

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Ilona Chalupová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace derivatizačních a extrakčních postupů pro HPLC/MS analýzu
metabolitů obsažených ve vzorcích tělních tekutin

Diplomová práce

2020

Bc. Ilona Chalupová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ilona Chalupová**
Osobní číslo: **C18504**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Optimalizace derivatizačních a extrakčních postupů pro HPLC/MS analýzu metabolitů obsažených ve vzorcích tělních tekutin**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši se zaměřením na analýzu metabolitů obsahující amino či hydroxy skupinu ve vzorcích tělních tekutin s využitím HPLC/MS. Věnujte se především různým způsobům derivatizace a extrakce sledovaných metabolitů.
- 2) Na základě literární rešerše zvolte vhodný derivatizační postup a optimalizujte podmínky derivatizační reakce na standardech vybraných zástupců sledovaných látek (aminokyseliny, aminy, hydroxy deriváty).
- 3) Dále se zaměřte na optimalizaci extrakce sledovaných látek a přečištění vzorků pro HPLC/MS analýzu.
- 4) Optimalizované podmínky aplikujte na reálné vzorky a výsledky diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Jitka Klikarová**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 25. 6. 2020

Ilona Chalupová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. a konzultantce Ing. Jitce Klikarové za odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas, ochotu a trpělivost při vypracování mé diplomové práce.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací derivatizačních a extrakčních podmínek pro HPLC/MS analýzu metabolitů obsahujících ve své molekule aminovou a hydroxylovou funkční skupinu. Práce je zaměřena na několik derivatizačních činidel, které se pro daný typ látek používají (fenylisothiokyanát, benzoylchlorid, dansylchlorid a fenylisokyanát). Výsledky získané pomocí jednotlivých činidel jsou diskutovány a porovnány.

KLÍČOVÁ SLOVA

aminy, hydroxylsloučeniny, tělní tekutiny, derivatizace, HPLC/MS

TITLE

Optimization of derivatization and extraction approaches for HPLC/MS analysis of metabolites in body fluid samples

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the optimization of derivatization and extraction conditions for HPLC/MS analysis of metabolites containing amine and hydroxyl functional groups in their molecule. The work is focused on several derivatizing agents that are used for a given type of substances (phenyl isothiocyanate, benzoyl chloride, dansyl chloride and phenyl isocyanate). The results obtained with each reagent are discussed and compared.

KEYWORDS

amines, hydroxy compounds, body fluids, derivatization, HPLC/MS

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1	Metabolomika	13
1.2	Aminokyseliny	14
1.2.1	Obecná charakteristika.....	14
1.2.2	Úloha jednotlivých AMK v organismu	16
1.3	Biogenní aminy	17
1.3.1	Obecná charakteristika.....	17
1.3.2	Úloha v organismu.....	18
1.4	Hydroxysloučeniny	19
1.5	Druhy biologických vzorků a jejich příprava k analýze	20
1.5.1	Sérum, plazma	21
1.5.2	Krev	21
1.5.3	Moč	22
1.5.4	Mozkomíšní mok	22
1.5.5	Tkáně	22
1.6	Derivatizace.....	23
1.6.1	Předkolonová derivatizace	23
1.6.2	Postkolonová derivatizace	24
1.6.3	Derivatizační činidla pro HPLC	24
1.7	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	28
1.7.1	Čerpadla a mobilní fáze	29
1.7.2	Dávkovací ventil	29
1.7.3	Kolona.....	30
1.7.4	Detektory	30
1.8	Hmotnostní spektrometrie.....	33
1.8.1	Ionizační techniky	33
1.8.2	Hmotnostní analyzátory	35
1.8.3	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS).....	36
1.9	Stanovení metabolitů.....	37
1.9.1	Analýza aminů a hydroxysloučenin pomocí RP-HPLC	37
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
2.1	Přístroje a zařízení.....	39
2.2	Použité chemikálie a standardní látky	39

2.2.1	Standardní látky	39
2.2.2	Chemikálie a rozpouštědla.....	40
2.3	Pracovní postupy	40
2.3.1	Příprava standardů	40
2.3.2	Analýza PITC derivátů	41
2.3.3	Analýza Bz-Cl derivátů	42
2.3.4	Analýza Dns-Cl derivátů	43
2.3.5	Analýza PIC derivátů.....	44
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
3.1	Derivatizace PITC	45
3.1.1	Reakce s PITC pro HPLC/MS	50
3.2	Derivatizace Bz-Cl	55
3.3	Další derivatizační činidla.....	61
3.3.1	Derivatizace Dns-Cl.....	61
3.3.2	Derivatizace PIC	64
4	ZÁVĚR	65
5	SEZNAM LITERATURY	66
6	PŘÍLOHA	77

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Obecný derivatizační mechanismus [49].....	23
Obrázek 2 - Benzoylace primárních, sekundárních aminů a fenolů [7]	25
Obrázek 3 - Reakce dansylchloridu s aminy, alkoholy a fenoly [34; 40; 47]	26
Obrázek 4 - Reakce PIC s aminy a alkoholy [47]	27
Obrázek 5 - Reakce OPA s primárními aminy [65]	27
Obrázek 6 - Reakce FMOC-Cl s aminokyselinami [69]	28
Obrázek 7 - Schéma HPLC [76].....	29
Obrázek 8 - Schéma DAD detektoru [75]	31
Obrázek 9 - Schéma fluorescenčního detektoru [75]	32
Obrázek 10 - Schéma hmotnostního spektrometru [78].....	33
Obrázek 11 - Separace standardů 6AMK po derivatizaci PITC a rozpuštěním ve vodě nebo MetOH	46
Obrázek 12 - Separace standardů po derivatizaci PITC	47
Obrázek 13 - Separace 11 standardů po derivatizaci PITC	48
Obrázek 14 - Separace 11 standardů derivatizovaných PITC bez sušících kroků	49
Obrázek 15 - Vliv mobilní fáze na separaci prolinu derivatizovaného PITC	50
Obrázek 16 - MS spektrum histaminu	52
Obrázek 17 - MS spektrum argininu	53
Obrázek 18 - MS spektrum dopaminu.....	54
Obrázek 19 - Separace 11 standardů derivatizovaných PITC po extrakci	55
Obrázek 20 - MS spektrum glukosy	59
Obrázek 21 - MS spektrum kys. gallové	60
Obrázek 22 - Činidlo Dns-Cl, 300x ředění	61
Obrázek 23 - Reakce Dns-Cl s AMK různými derivatizačními postupy	63
Obrázek 24 - Reakce Dns-Cl s hydroxyloučeninami různými derivatizačními postupy.....	64
Tabulka 1 - Srovnání detektorů [75]	31
Tabulka 2 - Souhrnné informace o separovaných látkách.....	51
Tabulka 3 - Souhrnné informace o derivatizovaných standardech	59

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	acetonitril
Ade	adenosin
Adr	adrenalin
AMK	aminokyselina(y)
Arq	arginin
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BA	biogenní amin(y)
Bz-Cl	benzoylchlorid
CE	kapilární elektroforéza
Cys	cystein
DAD	detektor s diodovým polem
DETA	diethylamin
DNA	kyselina deoxyribonukleová
Dop	dopamin
Dns-Cl	dansylchlorid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem
Gal	kyselina gallová
GC	plynová chromatografie
Glu	D-glukosa
His	histidin
HisA	histamin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
Iso	isopentylamin
LC	kapalinová chromatografie
Leu	leucin
Lys	lysin
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometr
NP	system s normálními fázemi

OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
Phe	fenethylalanin
PheA	fenethylamin
PIC	fenylisokyanát
PITC	fenylisothiokyanát
Pro	prolin
Q	kvadrupólový analyzátor
QqQ	trojitý kvadrupól
RNA	kyselina ribonukleová
RP	system s obrácenými fázemi
Ser	serin
Sero	serotonin
SPE	extrakce tuhou fází
Thr	threonin
TOF	analyzátor doby letu
Tryp	tryptamin
Tyr	tyrosin
TyrA	tryptamin
UPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
Val	valin
VIS	viditelné záření
Xyl	D-xylosa
λ_{ex}	excitační vlnová délka
λ_{em}	emisní vlnová délka
1,7-DIA	1,7-diaminoheptan

ÚVOD

Metabolomika je vědní obor, který se v posledních letech dostává do popředí, a to především v klinické analýze. Zabývá se analýzou sloučenin účastnících se metabolických drah v biologických systémech. V lidském organismu metabolické dráhy zahrnují nespočet sloučenin, které ve své struktuře obsahují aminovou nebo hydroxylovou funkční skupinu, či obě zároveň. Tyto látky zajišťují v organismu důležité funkce, a proto mohou sloužit jako potenciální biomarkery různých patologických stavů organismu.

Pro metabolomickou analýzu se nejčastěji používají vzorky tělních tekutin jako je plazma či moč. Celý postup zpracování vzorku by měl být, pokud možno, časově a ekonomicky úsporný. Při analýze metabolitů zahrnuje příprava vzorku k analýze často i derivatizační krok, a to především z důvodu umožnění detekce těchto malých molekul. K derivatizaci sloučenin s aminovou či hydroxylovou funkční skupinou lze využít různá derivatizační činidla. Separace těchto derivatizovaných sloučenin je nejčastěji prováděna kapalinovou chromatografií ve spojení se spektrofotometrickou či fluorimetrickou detekcí nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Metabolomika

Základní stavební a funkční jednotkou organismu je buňka (lat. cellula). Aby buňka získala pro své životní projevy potřebné látky a energii, dochází v ní během různých chemických reakcí k přeměně sloučenin. Tyto chemické přeměny, které zahrnují jak katabolické, tak anabolické děje, se označují jako metabolické dráhy a souhrn těchto drah jako metabolismus. Sloučeniny, které se metabolických drah účastní, nazýváme metabolity. Jejich zastoupení v metabolických drahách je různé a liší se i jejich koncentrační hladiny v organismu. Komplexní sadě všech metabolitů říkáme metabolom, který je tedy souborem všech intra- a extracelulárních nízkomolekulárních sloučenin ($M_w < 1000$), jež jsou zapojeny do metabolických přeměn [1].

Identifikací a kvantifikací nízkomolekulárních látek v biologických systémech, tedy studiem metabolomu, se zabývá metabolomika. V porovnání s jinými vědními disciplínami, jako jsou proteomika či genomika, odráží metabolomika mnohem lépe aktuální stav buňky. Ten je však velice proměnný, a proto není možné provést analýzu celého metabolomu současně. Pokud se provádí komplexní analýza intracelulárních metabolitů ve vzorku (endometabolom), mluvíme o tzv. metabolickém „fingerprintingu“, pokud získáváme informace o extracelulárních metabolitech (exometabolom), hovoříme o tzv. metabolickém „footprintingu“. Při metabolomických analýzách se nejčastěji využívá přístup tzv. profilování metabolitů. Jedná se o identifikaci a kvantifikaci většího počtu metabolitů, které mají podobné chemické struktury obsahující stejné funkční skupiny nebo které se společně účastní určité metabolické dráhy. V některých případech se však využívá i cílená analýza metabolitů, jež se zaměřuje na kvalitativní a kvantitativní analýzu jen několika málo konkrétních metabolitů [1-4].

Pomocí metabolomických technik můžeme sledovat vzájemné interakce metabolitů v metabolických drahách a můžeme získat kvantitativní informace o množství meziproductů z několika metabolických drah zároveň. To vše nám poskytne přehled o metabolické síti a může nám pomoci odhalit a pochopit její odchylky. Jelikož jsou patologické změny v metabolismu doprovázeny změnou profilu určitých metabolitů [5], má metabolomika velký význam a potenciál v objevování biomarkerů, což jsou metabolity, které svojí nižší či vyšší koncentrací v biologických tekutinách a tkáních poukazují na přítomnost patologických stavů [6]. S využitím metabolomiky můžeme rovněž sledovat i mechanismy účinku léčiv, a tím určovat konkrétní cílová místa pro jejich působení a monitorovat jejich možné vedlejší či dokonce toxické účinky [1; 3; 7].

V posledních letech se hodně publikací zaměřuje právě na různé potenciaální biomarkery. Metabolomické techniky jsou hojně aplikovány například při studiu synaptického přenosu, při němž dochází k uvolňování neurotransmiterů (př. acetylcholin, adenosin, katecholaminy, indolaminy, aminokyseliny, dipeptidy) z jednoho neuronu na neuroreceptory neuronu druhého. Monitorování neurotransmisí má význam především pro vývoj farmakologických sloučenin [7; 8]. Jako potenciaální metabolomické biomarkery jsou zkoumány i sloučeniny spojené s metabolismem oxidu dusnatého (L-arginin, L-citrulin, symetrický a asymetrický dimethylarginin a dimethylamin). Výzkum odhalil, že zvýšené hladiny symetrického argininu a dimethylaminu v krvi mohou být spojeny se špatnou funkcí ledvin, jelikož tyto sloučeniny jsou z těla vylučovány močí [9]. Pozornost je věnována také stanovení biogenních aminů, a to například v mateřském mléce, kdy byl porovnáván obsah putrescinu, sperminu, spermidinu, histaminu, tyraminu a kadaverinu v mateřském mléce zdravých matek a matek trpících mastitidou. Bylo zjištěno, že mléko matek s mastitidou obsahuje vyšší hladiny histaminu, putrescinu a sperminu [10].

Díky obrovskému potenciálu metabolomiky v klinické analýze a v dalších oblastech, jako je mikrobiologie, biologie rostlin, fyziologie zvířat či potravinářství, je jí v současné době věnována větší a větší pozornost [7; 11].

