotu při spolupráci při vypracování experimentální části diplomové práce, za její rady, velkou trpělivost a zkušenosti, které jsem pod jejím vedením během vypracování diplomové práce získala. Především bych také chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě během celého mého studia podporovali.

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Niké Hazuková

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití kapalinové chromatografie pro stanovení vybraných aminokyselin a agmatinu v biologickém materiálu

Klíčová slova: agmatin, L-arginin, L-citrulin, L-ornitin, UHPLC, chronické rány

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metody pro stanovení agmatinu, L-argininu, L-citrulinu, L-ornitinu v chronických ranách pomocí ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie. Cílem této diplomové práce, bylo vytvořit vhodné chromatografické podmínky pro již zmíněné analyty a možnost využít tuto metodu v rámci klinického výzkumu a praxe.

Během vývoje byly testovány čtyři chromatografické kolony, jako finální kolona byla zvolena Meteoric Core C18 BIO o rozměrech 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7  $\mu\text{m}$ , (YMC, Německo) s povrchově porézními částicemi, pro kterou byly zvoleny tyto podmínky: mobilní fáze byla 100% 10 mM AMFO (o pH 2,5), teplota byla nastavena na 25°C, průtok MF na 0,25 ml/min a nástřik vzorků byl zvolen na 2  $\mu\text{l}$ . Po provedení optimalizace separačních podmínek, byla metoda aplikována na biologický materiál (výpotky z chronických ran), vzorky byly upraveny pomocí extrakčních postupů (ultrafiltrace, deproteinace). Metoda byla částečně validována.

Léčba chronických ran je velice obtížná, proto bude tato nová metoda sloužit pro klinický výzkum a praxi, čímž by se mohla zvýšit úspěšnost predikce prognózy a tím i léčby pacientů s chronickými ranami.

## Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Niké Hazuková

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

Title of diploma thesis: High performance liquid chromatography determination of selected amino acids and agmatine in biological material

Keywords: agmatine, L-arginine, L-citrulline, L-ornithine, UHPLC, chronic wounds

This thesis follows up the method development for the determination of agmatine, L-arginine, L-citrulline, L-ornithine in chronic wounds using ultra-high performance liquid chromatography. The aim of this thesis was to optimize suitable chromatographic conditions for the already mentioned analytes with possibility to use this method in clinical research and practice.

Four chromatographic columns were tested. Finally the Meteoric Core C18 BIO the dimensions 100 x 4.6 mm, 16 nm, 2.7  $\mu\text{m}$  (YMC, Germany) was chosen, using these conditions: the mobile phase (MF) was 100% 10 mM AMFO (pH 2.5), the temperature was set at 25 °C, the MF flow rate was 0.25 mL / min, and the injection volume was 2  $\mu\text{L}$ . After optimization of the separation conditions, the method was applied to biological material (exudate from chronic wounds), samples were modified by selected extraction procedures as ultrafiltration and protein precipitation. The method has been partially validated.

Treatment of chronic wounds is very difficult; this new method can be used for clinical research and practice, and could improve prognosis prediction and the treatment of patients with chronic wounds.

## Obsah

Použité zkratky .....	8
1 Úvod .....	10
2 Cíl práce a popis zadání .....	11
3 Teoretická část .....	12
3.1 Stanovované analyty .....	12
3.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) .....	17
3.2.1 Chromatografické kolony a sorbenty v UHPLC .....	19
3.2.2 Detektory v UHPLC .....	22
3.3 Hmotnostní spektrometrie .....	22
3.3.1 Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii (tvorba iontů) .....	24
3.3.2 Analyzátoři v hmotnostní spektrometrii .....	25
3.3.3 Detektory v MS .....	27
4 Experimentální část .....	28
4.1 Použité přístroje a vybavení .....	28
4.1.1 Přístroje .....	28
4.1.2 Vybavení .....	28
4.1.3 Chromatografické kolony .....	29
4.2 Použité chemikálie .....	29
4.3 Příprava roztoků .....	30
4.3.1 Mobilní fáze .....	30
4.3.2 Zásobní roztoky standardů a pracovní roztoky .....	30
4.3.3 Směs standardů .....	31
5 Výsledky a diskuze .....	32
5.1 Optimalizace chromatografické separace .....	32
5.1.1 Detekční podmínky .....	32
5.1.2 Volba stacionární a mobilní fáze .....	33
5.1.2.1 Kinetex® HILIC 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm, Phenomenex (USA) .....	33
5.1.2.2 Kinetex® Polar C18 100 A, 100 x 3,0 mm, 2,6 μm, Phenomenex (USA) .....	35
5.1.2.3 Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 μm, YMC (Německo) .....	39
5.1.2.4 Kinetex® F5 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm, Phenomenex (USA) .....	41
5.2 Souhrn vybraných podmínek .....	44
5.3 Úprava biologického materiálu .....	44
5.3.1 Ultrafiltrace .....	44

5.3.2 Deproteinace.....	46
5.4 Částečná validace metody- test vhodnosti chromatografického systému (system suitability test) .....	48
5.4.1 Zdánlivý počet teoretických pater .....	48
5.4.2 Výškový ekvivalent teoretického patra .....	49
5.4.3 Faktor symetrie .....	49
5.4.4 Rozlišení .....	50
5.4.5 Opakovatelnost nástřiku .....	51
6 Závěr.....	52
7 Použitá literatura.....	54

## Použité zkratky

ACN	Acetonitril
ADMA	Asymetrický dimethylarginin
AMAC	Octan amonný
AMBI	Hydrogenuhlíčan amonný
AMFO	Mravenčan amonný
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
BEH	Ethylen hybridní částice
bFGF	Fibroblastový růstový faktor
CE	Kolizní energie
DAD	UV/VIS Detektor s diodovým polem
DL	Desolvatační linka
EGF	Epidermální růstový faktor
EI	Elektronová ionizace
ELSD	Odpařovací detektory rozptylu světla
ESI	Ionizace elektrosprejem
FA	Kyselina mravenčí
FAB	Ionizace urychlenými atomy
FLR	Fluorescenční detektor
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPT	Technologie hybridních částic
ICR	Iontová cyklotronová resonance
IL-1a	Interleukin 1-alfa
IL- 1b	Interleukin 1-beta
IL -6	Interleukin 6
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
MALDI	Laserová desorpce za účasti matrice



MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MMPs	Sérové matrix metaloproteinázy
MS	Hmotnostní detektor
m/z	Poměr hmotnost/náboj
NO	Oxid dusnatý
ODS	Oktadecylsilikagel
PDA	UV/ VIS Detektor s diodovým polem
PDGF	Růstový faktor destiček
QqQ	Trojité kvadrupól
Q1	První kvadrupól
Q2	Druhý kvadrupól
Q3	Třetí kvadrupól
SPE	Extrakce na tuhou fázi
TGF-alfa	Transformující růstový faktor alfa
TGF-beta	Transformující růstový faktor beta
TIC	Celkový iontový proud
TNF-alfa	Tumor nekrotizující faktor
TOF	Analyzátor doby letu
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC/MS	Spojení ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
UV/ VIS	Spektrofotometrický detektor
VEFG	Vaskulární endotelový faktor

## 1 Úvod

Hojení chronických ran je velmi problematické, především kvůli dlouhodobému léčení, které však nemá vždy úspěšné výsledky. Mezi chronicky nehojící se rány se obecně řadí např. bércové vředy, exulcerující maligní nádory kožní i vnitřních orgánů a popáleniny III. stupně nebo tzv. syndrom „diabetické nohy“, který je definován jako ulcerace nebo poškození tkání nohou u diabetiků způsobené neuropatií a ischemií, které je většinou doprovázeno infekcí). Metoda, která by byla schopna monitorovat a hodnotit vybrané analyty přímo ze vzorků odebraných z místa rány, není doposud dostupná. Vývoj takové metody by mohl pomoci při léčbě pacientů s chronickými ranami. Diplomová práce je zaměřena na vývoj nové metody UHPLC-MS/MS s cílem stanovit agmatin, L-arginin, L-citrulin, L-ornitin ve výpotcích přímo odebraných z chronických ran pacientů. Jako vhodná separační technika byla zvolena UHPLC-MS/MS, která nabízí vývoj citlivých, rychlých metod vhodných pro analýzu velkých sérií vzorků. Během vývoje této metody byly testovány čtyři typy chromatografických kolon a také různé kombinace mobilních fází. Pro vzorky biologického materiálu byly aplikovány některé vybrané metody, jako jsou: ultrafiltrace a deproteinace. Jak již bylo zmíněno, léčba chronických ran je velice obtížná, proto by se na základě výsledků získaných pomocí této metody mohla zvýšit úspěšnost predikce prognózy a tím i léčby.

## 2 Cíl práce a popis zadání

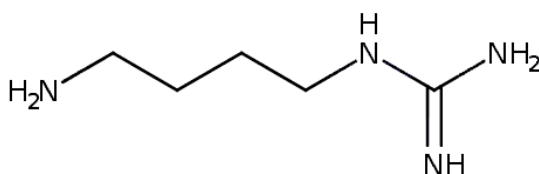
Cílem této diplomové práce bylo, vybrat vhodné chromatografické podmínky pro stanovení agmatinu, L-citrulinu, L-ornitinu a L-argininu ve výpotcích chronických ran. Novou UHPLC-MS/MS metodu částečně validovat a začít s vývojem extrakčního postupu. Nová metoda bude po jejím dokončení a kompletní validaci využita v klinickém výzkumu i praxi, při léčbě a stanovení prognózy u pacientů s chronickými ranami.

## 3 Teoretická část

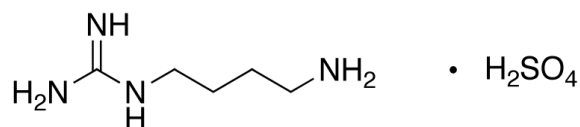
### 3.1 Stanovované analyty

#### Agmatin

Agmatin je biogenní amin, který vzniká v lidských tkáních dekarboxylací z argininu za přítomnosti mitochondriálního enzymu arginin dekarboxylasy a je degradován enzymem agmatinasou na močovinu a putrescin. Jeho zastoupení se v různých tkáních lidského organismu liší, bylo zjištěno, že největší zastoupení má agmatin v žaludku. Bylo pozorováno, že se stresem vzrůstá jeho koncentrace v krvi, také se podílí na ovlivnění syntézy NO (oxidu dusnatého), který v organismu zajišťuje vazodilataci cév. Je také označován jako neurotransmitter [1]. Jeho hodnota rozpustnosti ve vodě: 3,61 mg/ml, logP: -1,2, pKa 12,61 a molekulová hmotnost: 130,19 g/mol [2]. Jeho struktura je zobrazena na Obrázku č. 1. Na Obrázku č. 2 je zobrazen agmatin sulfát, standard využívaný při vývoji metody.



Obrázek č. 1: Struktura Agmatinu [2]

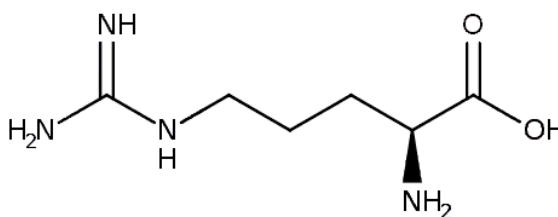


Obrázek č. 2: Struktura Agmatin sulfátu, standard využívaný při vývoji metody [3]

#### L-Arginin

L-Arginin je semi-esenciální aminokyselina s protizánětlivým efektem, jehož dekarboxylací vzniká agmatin. Je meziproductem močovinného cyklu, který probíhá především v játrech, hydrolýzou je přeměněn na močovinu a L-ornitin. Také se účastní

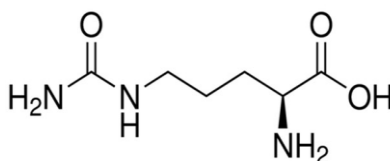
syntézy oxidu dusnatého. Jeho dalším metabolitem je asymetrický dimethylarginin (ADMA), který brzdí syntézu oxidu dusnatého, čím způsobuje agregaci a vazokonstrikci cév je označován jako prognostický marker (např. pro vaskulární onemocnění, hypertenzi, aterosklerózu atd.). U argininu byl také prokázán jeho stimulační efekt na imunitní systém, což je velice příznivé v období po úrazu či při zánětlivých stavech [4], [5], [54]. Jeho rozpustnost ve vodě: 2,28 mg/ml, logP: -3,2, pKa: 12,41 a molekulová hmotnost: 174,20 g/mol [6]. Jeho struktura, je zobrazena na Obrázku č. 3.



**Obrázek č. 3:** Struktura L-Argininu [6]

### L-Citrulin

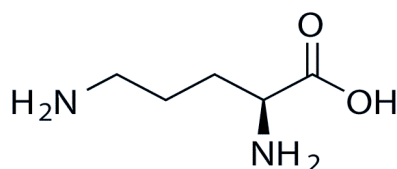
První izolaci a popis struktury citrulinu provedli v roce 1914 Koga a Ohtake, ze šťávy vodního melounu. Citrulin je neproteinová neesenciální aminokyselina a je meziproduktem močovinového cyklu. V močovinovém cyklu vzniká z L-ornitinu a také se tvoří jako vedlejší produkt při tvorbě NO z L-argininu. Jeho zastoupení v plazmě je poměrně vysoké, na základě jeho produkce v enterocytech tenkého střeva. Jeho koncentrace v plazmě je lékaři využívána k posouzení funkčnosti tenkého střeva, případně akutním a chronickým onemocněním tenkého střeva. Jeho využití jako biomarkeru se rozšířilo nejen v intestinální patologii, ale také při diagnostice revmatoidní artritidy [7], [8], [9]. Jeho hodnota rozpustnosti ve vodě je 21,8 mg/ml, logP -3,9, pKa (nejsilnější báze) 2,27 a pKa (nejsilnější kyseliny) 9,23, molekulová hmotnost 175,19 g/mol [11]. Jeho struktura, je zobrazena na Obrázku č. 4.



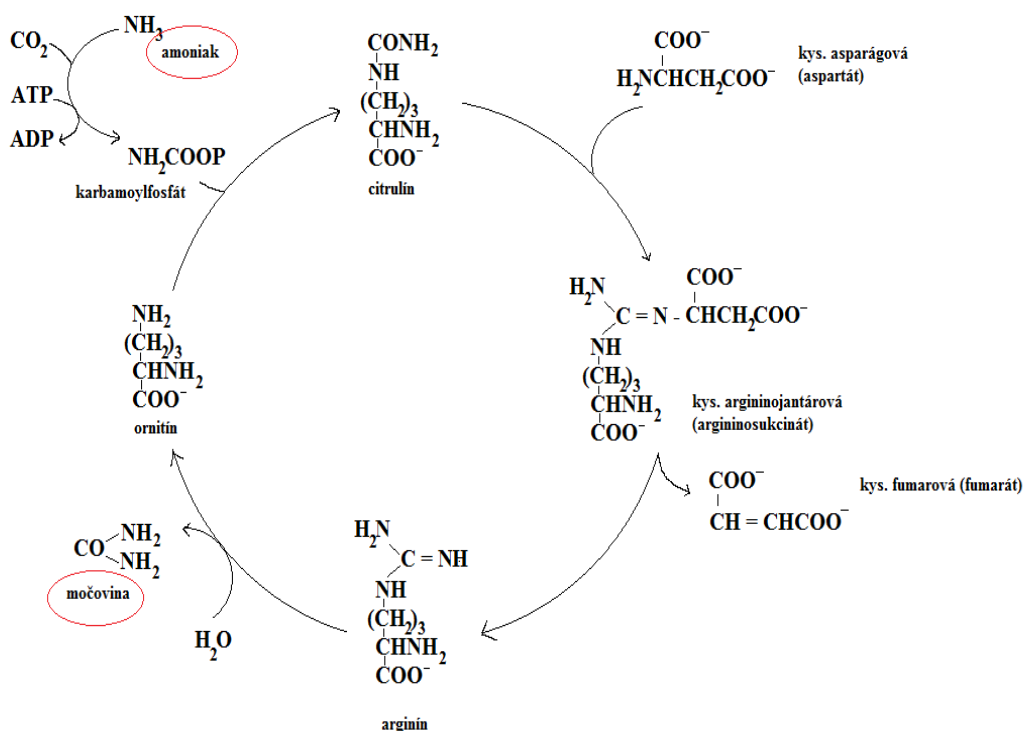
**Obrázek č. 4:** Struktura L-Citrulinu [10]

## L-Ornitin

L-ornitin je neproteinová aminokyselina, která je součástí močovinového cyklu. Přísunem ornitinu do buňky, se rychlost tohoto cyklu zpomaluje. Vzniká hydrolyzou argininu pomocí enzymu arginázy, jedná se o poslední krok v močovinovém cyklu, dochází ke vzniku močoviny. Následně se ornitin váže v mitochondriích s molekulou karbamoylfosfát a jejich kondenzací vzniká citrulin. Jeho rozpustnost ve vodě je 172 g/l, logP -3,7 pKa (nejsilnější báze) 10,29 a pKa (nejsilnější kyseliny) 2,67, molekulová hmotnost 132,16 g/mol [12], [13]. Jeho struktura je zobrazena na Obrázku č. 5. Na Obrázku č. 6 lze vidět zapojení ornitinu a výše uvedených analytů v močovinovém cyklu.



Obrázek č. 5: Struktura L-Ornitinu [14]



Obrázek č. 6: Zobrazení stanovovaných analytů v močovinovém cyklu [15]

## Stanovení analytů v chronických ranách pacientů

Chronické rány patří mezi závažné zdravotní komplikace, jejichž hojení je velice obtížné, špatně koordinované a ne vždy úspěšné. Obecně se mezi chronické rány řadí (např. diabetické ulcerace, bérkové vředy na Obrázku č. 7, popáleniny III. stupně, dekubity, exulcerující maligní nádory kožní na Obrázku č. 8). Doposud nebyla vyvinuta metoda, která by umožňovala výše vybrané analyty stanovovat přímo ze vzorku odebraných z chronické rány. Cílové analyty byly vybrány na základě jejich uplatnění při hojení ran a v syntéze významných sloučenin (např. putrescin, oxid dusnatý), které se také uplatňují při hojení. Putrescin patří mezi polyaminy, které se podílejí na růstu a proliferaci buněk, vzniká dekarboxylací ornitinu nebo degradací agmatinu. Dalším význam produktem je oxid dusnatý, na jehož metabolismu se podílí nejen arginin, ale také agmatin a jeho funkce je při hojení ran uplatňována především díky jeho schopnosti rozšiřování cév, což vede k lepšímu prokrvení a vyživení postižené tkáně. Pro citrulin je obecně známo, že zlepšuje nejen hojení ran, ale také prokrvení tkáně a zajišťuje přesun energie do svalů. Cílem této diplomové práce, bylo tedy vyvinout novou chromatografickou metodu s vhodnými chromatografickými podmínkami, která by umožňovala poskytnout informaci o hladinách vybraných aminokyselin a agmatinu vztaženou přímo na postižené místo a lépe přiblížit biologické procesy probíhající v chronické ráně a také poukázat na zdravotní stav pacienta a tím pomoci při léčbě. Vzorky výpotků z chronických ran pacientů, byly odebírány přímo z obvazového krytí rány, nejvíce byli zastoupeni pacienti s bérkovými vředy a diabetickými ulceracemi [1], [5], [44], [45], [41].



**Obrázek č. 7:** Bérkové vředy venózní etiologie [53]



**Obrázek č. 8:** Smíšený bazoskvamocelulární karcinom exulcerující [41]

#### **Fáze hojení chronických ran:**

- **1. Fáze exsudativní:** ve které dochází k zástavě krvácení a čistění rány se především uplatňují trombocyty, které sekrenují významné cytokiny podílející se na hojení rány (např. destičkově derivovaný faktor (PDGF), inzulin-like růstový faktor-1, epidermální růstový faktor (EGF) atd.). Další dominantní buňky jsou neutrofilní granulocyty, které nejen produkují významné mediátory zánětu (např. cytokinin TNF-alfa a interleukin-1), ale také fagocytují bakterie a sekrenují proteolytické enzymy podílející se na odstranění poškozené tkáně. Zásadní význam v této fázi hojení mají makrofágy, které jsou do místa poškození přitahovány chemotakticky a uvolňují proteolytické enzymy, které rozvolňují poškozenou tkáň, pokračují ve fagocytóze a uvolňují další významné cytokiny (např. IL-1a, IL-1b, IL-6 a TNF-alfa atd.) a růstové faktory (např. bFGF, TGF-alfa, TGF-beta atd.), které podporují zánětlivý proces.
- **2. Fáze proliferační:** tato fáze, je také označována jako granulační, protože zde dochází k tvorbě nové granulační tkáně společně s krevními kapilárami. Opět se této fáze účastní cytokiny a růstové faktory (např. bFGF, TGF-beta, VEGF, a PDGF), které se podílejí na stimulaci fibroblastů a buňkách cévního endotelu (podílející se na tvorbě cévnaté granulační tkáně).
- **3. Fáze epitelizační, nemodelační:** tato závěrečná fáze se vyznačuje postupným pokrýváním povrchu postiženého místa novou kůží a dochází k vytvoření jizvy. Na základě podpory růstových faktorů a vyzrávání kolagenních vláken dochází k buněčné migraci, proliferaci a diferenciaci. Významnou roli, zde mají proteolytické enzymy (např. MMPs – sérové matrix metaloproteinázy), které jsou produkovány epiteliálními



buňkami. Diferenciací buněk, tedy dochází k přestavbě epidermis s jednotlivými vrstvami a funkcemi, což vede ke změnám ve škáře a rána se mění v jizevnatou tkáň, která je oproti zdravé tkáni nejen méně pružná, ale také méně vaskularizovaná a je označována jako riziková.

Jednotlivé fáze hojení u chronických ran, neprobíhají úplně dle výše uvedeného postupu, především proto, že je u pacientů s chronickými ranami je porušena regulační a stimulační funkce cytokinů, růstových faktorů, proteáz a endokrinních hormonů, jejichž činnost sehrává klíčovou roli v procesu hojení. Dochází k prodloužení exsudativní a proliferační fáze. Pro úspěšnou léčbu chronických ran je důležité zjistit především příčinu vzniku rány a také faktory podněcující zhoršení stavu pacienta, proto se k léčbě chronických ran využívá tzv. *wound management*, který zahrnuje: určení příčiny rány, zhodnocení rány a určení jejího stádia a také identifikuje faktory, které prodlužují hojení. Na základě dodržování *wound managementu* a komplexního přístupu k pacientovi, lze chronické rány léčit úspěšně či alespoň zlepšit kvalitu života nemocného [41], [42], [43].

### 3.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Separční chromatografické techniky, slouží k separaci směsi látek na jednotlivé složky. Jednotlivé složky směsi jsou děleny na základě, neustálého ustanovení rovnováhy mezi stacionární (pevná látka nebo kapalina nanosená na pevnou látku) a mobilní fází (kapalina nebo plyn). Mezi chromatografické separační techniky, patří ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Je to moderní chromatografická technika, která udává nový směr v kapalinové chromatografii, jedná se o kvantitativní i kvalitativní metodu, která je považována za vysoce výkonnou kapalinovou chromatografii a to především na základě zvýšení separační účinnosti, rychlosti analýzy a citlivosti metody. U této chromatografické metody lze využít pro sorbent stacionární fáze, částice menší než 2  $\mu\text{m}$ , které se podílejí na pozitivěch této metody, jako jsou: citlivost, rozlišení a zkrácení doby analýzy oproti vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). Celá separace probíhá za velmi vysokého tlaku až 100 MPa. UHPLC má potenciál nahradit analytické techniky, které jsou méně šetrné k životnímu prostředí, díky nižší spotřebě rozpouštědel, její uplatnění je nejen ve farmaceutickém

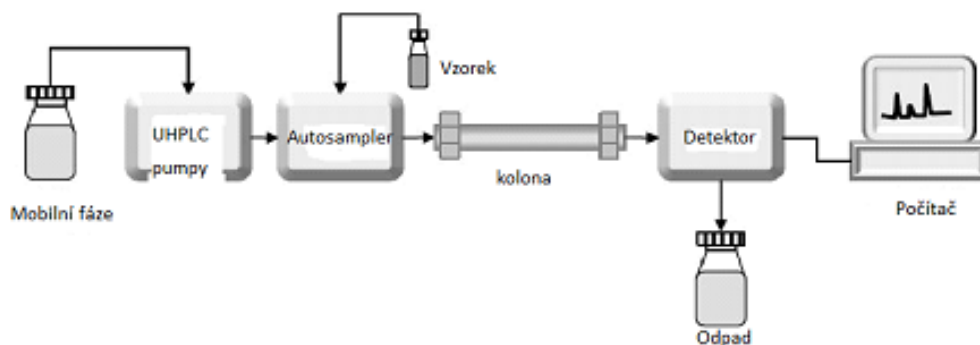
průmyslu, kde slouží k analýze různých léčiv a biofarmaceutik, ale také pro analýzu, látek v biologickém materiálu, odpadních vodách a v potravinářském průmyslu [16], [17], [18].

UHPLC systém vyžaduje u jednotlivých částí těsné a odolné šroubení, které je odolné vysokým tlakům. Ocel, pozlacená ocel, kombinace ocel-PEEK (Polyetheretherketon), jsou využívány pro výrobu spojovacího materiálu předkolon, jejich držáků a kolon (ocel).

UHPLC systém se skládá, ze zásobníků mobilní fáze, pump, degaséru, který slouží k odplynění mobilní fáze, injektoru, kolony umístěné v termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Schéma je zobrazeno na Obrázku č. 9.

Mobilní fáze jsou umístěny v zásobníku, nejčastěji se jedná o polární či nepolární rozpouštědla o různé koncentraci, případně i v kombinaci s pufrý. Při přípravě mobilní fáze, je třeba používat rozpouštědla nejvyšší čistoty, která jsou přesně určena pro UHPLC systém, v případě kombinace s pufrý, je doporučeno mobilní fázi přefiltrovat pomocí speciálních filtrů, aby se zamezilo zanesení kolony. V této diplomové práci, byly mobilní fáze s pufrý, filtrovány pomocí vakua přes filtry o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ . Jak již bylo zmíněno, UHPLC systém pracuje za vysokého tlaku, který dosahuje až 100 MPa, pumpy (čerpadla) musí být upraveny, tak aby byly, schopny pracovat a zajišťovat stabilní a kontinuální průtok mobilní fáze. Dalším důležitým krokem pro úspěšnou analýzu a účinnost chromatografického systému, je dávkování vzorku do systému. Dávkování vzorku, je prováděno pomocí automatického dávkovače tzv. autosampleru, který je navržen tak, aby byl schopen pracovat za vysokého tlaku a umožňoval rychlý nástřik vzorků i velmi malých objemů, pro plné využití rychlosti analýzy, kterou UHPLC umožňuje. Autosampler je propojen se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou vzorky umístěny ve vialkách případně v mikrotiračních destičkách. Dochází tedy, k nasátí vzorku (typickým objem vzorku 2-5  $\mu\text{l}$ ) a jeho vnesení do mobilní fáze a následného unášení vzorku mobilní fází na kolonu, kde dochází k separaci. Za chromatografickou kolonou je umístěn detektor. Detektory využívané v UHPLC by měly dosahovat: vysoké citlivosti, vysoké frekvence sběru dat, zajišťovat minimální mimokolonové objemy (nízkoobjemová detekční cela), spolehlivosti, snadného použití a signálu nezávislého na změně průtoku či teploty. Detektor, je umístěn za chromatografickou kolonou a zaznamenává odezvu signálu při

průchodu čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt (měří jeho koncentraci nebo hmotnost). Výstupy z detektoru (chromatogram, hmotnostní spektrum), jsou zaznamenány v počítači [16], [18], [19], [20], [21], [22], [26].