1.2 Aminokyseliny

1.2.1 Obecná charakteristika

Aminokyseliny (AMK) jsou sloučeniny obsahující aminovou ($-NH_2$) a karboxylovou ($-COOH$) funkční skupinu zároveň. V přírodě se nachází nepřeberné množství AMK, ovšem v organismu je hlavní pozornost věnována pouze 20 tzv. proteinogenním neboli bílkovinným aminokyselinám, které jsou totiž základními stavebními kameny bílkovin. Jelikož je syntéza bílkovin řízena genetickým kódem, nesou díky tomu i označení kódované. Jedná se o α -aminokyseliny, což znamená, že obě funkční skupiny jsou navázány na stejném atomu α uhlíku. Téměř všechny obsahují minimálně jednu primární aminovou skupinu. Výjimkou je prolin, jehož aminoskupina je zacyklena v postranním řetězci. Prolin tedy obsahuje sekundární aminovou funkční skupinu, a je proto často považován za iminokyselinu. Jednotlivé AMK se pak ve své struktuře od sebe liší postranním řetězcem [12-14].

Díky přítomnosti chirálního uhlíku v molekule jsou AMK opticky aktivní, tzn. že stácejí rovinu polarizovaného světla. V bílkovinách se nachází pouze L-aminokyseliny, ovšem v přírodě, a v malé míře dokonce i v lidském organismu, se můžeme setkat i s AMK v D-konfiguraci. Původ a funkce D-aminokyselin nejsou zatím přesně známé, avšak jejich

abnormální koncentrace v lidské krvi je spojována s různými chorobami [13; 15]. Téměř všechny AMK mají pouze jeden chirální uhlík a poskytují tak jen 2 stereoizomery. Výjimkou je isoleucin, threonin a glycin. Zatímco první dvě zmiňované obsahují chirální uhlík i ve struktuře postranního řetězce, a tvoří tak dokonce 4 stereoizomery, glycinu chirální centrum absentuje [12-14].

Jelikož AMK nese ve své struktuře záporný (COO^-) i kladný náboj (NH_3^+), čímž tvoří jakousi vnitřní sůl, je považována za amfoterní elektrolyt. To znamená, že v neutrálním prostředí jsou karboxylové skupiny deprotonizovány za současné protonizace aminoskupiny. Dochází tedy k přenosu náboje uvnitř struktury AMK. Hodnota pH, kdy se molekula AMK chová jako neutrální sloučenina, se označuje jako izoelektrický bod. V zásaditém prostředí dochází k reakci OH^- skupin s kladně nabitou aminovou skupinou za tvorby aniontu. Naopak v kyselém prostředí dochází k reakci H_3O^+ se záporným nábojem karboxylové skupiny za tvorby kationtu [12-14].

AMK se mohou řetězit za vzniku peptidové vazby. Do tvorby peptidové vazby ($-\text{CO}-\text{NH}-$) se zapojuje α -aminoskupina jedné AMK a α -karboxylová skupina AMK druhé za současného odštěpení molekuly vody. Podle počtu vázaných aminokyselin peptidovou vazbou dochází ke vzniku peptidů (2 až 100 jednotek) a následně bílkovin (více než 100 jednotek) [12; 13].

Aminokyseliny můžeme rozdělit podle struktury postranního řetězce na jednoduché s nesubstituovaným postranním řetězcem (glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin), hydroxyaminokyseliny (serin, threonin), sírné AMK (cystein, methionin), AMK s karboxylovou skupinou v postranním řetězci (asparagová a glutamová kyselina), amidy dikarboxylových AMK (asparagin, glutamin), AMK se zásaditými funkčními skupinami v postranním řetězci (lysin, arginin, histidin), aromatické AMK (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) a cyklické (prolin) [12; 13].

Dle polarity můžeme AMK klasifikovat na hydrofobní, hydrofilní a amfifilní. Hydrofilní AMK dělíme dále na neutrální, kyselé a bazické [12].

AMK rozdělujeme také na esenciální, podmíněně esenciální a neesenciální. Esenciální AMK si na rozdíl od neesenciálních nedokáže lidský organismus sám vytvořit, a tudíž musí být dodávány do těla potravou. Do této skupiny patří valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin a tryptofan. Arginin a histidin jsou podmíněně esenciální, jelikož si je není schopen v dostatečné míře syntetizovat mladý organismus [12].

1.2.2 Úloha jednotlivých AMK v organismu

Aminokyseliny mají důležitou roli v anabolickém i v katabolickém metabolismu. Podle osudu jejich uhlíkaté kostry je rozdělujeme na ketogenní a glukogenní. Většina AMK patří mezi glukogenní, které jsou prekurzory glukosy. Ketogenní aminokyseliny poskytují meziprodukty, díky kterým dochází k tvorbě ketolátek a mastných kyselin. Patří mezi ně pouze leucin a lysin. Aminokyseliny isoleucin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan jsou zároveň keto- i glukogenní [14; 16].

Strukturně nejjednodušší aminokyselinou je glycin. Podílí se na biosyntéze hemu, purinových bazí adeninu a guaninu a je také jedním z prekurzorů pro syntézu svalové makroergní sloučeniny kreatinu. Ve vysokém podílu se rovněž nachází v kolagenu a elastinu, což jsou bílkoviny pojivových a vazivových tkání. Glycin patří také mezi nejdůležitější neurotransmitery.

Alanin je aminokyselina, která vzniká transaminací z pyruvátu a podílí se na transportu dusíku ze svalů do jater. V játrech dochází zpětně k transaminaci L-alaninu za vzniku pyruvátu, který slouží jako výchozí látka pro glukoneogenezi (tzv. alaninový cyklus) [13; 14; 16].

AMK s rozvětveným řetězcem (valin, leucin a isoleucin) mají své zastoupení především v bílkovinách kosterního svalstva, s čímž jsou spjaté i jejich anabolické účinky. K oxidaci těchto AMK dochází přímo ve svalu, a proto jsou významným zdrojem energie během fyzické aktivity. Volně se podílí na regulaci hormonů, především inzulínu, glukagonu a růstového hormonu. Valin je spojován s dědičnou chorobou zvanou srpkovitá anémie. Toto onemocnění je způsobené nahrazením glutamové kyseliny valinem v šesté pozici β -řetězce hemoglobinu, což vede k deformaci červené krvinky, a tudíž k porušení její funkce. Leucin dále urychluje i hojení pokožky a zlomenin [13; 14; 17].

Serin je díky své hydroxylové funkční skupině součástí aktivního centra enzymů štěpících bílkoviny, tzv. proteáz, které hydrolyzují peptidové vazby. Aktivní centrum je nejdůležitější částí enzymu. Nachází se tam totiž katalyticky aktivní aminokyselinové zbytky, jež jsou klíčovým předpokladem k potencionálnímu průběhu celé enzymové reakce. Mezi serinové proteázy patří trypsin, chymotrypsin, elastáza, trombin a plasmin.

Threonin je esenciální AMK, při jejímž nedostatku dochází k ukládání tuku v játrech. Jelikož jsou zdrojem threoninu zejména živočišné produkty, jeho nedostatkem trpí především vegetariáni.

Cystein se díky své thiolové funkční skupině (-SH) podílí na tvorbě disulfidové vazby a na oxidačně-redukčních reakcích, díky kterým chrání organismus před toxickými látkami. Stejně jako serin je i cystein součástí aktivního centra některých proteáz. Cystein může být

navíc ze serinu syntetizován, ovšem za účasti L-methioninu, který je navíc nezbytný pro zahájení syntézy bílkovin.

Kyselina asparagová se v organismu vyskytuje ve formě své soli – aspartátu, který je donorem dusíkových atomů v ornitinovém cyklu a uplatňuje se i při syntéze nukleotidů.

Glutamová kyselina je hlavním excitačním neurotransmiterem v centrální nervové soustavě a hraje roli v metabolismu tuků. Podílí se také na detoxikaci amoniaku v organismu, čímž udržuje správnou dusíkovou bilanci. Podobnou roli jako kyselina glutamová má i glutamin. Kromě odbourávání přebytečného amoniaku se uplatňuje při syntéze purinových bazí a je významným zdrojem energie pro ledviny, střeva a játra.

Lysin je důležitý pro vstřebávání vápníku a pro tvorbu svalové a pojivové tkáně. Arginin je prekurzorem pro syntézu kreatinu a je výchozí sloučeninou pro vznik signální molekuly oxidu dusnatého, který se podílí především na vasodilataci hladkého svalstva. Arginin se také účastní ornitinového cyklu [13; 14; 16].

Významnou AMK je fenylalanin, který se využívá při léčbě deprese a tlumení bolesti. Za katalýzy enzymem fenylalaninhydroxylázou je odbouráván na tyrosin. Pokud je tato metabolická cesta fenylalaninu narušena, dochází k onemocnění zvanému fenylketonurie, což je dědičná choroba, která se při nedostatečné či absentující léčbě projevuje především psychickými poruchami [13; 14; 18].

Tyrosin je tedy meziproduktem metabolismu fenylalaninu a dále slouží jako výchozí sloučenina pro řadu důležitých látek především hormonální povahy. Z tyrosinu vznikají hormony dřeně nadledvin neboli katecholaminy (adrenalin, noradrenalin, dopamin) a hormony štítné žlázy. Tyrosin je rovněž i prekurzorem pro tvorbu pigmentu melaninu.

Tryptofan je významnou výchozí látkou pro syntézu vitamínu nikotinamidu a neurotransmiteru serotoninu a je využíván k léčbě úzkosti, stresu a deprese.

Histidin má svůj význam především ve struktuře hemoglobinu a myoglobinu, kde pomocí koordinačně kovalentní vazby váže atom železa. Histidin je stejně jako serin součástí aktivních míst některých enzymů.

Prolin nacházíme zejména v pojivových tkáních [13; 14].

1.3 Biogenní aminy

1.3.1 Obecná charakteristika

Biogenní aminy (BA) patří mezi nízkomolekulární dusíkaté organické sloučeniny, které vznikají aminací aldehydů a ketonů nebo dekarboxylací aminokyselin za působení enzymů. BA jsou v malém množství syntetizovány v rostlinných i živočišných buňkách. V lidském střevě

jsou pomocí enzymů monoaminoxidáz či diaminoxidáz detoxikovány na menší degradační produkty. Účinek enzymů však inhibují některé léky (např. antidepresiva) a alkohol. Při nadměrné konzumaci BA však není náš organismus schopen jejich přebytek zcela odbourat, čímž dochází k jejich akumulaci, která způsobuje mnohé zdravotní problémy [19-21].

BA zahrnují mnoho strukturně odlišných sloučenin, které lze rozdělit dle několika parametrů. Podle chemické struktury rozlišujeme alifatické (kadaverin, putrescin, spermidin), aromatické (fenylethylamin, tyramin) a heterocyklické (histamin, tryptamin) biogenní aminy. Dle počtu aminových funkčních skupin je pak dělíme na monoaminy (tyramin), diaminy (histamin, kadaverin) a polyaminy (spermidin, spermin) [10; 21].

Jelikož BA vnikají během mikrobiálního metabolismu, jsou přirozenou složkou fermentovaných potravinářských výrobků jako jsou sýry, kvašená zelenina, pivo či víno. Druh a koncentrace BA, které se v potravinách vytvoří během fermentačního procesu, jsou ovlivněny několika faktory: složením potravin, bakteriální mikroflórou a podmínkami skladování, mezi které patří například teplota, proces zrání či balení produktu. Tvorba BA ve fermentovaných i nefermentovaných potravinách je spojována hlavně s jejich kvalitou. BA lze tudíž využít jako indikátory kvality potravin (stupně čerstvosti) například u zeleniny a ovoce, ale především u masa a masných výrobků a u jiných potravin s vysokým obsahem bílkovin. Dalším důvodem stanovení BA v potravinách je i jejich potenciální toxicita ve vyšším množství [14; 19; 21-23].

1.3.2 Úloha v organismu

BA zastávají důležité fyziologické funkce ve tkáních a biologických tekutinách [14; 20; 24]. Mezi nejvýznamnější BA přítomné v organismu patří histamin, serotonin, dopamin, noradrenalin (norepinefrin), adrenalin (epinefrin), spermidin, spermin a putrescin.

Histamin vzniká dekarboxylací histidinu pomocí enzymu histidindekarboxylázy a je důležitým neurotransmiterem v centrální nervové soustavě. Podílí se na sekreci žaludeční kyseliny a významnou roli hraje také při alergických reakcích. V případě, že je organismus atakován alergenem, dochází k uvolňování histaminu. Jeho cílem je zmírnit podráždění vyvolané alergenem, tudíž je jakýmsi prostředníkem pro zaktivování adekvátní odpovědi organismu. Cílovými místy pro působení histaminu jsou endoteliální buňky a buňky hladké svaloviny. Zde vyvolává samotné příznaky alergie jako je vazodilatace cév, zarudnutí kůže či zvýšení sekrece žláz v místě reakce. Díky rozšíření cév tak dochází ke snadnějšímu putování bílých krvinek, které se podílejí na imunitních mechanismech. Zvýšená sekrece tekutin (slzy, výtok z nosu) zase přispívá k vylučování alergenu z těla. Při silných alergických reakcích však může být jeho účinek také smrtelný [14; 25].

Serotonin vzniká hydroxylací a následnou dekarboxylací tryptofanu za účasti enzymu tryptofanhydroxylázy. V lidském těle se serotonin vyskytuje v gastrointestinálním traktu, v granulech krevních destiček a v centrální nervové soustavě. Serotonin má vazokonstrikční účinek, který uplatňuje především při kontrakci hladké svaloviny střev. Je prekurzorem pro biosyntézu hormonu melatoninu, jež v lidském těle reguluje periodicky se opakující biologické rytmy (např. spánek). Serotonin také řadíme mezi neurotransmitery a jeho snížená aktivita či úplný nedostatek jsou spojovány s psychickými poruchami (obzvláště deprese), poruchami nálad, spánku, paměti a chuti. Naopak v důsledku zvýšené koncentrace tryptofanu dochází často k výskytu migrény či nevolnosti [14; 26].