**Obrázek č. 9:** Jednoduché schéma- instrumentace UHPLC (obrázek převzat a upraven)  
[18]

### 3.2.1 Chromatografické kolony a sorbenty v UHPLC

Kolony, které jsou využívány pro UHPLC systém jsou nejčastěji dlouhé 5 až 10 cm a jejich vnitřní průměr je většinou 3,0 nebo 2,1 mm [24], [22]. Velikost používaných částic se obvykle pohybuje od 1,5 do 2,0  $\mu\text{m}$ . Jejich plnění probíhá za vysokého tlaku, který zajišťuje optimální uložení a stabilitu sorbentu v těle kolony. Koncové spoje kolony jsou opatřeny frity, které zabraňují uvolňování stacionární fáze z kolony, umožňují plynulý průtok mobilní fáze kolnou a schopnost odolávat vysokému tlaku, který je během analýzy využíván. Každá stacionární fáze se liší svým chemickým složením, hydrofobicitou, hydrolytickou stabilitou a chemickými interakcemi se stanovovanými analyty.

Sorbenty, které se používají pro stacionární fázi v UHPLC kolonách, mohou být organického (např. polymer, uhlík) nebo anorganického typu (např. silikagel, oxid hlinitý či oxid zirkoničitý) v případě hybridních stacionárních fází, jde o kombinaci upraveného silikagelu s polymerem. Je obecně známo, že stacionární fáze na bázi silikagelu, není příliš vhodná, kvůli své limitaci v rozsahu pH a také chemické nestabilitě, která může způsobit: rozpuštění silikagelu a chvostování píků bazických analytů. Sorbenty, které jsou založeny na polymeru, mohou pracovat v široké oblasti

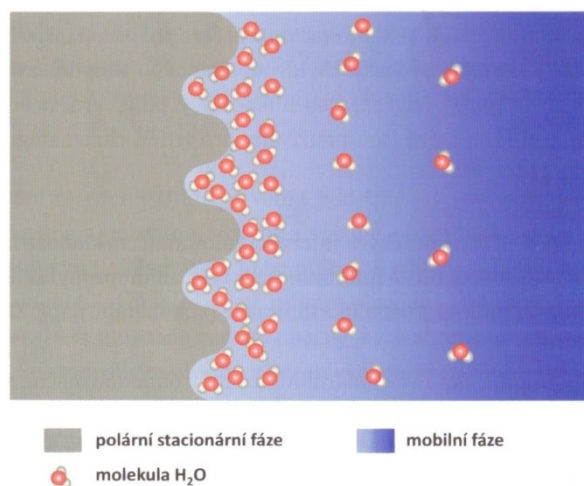
pH a jsou chemicky stabilní, avšak jejich nevýhodou je nižší mechanická odolnost, nižší účinnost a špatná retence analytů. Na základě již zmíněných výhod a nevýhod sorbentů byly vyvinuty tzv. Hybride Particle Technology (HPT) – hybridní částice, které obsahují methylsiloxanové jednotky jak uvnitř, tak na povrchu. Spojením silikagelu a polymeru dosahují optimálních vlastností (např. mechanická pevnost, mimořádná separační účinnost a vynikají stabilita v širokém rozmezí pH). Druhou generací hybridních částic je Ethylen-Bridged Hybrids (BEH Technology), jejichž částice mají ve své struktuře ethylenové můstky. Významnou výhodou BEH je oproti první generaci, jejich výrazně lepší separační účinnost, mechanická pevnost a možný rozsah pH 1-12. Dalším typem jsou částice s pevným jádrem tzv. povrchově porézní částice (core-shell), které mají homogenní porézní obal (zde se odehrává separace) na pevném jádře silikagelu (v případě firmy Pehnomenex, je jádro tvořeno oxidem křemičitým [25]). Pozitiva těchto částic spočívají ve vysoké účinnosti, nižším zpětném tlaku na koloně a také možnosti používat vyšších průtoků mobilní fáze bez ztráty chromatografické účinnosti. Uplatnění těchto částic je i v HPLC systému, čehož se využívá především při přenosu metody z HPLC na UHPLC, kde je základním předpokladem pro přenos využití identické stacionární fáze.

Dalším významným typem sorbentu stacionární fáze, jsou nečasticové porézní monolitické kolony, které mají vysokou permeabilitu a velký separační povrch. Jak již bylo zmíněno sorbent těchto kolon, je tvořen z porézního monolitického materiálu. Tyto kolony umožňují využití vysokých průtoků mobilní fáze (až 10 ml/min) a tím výrazně urychlí dobu analýzy, v UHPLC systému se průtok mobilní fáze pohybuje v rozmezí 0,01-2 ml/min, proto je využití těchto kolon vhodné spíše pro HPLC systém, kde se využívá vyšších průtoků mobilní fáze. Výjimku, však tvoří Chromolith® monolitické kolony, které lze využít i v UHPLC systému [55]. Monolitické kolony obsahují makropóry nebo mezopóry. Makropóry (větší póry, obvykle 1-2  $\mu\text{m}$ ), které umožňují použití vyšších průtoků mobilní fáze a to bez nárůstu tlaku na koloně a mezopóry (menší póry, obvykle 12 nm), které zvětšují separační povrch a zajišťují, tak vysokou účinnost separačního procesu. [21], [22], [23].

Typy stacionárních fází, lze také rozlišit podle typu ligandu, který se váže na povrch silikagelu na tzv. normální a reverzní fázi a na základě toho, se pak volí vhodný typ mobilní fáze. Při normální fázi, je stacionární fáze polárního charakteru (např.

silikagel) a mobilní fáze nepolárního charakteru (např. hexan), v případě reverzní fáze je na silikagelu například navázán C18 (Oktadecylsilikagel), stacionární fáze je tedy nepolární a mobilní fáze (např. acetonitril), je polární. Při vývoji této metody byla také testována fáze C18 s kombinací povrchově porézních částic, na jejichž povrchu byl navázán C18. Technologii core-shell využívají i ostatní studované fáze během vývoje metody [25], [26].

Při vývoji metody byla zkoušena kolona, která pracuje na principu HILIC (hydrofilní interakční chromatografie), která je vhodná pro separaci polárních a hydrofilních látek. Stacionární fáze pro HILIC, jsou typické normální fáze (polární) např. silikagel nebo silikagel modifikovaný aminopropylou funkční skupinou a mobilní fáze jsou vodně-organické jako v případě reverzního systému. Označení hydrofilní vyznačuje její afinitu k vodě, která se přidává do mobilních fází při HILIC separacích na polárních kolonách. Mechanismus HILIC není stále zcela objasněn, jedním z možných principů je mechanismus rozdělování měřených analytů mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou vody, která je fixována na povrchu polární stacionární fáze (Obrázek č. 10). Během separace dojde k oddělení analytů z mobilní fáze a jejich přenosu do povrchové hydrofilní vrstvy stacionární fáze. Retence zkoumaných analytů na koloně je zvyšována jejich zvyšování polarity a naopak ke snížení retence dochází při zvýšení polarity mobilní fáze (tedy při použití zvýšeného podílu vody či pufru v MF). Její využití je vhodné při využívání detekce ESI-MS [27], [22], [49]. Další kolonou byla Meteoric core C18 BIO, která se vyznačuje svým využitím v širokém rozmezí pH a je také ideální kolonou pro HPLC i UHPLC systém ve spojení s hmotnostním spektrometrem [28]. Poslední zkoušenou byla fluorovaná stacionární fáze (pentafluorofenyl) jejíž sorbent je tvořen povrchově porézními částicemi, které jsou modifikované navázaným pentafluorofenylem pomocí alkylových řetězců [29].



**Obrázek č. 10:** Difuzní vrstva vody na povrchu HILIC stacionární fáze [22]

### 3.2.2 Detektory v UHPLC

V UHPLC systému, jsou zejména používané tyto detektory [21], [30]:

- Spektrofotometrický detektor (UV/VIS)
- UV/VIS detektor s diodovým polem (PDA, DAD)
- Odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD)
- Fluorescenční detektor (FLR)
- Hmotnostní detektor (MS)

Při vývoji metody byl využíván hmotnostní detektor (MS), který detekuje vzniklé ionty, vznikající ionizací studovaných analytů [21]. Při vývoji této metody byla k ionizaci analytů využívána měkká ionizační technika- ionizace elektrosprejem (ESI).

### 3.3 Hmotnostní spektrometrie

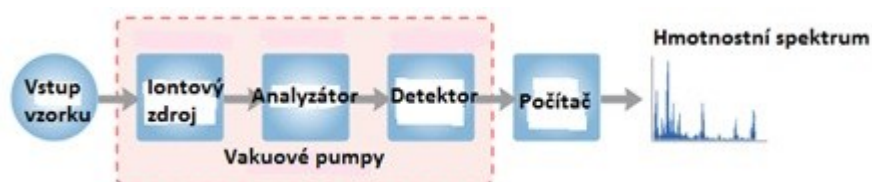
Hmotnostní spektrometrie jednou z nejpoužívanějších analytických technik, která je široce používaná v těchto oblastech: farmaceutická a environmentální analýza, analýza potravin, biologické a lékařské vědy apod. (např. mikrobiologie, rostlinná věda, klinická diagnostika, forenzní a proteinové výzkumy)[31]. Je využívána pro kvantifikaci známých sloučenin (odezva je závislá na koncentraci), identifikaci neznámých sloučenin ve vzorku a také pro objasnění chemické struktury a vlastností stanovovaných analytů

(např. molekulová hmotnost, elementární složení a zastoupení izotopů). Při této metodě, dochází k přeměně neutrálních molekul stanovaných analytů na ionty, které jsou rozděleny podle jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následně detekovány. Výsledkem měření na hmotnostním spektrometru je hmotnostní spektrum, které zobrazuje závislost intenzity iontů (absolutní/relativní) na jejich  $m/z$  [32], [33].

**Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí:**

- Iontový zdroj
- Analyzátor
- Detektor

Kromě těchto částí je nezbytnou součástí systému, také sonda pro zavedení vzorku, vakuové pumpy, které zajišťují, že spektrometr pracuje za vysokého vakua ( $10^{-3}$  až  $10^{-11}$  Pa, hodnotu ovlivňuje výběr analyzátoru), iontová optika, která slouží k fokusaci a urychlení iontů a také počítač, který slouží k ovládání systému, sběru dat (spekter) a umožňuje pracovat se získanými daty a porovnávat spektra s referenčními knihovny. Schéma spektrometru zobrazuje Obrázek č. 11 [32].



**Obrázek č. 11:** Schéma hmotnostního spektrometru (obrázek převzat a upraven) [32]

Po vstupu vzorku do hmotnostního spektrometru, dochází k jeho ionizaci v iontovém zdroji. Po ionizaci, vzniklé ionty pokračují dále do analyzátoru, který slouží k jejich rozdělení dle poměru  $m/z$  za vysokého vakua. Následně přechází do detektoru, který konvertuje ionty na elektrické signály a ty jsou následně převáděny do počítače, který zobrazuje tyto signály ve formě hmotnostního spektra [32], [33].

### 3.3.1 Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii (tvorba iontů)

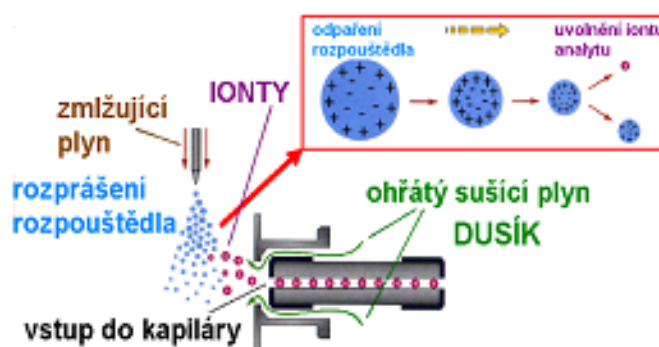
Jak již bylo zmíněno, iontový zdroj převádí neutrální molekuly analytů na ionty, vše na základě využití ionizačních technik. V hmotnostní spektrometrii se využívá mnoho typů ionizačních technik. Klasické techniky mezi, které se řadí elektronová ionizace (EI) a ionizace urychlenými atomy (FAB), nejsou s moderní hmotnostní spektrometrií dnes spojovány, kromě vyžití EI pro analýzu týkající se životního prostředí. Ionizační techniky se rozdělují na tvrdé a měkké, jejich výběr závisí na typu analytu a jeho vlastností (např. polarita, molekulová hmotnost, těkavost látky atd.). Mezi tvrdé ionizační techniky, se řadí: elektronová ionizace (EI), mezi měkké ionizační techniky se řadí: chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace elektrosprejem (ESI), ionizace urychlenými atomy (FAB), laserová desorpce za účasti matrice (MALDI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Při vývoji této metody, byla využita měkká ionizační technika: ionizace elektrosprejem, která je kompatibilní s kapalinovou chromatografií a společně s APCI a APPI pracuje za atmosférického tlaku [33],[34].

#### **Ionizace elektrosprejem (ESI):**

ESI je označována, za nejoblíbenější a nejšetrnější ionizační techniku v hmotnostní spektrometrii, která je nejvíce využívána ve spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS). Tato ionizační technika, je vhodná pro polární, iontové analyty a biopolymery (až do 150 kDa). Principem této techniky, je rozpuštění stanovovaného analytu ve vhodném eluentu (např. methanol), který je následně přiváděn na kovovou kapiláru, na kterou je vloženo vysoké napětí (3-5 kV). Na konci této kapiláry, vznikají malé kapičky rozpuštěného analytu, které obsahují velké množství náboje. Díky přiváděnému dusíku na konec kapiláry, který zde působí jako tzv. sušící plyn, dochází k odpařování eluentu, čímž dojde ke zvýšení hustoty povrchového náboje kapiček a dochází k tzv. Coulombické explozi. Tento proces vede k rozdělení kapiček, ještě na menší kapičky s rozdělením původních nábojů a opakování tohoto procesu vede, k uvolnění a vzniku iontů (ionty jsou odváděny do analyzátoru). Při této ionizaci mohou vznikat i vícenásobně nabité ionty a to v případě, více ionizačních míst v molekule



stanovovaného analytu, proto je také vhodná pro sledování vysokomolekulárních látek. Existují však, další ionizační techniky (např. nanoelektrosprej nebo desorpční elektronová ionizace (DESI)), které pracují na obdobném principu a mohly by být použitelné místo ESI [33], [34],[35],[36],[37]. Schéma ionizace vzorku elektrosprejem je zobrazena na Obrázku č. 12.