Dopamin, adrenalin a noradrenalin obsahují ve své struktuře pyrokatechol, a proto se jim obecně říká katecholaminy. Výchozí sloučeninou pro vznik katecholaminů je tyrosin, jehož hydroxylace a následná dekarboxylace vede ke vzniku dopaminu. Noradrenalin pak vzniká hydroxylací dopaminu za pomoci enzymu dopamin- β -hydroxylázy a adrenalin získáme methylací noradrenalinu pomocí enzymu fenylethanolamin-N-methyltransferázy. Katecholaminy jsou produkovány dřením nadledvin a působí jako hormony a neurotransmitery. Adrenalin je vylučován do krve při fyzickém a psychickém stresu a způsobuje zvýšení koncentrace glukózy, laktátu a volných mastných kyselin. Noradrenalin vyvolává kontrakci cév (kromě cév srdečních), čímž zvyšuje krevní tlak. Dopamin zase inhibuje sekreci hormonu prolaktinu, který stimuluje růst mléčné žlázy a tvorbu mateřského mléka. Se sníženou koncentrací dopaminu se pojí Parkinsonova choroba, což je neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy [14; 27; 28].

Decarboxylací ornitinu je v těle tvořen BA putrescin, jehož enzymatickou přeměnou poté vznikají polyaminy spermin a spermidin. Tyto dva se podílí na proliferaci a diferenciaci buněk a na syntéze RNA, DNA a bílkovin. V rakovinných tkáních je aktivita enzymů podílejících se na syntéze sperminu a spermidinu zvýšená, což má za následek zvýšení celkové koncentrace BA v těle, a tím i zvýšení proliferace rakovinných buněk [10; 24; 29; 30].

1.4 Hydroxysloučeniny

Hydroxysloučeniny jsou organické látky, které ve své struktuře obsahují minimálně jednu hydroxylovou funkční skupinu (-OH). Také hydroxysloučeniny lze rozdělit do několika kategorií. Podle toho, na jakém uhlovodíkovém zbytku je hydroxylová funkční skupina vázána, rozlišujeme alkoholy (alifatický uhlovodíkový řetězec) a fenoly (aromatické jádro). Pokud posuzujeme uspořádání na uhlíku nesoucím funkční skupinu, odlišujeme hydroxysloučeniny

primární, sekundární či terciální. Dle počtu funkčních skupin v molekule dělíme hydroxysloučeniny na jednosytné, dvojsytné či vícesytné [31].

Metabolity obsahující hydroxylovou funkční skupinu jsou důležitou třídou metabolomu [32]. Jedná se především o sacharidy, lipidy [33], steroidy [8; 33; 34], vitaminy, [34], ribonukleosidy [35] a jiné polyoly [36].

1.5 Druhy biologických vzorků a jejich příprava k analýze

Pro metabolomické studie je nesmírně důležitá vhodná úprava vzorku. Optimální metoda by měla být neselektivní, jednoduchá, rychlá, reprodukovatelná a zahrnovat krok zastavení (tzv. zhášení) metabolismu. Během přípravy vzorků by nemělo dojít k degradaci či jiné ztrátě metabolitů, proto je nutné dobu a kroky postupu přípravy minimalizovat a optimalizovat [37].

Jelikož je stabilita metabolitů závislá na jejich chemické povaze, účasti v enzymatických procesech a na velikosti enzymatické aktivity ve vzorku během jeho skladování, je potřeba při přípravě vzorku zařadit krok zhášení metabolismu. Vzorek si tak uchová skutečné složení metabolomu, jaké měl v době jeho odběru. Například degradace proteinů může zvýšit hladiny aminokyselin ve vzorku, a tím negativně ovlivnit výsledky analýzy. Zhášení metabolismu se provádí rychlými změnami teplot (chlazení tekutým dusíkem) či úpravou pH vzorku na extrémní hodnotu. Pro dosažení nízké hodnoty pH lze přidat ke vzorku kyselinu chloristou, chlorovodíkovou nebo trichloroctovou, naopak silně alkalického pH vzorku dosáhneme přidáním hydroxidu sodného nebo draselného. V některých případech však ani tyto kroky nemusí zabránit negativnímu ovlivnění experimentu. Například použití kyseliny při zhášení metabolismu může vést k degradaci některých významných metabolitů a také ke špatné kompatibilitě s hmotnostní detekcí. Krok zhášení metabolismu se běžně používá při metabolomických analýzách buněk a tkání, avšak u vzorků biologických tekutin je obecně vynecháván. Důsledky zahrnutí či vynechání tohoto kroku u vzorků tělních tekutin nejsou zcela přezkoumány, lze jej však opomenout v případě, že se jedná o velmi stabilní metabolity, avšak v případě analýzy snadno oxidovatelných sloučenin (např. kyselina askorbová, adrenalin, dopamin) by měl být zařazen [37-39].

Po procesu zhášení metabolismu se při přípravě biologických vzorků využívají jednoduché techniky úpravy jako je zředování vzorku, srážení proteinů rozpouštědlem, ultrafiltrace či extrakce tuhou fází (SPE). Proteiny jsou ze vzorků odstraňovány organickými rozpouštědly, kyselinami nebo solemi. Účinné je použití acetonitrilu, acetonu, methanolu, ethanolu či jejich směsi nebo použití kyseliny trichloroctové či síranu zinečnatého. Metoda

ultrafiltrace využívá speciálních filtrů (membrán), které jsou schopny propustit pouze molekuly o specifické molekulové hmotnosti. Filtrace je pak dosaženo působením tlaku nebo odstředěním [37]. SPE extrakce se používá pro čištění a zakoncentrování vzorku. K tomuto účelu se používají kolony s vhodným sorbentem, nejčastěji C₁₈. Materiál sorbentu zvyšuje selektivitu metody, a proto je SPE extrakce vhodná pro cílenou analýzu metabolitů. Kolona je nejdříve aktivována vhodným rozpouštědlem, čímž se vytvoří vhodné podmínky pro záchyt analytů. Následně je nanášen vzorek s cílovými analyty, které jsou pomocí sorbentu na koloně zachyceny. Pro odstranění interferujících látek je kolona následně promývána a v posledním kroku jsou zachycené analyty z kolony vypuzeny elučním činidlem [37; 40; 41]. Pokud je třeba rozdělit metabolity dle polaritý pouze do dvou frakcí (polární a nepolární), lze využít i techniku extrakce kapalina-kapalina [39].

Většina klinických analýz se provádí v plazmě, séru a moči. K analýze lze však využít i jiné biologické tekutiny, například mozkomíšni mok, sliny, plodovou vodu, mateřské mléko, synoviální tekutinu, trávicí tekutiny, seminální plazmu, ale také vzorky tkání [4].

1.5.1 Sérum, plazma

Plazma se získá z plné krve ve dvou krocích. Nejprve se přidá antikoagulační činidlo (př. heparin, citrát, EDTA), které zabrání zahájení srážecí (tzv. hemokoagulační) kaskády. Poté je suspenze odstředěna, čímž je oddělena buněčná část od supernatantu, tedy plazmy. Pro získání séra se žádné antikoagulanty nepřidávají. Po srážení krve je sérum od buněčné části odděleno pomocí centrifugace. Jelikož se některé bílkoviny podílí na hemokoagulační kaskádě, jsou z krve odstraněny, a tím je jejich obsah v séru nižší než v plazmě. Příprava séra trvá delší dobu, což zvyšuje pravděpodobnost výskytu enzymatických a degradačních procesů ve vzorku. Z tohoto důvodu je pro metabolomické analýzy upřednostňována plazma [37]. K odstranění bílkovin ze séra či plazmy se využívají organická rozpouštědla jako je acetonitril [8; 42; 43], kyselina sulfosalicylová [18], chloristá [11] či trichloroctová [10].

1.5.2 Krev

Dalším druhem biologického vzorku je plná krev, jež se v metabolomických analýzách využívá jen zřídka. Běžně se však používá při novorozeneckém screeningu vrozených vad tzv. metodou sušené kapky krve. Při této metodě se malá kapka krve nanese na filtrační papír, nechá se zaschnout a metabolity jsou následně ze skvrny extrahovány organickým rozpouštědlem (např. methanolem). K výhodám této metody patří především potřeba menších objemů vzorků (20-25 µl), snadnost odběru a menší nároky na skladování. Nevýhodou je však

omezená stabilita některých metabolitů ve vysušené kapce krve. Analýzu mohou také narušovat sloučeniny uvolněné během extrakce z filtračního papíru. Některé metabolity mohou navíc s papírem silně interagovat, a tudíž je obtížné vybrat vhodný extrakční postup [37].

1.5.3 Moč

Moč obsahuje především polární látky, které jsou z těla vylučovány v důsledku katabolismu [4]. Po odběru je vhodné vzorek moči odstředit. Dojde tak k odstranění buněčných elementů, jež se mohou v moči nacházet (např. erytrocyty, leukocyty). Pozor si musíme dát na rychlost otáček během odstředění. Při vyšších otáčkách totiž může dojít k poškození některých buněk, a tím k ovlivnění výsledků analýzy. Ke vzorku se někdy přidává azid sodný, jež zabraňuje růstu bakterií během jeho skladování, avšak lepší je bakterie ze vzorku zcela odstranit pomocí mikrofiltrace [37; 38; 44]. Vzorek moči je před analýzou nejčastěji pouze ředěn vodou v poměru 1:1 až 1:10. [37; 38]. K extrakci analytů ze vzorku moči lze však využít metodu SPE s nepolární stacionární fází (C_{18}) a methanolem jako elučním činidlem [45; 46].

1.5.4 Mozkomíšní mok

Analýzy metabolitů v mozkomíšním moku jsou klíčové pro porozumění poruch centrálního nervového systému. Vzorek mozkomíšního moku stačí pouze naředit vodou [8], ale z důvodu odstranění proteinů je vhodné přidat srážecí rozpouštědlo, například methanol či studený acetonitril a následně odstředit [37; 43]

1.5.5 Tkáň

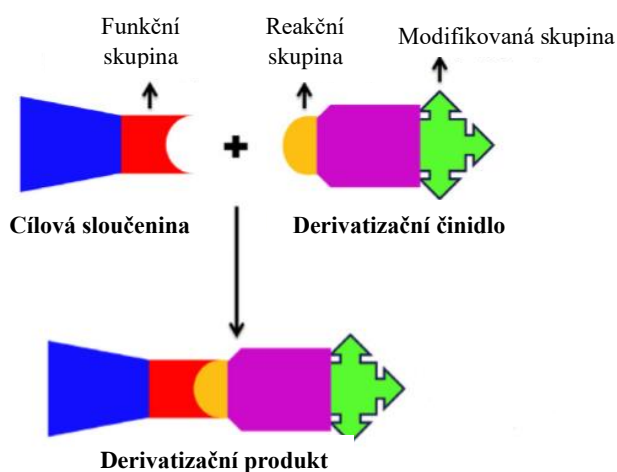
V porovnání s biologickými tekutinami přináší analýza tkání mimo jiné i prostorové informace o obsahu metabolitů, čímž můžeme například rozlišit zdravou a kancerózní tkáň [4]. Vzorky tkání se doporučuje zbavit zbytků krve oplachem, jelikož by mohly narušovat profil metabolitů. Následuje krok homogenizace tkání, která se provádí za snížené teploty pomocí homogenizačních kuliček nebo rotačních homogenizátorů [37].

Z homogenizované tkáně získáme metabolity pomocí extrakce, ke které lze použít různá činidla dle polaritý analytů. Nejčastěji se využívají rozpouštědla jako je voda, ethanol, methanol, chloroform atd. Pro extrakci hydrofilních i hydrofobních sloučenin zároveň se pak používají směsi extrakčních činidel, např. kombinace chloroform/methanol či chloroform/methanol/voda [37].

1.6 Derivatizace

Derivatizace je způsob modifikace struktury analytu, díky které získá nové fyzikální nebo chemické vlastnosti. Provádí se pro umožnění detekce analytů, pro zvýšení citlivosti a selektivity detekce a ke zlepšení chromatografické separace. K tomuto účelu se využívají derivatizační činidla, která jsou schopna za určitých podmínek selektivně reagovat s určitou funkční skupinou analytu a vnáší do struktury analytu chromofor, fluorofor nebo elektrofor.

V plynové chromatografii (GC) se využívají derivatizační činidla především z důvodu zvýšení těkavosti stanovovaných látek, jelikož podmínkou analýzy pomocí GC je těkavost a termostabilita analytů. Díky derivatizaci tak mohou být stanovovány metodou GC i netěkavé sloučeniny. V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se derivatizační techniky provádí především kvůli zlepšení citlivosti a selektivity detekce, ale také ke zlepšení chromatografické separace (např. retenční čas, tvar a symetrie píku) [40; 47-49]. Obecný princip derivatizace je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1 - Obecný derivatizační mechanismus [49]

Kvantitativní průběh derivatizační reakce je velmi závislý na reakčních podmínkách, jako je vhodné pH, teplota a doba reakce. Právě tato kritéria se při použití derivatizačních činidel optimalizují. Při volbě vhodného činidla se také věnuje pozornost stabilitě derivátů či ceně derivatizačního činidla [11; 47-49].

Derivatizační reakce může být realizována před vlastní separací analytů (předkolonová) nebo až po ní (postkolonová). U obou provedení jsou na reakci, použítá činidla i na vzniklé deriváty kladeny různé požadavky [47; 48].

1.6.1 Předkolonová derivatizace

Předkolonová derivatizace probíhá ještě před zavedením analytu na kolonu a v tomto případě musí reakce probíhat kvantitativně, selektivně, za mírných reakčních podmínek,

bez vzniku vedlejších produktů a nezreagované činidlo musí být dobře separovatelné od produktů. Předkolonovou derivatizaci lze provádět v offline provedení, při němž je reakce uskutečněna ještě před nástřikem vzorku na kolonu nebo v online upořádání, kdy derivatizační reakce probíhá v dávkovací smyčce, mezi smyčkou a kolonou či přímo na koloně. Předkolonovou derivatizací je ovlivňována nejen selektivita detekce, ale i separovatelnost sloučenin, čímž je možné samotnou separaci analytu zjednodušit. Zároveň může také sloužit jako krok čištění vzorku. Výhodou tohoto typu derivatizace je především neomezená volba reakčních podmínek (např. teplota, rozpouštědla, pH a čas). Naopak nevýhodou je pak častý vznik vedlejších produktů, které ztěžují orientaci v chromatogramu, a také vysoké nároky na zkušenost operátora, který nesmí negativně ovlivnit reprodukovatelnost výsledků [21; 47; 48].

1.6.2 Postkolonová derivatizace

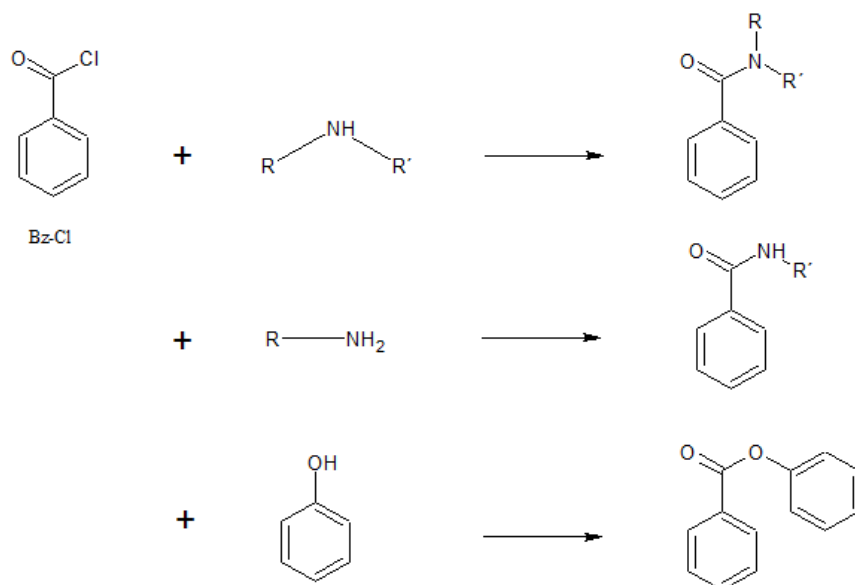
Postkolonová derivatizace se používá pro látky, jež lze dobře separovat, avšak jejich detekce není dostatečně selektivní. V tomto provedení je derivatizační činidlo dodáváno do mobilní fáze až poté, co proběhne separace analytů na koloně. Z tohoto důvodu je nutné do instrumentace zavést další speciální zařízení a reaktory, čímž se zvýší pořizovací náklady celé techniky. Reakce analytu s derivatizačním činidlem musí probíhat rychle a v prostředí mobilní fáze, což nás omezuje v jejím výběru. Derivatizační činidlo by samo o sobě nemělo poskytovat odezvu detektoru. Nadbytek přiváděného derivatizačního činidla do systému navíc způsobuje ředění mobilní fáze, čímž dochází k rozmývání píků, a tím snížení účinnosti separace. Výhodou postkolonové derivatizace je eliminace manuální práce a také možnost zapojení dalšího detektoru, který je zařazen do instrumentace ještě před derivatizací [33; 47; 48; 50].

1.6.3 Derivatizační činidla pro HPLC

V současné době je již vyvinuto nepřehledné množství derivatizačních činidel aplikovaných na různé skupiny látek. Obecně se pro derivatizaci amino skupiny využívají acylchloridy, arylsulfonfylchloridy, sulfonfylchloridy, karbonylchloridy, nitrobenzeny, isokyanáty, isothiokyanáty, ninhydrin, halogennitrobenzofurany či fluorescamin. Derivatizace hydroxysloučenin je prováděna pomocí acylchloridů či fenylisokyanátů. V následující kapitole jsou blíže představena některá derivatizační činidla, která jsou používána pro derivatizaci aminokyselin, biogenních aminů a hydroxysloučenin [47].

1.6.3.1 Činidlo benzoylchlorid

Benzoylchlorid (Bz-Cl) je komerčně i cenově dostupné derivatizační činidlo ze skupiny acylchloridů, které reaguje se sloučeninami obsahující aminové a hydroxylové skupiny již za mírných podmínek (obrázek 2). Je nositelem chromoforu, který umožňuje následnou spektrofotometrickou detekci analytů [47].



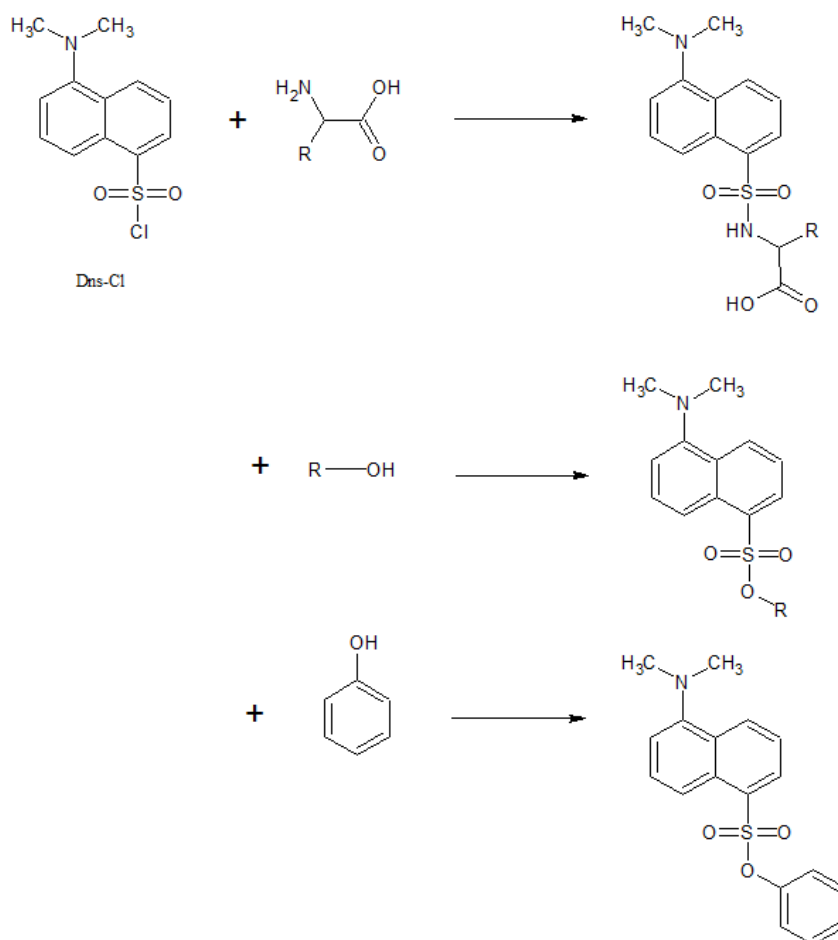
Obrázek 2 - Benzoylace primárních, sekundárních aminů a fenolů [7]

Benzoylace aminů se řídí Schotten-Baumannovým reakčním schématem, v němž Bz-Cl reaguje s primárními a sekundárními aminy za vzniku amidů. S hydroxysloučeninami tvoří Bz-Cl estery a je vhodný především k esterifikaci cukrů, alkoholů a glykolů [7; 36; 47]. V obou případech se během reakce uvolňuje kyselina chlorovodíková, která je schopná vázat se na původní amin, a tím snižovat výtěžek reakce. Právě z důvodu neutralizace a eliminace negativního vlivu generované HCl, musí benzoylace probíhat v mírně alkalickém prostředí (pH 9) [47; 51]. Pro úpravu pH je často používán hydroxid sodný [36; 48], borátový pufr [9; 43], triethylamin [36; 48], uhličitan sodný [8], hydrogenuhličitan sodný [52] či pyridin [48].

Benzoylace probíhá za laboratorní teploty do 10 minut [9; 36; 43; 52] a poskytuje stabilní deriváty, jež nejsou náchylné k fotodegradaci [7; 8; 21; 53]. Po proběhnutí reakce lze zvýšit stabilitu derivátů přidáním kyselého činidla např. kyseliny mravenčí, sírové [7] nebo fosforečné [36]. Hotové deriváty mohou být následně extrahovány např. ethylacetátem [36] či chloroformem [52]. Deriváty benzoylchloridu absorbují v rozmezí 230 až 260 nm [7; 36; 47; 48].

1.6.3.2 Činidlo dansylchlorid

Dansylchlorid (Dns-Cl, 5-N,N'-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid) je derivatizační činidlo ze skupiny sulfonylchloridů, které je považováno za jedno z nejstarších a nejvíce používaných derivatizačních činidel [21; 47; 48]. V mírně alkalickém prostředí poskytuje fluoreskující deriváty s primárními i sekundárními aminy (obrázek 3). Za vyššího pH reaguje i s fenoly, imidazoly, a dokonce i s alkoholy (obrázek 3). Se vzrůstajícím pH se zvyšuje rychlost dansylační reakce, ale i rychlost hydrolyzy činidla i derivátů. Hydrolyzní produkty však rovněž fluoreskují, čímž negativně ovlivňují separaci a orientaci v chromatogramech. Při dansylaci hydroxylsloženin se někdy ke vzorku přidává 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP), jež slouží k aktivaci reakce. Dle literatury je pro urychlení reakce nutné derivatizační směs zahřát na teplotu 60-100 °C, ale i přesto je reakční doba dlouhá až kolem 45-60 min [11; 32; 34; 47; 48; 54]. Velkou nevýhodou Dns-Cl a jeho derivátů je velká citlivost na světlo. Derivatizační reakce tedy musí probíhat ve tmě, aby nedocházelo k rozkladným reakcím [11; 53]. Dansylderiváty jsou detekovány při vlnových délkách excitačního záření (λ_{ex}) 340-380 nm a emisního záření (λ_{em}) 470-530 nm [21; 47; 48].

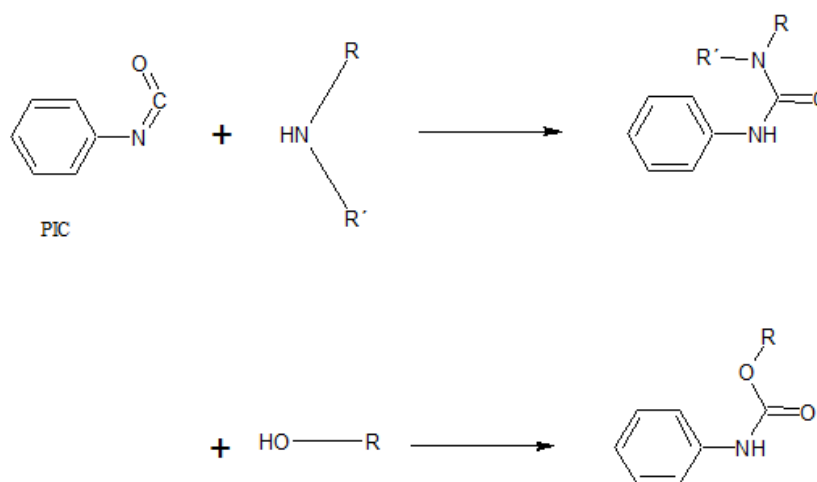


Obrázek 3 – Reakce dansylchloridu s aminy, alkoholy a fenoly [34; 40; 47]

1.6.3.3 Činidlo fenylisokyanát

Derivatizační činidlo fenylisokyanát (PIC) reaguje s primárními i sekundárními aminy za vzniku disubstituované močoviny a s hydroxysloučeninami za vzniku esterů N-substituovaných karbamových kyselin (obrázek 4). Derivatizační reakce probíhá nejen za zvýšené ale i za laboratorní teploty a trvá okolo 15-20 minut [47; 55-61]. Nadbytek činidla lze po proběhnutí reakce následně odstranit přidávkem alifatického alkoholu, např. methanolu. Deriváty jsou detekovány při vlnové délce 230-260 nm.

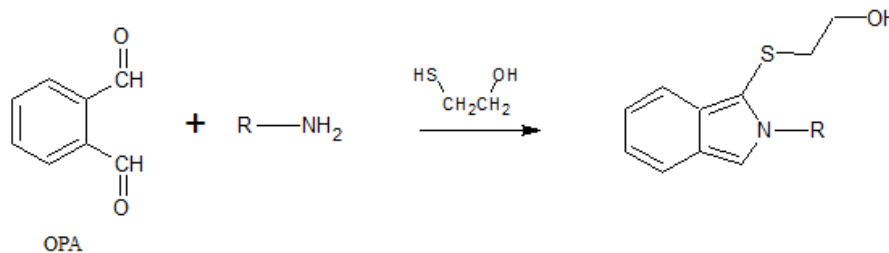
Obdobou tohoto činidla je také derivatizační činidlo fenylisothiokyanát (PITC), jež se používá pro derivatizaci aminů či aminokyselin za vzniku fenylthiokarbamoylů [47; 62-64].



Obrázek 4 – Reakce PIC s aminy a alkoholy [47]

1.6.3.4 Činidlo *o*-ftaldialdehyd

Derivatizační činidlo *o*-ftaldialdehyd (OPA) je jedním z nejpobulárnějších činidel vhodných pro předkolonou i postkolonovou derivatizaci. OPA reaguje pouze s primárními aminy (obrázek 5). Reakce probíhá v zásaditém prostředí při laboratorní teplotě a za přítomnosti redukčního činidla, kterým je nejčastěji 2-merkptoethanol nebo kyselina 3-merkptopropanová [42; 65-68].