**Obrázek č. 12:** Ionizace vzorku- ionizace elektrosprejem (ESI) [50]

### 3.3.2 Analyzátoři v hmotnostní spektrometrii

Analyzátor je považován za srdce hmotnostního spektrometru a je umístěn za iontovým zdrojem. Odděluje ionty v plynné fázi za vysokého vakua, dle jejich poměru  $m/z$  a následně zaznamenává jejich intenzity. Výkon hmotnostních analyzátorů lze charakterizovat na základě těchto parametrů jako je (např. rozlišení, hmotnostní přesnost, hmotnostní rozsah měření atd.). Pro separaci iontu lze použít různé fyzikální principy:

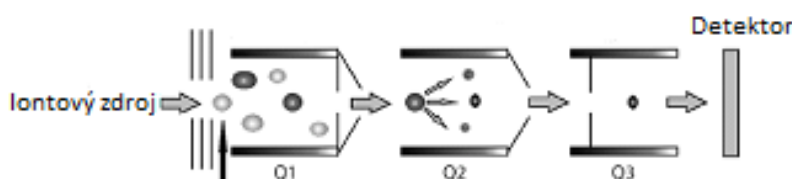
- zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický analyzátor)
- různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupóly a iontové pasti)
- různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu (TOF))
- různá frekvence harmonických oscilací v orbitrapu
- různá absorpce energie při cyklonálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance – ICR)

Mezi základní typy hmotnostních analyzátorů lze zařadit: magnetický sektorový analyzátor, kvadrupólový analyzátor, 3D a lineární iontovou past, průletový analyzátor, orbitrap a iontovou cyklotronovou resonanci [33], [38]. Při vývoji této metody byl využit trojitý kvadrupól (QqQ).

### **Kvadrupól a Trojitý kvadrupól (QqQ):**

Kvadrupól, je analyzátor jehož konstrukce se skládá ze čtyř kovových tyčí, na které je vkládáno střídavé napětí. Během tohoto děje dochází k oscilaci (kmitání iontů), která je však charakteristická pro ionty určitého poměru  $m/z$ . Tyto ionty se dostávají dále do detektoru, ostatní ionty jsou zachytávány na tyčích kvadrupólu. Postupnými změnami napětí, tedy oscilací, postupně projdou do detektoru všechny ionty. Spojením tří kvadrupólu vzniká tzv. trojitý kvadrupól, jehož schéma je zobrazeno na Obrázku č. 13. Jeho konstrukce se skládá z:

- 1. Kvadrupól (Q1): vybírá ionty, které byly generovány v iontovém zdroji.
- 2. Kvadrupól (Q2): je využíván jako tzv. kolizní cela, která slouží k fragmentaci vybraného iontu, pomocí kolizního plynu (např. argon), který je silnější než dusík a podporuje silnější fragmentaci.
- 3. Kvadrupól (Q3): je využíván pro analýzu již fragmentovaných iontů a posledním krokem před samotnou detekcí v detektoru.



**Obrázek č. 13:** Schéma trojitého kvadrupólu – QqQ (obrázek převzat a upraven)

[51]

Trojitý kvadrupól (QqQ), je vyžadován především pro svoji vyšší citlivost a specifičnost při měření a také může být použit k vytvoření dalších fragmentačních iontů z vybraného iontu. Je často využíván pro kvantitativní analýzy a screening drog v toxikologických laboratořích [37], [39].

### 3.3.3 Detektory v MS

Jak již bylo zmíněno, závěrečný krokem v hmotnostní spektrometrii je detekce iontu, ke které dochází po jejich separaci podle poměru  $m/z$  v analyzátoru. Detektory slouží k určení intenzity iontů a následného zobrazení hmotnostního spektra iontů. Jako detektory jsou v MS využívány: elektronový násobič a fotonásobič [32], [37].

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS, UHPLC/MS), je dnes využíváno, především pro přesnější identifikaci analytů ve směsi (složitě matrici). V HPLC/UHPLC dochází k separaci měřených analytů a v hmotnostním spektrometru k samotné detekci. Výsledkem měření je chromatografický záznam, kde lze vidět tzv. MRM přechody které jsou charakteristické pro dané analyty. Spojení těchto dvou systémů, lze využít v klinické, farmaceutické, environmentální, chemické a biochemické analýze [33], [40], [52].

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje a vybavení

#### 4.1.1 Přístroje

UHPLC systém Nexera, Shimadzu (Japonsko) složen z:

- Centrální jednotka CMB-20 A
- Degasser DGU-20 A3
- Dvě vysokotlaké pumpy LC-30 AD
- Dávkoč typ SIL/30 AC pro vialky
- Rack Changer II pro mikrotitrační destičky
- Kolonový termostat CTO-20 AC
- Selekční ventil
- Detektor - Hmotnostní spektrometr LCMS-8030 trojitý kvadrupól, Shimadzu (Japonsko) s ionizačním zdrojem ESI
- Počítačový software LabSolutions 5.41 SP1

Analytické váhy, Sartorius AG CPA 623S (Německo)

Magnetická míchačka, Ika Werke (Německo)

Manifold pro mikrotitrační destičky, Multi-well Filter Plate Vacuum Manifold, Pall Life Science (USA)

Mikrocentrifuga D3024R High Speed Refrigerated Micro-Centrifuge Scilogex (USA)

pH metr Sentron SI 400, Sentron Europe BV (Nizozemsko)

Vakuová pupma Vacc Space 50, Chromservis (Česká republika)

Vakuová odparka Concentrator plus, Eppendorf (Německo)

Vortex Lab Dancer, Ika Werke (Německo)

#### 4.1.2 Vybavení

Ultrafiltrační zkumavky, Microcon-10kDa Centrifugal filter Unit with Ultracel-10 membrane, Merck Millipore Ltd. (Irsko)

Mikrotitrační destičky 96-jamkové, Brand plates F pure grade-clear, 350 µl Brand (Německo)

Filtry pro filtraci mobilní fáze, Hydrophilic Polypropylen membrane filters 100/ pack, GH polypek 47 mm, 0,2 µm, Pall Life Science (USA)

Mikrotitrační destičky s filtrem, AcroPreptm Advance 96 filter Plate 0,2 µm 350 µl, Pall life Science (USA)

#### 4.1.3 Chromatografické kolony

Kinetex® HILIC 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA)

Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 µm, YMC (Německo)

Kinetex® Polar C18 100 A, 100 x 3,0 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA)

Kinetex® F5 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA)

#### 4.2 Použité chemikálie

Hydrogenuhlíčitán amonný, Fluka Analytical- Sigma Aldrich (Česká republika)

Mravenčan amonný (≥ 99%), Fluka Analytical- Sigma Aldrich (Česká republika)

Octan amonný (≥ 99%), Fluka Analytical- Sigma Aldrich (Česká republika)

Kyselina octová, Fluka analytical- Sigma Aldrich (Česká republika)

Kyselina mravenčí (98-100%), Emsure®- Merck (Česká republika)

L-Arginin, reagent grade (≥ 98%) - Sigma Aldrich (Japonsko)

Agmatin sulfát (≥ 97%) - Sigma life science (USA)

L-Citrulin (≥ 98%) - Sigma Aldrich (Čína)

L- Ornitin monohydrochlorid (≥ 99%) - Sigma life science (Japonsko)

Voda (LC-MS Chromasolv®), Fluka analytical- Sigma Aldrich (Česká republika)

2-propanol (LC-MS Chromasolv®), Fluka analytical-Sigma Aldrich (Česká republika)

Methanol (LC-MS Chromasolv®), Fluka analytical- Sigma Aldrich (Česká republika)

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena z vodné a organické složky. Ve vodné mobilní fázi byly zkoušeny: LC-MS voda, LC-MS voda s 0,1% kyselinou mravenčí (FA), mravenčan amonný, hydrogenuhličitan amonný a octan amonný s kyselinou mravenčí nebo kyselinou octovou o různém pH. V Organické fázi byly zkoušeny: acetonitril, methanol, acetonitril s methanolem a s 0,1% FA, methanol s 0,1% FA. Mobilní fáze byla vždy filtrována pomocí vakuové pumpy přes membránové filtry o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Zásobní roztoky standardů a pracovní roztoky

#### **Agmatin**

Na analytických vahách bylo naváženo 1,41 mg standardu agmatinu a rozpuštěno ve vodě LC-MS čistoty v 5 ml odměrné baňce a doplněno po rysku. Tímto způsobem byl připraven zásobní roztok agmatinu o koncentraci 1373,1  $\mu\text{M}$ . Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o požadované koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , 153 nM či 40 nM.

#### **L- Citrulin**

Obdobným způsobem byl následně připraven i zásobní roztok standardu L-citrulinu. Bylo naváženo 1,49 mg standardu L-citrulinu na analytických vahách a rozpuštěno ve vodě LC-MS čistoty v 5 ml odměrné baňce a doplněno po rysku LC-MS vodou. Výsledná koncentrace zásobního byla 1699,8  $\mu\text{M}$ . Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ .

#### **L-Arginin**

Pro přípravu zásobního roztoku L-argininu, bylo naváženo na analytických vahách 1,20 mg standardu, rozpuštěno ve vodě LC-MS čistoty v 5 ml odměrné baňce a doplněno po rysku LC-MS vodou. Tento zásobní roztok byl připraven o koncentraci 1373  $\mu\text{M}$ . Z toho zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ .

## L-Ornitin

Pro přípravu zásobního roztoku ornitinu bylo naváženo na analytických vahách 1,43 mg standardu, rozpuštěno v malém množství LC-MS vody v 5 ml odměrné baňce a doplněno po rysku LC-MS vodou. Tento zásobní roztok byl připraven o koncentraci 1691,4  $\mu\text{M}$ . Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ .

Zásobní roztoky standardů byly uchovávány v lednici při 4°C dva týdny. Ze zásobních roztoků byly připraveny pracovní roztoky o požadované koncentraci a ředěny LC-MS vodou či pufrům (mravenčan amonný, octan amonný).

### 4.3.3 Směs standardů

Během analýzy byla použita směs standardů, jejich výsledná koncentrace je uvedena v Tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1:** Koncentrace standardů

Analyt	c
Agmatin	10 $\mu\text{M}$ , 40 nM, 153 nM
L-Citrulin	10 $\mu\text{M}$
L-Arginin	10 $\mu\text{M}$
L-Ornitin	10 $\mu\text{M}$

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Optimalizace chromatografické separace

Optimalizace je proces, během kterého jsou vybrány vhodné podmínky pro separaci námi zkoumaných látek. V průběhu vývoje metody byly pro standardy optimalizovány tyto parametry: detekční podmínky, stacionární fáze a složení mobilní fáze. Nejdříve bylo nutné vyhledat veškeré informace o fyzikálně-chemických vlastnostech zkoumaných látek, včetně jejich struktury a poté byly zkoumány různé druhy mobilní a stacionární fáze.

#### 5.1.1 Detekční podmínky

Po provedení automatické optimalizace detekce hmotnostního spektrometru s využitím roztoků standardních látek byly vyhodnoceny tzv. MRM přechody (multiple reaction monitoring) a také další podmínky detekce jako je: teplota DL (Desolvation Line), teplota heat bloku, průtok sušícího plynu, průtok nebulizačního plynu. Pro každý stanovovaný analyt byla zvolena kombinace tří MRM přechodů pro přesnější identifikaci stanovených analytů. Detekční podmínky jsou uvedeny v Tabulce č. 2 a MRM přechody jsou uvedeny v Tabulce č. 3

**Tabulka č. 2:** Nastavení parametrů detekce

Typ ionizace	ESI +
Teplota DL (Desolvation Line)	150 °C
Teplota na Heat bloku	400 °C
Průtok sušícího plynu	15 L/min
Průtok nebulizačního plynu	3 L/min



**Tabulka č. 3:** MRM přechody jednotlivých analytů

Prekursorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (CE)
<b>L-Ornitin</b>		
133,20	>70,00	-21,0
133,20	>115,90	-16,0
133,20	>28,10	-38,0
<b>L-Arginin</b>		
174,70	>70,00	-25,0
174,70	>60,00	-15
174,70	>115,90	-17
<b>Agmatin</b>		
131,15	>72,00	-17
131,15	>30,00	-28
131,15	>59,95	-13
<b>L-Citrulin</b>		
175,70	>70,00	-24,0
175,70	>158,95	-12,0
175,70	>112,95	-18,0

### 5.1.2 Volba stacionární a mobilní fáze

#### 5.1.2.1 Kinetex® HILIC 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA)

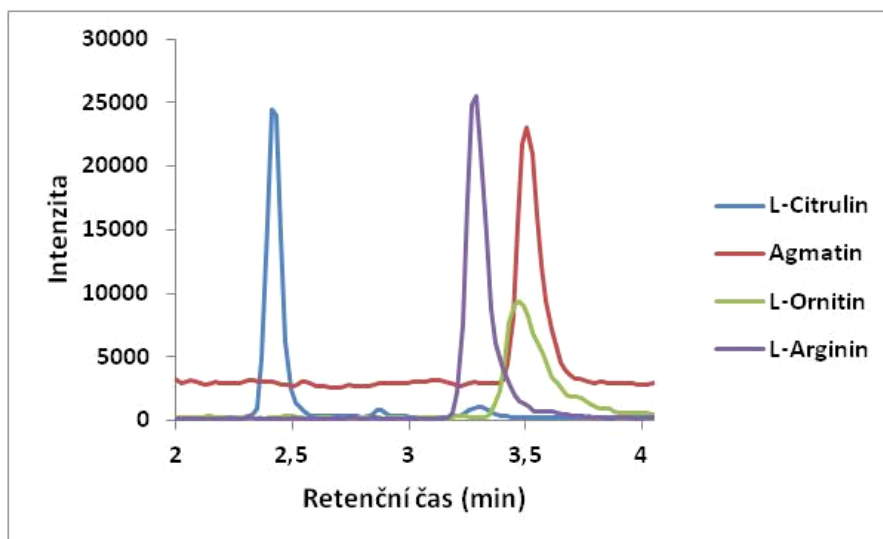
Jako první byla zkoušena kolona HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) s povrchově porézními částicemi. Tyto částice se skládají z dvou odlišných částí sorbentu, pevné jádro z neporézního silikagelu a vnější vrstva z několika vrstev porézního chemicky modifikovaného silikagelu (zde se odehrává separace). HILIC kolona je určena pro malé polární látky, proto byla zvolena jako první a nejvhodnější kolona pro naše analyty.