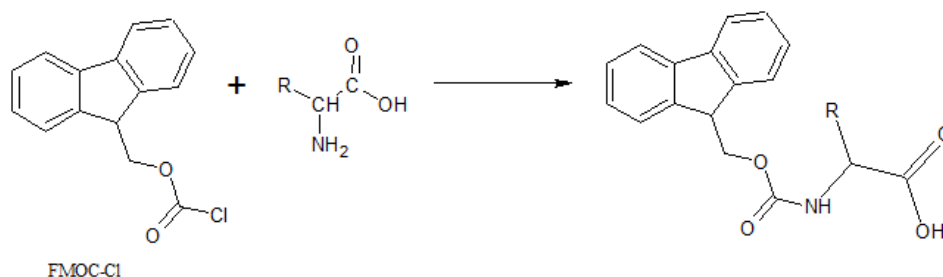


Obrázek 5 - Reakce OPA s primárními aminy [65]

Výhodou derivatizace s OPA činidlem je krátká reakční doba obvykle do 2 min a vznik vysoce fluoreskující sloučeniny detekovatelné při $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$. Nevýhodou je nedostatečná stabilita připravených derivátů. Z tohoto důvodu je OPA činidlo upřednostňováno v postkolonové derivatizaci [65-68].

1.6.3.5 Činidlo FMOC-Cl

Dříve byl FMOC-Cl (9-(fluorenyl)methoxykarbonyl chlorid) používán jako protektivní činidlo amino skupiny při syntéze peptidů. Až později našel své využití v derivatizacích. FMOC-Cl reaguje s primárními i sekundárními aminy za tvorby fluoreskujícího derivátu karbamátu (obrázek 6). Derivatizační reakce je rychlá a probíhá v mírně alkalickém prostředí zajištěným nejčastěji borátovým pufrem. S vyšším pH se zvyšuje i tvorba hydrolyzního produktu. Detekce probíhá při $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$ [47; 69; 70].

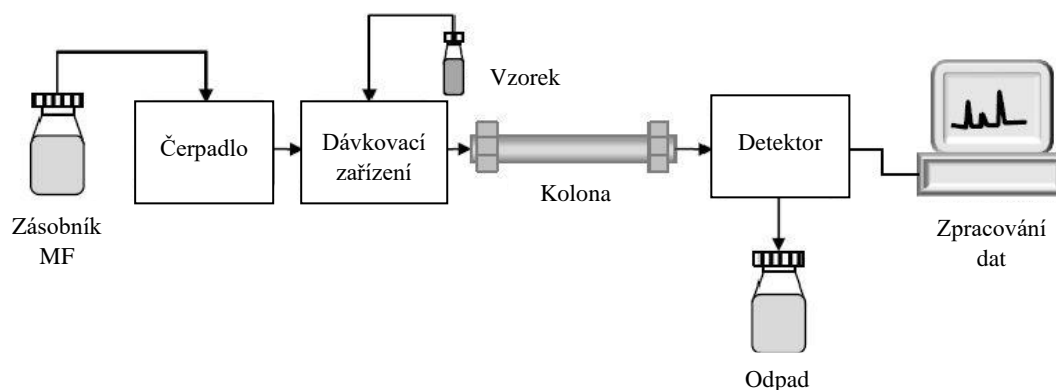


Obrázek 6 - Reakce FMOC-Cl s aminokyselinami [69]

1.7 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Široce využívanou analytickou separační metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Princip HPLC spočívá v rozdílné afinitě jednotlivých složek směsi ke dvěma fázím – stacionární a mobilní. Stacionární fází je pevný sorbent a fází mobilní je kapalina. Výhodou této metody je velký výběr mobilních a stacionárních fází, jejichž kombinacemi je možné separovat širokou škálu látek nepolární až iontové povahy. Dle principu distribuce složek mezi fázemi rozlišujeme chromatografii v systému s normálními fázemi (NP-HPLC), v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC), iontově-výměnnou, gelovou permeační chromatografii, afinitní, chirální aj. Rozdíl mezi NP-HPLC a RP-HPLC spočívá v rozdílné polaritě stacionární a mobilní fáze. Pokud je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, hovoříme o NP-HPLC, naopak je-li fáze stacionární méně polární než fáze mobilní, jedná se o RP-HPLC. Právě s využitím RP-HPLC se setkáme nejčastěji [71-75].

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních částí: zásobník(y) mobilní fáze, čerpadla, dávkovací zařízení, kolona a detektor. Schéma HPLC instrumentace je zobrazeno na obrázku 7 [71].



Obrázek 7 - Schéma HPLC [76]

1.7.1 Čerpadla a mobilní fáze

Mobilní fáze (MF) je čerpána ze zásobníku pomocí čerpadla vyrobeného z chemicky a mechanicky odolného materiálu. Čerpadla pracují za velmi vysokého tlaku od 5 do 60 MPa a v případě ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) se při analýzách dosahuje tlaků až do 130 MPa. Vysokotlaká čerpadla musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze bez tlakových pulzací. Rychlost průtoku se obvykle pohybuje v rozmezí 0,5-1,5 ml/min. MF unáší nadávkovaný vzorek do kolony a zároveň se účastní fázových rovnováh a tedy i separace. Velký vliv má na eluční charakteristiky jako je rozlišení, retenční poměr, doba analýzy a citlivost. Proto je volba mobilní fáze pro analýzu velmi důležitá. U NP-HPLC se používají nepolární organická rozpouštědla jako je hexan, heptan nebo cyklohexan spolu s přísadkou polární složky, např. 2-propanolu. V RP-HPLC bývají mobilní fází vodné roztoky methanolu či acetonitrilu [71-75].

Pro separaci jednodušších vzorků se využívá izokratické eluce, při níž se během analýzy nemění složení mobilní fáze. Pro komplexní vzorky se naopak využívá eluce gradientová, při níž se složení mobilní fáze mění, což mění selektivitu látek na analytické koloně. Pomocí gradientové eluce lze výrazně snížit dobu analýzy, oddělit od sebe látky velmi podobné struktury a ovlivnit tvar píků [72].

1.7.2 Dávkovací ventil

Vzorek se dávkuje pomocí vícecestného (většinou šesticestného) dávkovacího ventilu se smyčkou přesně definovaného objemu, která tak zajišťuje dávkování stejného množství vzorku. Dávkování vzorku lze provést manuálně nebo pomocí autosampleru, jenž minimalizuje chyby operátora. Nástřikový objem je dán velikostí smyčky a pro většinu analytických aplikací se pohybuje v rozmezí 1-50 μ l [71-75].

1.7.3 Kolona

Kolona je trubice o délce 3-25 cm a vnitřním průměru od 2,1-4,6 mm vyrobená nejčastěji z nerezové oceli a je vyplněna vhodným sorbentem. Podle tvaru náplně rozlišujeme kolony na monolitické a náplňové. Monolitické kolony jsou zcela vyplněny jedním kusem porézního materiálu, jež bývá nejčastěji na bázi organického polymeru (methakrylát, akrylamid, styren) či silikagelu. Kolony jsou charakteristické velikostí pórů, které umožňují průtok mobilní fáze a zajišťují povrch pro interakci s analytem. Monolity na bázi organického polymeru jsou připravovány radikálovou polymerační reakcí iniciovanou zvýšením teploty či UV zářením. Monolitické kolony lze využít pro separace nízko i vysokomolekulárních látek, často se však využívají při analýze proteinů, oligo- či polynukleotidů nebo štěpů DNA.

Náplňové analytické kolony jsou plněné částicemi nejčastěji o velikosti 2-5 μm , v případě UPLC pod 2 μm . Částice mohou být pórovité, povrchově pórovité, širokoporézní či neporézní a jsou zpravidla tvořeny silikagelem, který je chemicky modifikovaný různými alkyly, aryly, či jinými skupinami, podle požadovaných vlastností stacionární fáze. U NP-HPLC systému jsou na nosič navázány polární funkční skupiny, např. kyanoskupina, aminoskupina nebo diolová skupina a u systému RP-HPLC jsou to pak stacionární fáze nepolárního charakteru, jako jsou alkylové řetězce různé délky (C18, C8 atd) [71-75].

Pro ochranu analytické kolony a zvýšení její životnosti se před ní často zařazují krátké předkolony. Jejich funkcí je zachytávání nečistot a látek, které se nevratně váží na stacionární fázi analytické kolony, a mohly by tak způsobit její destrukci [71-75].

1.7.4 Detektory

Detektor je zařízení, které slouží k detekci látek v eluátu vedeného z kolony. Detekce je uskutečněna sledováním určitých vlastností analytů, jako je schopnost absorpce záření, vést či indukovat elektrický proud, lámat světlo nebo vyzařovat sekundární záření. S tím souvisí i rozdělení detektorů na univerzální, které lze využít pro většinu látek, a selektivní, které jsou určeny pouze pro konkrétní třídy analytů. Selektivní detektory se oproti univerzálním vyznačují vyšší citlivostí a vyšší pořizovací cenou. Typ a vlastnosti běžných detektorů jsou uvedeny v tabulce 1 [71-75].

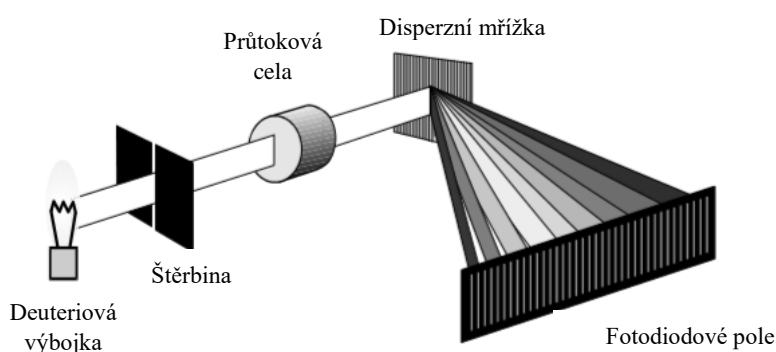
Tabulka 1- Srovnání detektorů [75]

Detektor	Typ detektoru	Měřená veličina	Citlivost
Spektrofotometrický	selektivní	absorbance	ng-pg
Fluorimetrický	selektivní	intenzita fluorescence	fg-pg
Elektrochemický	selektivní	elektrický proud	pg
Refraktometrický	univerzální	index lomu	μg
Vodivostní	univerzální	vodivost	ng

Spektrofotometrické detektory

K nejběžnějším detektorům patří spektrofotometrický detektor, který monitoruje absorpci eluentu v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti vlnových délek ($\lambda=190-800$ nm). Některé analyzované vzorky však obsahují velké množství látek absorbujících záření stejných vlnových délek, nebo naopak tuto vlastnost stanovované analyty postrádají. Z tohoto důvodu se často před či za samotnou separací zařazuje derivatizační krok [40; 47-49].

Spektrofotometrické detektory s diodovým polem (DAD) mohou v libovolném čase zaznamenávat celé spektrum eluátu bez přerušování chromatografické separace. Spektra lze následně porovnávat s knihovnou spekter. Schéma DAD je znázorněno na obrázku 8. Světlo vycházející z deuteriové výbojky, prochází štěrbinou, průtokovou celou a následně je celé spektrum světla rozptýleno disperzním prvkem a dopadá na soustavu fotodiódů tzv. fotodiódové pole, které měří intenzitu světla pro každou vlnovou délku [71-75].

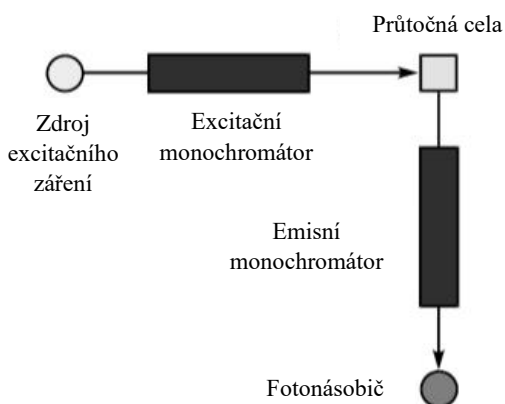


Obrázek 8 - Schéma DAD detektoru [75]

Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor je selektivní a velmi citlivý detektor měřící intenzitu emitovaného záření. Aby látka vykazovala fluorescenci, musí ve své struktuře obsahovat alespoň 2 aromatická jádra. Z tohoto důvodu je nutné většinu analytů před detekcí derivatizovat

derivatizačními činidly. Součástí fluorescenčního detektoru, jehož schéma je znázorněno na obrázku 9, je zdroj excitačního záření, excitační monochromátor, průtočná cela, emisní monochromátor a fotonásobič pro zesílení emitovaných fotonů [71-75].



Obrázek 9 - Schéma fluorescenčního detektoru [75]

Refraktometrický detektor

Refraktometrický detektor je vhodné používat k detekci látek, které nevykazují absorpci ani emisi. Detektor měří index lomu eluátu procházejícího měrnou celou a porovnává jej s indexem lomu čisté mobilní fáze v cele referentní. Odezva detektoru je přímo úměrná rozdílu intenzity světla a je velmi závislá na teplotě, čistotě a složení mobilní fáze. Použití refraktometrického detektoru je tedy vhodné pouze pro izokratickou eluci [77].

Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory jsou založené na měření určité elektrické veličiny, jež vzniká při průchodu oxidovatelných nebo redukovatelných analytů měrnou celou. Využívají se tedy k detekci látek schopných elektrochemické reakce. V měrné cele jsou umístěné elektrody (pracovní, pomocná, referentní), na které je vloženo napětí potřebné k reakci. Podmínkou použití elektrochemického detektoru je vodivost mobilní fáze. Rozlišujeme detektor amperometrický a coulometrický. Zatímco amperometrický detektor je založen na měření proudu vyvolaného průchodem redukované či oxidované látky měrnou celou, coulometrický měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukci látky [77].