Byla testována řada mobilních fází (MF), v první fázi byla zkoušena kombinace mobilní fáze: LC-MS voda a ACN (acetonitril). Tato kombinace nebyla vhodná ani po přidání 0,1% kyseliny mravenčí do LC-MS vody a prodloužením analýzy nedošlo k detekci agmatinu. Pro další složení mobilních fází byl použit 5 mM a 10 mM AMFO v kombinaci s 0,1% kyselinou mravenčí, acetonitrilem a methanolem. Po použití AMFO došlo k retenci agmatinu na koloně. Jednotlivé poměry mobilních fází jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4:** Složení mobilních fází

Rozpouštědla	Poměry									
LC-MS H <sub>2</sub> O	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN LC-MS	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC-MS H <sub>2</sub> O +0,1% FA	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-
ACN + 0,1% FA	-	60	-	-	-	65	65	-	-	-
5 mM AMFO + 0,1% FA (pH=3)	-	-	30	20	20	35	-	-	-	-
10 mM AMFO v 85% ACN + 0,1% FA	-	-	-	-	-	-	-	65	80	-
10 mM AMFO v LC-MS H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
10 mM AMFO + 0,1% FA	-	-	-	-	-	-	35	35	-	-
ACN + MeOH + 0,1% FA	-	-	70	80	-	-	-	-	-	-
MeOH + 0,1% FA	-	-	-	-	80	-	-	-	-	-

Při kombinaci 10 mM AMFO s 0,1% FA : ACN s 0,1% FA (35:65), bylo zjištěno, že pík agmatinu má vyšší intenzitu a také lepší tvar, než při použití 5 mM AMFO ve stejné kombinaci. Teprve při použití 10 mM AMFO s 0,1% FA : 10 mM AMFO v 85% ACN s 0,1% FA, byl výrazně, i když stále nedostatečně, zlepšen i tvar píku ornitinu, který bylo předtím problematické detekovat. Jako optimální podmínky pro separaci analytů na této koloně byla zvolena kombinace mobilní fáze 10 mM AMFO v LC-MS H<sub>2</sub>O : 10 mM AMFO v 85% ACN s 0,1% FA (20:80), (Obrázek č. 14).



**Obrázek č. 14:** Chromatogram I

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin a 10  $\mu$ M L-ornitin (naředěny v AMFO, pH=2,5)

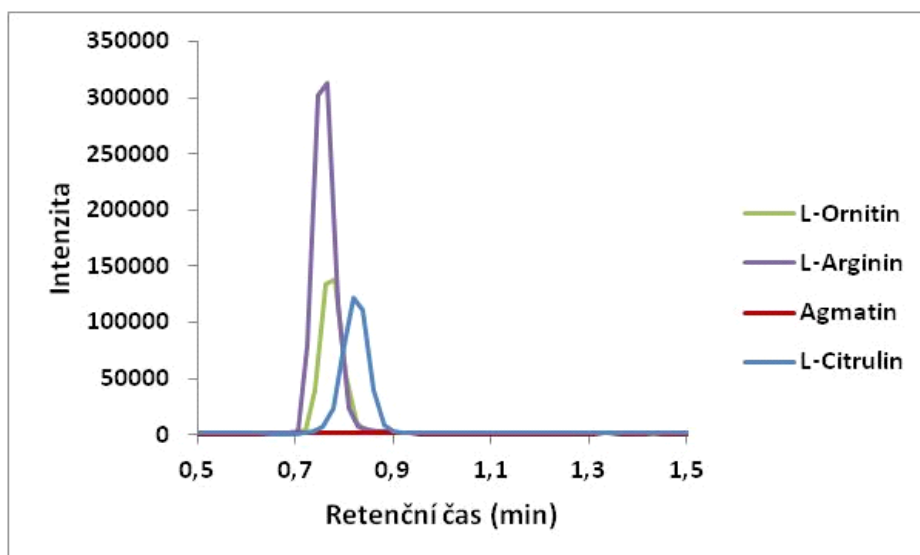
20% AMFO (10 mM) v LC-MS H<sub>2</sub>O (pH= 2,5) + 80% AMFO (10 mM) v 85% ACN ( 0,1% FA), 0,8 ml/min, 2  $\mu$ l,

Kinetex® HILIC 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).

#### 5.1.2.2 Kinetex® Polar C18 100 A, 100 x 3,0 mm, 2,6 $\mu$ m, Phenomenex (USA)

Druhou zkoušenou kolonou byla kolona Polar C18, také s povrchově porézními částicemi, na nichž je chemicky navázaný alkyl C18 (oktadecylsilikagel=ODS). Navázaný alkyl způsobuje hydrofobní interakce a polární modifikace povrchu, má vliv na zvýšenou selektivitu a retenci pro polární a bazické látky.

Jako první mobilní fáze byla zvolena LC-MS voda (pH 5,3). Retenční časy analytů byly velice podobné, snahou bylo analyty oddělit kvůli citlivosti metody, tato MF byla nevhodná. Nedošlo k retenci analytů na koloně. Dále byla zkoušena LC-MS voda s 0,1% FA (pH 2,8) a také LC-MS voda s kyselinou octovou (pH 3,5). Snížené pH LC-MS vody, pomocí kyseliny mravenčí či octové vedlo k zvýšené retenci a zlepšené separaci analytů. Další zkoušená kombinace LC-MS vody s 0,1% FA a ACN LC-MS v poměru 95:5 byla nevhodná, došlo ke zhoršení separace, tedy vzájemnému překrytí píku standardů (Obrázek č. 15). Další kombinace mobilních fází, jsou uvedeny v Tabulce č. 5.



**Obrázek č. 15:** Chromatogram II

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin, 10  $\mu$ M L-ornitin (naředěny v LC-MS vodě)

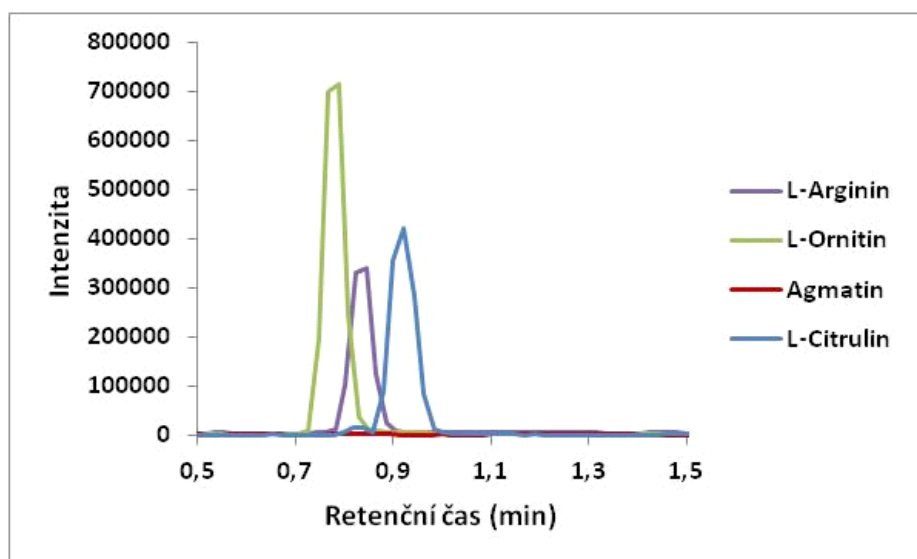
95% LC-MS H<sub>2</sub>O (0,1% FA) + 5% LC-MS ACN (bez FA), 0,5 ml/min, 2  $\mu$ l,

Kinetex® Polar C18 100 A, 100 x 3,0 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).

**Tabulka č. 5:** Složení mobilních fází

Rozpouštědla	Poměry												
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=5,3)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC-MS H <sub>2</sub> O + 0,1% FA (pH=2,8)	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC-MS H <sub>2</sub> O + 0,1% AA (pH=3,5)	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 mM AMFO (pH= 2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
ACN LC-MS	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 mM AMFO v LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=5,7)	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-
10 mM AMFO + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=3,6)	-	-	-	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 mM AMFO + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=2,8)	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
10 mM AMFO + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=3,3)	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
10 mM AMFO + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=2,5)	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
10 mM AMAC + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=5,0)	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-
10 mM AMAC + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=3,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
10 mM AMBI + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=8,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
10 mM AMBI + LC-MS H <sub>2</sub> O (pH=7,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-

Standardy byly rozpuštěny v LC-MS vodě, bylo však zjištěno, že po rozpuštění standardů v 10 mM AMFO došlo k výraznému zvýšení intenzity píku agmatinu. Dále byl jako mobilní fáze zkoušen octan amonný (AMAC) při různých hodnotách pH, ale nedocházelo k výrazné separaci analytů. Analyty nebyly separovány ani při použití hydrogenuhličitanu amonného (AMBI) o (pH=8,0 a 7,0) a agmatin nebyl detekován vůbec. Při složení mobilní fáze LC-MS vody s 0,1% FA (pH= 2,8), došlo ke zvýšení intenzity píků, kromě agmatinu (Obrázek č. 16). Při další separaci, byl proto přidán do mobilní fáze 10 mM AMFO, byl snížen průtok mobilní fáze a standardy analytů byly rozpuštěny v 10 mM AMFO (pH=2,5). Tyto podmínky se ukázaly jako nejvhodnější pro testovanou kolonu. Následně byla porovnána separace při použití mobilní fáze s 100% 10 mM AMFO (pH= 2,5), (Obrázek č. 17) a 100% 10 mM AMFO (pH=2), (Obrázek č. 18). Bylo zjištěno, že při pH 2,5 došlo ke zvýšení intenzity píků a při pH 2, byla lepší retence a separace analytů na koloně, ale snížená intenzita píků.

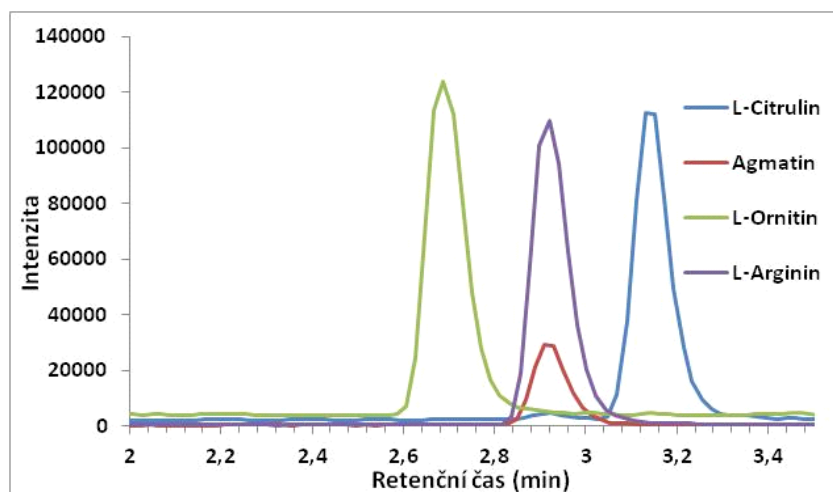


**Obrázek č. 16:** Chromatogram III

153 nM agmatin, L-citrulin 10  $\mu$ M, L-arginin 10  $\mu$ M, L-ornitin 10  $\mu$ M (naředěny v LC-MS vodě)

100% LC-MS H<sub>2</sub>O (0,1% FA); (pH= 2,8), 0,5 ml/min, 2  $\mu$ l,

Kinetex®Polar C18 100 A, 100 x 3,0 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).

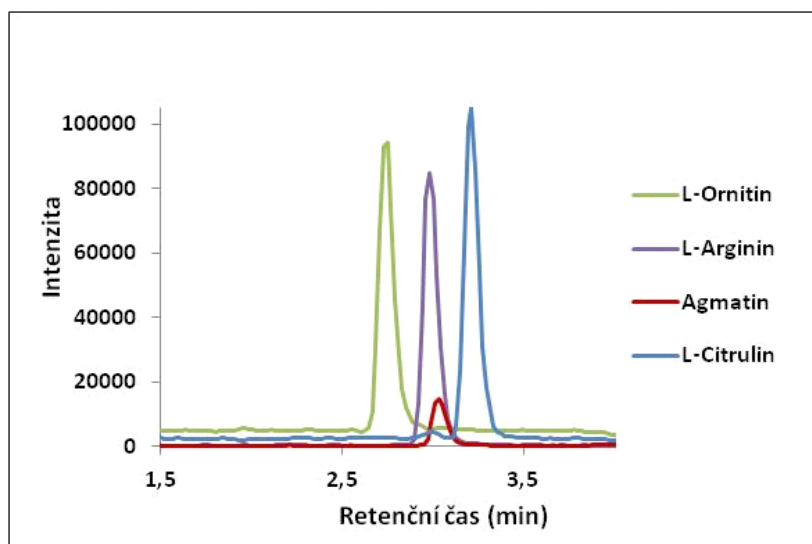


**Obrázek č. 17:** Chromatogram IV

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin, 10  $\mu$ M L-ornitin (naředěny v 10 mM AMFO pH 2,5)

100% 10mM AMFO v LC-MS H<sub>2</sub>O (pH= 2,5), 0,15 ml/min, 2  $\mu$ l,

Kinetex<sup>®</sup> Polar C18 100 A Core Shell technology, 100 x 3,0 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).



**Obrázek č. 18:** Chromatogram č. V

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin, 10  $\mu$ M L-ornitin (naředěny v 10 mM AMFO pH 2)

100% 10mM AMFO v LC-MS H<sub>2</sub>O (pH= 2), 0,15 ml/min, 2  $\mu$ l,

Kinetex<sup>®</sup> Polar C18 100 A, 100 x 3,0 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).