Vodivostní detektor

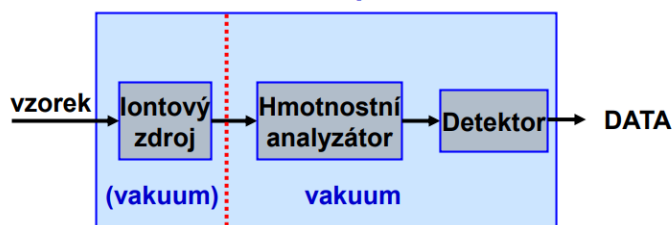
Vodivostní detektor, často řazen mezi elektrochemické, měří elektrickou vodivost eluátu procházejícího průtokovou celou mezi dvěma elektrodami. Na elektrody je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo jejich polarizaci. Pro použití vodivostního detektoru jsou kladeny vysoké nároky na mobilní fázi. Aby bylo možné detekovat i stopová množství iontů,

je nutné, aby byla mobilní fáze, pokud možno, nevodivá. Pokud by byla použita mobilní fáze disponující mnohem vyšší vodivostí, v přítomnosti stopového množství iontu by došlo pouze k nepatrnému zvýšení vodivosti, a tudíž ke ztížení či dokonce znemožnění detekce. Tento typ detektoru má své uplatnění především v iontově-výměnné chromatografii [77].

1.8 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, při níž dochází k převedení molekul analytu na ionty, které jsou následně separovány podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Výsledným záznamem je hmotnostní spektrum, které zobrazuje relativní intenzitu jednotlivých iontů v závislosti na m/z [5; 71; 78].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze třech základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru (obrázek 10) [71; 78].



Obrázek 10 - Schéma hmotnostního spektrometru [78]

1.8.1 Ionizační techniky

Iontový zdroj převádí neutrální analyzovanou látku na ionty v plynné fázi. Podle konstrukčního uspořádání může iontový zdroj pracovat za atmosférického tlaku nebo za vakuu. Dle množství dodané energie rozlišujeme ionizační techniky měkké a tvrdé. Pokud získá molekula větší přebytek vnitřní energie při ionizaci, jedná se o tvrdou ionizační techniku a dochází k rozsáhlejší fragmentaci, kdy může zcela chybět molekulární ion. Pokud je přebytek dodané energie malý, jedná se o měkkou ionizační techniku. Při použití měkké ionizační techniky nevznikají fragmentové ionty či jen ve velmi nízké intenzitě [71; 78].

Elektronová ionizace

Elektronová ionizace je jediným zástupcem tvrdých ionizačních technik a výhradně se používá při spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Elektronová ionizace probíhá za sníženého tlaku a jako iontový zdroj se využívá wolframové nebo rheniové vlákno. Elektricky žhavená katoda emituje elektron, který putuje prostorem iontového zdroje k anodě. Jakmile se elektron přiblíží k valenčním elektronům molekuly, dojde k vzájemnému ovlivnění jejich magnetických polí, což vede ke vzniku iontu s lichým počtem elektronů, který je pomocí vytěšňovací elektrody vypuzen a fokusován do analyzátoru [78].

Chemická ionizace

Příkladem měkké ionizační techniky je chemická ionizace. Stejně jako u ionizace elektronové dochází pomocí iontového zdroje k emisi elektronů, ovšem v případě chemické ionizace je ve zdroji navíc přítomný reakční plyn o tlaku 50-100 Pa. Mezi nejběžnější reakční plyny patří methan, izobutan a amoniak, méně se pak používá například propan, methanol, dusík aj. Elektrony nejdříve ionizují molekuly reakčního plynu, které až následně ionizují molekuly analytu [71; 78].

Ionizace elektrosprejem (ESI)

ESI je nejčastěji používanou měkkou ionizační technikou, používanou především pro spojení HPLC-MS. Ionizace probíhá za atmosférického tlaku a je určena pro nízko- i vysokomolekulární látky středně polární až iontové povahy. Princip spočívá v tom, že je analyt rozprášen na konci kovové kapiláry, na níž je vloženo vysoké napětí. Na povrchu kapiček vzniklého aerosolu jsou akumulovány náboje a při odpařování rozpouštědla sušicím plynem dochází ke zhušťování náboje. Jakmile je dosaženo kritické hodnoty, dojde k tzv. Coulombické explozi. Opakování tohoto procesu vede až k uvolnění iontů, které jsou přitahovány do analyzátoru [40; 78].

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

APCI je měkká ionizační technika používaná pro středně polární nízkomolekulární sloučeniny. Tento zdroj ionizace je vhodný i pro analýzy s postkolonovou derivatizací. U APCI je eluát z chromatografické kolony přiváděn do vyhřívané zóny, kde dochází k jeho rozprášení a odpaření. Pomocí koronového výboje zprostředkovaného koronovou jehlou s vloženým vysokým napětím, dochází k ionizaci molekul analytu. Vzniklé ionty jsou pak pomocí elektrod nasměrovány do analyzátoru [40; 50; 71; 78].

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

Další měkkou ionizační technikou je fotoionizace za atmosférického tlaku, která je vhodná pro nízkomolekulární látky středně polární až velmi nepolární povahy. Uspořádání v této technice ionizace je analogické jako u APCI, ovšem k ionizaci dochází pomocí fotonů, kdy se jako zdroj UV záření používá kryptonová výbojka. Fotony musí mít vyšší energii, než je ionizační energie analytů, ovšem nižší, než je ionizační energie mobilní fáze, tím dochází k selektivní ionizaci molekul analytu [71; 78].

1.8.2 Hmotnostní analyzátory

Další částí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor, v němž jsou vzniklé ionty rozděleny podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Proud iontů je dále směřován do detektoru [71; 78].

Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (Q) se běžně využívá u hmotnostních spektrometrů v kombinaci s GC a LC. Konstrukčně je složen ze čtyř kovových tyčí s kruhovým průřezem. Na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na druhou dvojici protilehlých tyčí záporné. Na všechny tyče je zároveň aplikováno i napětí střídavé. Jakmile se ionty analytu dostanou do prostoru kvadrupólu, začnou oscilovat. Podle nastaveného poměru stejnosměrného a střídavého napětí je z prostoru mezi tyčemi uvolněn vždy pouze ion o určité hodnotě m/z . Změnou poměru stejnosměrného a střídavého napětí jsou z analyzátoru postupně vypuzeny všechny ionty, které následně dopadají na detektor. Výhodou tohoto analyzátoru je jednoduchost, rychlá změna volby vkládaného napětí a nižší finanční nákladnost. Naopak nevýhodou je omezený hmotnostní rozsah [71; 78].

Pro kvantitativní analýzu je vhodné použít trojitý kvadrupól (QqQ). Jedná se o tři kvadrupóly řazené za sebou. První kvadrupól vybírá analyzované ionty, druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela, kde dochází k fragmentaci iontů, a třetí slouží k analýze vzniklých fragmentů [78].

3D iontová past

Iontová past je analyzátor, který se skládá z jedné prstencové elektrody a ze dvou elektrod koncových. Na koncové elektrody je vloženo stejnosměrné napětí, naopak na elektrodu prstencovou napětí střídavé o malé amplitudě. Ionty jsou směřovány do vnitřního prostoru pasti, kde jsou vhodnými poměry napětí zadržovány. Díky postupným změnám v poměru napětí, respektive zvyšováním amplitudy střídavého napětí na prstencové elektrodě, jsou ionty podle jejich m/z z analyzátoru vypuzovány [71; 78].

Analyzátor doby letu (TOF)

Průletový analyzátor rozděluje ionty s různým m/z podle doby, kterou urazí v letové trubici z pulzního iontového zdroje do detektoru. Ionty, které mají stejnou kinetickou energii ale rozdílnou hodnotu m/z , dopadají na detektor v různém čase, tzn. ionty vysokomolekulárních látek dopadají na detektor později než ionty látek nízkomolekulárních. Během ionizace však mohou ionty o stejném m/z získat rozdílnou kinetickou energii, což vede ke snížení rozlišení.

Z tohoto důvodu lze do konstrukce analyzátoru zařadit iontové zrcadlo neboli reflektoru, jež slouží k vyrovnání rozdílné kinetické energie iontů o stejné hodnotě m/z . Díky reflektoru tudíž urazí ionty o stejné hodnotě m/z dráhu k detektoru za stejnou dobu [71; 78].

1.8.2.1 Detektory

K detekci proudu iontů přiváděných z hmotnostního analyzátoru slouží detektory. Detektory generují signál, který je následně programově zpracován do formy hmotnostních spekter. Obecně lze rozdělit detektory v hmotnostní spektrometrii na detektory indukující proud, jež vzniká při dopadu iontů, a detektory využívající efekt násobení elektronů. Nejčastěji využívaným detektorem v MS je elektronový násobič. V tomto případě dopad iontů na dynodu způsobí vyrazení elektronů, jejichž počet se opakovanými nárazy na další dynody násobí, a tím dochází k zesílení signálu. Dále lze detekovat ionty pomocí fotonásobiče. V tomto případě dopadají ionty z hmotnostního analyzátoru také na dynodu, ze které vyrazí elektrony. Ty ovšem následně atakují scintilační vrstvu (fosforovou destičku), čímž jsou emitovány fotony, které jsou následně zesíleny ve fotonásobiči. K detekci lze využít také Faradayovu klec. Ionty analytů opět naráží na dynodu, ze které jsou emitovány elektrony, avšak dochází k indukci proudu. Proud je následně zesílen a zaznamenáván [71; 78].

1.8.3 Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS)

V posledních letech se hojně využívá spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, jež nám umožňuje separaci a identifikaci složité směsi látek během jedné analýzy [71; 74; 78]. Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie se vyznačuje svojí vysokou citlivostí, širokým dynamickým rozsahem a vysokou selektivitou [1; 5; 7; 35].

Při výběru kolon pro LC/MS jsou upřednostňovány kratší kolony, s menším vnitřním průměrem a menší velikostí částic. Při většině analýz se používají RP-LC systémy, často se stacionární fází C8 nebo C18. Důležitá je volba mobilní fáze. Použitá rozpouštědla i aditiva musí být nejvyšší čistoty, redestilovaná voda vždy čerstvá a MF by měla být filtrována. Kvůli možnému znečištění iontového zdroje hmotnostního spektrometru by neměla obsahovat netěkavé složky, jako jsou sodné a draselné soli. Aditiva se do MF přidávají v co nejnížší koncentraci a musí být těkavá (např. kyselina mravenčí a octová, octan i mravenčan amonný). Nejčastěji využívaným typem ionizace je ionizace za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI), během níž vznikají hlavně ionty se sudým počtem elektronů. Při záznamu kladných iontů vznikají protonované molekuly, $[M+H]^+$, či adukty se sodnými, $[M+Na]^+$, draselnými, $[M+K]^+$,

nebo amonnými ionty, $[M+Na]^+$. Při záznamu záporných iontů vznikají zpravidla deprotonané molekuly, $[M-H]^-$ [71; 74].

1.9 Stanovení metabolitů

Pro stanovení metabolitů obsahujících aminovou či hydroxylovou skupinu neexistuje ideální analytická metoda. Výběr vždy záleží na typu vzorku, přístrojovém vybavení, dostupnosti reagensů a cíli studie [66]. Nejvíce se využívají separační techniky, jako je HPLC, GC [1; 7-9; 79] či CE, často ve spojení s hmotnostní spektrometrií [1; 7; 17]. Můžeme se však setkat i s méně tradičními technikami jako je například nukleární magnetická rezonance [1; 5]. Z kapalinové chromatografie se nejčastěji využívá RP-HPLC a pro stanovení velmi polárních metabolitů lze využít i kapalinovou chromatografii hydrofilních interakcí (HILIC) [9; 33; 80].

1.9.1 Analýza aminů a hydroxysloučenin pomocí RP-HPLC

Metabolity obsahující aminovou [8-11; 36; 42-46; 62; 64; 68; 81; 82] či hydroxylovou [32; 34-36; 55] funkční skupinu se stanovují v různých biologických matricích, nejčastěji v séru [8; 9; 11; 36; 42; 68; 81], plazmě [43; 62; 64], moči [32; 35; 42; 44-46; 82], mozkomíšním moku [8; 40; 42], mateřském mléce [10; 55] a také v různých druzích tkání [34; 43].

Pro selektivní stanovení metabolitů obsahujících aminovou nebo hydroxy skupinu (aminokyseliny, biogenní aminy, hormony, cukry atd.) je nezbytné zařadit derivatizační krok. Hojně využívanými derivatizačními činidly jsou Bz-Cl a Dns-Cl. Dále se využívá i derivatizace pomocí OPA [42], FMOC-Cl [83], PIC či PITC.

Činidlo PITC je často využíváno k derivatizaci AMK. K separaci derivátů zpravidla dochází na oktadecyl silikagelové (C18) stacionární fázi a jako mobilní fáze se využívá směs vody a acetonitrilu. K úpravě pH vodné složky mobilní fáze se většinou používá octan sodný [62; 64]. PITC deriváty absorbují v UV/VIS oblasti, a proto se pro detekci využívá spektrofotometrický detektor [62; 64]. Deriváty lze analyzovat i s použitím HPLC/MS spojení, kde se k okyselení vodné složky mobilní fáze používá kyselina mravenčí [63].

Obdobou je derivatizační činidlo PIC, které reaguje s aminovou [59] i hydroxylovou skupinou [55; 57; 58; 60]. Deriváty se separují na C18 stacionární fázi pomocí binární mobilní fáze složené z vody a acetonitrilu [55-61]. Do vodné složky mobilní fáze se zpravidla přidává kyselina trifluoroctová [61], octan sodný [56], nebo hydrogenuhličitan draselný [58]. K detekci se využívá spektrofotometrický detektor [55-61] či MS při snímání kladných iontů [56; 61].

Deriváty vzniklé reakcí Dns-Cl s amino [11; 41; 54; 84] či hydroxysloučeninami [34] jsou separovány na C18 koloně. Jako mobilní fáze se využívá acetonitril s vodou [34; 54; 84]

nebo s roztokem mravenčanu [54] či octanu amonného [11]. Pro detekci dansylderivátů lze využít spektrofotometrický [11] nebo fluorescenční detektor [84]. Při použití hmotnostního spektrometru [41; 44; 54] je vhodné deriváty před analýzou extrahovat ethylacetátem [41].