### 5.1.2.3 Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 $\mu$ m, YMC (Německo)

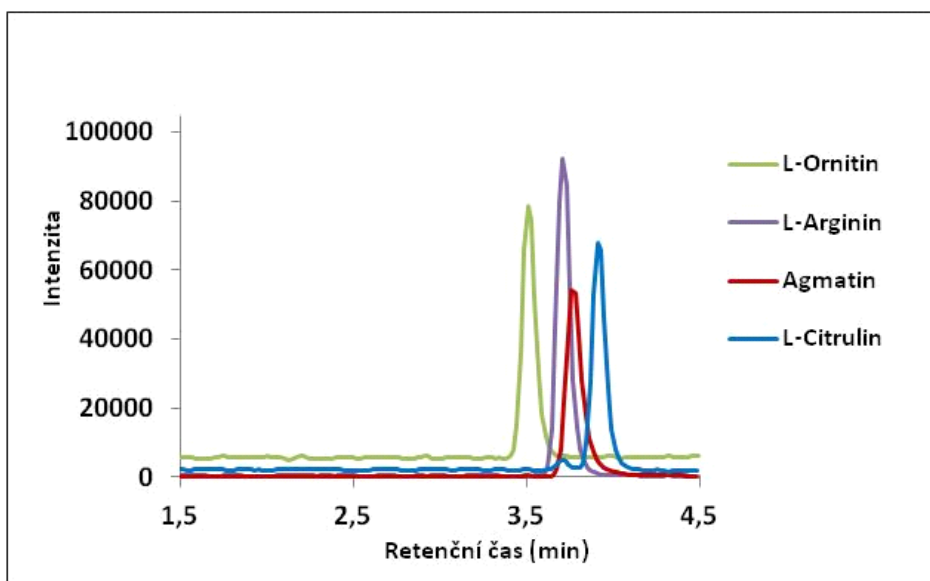
Třetí zkoušenou kolonou byla kolona Meteoric core C18 BIO. Tato analytická kolona je také s povrchově porézními částicemi, avšak s většími póry, je tedy vhodná pro větší molekuly a pro analýzu biologického materiálu.

Na základě zkušeností s kolonou Polar C18, bylo v mobilních fázích použito 10 mM AMFO. V první mobilní fázi bylo zkoušeno 100% 10 mM AMFO (pH=3) o průtoku 0,5 ml/ min a standardy analytů byly rozpuštěny ve vodě. Následně byly zkoušeny mobilní fáze v kombinaci 10 mM AMFO (pH=3) a methanolu, poté pouze 100% 10 mM AMFO (pH=2,5) a také kombinace 10 mM AMFO (pH=2,5) a 10 mM AMFO v ACN. Během těchto kombinací, bylo zkoušeno snížení průtoků MF z 0,5 ml/min na 0,2 a 0,25 ml/min a standardy analytů byly rozpuštěny v 10 mM AMFO, což vedlo ke zvýšení intenzity píku agmatinu. Jednotlivé poměry mobilních fází jsou uvedeny v Tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6:** Poměry mobilních fází

<b>Rozpouštědla</b>	<b>Poměry</b>				
10 mM AMFO (pH=3)	100	95	-	-	-
10 mM AMFO (pH=2,5)	-	-	100	100	95
10 mM AMFO v ACN LC-MS + 0,1% FA	-	-	-	-	5
MeOH LC-MS	-	5	-	-	-

Použití methanolu v MF vedlo ke zhoršení separace a zkrácení retenčních časů analytů. Nejlepší separace na této koloně byla při použití 100% 10 mM AMFO (pH= 2,5), při průtoku 0,25 ml/min a rozpuštění standardů v 10 mM AMFO (Obrázek č. 19). Na základě tohoto výsledku, byly porovnávány dvě separace analytů o stejném složení MF, ale rozdílném rozpuštění standardů a průtoku MF. V první separaci byly standardy analytů rozpuštěny v LC-MS vodě o průtok MF 0,2 ml/min (Obrázek č. 20) a při druhé separaci byly rozpuštěny v 10 mM AMFO o průtoku MF 0,25 ml/min. Toto porovnání ukázalo, že při rozpuštění analytů v 10 mM AMFO došlo ke zvýšení intenzity píku agmatinu a také, že změna průtoku MF neměla vliv na separaci (Obrázek č. 21).

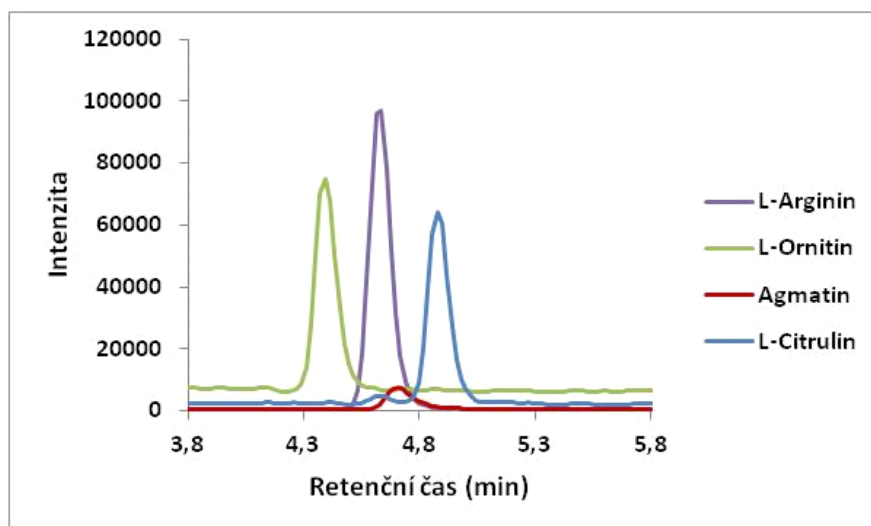


**Obrázek č. 19:** Chromatogram VI

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin, 10  $\mu$ M ornitin (rozpuštěny v 10 mM AMFO pH= 2,5)

100% 10 mM AMFO (pH= 2,5), 0,25 ml/min, 2  $\mu$ l,

Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7  $\mu$ m, YMC (Německo).



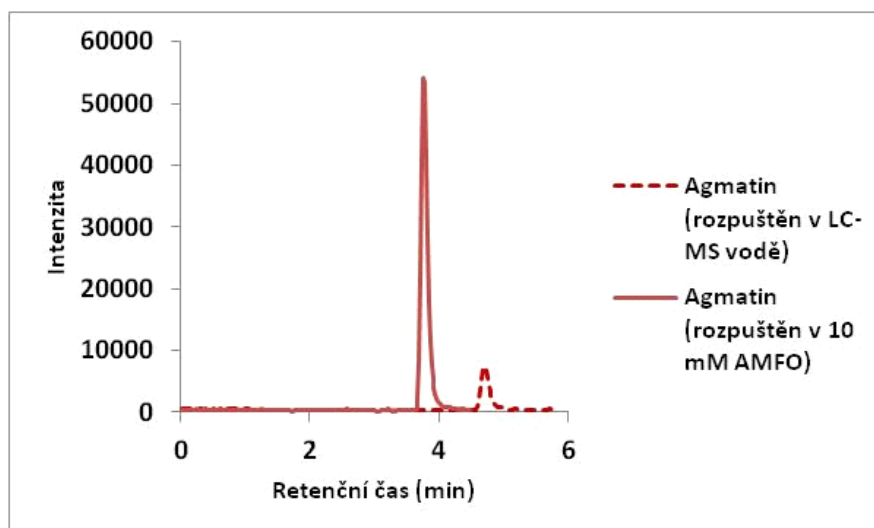
**Obrázek č. 20:** Chromatogram č. VII

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin, 10  $\mu$ M L-ornitin (rozpuštěny v LC-MS vodě)

100% 10 mM AMFO (pH= 2,5), 0,2 ml/min, 2  $\mu$ l,

Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7  $\mu$ m, YMC (Německo).





**Obrázek č. 21:** Chromatogram č. VIII

153 nM agmatin (rozpuštěn v 10 mM AMFO, pH=2,5) 100% 10 mM AMFO (pH= 2,5), 0,25 ml/min, 2  $\mu$ l;

153 nM agmatin (rozpuštěn v LC-MS vodě) 100% 10 mM AMFO (pH= 2,5), 0,2 ml/min, 2  $\mu$ l

Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7  $\mu$ m, YMC (Německo).

#### *5.1.2.4 Kinetex® F5 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 $\mu$ m, Phenomenex (USA)*

Poslední zkoušenou byla fluorovaná stacionární fáze (pentafluorofenyl) jejíž sorbent je tvořen povrchově porézními částicemi, které jsou modifikované navázaným pentafluorofenylem pomocí alkylových řetězců.

Jako první mobilní fáze byla zvolena 100% LC-MS voda (pH= 5,3) a poté byla zkoušena kombinace LC-MS vody a methanolu s 0,1% FA v poměru 95:5. Obě tyto kombinace byly nevhodné pro detekci píku agmatinu. Následně byla zkoušena 100% LC-MS voda s 0,1% FA (pH=3,3), kde bylo možné zachytit pík agmatinu, avšak o malé intenzitě. Při dalším měření byl do mobilních fází na základě zkušeností z předešlých kolon přidán 10 mM AMFO s 0,1% FA v kombinaci s LC-MS acetonitrilem obsahující 0,1% FA. Při dalším měření byl 10 mM AMFO s 0,1% FA kombinován s LC-MS methanolem obsahující 0,1% FA ve stejných poměrech jako s LC-MS acetonitrilem. Jednotlivé poměry a kombinace dalších mobilních fází jsou uvedeny v Tabulce č. 7. Tato dvě měření byla porovnávána a bylo zjištěno, že v případě kombinace 10 mM

AMFO s 0,1% FA : MeOH s 0,1% FA (95:5), došlo ke zvýšení intenzity píků, lepší retenci, prodloužení retenčních časů a lepší separaci jednotlivých analytů než při kombinaci s ACN.

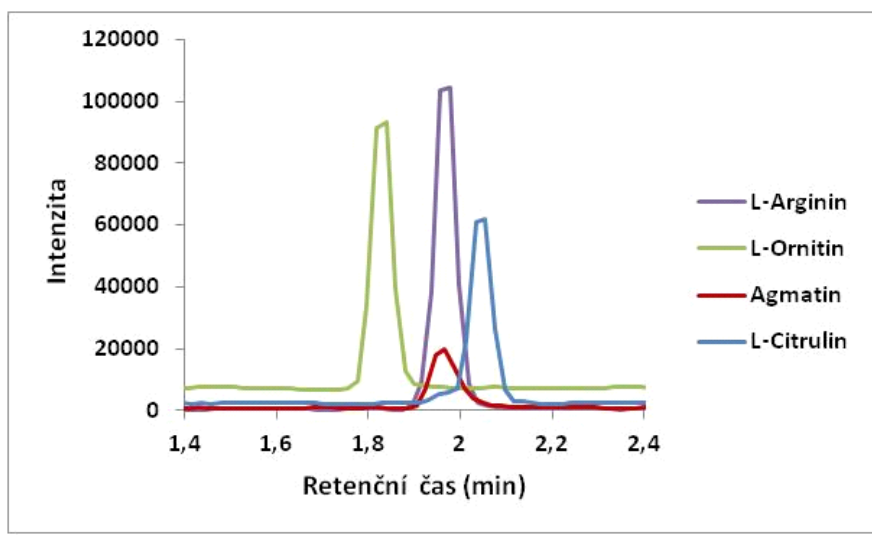
**Tabulka č. 7:** Složení mobilních fází

<b>Rozpouštědla</b>	<b>Poměry</b>						
LC-MS voda (pH=5,3)	100	-	-	-	-	-	95
LC-MS voda + 0,1% FA (pH=3,3)	-	100	-	-	-	-	-
10 mM AMFO + 0,1% FA	-	-	95	95	80	100	-
ACN LC-MS + 0,1% FA	-	-	5	-	-	-	-
MeOH LC-MS + 0,1% FA	-	-	-	5	-	-	5
10 mM AMFO + MeOH 85% + 0,1% FA	-	-	-	-	20	-	-

Na základě těchto kombinací uvedených v tabulce, bylo zjištěno, že zvýšením procent organického rozpouštědla v mobilní fázi došlo k zhoršení separace a zkrácení retenčních časů analytů.

Dále byly také porovnávány separace analytů v přítomnosti 10 mM AMFO jak ve vodné, tak i organické části mobilní fáze se separací, kdy bylo 10 mM AMFO obsaženo pouze ve vodné části mobilní fáze, poměry jsou uvedeny v Tabulce č. 7. Chromatogramy těchto separací byly velice podobné, proto tedy stačí zastoupení 10 mM AMFO ve vodné části mobilní fáze.

Na závěr byla porovnávána separace, kdy byla mobilní fáze složena pouze z 10 mM AMFO s 0,1% FA (Obrázek č. 22) se separací, kde byla v mobilní fázi použita LC-MS voda s 0,1% FA (Obrázek č. 23). Porovnání ukázalo, že ve vodném prostředí došlo ke zvýšení intenzity a zkrácení retenčních časů všech analytů kromě agmatinu, jehož intenzita a retence na koloně byla vyšší v přítomnosti 10 mM AMFO v mobilní fázi. K dalšímu zvýšení intenzity píku agmatinu došlo při naředění standardů 10 mM AMFO s 0,1% FA.

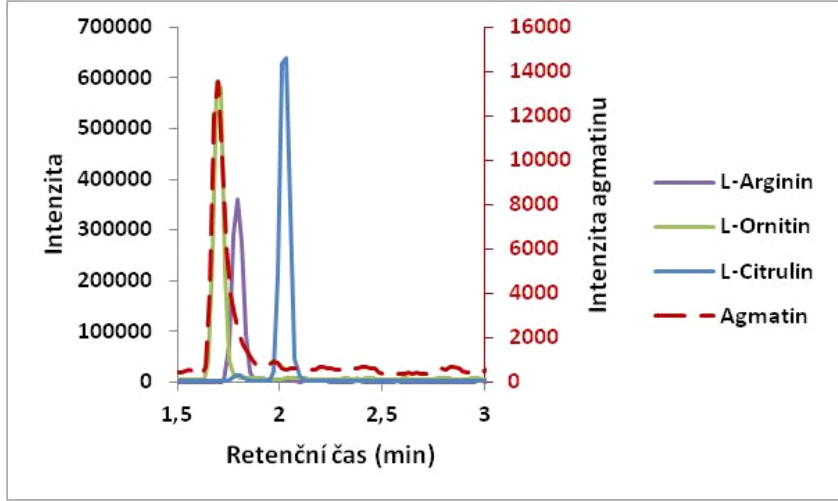


**Obrázek č. 22:** Chromatogram č. IX

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin, 10  $\mu$ M L-ornitin (rozpuštěny v LC-MS vodě)

100% 10 mM AMFO + 0,1% FA, 0,5 ml/min, 2  $\mu$ l,

Kinetex® F5 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).



**Obrázek č. 23:** Chromatogram č. X

153 nM agmatin, 10  $\mu$ M L-citrulin, 10  $\mu$ M L-arginin, 10  $\mu$ M L-ornitin (rozpuštěny v LC-MS vodě)

100% LC-MS H<sub>2</sub>O + 0,1% FA, 0,5 ml/min, 2  $\mu$ l,

Kinetex® F5 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).

## 5.2 Souhrn vybraných podmínek

Jako nejlepší kolona byla vyhodnocena Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7  $\mu\text{m}$ , YMC (Německo), na které bylo dosaženo nejvyšší intenzity agmatinu, jehož koncentrace je v biologickém materiálu velmi nízká. Nejvhodnější podmínky pro tuto kolonu jsou uvedeny v Tabulce č. 8.

**Tabulka č. 8:** Souhrn vybraných podmínek

<b>Analytická kolona</b>	Meteoric Core C18 BIO, 100x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 $\mu\text{m}$ , YMC Německo
<b>Mobilní fáze</b>	100% 10 mM AMFO
<b>Průtok</b>	0,25 ml/min
<b>pH</b>	2,5
<b>Detekce</b>	MS/MS (vybrané MRM)
<b>Teplota</b>	25 °C
<b>Nástřikový objem</b>	2 $\mu\text{l}$
<b>Retenční časy</b>	L-ORN 3,513 min
	L-ARG 3,712 min
	L-CIT 3,918 min
	AGM 3,769 min

## 5.3 Úprava biologického materiálu

Před samostatnou analýzou biologického materiálu, v našem případě výpotků z ran pacientů, byly provedeny extrakční postupy, aby nedošlo k zanesení a znečištění kolony a celého chromatografického systému. Byly používány dva typy extrakčních postupů: ultrafiltrace a deproteinace.

### 5.3.1 Ultrafiltrace

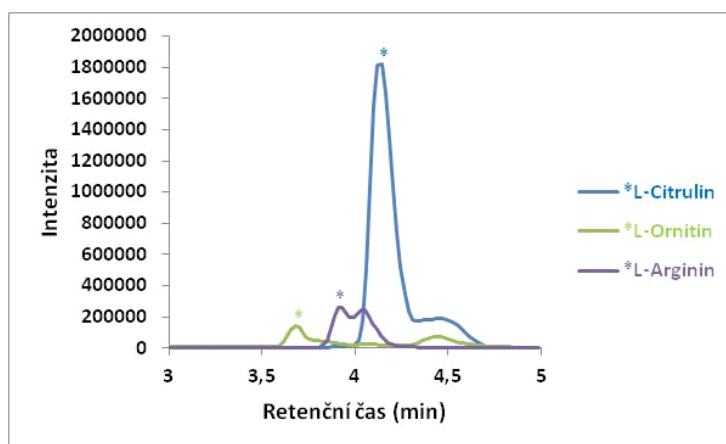
Jako první extrakční postup byla zvolena ultrafiltrace. Pro tento typ extrakce byly výpotky z ran používány neředěné a naředěné v 10 mM AMFO (pH= 2,5). Byly připraveny dva typy vzorků. První typ vzorků se skládal z výpotků ran pacientů, bez naředění a byly z nich připraveny: blank (obsahuje výpotky z ran od pacientů, ve kterých jsou analyty fyziologicky přítomny), spike (obsahující výpotky a přidáné standardy analytů o známé koncentraci), extrakt s přídavkem STD (po provedené extrakci byly přidány STD analytů) a standard (standardy analytů rozpuštěny ve

fyziologickém roztoku), vše bylo pipetováno do ultrafiltračních zkumavek s membránou. Při druhé přípravě vzorků, byly výpotky z ran pacientů naředěny 10 mM AMFO (pH= 2,5) (1:1 v/v) a opět byly připraveny: blank, spike, extrakt a pipetovány do ultrafiltračních zkumavek s membránou. Po přípravě byla provedena ultrafiltrace.

Pro ultrafiltraci byly nastaveny tyto podmínky:

- 14 000 g
- 50 min
- 4 °C

Po ultrafiltraci byly supernatanty obou typů vzorků přeneseny pomocí pipety do mikrotitrační destičky a pouze k extraktům byly na základě výpočtu, přidány standardy jednotlivých analytů, došlo ke vzniku tzv. „spike do extraktu“. Vzorky byly následně měřeny na koloně Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 μm, YMC (Německo), (Obrázek č. 24), která byla vyhodnocena jako nejvhodnější kolona viz. Tabulka č. 8. Tento extrakční postup nebyl účinný pro agmatin i po naředění výpotků z ran pacientů 10 mM AMFO. Tento extrakční postup nebyl vyhovující z důvodu výskytu balastů v oblasti píků.



**Obrázek č. 24:** Chromatogram č. XI

Ultrafiltrace (\*zobrazuje píky stanovovaných analytů v biologickém materiálu (spike))

100% 10 mM AMFO pH= 2,5, 0,25 ml/min, 5 μl, 25 °C

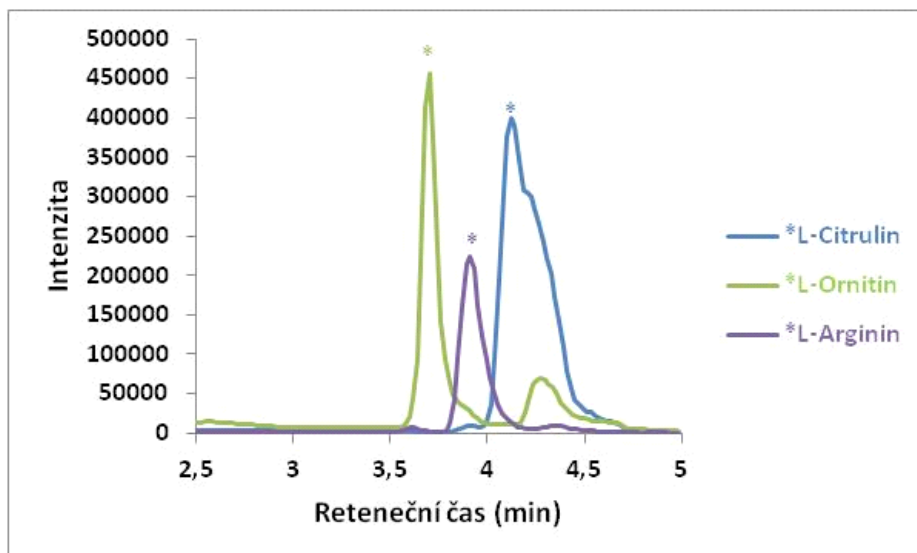
Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 μm, YMC (Německo).

### 5.3.2 Deproteinace

Dalším extrakčním postupem byla deproteinace, tedy srážení proteinů pomocí LC-MS methanolu, který je nejčastěji společně s ACN používán pro tento typ extrakce [22]. Při tomto extrakčním postupu bylo k 200 µl výpotku z rány přidáno 100 µl 10 mM AMFO a 100 µl LC-MS methanolu. A opět byl připraven: blank, spike, STD a extrakt do ependorfe. Následně bylo provedeno promíchání vzorků na vortexu. Dalším krokem byla centrifugace vzorků, která probíhala, za těchto podmínek:

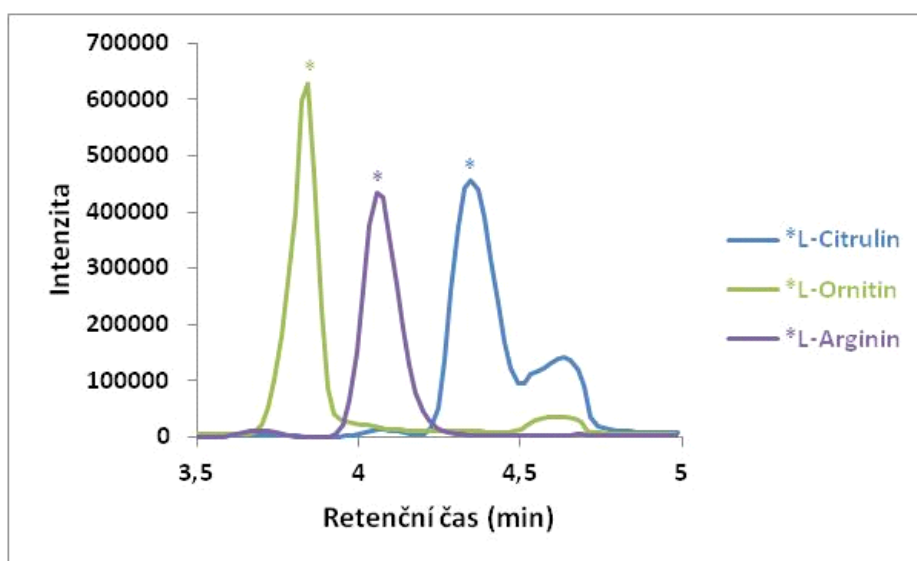
- 17 000 *g*
- 10 min
- 4 °C

Po centrifugaci, byl supernatant z jednotlivých vzorků přepipetován do mikrotitrační destičky s filtry, určené pro filtraci pomocí vakua. Vzorky byly filtrovány do další mikrotitrační destičky, ze které byly následně analyzovány. Po filtraci bylo pouze k extraktům přidáno dané množství standardů analytů, vznikl tzv. „spike do extraktu“. Vzorky byly měřeny na koloně Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 µm, YMC (Německo) a Kinetex® F5 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA). Při měření spike na koloně Meteoric Core C18 BIO (Obrázek č. 25), byla viditelná interference v oblasti píku citrulinu a pík agmatinu nebyl detekovaný. Na koloně Kinetex® F5 100 A Core Shell Technology (Obrázek č. 26), byla vyšší intenzita píků analytů, kromě agmatinu, který nebyl opět detekovaný a došlo k většímu oddělení interference od píku ornitinu.



**Obrázek č. 25:** Chromatogram č. XII

Deproteinace (\*zobrazuje píky stanovovaných analytů v biologickém materiálu (spike))  
 100% 10 mM AMFO (0,1% FA); (pH= 2,5), 0,25 ml/min, 5  $\mu$ l, 25 °C  
 Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7  $\mu$ m, YMC (Německo).



**Obrázek č. 26:** Chromatogram č. XIII

Deproteinace (\*zobrazuje píky stanovovaných analytů v biologickém materiálu (spike))  
 100% 10 mM AMFO pH= 2,5, 0,25 ml/min, 5  $\mu$ l, 25 °C  
 Kinetex® F5 100 A Core Shell Technology, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex (USA).

Při další fázi vývoje metody bude nutné, se zaměřit na extrakci agmatinu, který je oproti ostatním třem analytům nejspíše přítomen v ranách pacientů v nM koncentrací, stejně jako v séru, proto je jeho detekce po provedení extrakce obtížná.

#### 5.4 Částečná validace metody- test vhodnosti chromatografického systému (system suitability test)

[22], [46], [47], [48]

Jednotlivé výpočty validačních parametrů jsou vztaženy na výsledky měření, které byly získány při měření analytů na koloně Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 μm, YMC (Německo) za již uvedených podmínek v Tabulce č. 8. Tato kolona byla v rámci vývoje metody zvolena jako nejvhodnější. V každé následující podkapitole je uveden vzorec pro výpočet daného parametru.

##### 5.4.1 Zdánlivý počet teoretických pater

Zdánlivý počet teoretických pater (N), je výpočet, který slouží k posouzení účinnosti kolony a jedná se o bezrozměrnou veličinu. Čím vyšší je hodnota (N), tím vyšší je účinnost kolony, což má příznivý vliv na kvalitu chromatografické separace.

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

$t_R$  - retenční čas píku daného analytu

$w_h$  - šířka píku v polovině jeho výšky

**Tabulka č. 9:** Zdánlivý počet teoretických pater

Analyt	N
L-Ornitin	8829
L-Arginin	10321
Agmatin	8720
L-Citrulin	11499



#### 5.4.2 Výškový ekvivalent teoretického patra

Výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  (HETP- Height to a Theoretical Plate), vyjadřuje účinnost kolony a je využíván pro porovnání účinnosti kolon různých délek. Tento parametr, lze definovat jako délku kolony, připadající na jedno patro a jeho hodnota, se udává v rozměrech délky, většinou v  $\mu\text{m}$ . Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce č. 10.

$$H = \frac{L}{N}$$

$L$  - délka kolony (100 000  $\mu\text{m}$ )

$N$  - zdánlivý počet teoretických pater

**Tabulka č. 10:** Výškový ekvivalent teoretického patra

Analyt	H ( $\mu\text{m}$ )
L-Ornitin	11,3
L-Arginin	9,68
Agmatin	11,47
L-Citrulin	8,7

#### 5.4.3 Faktor symetrie

Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) popisuje symetrii chromatografického píku a je bezrozměrnou veličinou. Tento faktor je důležitý pro určení kvantity měřeného analytu. Je-li hodnota  $A_s$  rovna 1, značí ideální symetrii píku. V případě, že je hodnota  $A_s > 1,0$  jedná se o chvostování píku a je-li hodnota  $A_s < 1$  jedná se o tzv. frontování (rozmývání píku v přední části). Hodnoty  $A_s$  jsou uvedeny v Tabulce č. 11.

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$  - šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

$2d$  - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

**Tabulka č. 11:** Faktor symetrie

Analyt	A <sub>s</sub>
L-Ornitin	1,17
L-Arginin	1,21
Agmatin	1,36
L-Citrulin	1,20

#### 5.4.4 Rozlišení

Rozlišení ( $R_s$ ), je parametr, který charakterizuje míru oddělení, případně překrývání dvou sousedních píků. Ideálním výsledkem  $R_s$  je získat hodnoty 1,5 a vyšší, v tomto případě považujeme píky separované až na základní linii. Hodnoty  $R_s$  jsou uvedeny v Tabulce č. 12.