Dalším derivatizačním činidlem v metabolomice, které se využívá pro analýzu látek obsahující aminovou [8; 9; 36; 43; 52; 53] nebo hydroxy skupinu [36], je benzoylchlorid. Vzniklé deriváty jsou analyzovány v RP-HPLC na koloně plněné C18 stacionární fází. Jako mobilní fáze se používá směs vody a acetonitrilu [8; 36] nebo metanolu [9; 52; 53]. Do vodné složky mobilní fáze se v některých případech přidává mravenčan amonný [8], kyselina mravenčí [9] či octanový pufr [53]. Benzoylderiváty lze detekovat spektrofotometricky [36; 52], ale také pomocí hmotnostní spektrometrie [8; 9; 43; 53], a to především při snímání kladných iontů. Před vlastní HPLC/MS analýzou je však vhodné zařadit extrakční krok, např. pomocí ACN [9], ethylacetátu [36], diethyletheru [53] nebo chloroformu [52].

Pro spojení HPLC/MS je nejpoužívanějším iontovým zdrojem ESI [9; 44; 46; 81] a nejběžnějším analyzátozem Q-TOF [9; 41; 44] či QqQ [7; 8; 43; 46; 81].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

Pro analýzu vzorků derivátů byl použit kapalinový chromatograf, který byl složený z autosampleru SIL-20ACXR, čerpadel mobilní fáze LC-20ADXR, detektoru s diodovým polem SPD-M30A (vše Shimadzu, Japonsko) a termostatu kolon LCO 102 (Ecom, ČR). Stejný chromatografický systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem QTrap 4500 (AB Sciex, USA). Dále byl použit kapalinový chromatograf, jehož součástí byla čerpadla LC-30AD, fluorescenční detektor RF-20AXS (vše Shimadzu, Japonsko) a termostat kolon LCO 102 (Ecom, ČR).

K separaci látek byla použita převážně kolona Zorbax SB-Aq (3,0 x 150 mm; 3,5 μm částice, Agilent, USA), dále Ascentis Express C18 (150 x 3 mm; 2,7 μm částice, Supelco, USA).

Pro přípravu standardů a vzorků byly použity mikropipety s nastavitelným objemem (ThermoLabsystems; Finnpiette; Sartorius; Biohit) a analytické váhy. Během derivatizačních postupů byla využita centrifuga (Centrifuge 5424, Eppendorf, Německo), třepačka Promax 1020 (Heidolph, Německo), míchačka REAX 2 (Heidolph, Německo), vařič MR2002 (Heidolph, Německo), vortex REAX top (Heidolph, Německo). Dále byly použity vialky různých objemů, odměrné a běžné laboratorní sklo a pH metr (Metrohm, Švýcarsko). Pro přečištění vzorků s deriváty před analýzou byly použity stříkačky s filtry PTFE o velikosti pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika). Mobilní fáze byly filtrovány přes filtr Nylon 66 Membranes o velikosti pórů 0,2 μm (Supelco, USA) pomocí vakuové jednotky Labobase SBC 860 s regulátorem vakua CVC 3000 (vacuubrand).

2.2 Použité chemikálie a standardní látky

2.2.1 Standardní látky

Standardy aminokyselin a biogenních aminů (vše Sigma Aldrich, USA): L-Arginin monohydrochlorid (Arg) ($\geq 98\%$), L-cystein hydrochlorid (Cys) ($\geq 98\%$), L-histidin monohydrochlorid monohydrát (His) ($\geq 98\%$), L-leucin (Leu) ($\geq 98\%$), L-lysin monohydrochlorid (Lys) ($\geq 98\%$), L-fenylalanin (Phe) ($\geq 98\%$), L-prolin (Pro) ($\geq 99\%$), L-serin (Ser) ($\geq 99\%$), L-threonin (Thr) ($\geq 98\%$), L-tyrosin (Tyr) ($\geq 98\%$), L-valin (Val) ($\geq 98\%$), fenethylamin (PheA) ($\geq 99\%$), isopentylamin (Iso) ($\geq 99\%$), tryptamin (Tryp) ($\geq 98\%$), tyramin (TyrA) ($\geq 99\%$), 1,7-diaminoheptan (1,7-DIA) ($\geq 98\%$), histamin (HisA) ($\geq 96\%$), diethylamin (DETA) ($\geq 97\%$).

Další použité standardy: D-glukosa bezvodá (Glu) (Penta, Chrudim, ČR), D-xylosa (Xyl) ($\geq 99\%$), adenosin (Ade) ($\geq 99\%$), adrenalin (Adr), dopamin (Dop), serotonin (Sero), kyselina gallová (Gal) ($\geq 98\%$) (vše Sigma Aldrich, USA).

2.2.2 Chemikálie a rozpouštědla

- Acetonitril (ACN) $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich; USA)
- Benzoylchlorid $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, USA)
- Dansylchlorid $\geq 98\%$ (TCI, Japonsko)
- Diethylether p.a. (Penta, ČR)
- Ethylacetát p.a. (Penta, ČR)
- Fenylišokyanát $\geq 90\%$ (Sigma Aldrich, USA)
- Fenylišothiokyanát $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, USA)
- n-hexan ≥ 95 (Penta, ČR)
- Hydroxid sodný p.a. (Penta, ČR)
- Chloroform $\geq 99\%$ (Penta, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina mravenčí 98% (Penta, ČR;) a pro LC-MS $> 98\%$ (TCI, Japonsko)
- Kyselina octová 99% (Penta, ČR)
- Methanol (MetOH) $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, USA)
- Mravenčan amonný pro MS $\geq 99\%$ (Fluka, Německo)
- Octan amonný $\geq 98\%$ (Lach-Ner, ČR) a pro MS $\geq 99,99\%$ (Honeywell, Německo)
- Octan sodný $\geq 99,5\%$ (Fluka, Německo)
- n - pentan p.a. (Penta, ČR)
- Pyridin $\geq 99\%$ (Penta, ČR)
- Deionizovaná voda (Milli-Q, Merck, Německo)
- Triethylamin 99,8% (TEA) (Lach-Ner, ČR)
- Uhličitan lithný $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, USA)

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava standardů

Zásobní roztoky aminokyselin a biogenních aminů ($c = 1\text{g/l}$) byly připraveny navážením standardu a doplněním destilovanou vodou (aminokyseliny), 50 % acetonitrem (biogenní aminy) nebo 100% acetonitrem (DETA, PheA, Iso). Na přípravu ostatních standardů ($c = 1\text{g/l}$)

byla použita také voda (dopamin a D-xylosa) nebo ethanol (adrenalin). Adenosin a serotonin byl rozpuštěn v 5 M kyselině chlorovodíkové ($c = 10 \text{ mg/ml}$) a naředěn vodou na $c = 1 \text{ g/l}$.

2.3.2 Analýza PITC derivátů

2.3.2.1 Derivatizační postup

Postup derivatizace činidlem PITC byl převzat z literatury [62; 64] a mírně upraven. Do Eppendorfovy zkumavky bylo napipetováno 60 μl každého standardu o koncentraci 1 g/l (Ser, Pro, His, Phe, Arg, Lys, HisA, Ade, Adr, Dop, Sero). Celkový objem směsi (660 μl) byl vysušen pod proudem dusíku. Po vysušení bylo přidáno 40 μl derivatizační směsi 1 (D1), která obsahovala MetOH, 1 M octan sodný a TEA v poměru 2:2:1, a po rozmíchání byl roztok opět vysušen. Následně bylo k sušině napipetováno 100 μl derivatizační směsi 2 (D2), jež byla složena z MetOH, redestilované H_2O , TEA a PITC v poměru 7:1:1:1. Roztok byl důkladně promíchán na vortexu a ponechán 20 min reagovat při laboratorní teplotě. Dále byl roztok vysušen a rozpuštěn v 200 μl MetOH. Po odstředění (2 min, 10 000 ot/min) a zfiltrování pomocí PTFE stříkačkového filtru byl připravený roztok analyzován pomocí systému HPLC/UV.

Pro HPLC/MS analýzu byla provedena extrakce k odstranění rušivého vlivu matrice. Po reakci byla směs vysušena a rozpuštěna v 50 μl MetOH. Po rozpuštění bylo ke směsi přidáno 150 μl redestilované H_2O a 200 μl ethylacetátu. Tento roztok byl třepán po dobu 5 minut a následně byla odebrána horní organická fáze (150 μl). Odebraná fáze byla vysušena pod proudem dusíku, a nakonec rozpuštěna v 200 μl MetOH. Po rozpuštění v MetOH byl roztok odstředěn a zfiltrován pomocí PTFE stříkačkového filtru. Připravený derivatizovaný roztok byl analyzován pomocí HPLC/MS.

2.3.2.2 Podmínky chromatografické analýzy

Separace proběhla na koloně Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 mm), na níž byla udržována konstantní teplota 30 °C. Mobilní fáze byla složena ze 70 mM octanu amonného o pH 6,55 (A) a 60% ACN (B). Pro úpravu pH octanu amonného byla využita kyselina octová či roztok hydroxidu sodného. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min a na kolonu byly dávkovány 2 μl vzorku. Analyty byly detekovány spektrofotometrickou detekcí při 254 nm. Pro separaci byla využita gradientová eluce s následujícím programem: 0 min - 10 % B; 2,5 min - 30 % (B); 4,5 min - 50 % (B); 8,5 min - 80 % (B); 9,5 min - 100 % (B). Po skončení gradientového programu následoval návrat na počáteční podmínky a ekvilibrace kolony.

Při HPLC/MS analýze byla použita stejná kolona, která byla udržována na teplotě 30 °C. Průtok mobilní fáze musel být snížen na 0,4 ml/min z důvodu poruchy přístroje.

Při experimentu byla porovnávána ionizační účinnost při dvou použitých mobilních fázích. Nejprve byla testována stejná mobilní fáze jako u HPLC/UV měření (octan amonný a 60% ACN). Poté byla testována směs vody okyselené kyselinou mravenčí (0,05 %, A) a 70% ACN (B). Separace látek proběhla lineární gradientovou elucí 10-100% B za 15 minut. Analyty byly detekovány spektrofotometrickou detekcí při 254 nm a hmotnostním spektrometrem (m/z 100-600). Hmotnostní spektrometr pracoval za následujících podmínek: ESI+, průtoky plynů použitých na rozprašení a sušení eluátu, „curtain gas“, „ion source gas 1“ a „ion source gas 2“ byly 20 psi, 40 psi a 50 psi (v uvedeném pořadí). Teplota byla 400 °C, „ion spray voltage“ 4500 V a vstupní potenciál 10 V, deklasterační potenciál byl 90 V.

2.3.3 Analýza Bz-Cl derivátů

2.3.3.1 Derivatizace Bz-Cl pro HPLC/MS

Deriváty jednotlivých standardů byly připraveny následujícím způsobem. Do vialky (o objemu 8 ml) bylo napipetováno vždy 50 μ l zásobního roztoku standardu (PheA, DETA, 1,7-DIA, Fen, Glu, Gal, Phe, Pro, Lys), jež byl následně vysušen pod proudem dusíku. Poté bylo přidáno 25 μ l 100% ACN, 60 μ l pyridinu a směs byla důkladně promíchána na vortexu. Dále bylo přidáno 30 μ l Bz-Cl. Reakce probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě za neustálého třepání na třepačce. Derivát byl ze směsi extrahován dvěma různými extrakčními činidly. Jedním byla směs 1 ml MetOH a 2 ml chloroformu a druhým extrakčním činidlem byl ethylacetát o objemu 3 ml. K extrakčnímu činidlu bylo přidáno také 600 μ l 1 M uhličitanu amonného. Následně bylo odebráno 500 μ l organické fáze, která byla odpařena a následně rozpuštěna v 500 μ l MetOH. Vzorky zástupců BA a hydroxysloučenin byly z důvodu vysoké odezvy naředěny, a to 1:5 MetOH v případě BA a 1:1 u hydroxysloučenin.

2.3.3.2 Podmínky HPLC/MS analýzy

Separace proběhla na koloně Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 mm), na níž byla udržována konstantní teplota 30 °C. Mobilní fáze byla složena z vody okyselené pomocí kyseliny mravenčí na pH 2,46 (A) a 100% ACN (B). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min a na kolonu byly dávkovány 2 μ l vzorku. Analyty byly detekovány spektrofotometrickou detekcí při 237 nm a hmotnostním spektrometrem v rozsahu m/z 50-800. Pro separaci byla využita gradientová eluce s následujícím programem:

AMK: 0 min – 5% B, 10 min – 100% B

BA: 0 min – 30% B, 10 min – 100% B

Hydroxysloučeniny: 0 min – 5% B, 10 min – 100% B

Po skončení gradientového programu následoval návrat na počáteční podmínky a ekvilibrace kolony.

Hmotnostní spektrometr pracoval za následujících podmínek: ESI+, průtoky plynů použitých na rozprášení a sušení eluátu, „curtain gas“, „ion source gas 1“ a „ion source gas 2“ byly 20 psi, 40 psi a 50 psi (v uvedeném pořadí). Teplota byla 400 °C, „ion spray voltage“ 4500 V a vstupní potenciál 10 V, deklasterační potenciál byl 90 V.

Pro sledování přítomnosti derivátů ve směsi byla provedena rovněž přímá infuze roztoku do hmotnostního spektrometru, přičemž parametry hmotnostního spektrometru byly následující: průtok 7 $\mu\text{l}/\text{min}$, ESI+, průtoky plynů „curtain gas“ 10 psi, „ion source gas 1“ – 20 psi a „ion source gas 2“ – 0 psi; ion spray voltage 4500 V, vstupní potenciál 10 V, deklasterační potenciál 60-120 V.