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R1}, t_{R2}$  - retenční časy píků

$w_{h1}, w_{h2}$  - šířky píků v poloviční výšce

**Tabulka č. 12:** Hodnoty rozlišení

Analyt	R <sub>s</sub>
L-Arginin	1,35
Agmatin	0,37
L-Citrulin	0,97

Nižší hodnota rozlišení u vybraných analytů nevadí, protože každý analyt je charakterizovaný svým MRM přechodem. Je tedy možné analyty identifikovat, i když nedošlo k jejich dokonalé separaci.

#### 5.4.5 Opakovatelnost nástřiku

Hodnota opakovatelnosti nástřiku je vyjádřena pomocí výpočtu relativní směrodatné odchylky ( $s_r$ ) v %. Tento parametr, je jedním z ukazatelů přesnosti měření. Opakovatelnost nástřiku byla provedena pro retenční čas i plochu pod píkem. Hodnoty opakovatelnosti nástřiku jsou uvedeny v Tabulce č. 13.

$$s_r(\%) = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

$y_i$  – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píků, vrcholová výška nebo poměr ploch vnitřních standardů

$\bar{y}$  – poměr jednotlivých naměřených hodnot

n – počet jednotlivých naměřených hodnot

**Tabulka č. 13:** Opakovatelnost nástřiku standardů

Analyt	(%)	
	Plochy	Retenčního času
L-Ornitin	2,30	0,06
L-Arginin	1,80	0,06
Agmatin	3,00	0,09
L-Citrulin	1,36	0,05

Hodnota relativní směrodatné odchylky retenčního času vyšla do 1 % a u retenčního času do 3 %.

## 6 Závěr

Byla vyvinutá nová UHPLC metoda s hmotnostní detekcí pro stanovení agmatinu, argininu, citrulinu a ornitinu v biologickém materiálu. Byly zkoušeny čtyři typy kolon: Kinetex® HILIC 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA), Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 µm, YMC (Německo), Kinetex® Polar C18 100 A, 100 x 3,0 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA), Kinetex® F5 100 A, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA). Jako finální kolona byla zvolena Meteoric Core C18 BIO, 100 x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 µm, YMC Německo, na které bylo dosaženo nejvyšší intenzity agmatinu. Zvolené finální podmínky této kolony, pro stanovení již zmíněných analytů jsou uvedeny v Tabulce č. 14. Bylo také zjištěno, že při rozpuštění analytů v 10 mM AMFO, byla vyšší intenzita píků.

**Tabulka č. 14:** Finální podmínky

<b>Analytická kolona</b>	Meteoric Core C18 BIO, 100x 4,6 mm, 16 nm, 2,7 µm, YMC Německo
<b>Mobilní fáze</b>	100% 10 mM AMFO
<b>Průtok</b>	0,25 ml/min
<b>pH</b>	2,5
<b>Detekce</b>	MS/MS (vybrané MRM)
<b>Teplota</b>	25 °C
<b>Nástřikový objem</b>	2 µl
<b>Retenční časy</b>	L-ORN 3,513 min
	L-ARG 3,712 min
	L-CIT 3,918 min
	AGM 3,769 min

Metoda byla částečně validována a byly ověřeny tyto parametry: počet teoretických pater, výškový ekvivalent teoretického patra, faktor symetrie, rozlišení a opakovatelnost nástřiku pro plochu a retenční čas. Tato metoda byla aplikována na výpotky odebíraných přímo z chronických ran pacientů s bércovými vředy a diabetickými ulceracemi. Vzorby byly upraveny dvěma extrakčními postupy (deproteinace a ultrafiltrace), v budoucnu by mohly být zkoušeny další typy extrakčních postupů jako je: SPE nebo odpaření.

Tato nová metoda by mohla být v budoucnu například využita pro detekci hladiny L-argininu, L-citrulinu, agmatinu a L-ornitinu v chronicky nehojících se kožních ranách či vředech pacientů a sloužit, tak k posouzení nastavené léčby. L-ornitin se

společně s karmaboylfosfátem v močovinovém cyklu podílí na vzniku L-citrulinu, jehož hodnota by mohla být využita jako biomarker poukazující na chronicky zánětlivý proces probíhající ve tkáni. Dále je třeba zmínit, že arginin má protizánětlivý efekt a je výchozím metabolitem pro oxid dusnatý, jehož syntézu také ovlivňuje agmatin. Oxid dusnatý zlepšuje prokrvení a vyživení postižené tkáně zánětem, což vede k zlepšení zdravotního stavu pacienta.

## 7 Použitá literatura

- [1] Piletz J. E., Aricioglu F., Cheng J.-T., et al. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discovery Today*, 2013, 18 (17/18), 880-883.
- [2] Showing metabocard for Agmatine (HMDB0001432). The Metabolomics Innovation Centre. [Online]. [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB01432>
- [3] Agmatine Sulfate  $\geq$  98.0% (by titrimetric analysis). VWR Part of Avantor. Centre. [Online]. [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <https://us.vwr.com/store/product/9569021/agmatine-sulfate-98-0-by-titrimetric-analysis>
- [4] Martens-Lobenhoffer J., Bode-Boger S. M. Mass spectrometric quantification of L-arginine and its pathway related substances in biofluids: The road to manurity. *Journal of Chromatography B*, 2013, 964, 89-102.
- [5] Kábrt J. Zánět a možnosti ovlivnění výživou. *Interní medicína pro praxi*, 2009, 11(9), 427-428. [Online]. [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/09/15.pdf>
- [6] Showing metabocard for L-Arginine (HMDB0000517). The Metabolomics Innovation Centre. [Online]. [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000517>
- [7] Fragkos K. C., Forbes A. Citrulline as a marker of intestinal function and absorption in clinical settings: A systematic review and meta-analysis. *United European Gastroenterology Journal*, 2017, 0 (0), 1-11.
- [8] Kaore S. N., Amane H. S., Kaore N. M. Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013, 27 (1), 35-50.
- [9] Fragkos K. C., Forbes A. Was citrulline first a laxative substance? The truth about modern citrulline and its isolation. *Nihon ishigaku zasshi [Journal of Japanese History of Medicine]*, 2011, 57 (3), 275-292.
- [10] L-citrulline structure. [Online]. [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: <http://nootropicsdepot.com/articles/lcitrulline-vs-lcitrulline-dlmalate-which-is-best/>

- [11] Showing metabocard for Citrulline (HMDB0000904). [Online]. [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: [http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000904#biological\\_properties](http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000904#biological_properties)
- [12] Ornitine [Online]. 2011-2018 [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: <https://examine.com/supplements/ornitine/>
- [13] Showing metabocard for Ornitine (HMDB0000214). [Online]. [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000214>
- [14] L-Ornitine [Online]. 2011-2018 [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: <http://www.selleckchem.com/products/l-ornithine.html>
- [15] Ornitinový cyklus. [Online]. [cit. 2018-01-23]. Dostupné z: [http://www.oskole.sk/userfiles/image/12\\_11/Metabolizmus%20bielkov%C3%ADn%20-%20katabolizmus,%20MO\\_html\\_m23486036.png](http://www.oskole.sk/userfiles/image/12_11/Metabolizmus%20bielkov%C3%ADn%20-%20katabolizmus,%20MO_html_m23486036.png)
- [16] Taleuzzaman M., Ali S., Gilani S. J., Imam S.S., Hafeez A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – A Review. *Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 2015, 2(6): 1056.
- [17] Cielecka-Piontek J., Zalewski P., Jelińska A., Garbacki P. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 2013, 76 (21-22), 1429-1437. [Online]. [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825615/>
- [18] HPLC: Principle, Types, Instrumentation and Applications. [Online]. [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
- [19] Roge A. B., Firke S. N., Dhane R.M., Gunjkar V. J., Vadvalkar S. M. Novel Achievement of HPLC: UPLC. *International Journal of PharmTech Research*, 2011, 3 (3), 1423-1429.
- [20] Guidelines for the use of UHPLC Instruments. [Online]. [cit. 2018-01-27]. Dostupné z: <https://epgl.unige.ch/labs/fanal/tools/hplctool/Guidelines%20for%20the%20use%20of%20UHPLC%20instruments%20-%20site%20WEB%20labo.pdf>
- [21] Rychlá chromatografie UHPLC. [Online]. [cit. 2018-01-27]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/481220/mod\\_resource/content/1/Rychl%C3%A1%20Ochromatgrafie%20-%20UHPLC.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/481220/mod_resource/content/1/Rychl%C3%A1%20Ochromatgrafie%20-%20UHPLC.pdf)
- [22] Nováková L., Douša M., et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání. Praha, 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3.

- [23] Rychlá chromatografie- UHPLC- prezentace přednáška. [Online]. [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/276856/mod\\_resource/content/1/Rychl%C3%A1%20ochromatografie%20%E2%80%93%20UHPLC%20-%20prezentace%20p%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ka.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/276856/mod_resource/content/1/Rychl%C3%A1%20ochromatografie%20%E2%80%93%20UHPLC%20-%20prezentace%20p%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ka.pdf)
- [24] ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC). [Online]. [cit. 2018-02-02]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc/>
- [25] Kinetex Core-Shell Columns. [Online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
- [26] Dong M. W. Modern HPLC for practicing scientists. Canada, 2006. ISBN-13: 978-0-471-72789-7, ISBN-10: 0-471-72789-X.
- [27] Thermo Fisher Scientific Inc. HILIC Separations Technical Guide. 2014, 1-44. [Online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TG-21003-HILIC-Separations-TG21003-EN.pdf>
- [28] Analytical: YMC Meteoric Core C18 BIO. [Online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.ymcamerica.com/ymc-meteoric-core-c18-bio/>
- [29] Kinetex F5 Core-shell LC Columns. [Online]. [cit. 2018-02-04]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Info/Page/f5>
- [30] Guillarme D., Veuthey J.-L. UHPLC in Life Sciences. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN: 978-1-84973-388-5. [Online]. [cit. 2018-02-05]. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=enMoDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=enMoDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- [31] Bjarnholt N., Bin L., D'Alvise J., Janfelt Ch. Mass spektrometry imagine of plant metabolites – principles and possibilities. Natural Product Reports, 2014, 31, 818-837. [Online]. [cit. 2018-02-06]. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2014/np/c3np70100j#sect247>
- [32] Mass Spectrometry. [Online]. [cit. 2018-02-06]. Dostupné z: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/mass-spectrometry.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html)



- [33] Holčapek M. Hmotnostní spektrometrie. [Online]. [cit. 2018-02-06]. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska6\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf)
- [34] Mass Spectrometry Ionization Methods. [Online]. [cit. 2018-02-07]. Dostupné z: <http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html>
- [35] Ionizace elektrosprejem (ESI). [Online]. [cit. 2018-02-08]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/JVAXG.htm>
- [36] Hmotnostní spektrometrie. [Online]. [cit. 2018-02-08]. Dostupné z: <https://clab.vscht.cz/ms/ionizace-ms>
- [37] Cvačka J. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. [Online]. [cit. 2018-02-08]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
- [38] Mass analyzers. [Online]. [cit. 2018-02-08]. Dostupné z: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=kwbgcDsHqnOxmOIIcCpBgFIFyB&subNav=oibelDsHqnOxmOIIcCvBG>
- [39] Kyle P. B. Toxicology: GCMS. [Online]. [cit. 2018-02-08]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/triple-quadrupole-mass-spectrometer>
- [40] Basic of LC/MS. [Online]. [cit. 2018-02-09]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf>
- [41] Pospíšilová A. Přístupy k léčbě chronických ran. [Online]. [cit. 2018-02-10]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/88/03.pdf>
- [42] Hojení chronických ran. [Online]. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.derm.cz/napln/historicke-standardy-cds/hojeni-chronicky-ran/>
- [43] Hyiodine na chronické rány. [Online]. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.hyiodine.cz/chronicke-rany>
- [44] Chmielewski M., Lindholm B. Uremic Toxicity. [Online]. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/putrescine>
- [45] Citrulin. [Online]. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/citrulin.htm>
- [46] Validation of Chromatographic Methods. [Online]. [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>
- [47] Český lékopis 2017: 1. díl. Praha: Grada Publishing, a.s. 2017. ISBN: 978-80271-0500-7.

- [48] European Pharmacopoeia 6.4 supplement. France, 2008. ISBN: 978-92-871-6314-1.
- [49] Jandera P. HILIC Chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. Chemagazín, 2011, XXI, 2.
- [50] Ionizace vzorku- ionizace elktrosprejem- ESI. [Online]. [cit. 2018-03-04]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/15714356-Metody-spektralni-metody-hmotnostni-spektrometrie-evropsky-socialni-fond-praha-eu-investujeme-do-vasi-budoucnosti.html>
- [51] Trojitý kvadrupól. [Online]. [cit. 2018-03-04]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Schema-of-mass-spectrometry-analysis-in-SRM-mode-triple-quadrupole-QqQ-mass\\_fig3\\_236197462](https://www.researchgate.net/figure/Schema-of-mass-spectrometry-analysis-in-SRM-mode-triple-quadrupole-QqQ-mass_fig3_236197462)
- [52] Hmotnostní spektrometrie. [Online]. [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: [http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_43.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_43.htm)
- [53] Bércové vředy venózní etiologie. [Online]. [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: <http://www.hojeniran.cz/teorie/chronicke-rany.aspx>
- [54] Šíroká R., Racek J., Filipovský J. Asymetrický dimethylarginin (ADMA). Klinická Biochemie a Metabolismus, 2005, 13 (34), No. 3, 131-134. [Online]. [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0503-131.pdf>
- [55] Chromolith® RP-18 Endcapped HPLC Columns. [Online]. [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: [http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/analytics-and-sample-preparation/chromolith-RP-18-endcapped/uhplc-on-any-instrument/IIOb.qB.1dIAAFCQyBJ3\\_uW,nav](http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/analytics-and-sample-preparation/chromolith-RP-18-endcapped/uhplc-on-any-instrument/IIOb.qB.1dIAAFCQyBJ3_uW,nav)