2.3.4 Analýza Dns-Cl derivátů

2.3.4.1 Derivatizční postup

K derivatizaci standardů derivatizačním činidlem Dns-Cl byly využity dva derivatizační postupy. První postup byl převzat z literatury [54] a mírně upraven. Do vialky (o objemu 8 ml) byl napipetován vždy 1 ml standardu (Pro, Ser, Lys, Glu, Fen, Gal, PheA, DETA nebo 1,7-DIA) o $c = 1 \text{ g/l}$, k němuž bylo přidáno 150 μl 2M NaOH a 300 μl nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po důkladném promíchání byl ke směsi přidán 1 ml Dns-Cl ($c = 1 \text{ g/l}$ v ACN). Reakce probíhala 60 min na vodní lázni při teplotě 50 °C a za nepřístupu světla, a po zreagování byly ke směsi přidány 3 ethylacetátu. Po deseti minutovém třepání byla vždy odebrána organická fáze, vysušena, a nakonec rozpuštěna v 500 μl ACN.

Druhý postup vycházející z literatury [84] byl také mírně modifikován. Do Eppendorfovy zkumavky bylo naváženo vždy 10 mg uhličitanu lithného, k němuž byl napipetován vždy 1 ml standardního roztoku (Pro, Ser, Lys, Glu, Fen, Gal, PheA, DETA nebo 1,7-DIA) o $c = 1 \text{ g/l}$ a 0,5 ml činidla Dns-Cl ($c = 0,02 \text{ M}$ v ACN). Reakce probíhala při laboratorní teplotě pouze 5 minut za neustálého třepání a za nepřístupu světla.

2.3.4.2 Podmínky chromatografické analýzy

Separace proběhla na koloně Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 mm), na níž byla udržována konstantní teplota 30 °C. Mobilní fáze byla složena z vody okyselené pomocí kyseliny mravenčí na pH 2,46 (A) a 100% ACN (B). Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a na kolonu byly dávkovány 2 μl vzorku. Analyty byly detekovány fluorimetrickou detekcí

při $\lambda_{\text{ex}} = 264 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 497 \text{ nm}$. Pro separaci byla využita gradientová eluce s následujícím programem: 0 min – 25% B, 2 min – 35%B, 4 min – 80% B, 5 min – 100% B.

2.3.5 Analýza PIC derivátů

2.3.5.1 Derivatizační postup

Na vybrané zástupce hydroxysloučenin (Gal a Glu) byl aplikován derivatizační postup převzatý z literatury [61] a mírně upraven. Ke 100 μl standardu vysušeného pod proudem dusíku bylo přidáno 200 μl TEA a 200 μl PIC.

2.3.5.2 Podmínky chromatografické analýzy

Separace proběhla na koloně Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 mm), na níž byla udržována konstantní teplota 30 °C. Mobilní fáze byla složena ze 70 mM octanu amonného o pH 6,55 (A) a 60% ACN (B). Pro úpravu pH octanu amonného byla využita kyselina octová či roztok hydroxidu sodného. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min a na kolonu byly dávkovány 2 μl vzorku. Analyty byly detekovány spektrofotometrickou při = 240 nm. Pro separaci byla využita gradientová eluce s následujícím programem: 0 min – 40% B, 9 min – 100% B.

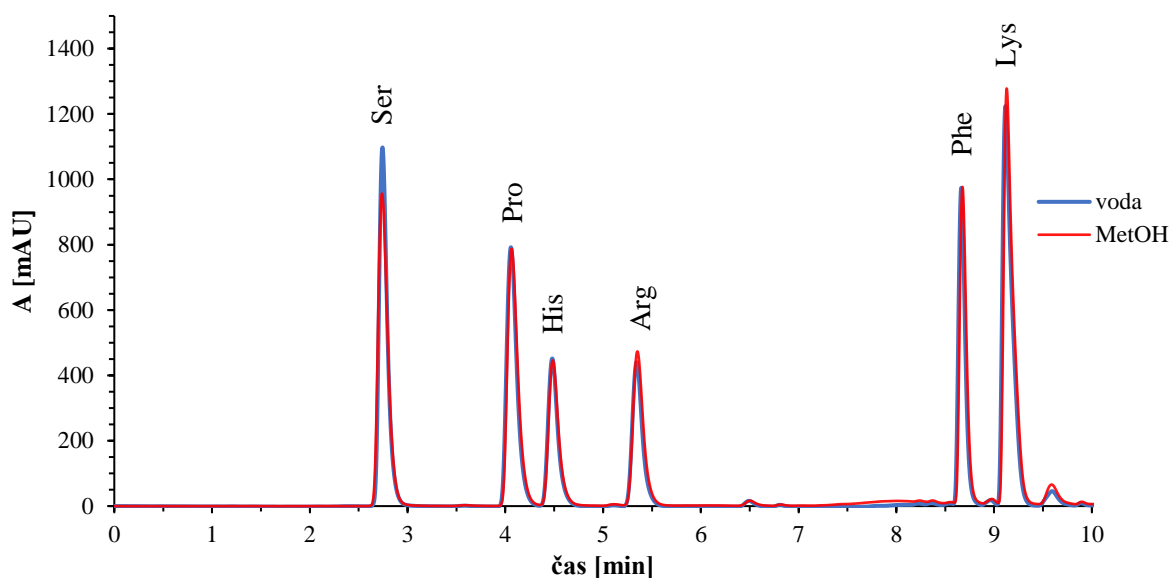
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální části diplomové práce byla porovnávána derivatizační činidla pro stanovení aminokyselin, biogenních aminů a hydroxyloučenin. Derivatizační činidla byla vybrána na základě dostupnosti, snadnosti použití a reaktivnosti, a podmínky derivatizačních reakcí byly optimalizovány.

3.1 Derivatizace PITC

Derivatizace směsi zásobních roztoků AMK byla provedena podle modifikovaného postupu uvedeného v literatuře [62; 64]. Tento postup se skládal ze dvou kroků, kdy nejprve byla k vysušenému vzorku přidána první derivatizační směs tvořená methanolem, 1 M octanem sodným a TEA v poměru 2:2:1 a po promíchání a vysušení byla přidána druhá derivatizační směs složená z MetOH, redestilované H₂O, TEA a PITC v poměru 7:1:1:1. Po promíchání byla směs opět vysušena a následně rozpuštěna. Po odstředění a filtraci pomocí stříkačkového filtru následovala HPLC analýza. Postup derivatizace je uveden v experimentální části v kapitole 2.3.2.1. Pro testování derivatizační reakce byla použita směs aminokyselin: serin (Ser), histidin (His), fenylalanin (Phe), prolin (Pro), arginin (Arg) a lysin (Lys).

Nejprve bylo testováno vhodné rozpouštědlo konečného derivátu před HPLC analýzou. Byla porovnávána voda a methanol. Jak lze vidět ze záznamů na obrázku 11, při použití H₂O i MetOH jako rozpouštěcího činidla byla odezva vzniklých derivátů srovnatelná. Pro další analýzy byl však vybrán methanol, který byl účinnější pro rozpouštění derivátů ostatních tříd sledovaných látek. Na základě poznatků z literatury [62; 64] byla pro separaci derivátů vybrána mobilní fáze skládající se ze 70 mM octanu amonného a 60% ACN. Vhodnou volbou jednotlivých parametrů gradientové eluce bylo dosaženo optimální separace testovací směsi aminokyselin. Spektrofotometrická detekce byla provedena při vlnové délce 254 nm.



Obrázek 11 - Separace standardů 6AMK po derivatizaci PITC a rozpuštěním ve vodě nebo MetOH

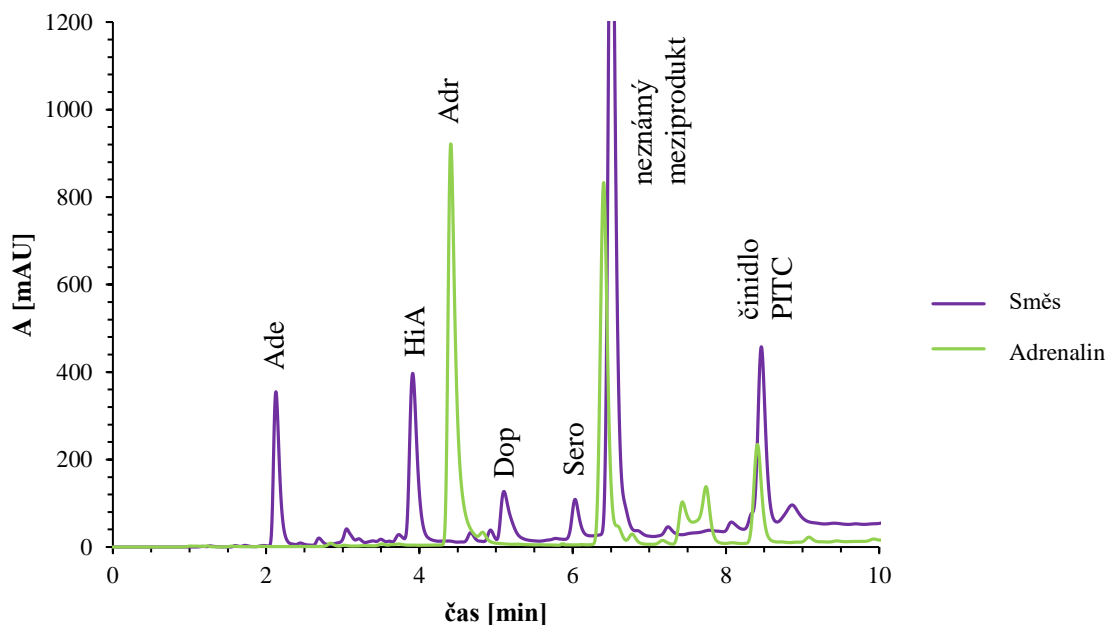
Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 8,5 min – 60 % B, 9 min 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.

Pozn.: Ser = serin, Pro = prolin, His = histidin, Arg = arginin, Phe = fenylalanin, Lys = lysin.

Pro ověření retenčního chování byly jednotlivé aminokyseliny derivatizovány a analyzovány samostatně. V tomto případě byl použit lehce modifikovaný postup derivatizace, který se lišil v objemech přidávaných derivatizačních směsí. K derivatizaci bylo použito 150 μ l zásobního roztoku jednotlivých standardů ($c = 1$ g/l) a po vysušení bylo přidáno 10 μ l D1, směs byla důkladně promíchána a opět vysušena. Následně bylo k sušině přidáno 25 μ l D2 a po promíchání a reakci byla směs opět vysušena rozpuštěna v 200 μ l MetOH. Následovalo odstředění, filtrace a analýza. Tímto modifikovaným postupem byly dále analyzovány zástupci dalších skupin metabolitů obsahující aminovou či hydroxylovou funkční skupinu, konkrétně histamin (HisA), dopamin (Dop), adrenalin (Adr), serotonin (Sero), adenosin (Ade), xylosa (Xyl) a glukosa (Glu). Nejprve byly jednotlivé deriváty připraveny a analyzovány samostatně a poté byl připraven i směsný vzorek napipetováním 50 μ l každé látky do Eppendorfovy zkumavky. U tohoto směsného vzorku byl využit postup s většími přídávky derivatizačních směsí uvedený v experimentální části v kapitole 2.3.2.1.

Opět bylo porovnáno rozpouštění sušiny v MetOH a ve vodě. V případě vody k rozpouštění sušiny vůbec nedošlo, tudíž byl pro všechny vzorky použit metanol. Porovnáním záznamů při analýze derivátů xylosy a glukosy se slepým pokusem bylo patrné, že sacharidy nereagují s PITC činidlem ochotně a za těchto podmínek s činidlem nereagují. Dále bylo pozorováno, že adrenalin, který samostatně po reakci s PITC poskytuje signál, ve směsi

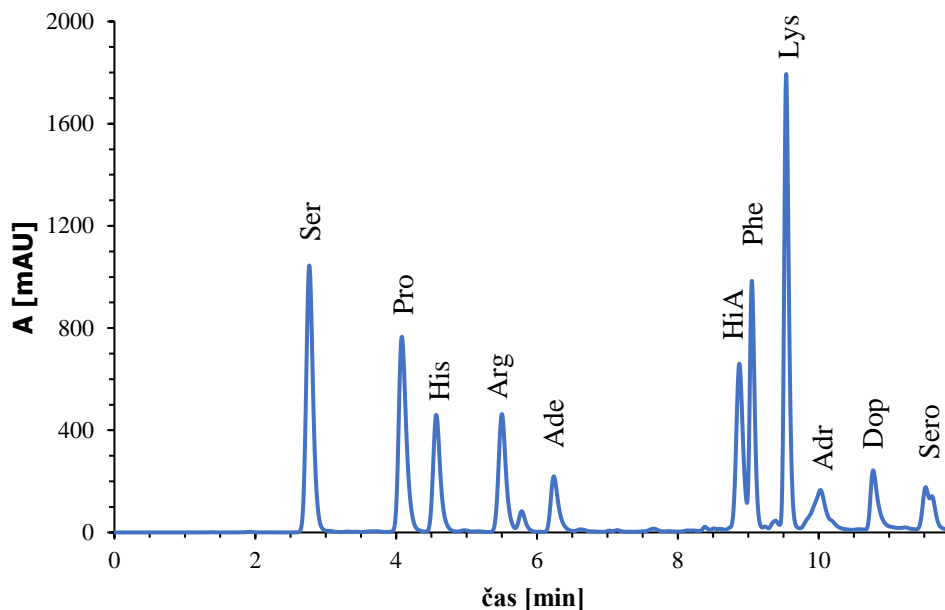
nezreagoval, a to zřejmě z důvodu kompetice o derivatizační činidlo, která v reakci probíhá (obrázek 12). Za stejných podmínek bylo analyzováno i samotné vhodně naředěné činidlo PITC, jehož záznam je uveden v příloze (Obrázek P1).



Obrázek 12 - Separace standardů po derivatizaci PITC

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 30 % B, 3 min – 60 % B, 9 min 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.
Pozn.: Ade = adenosin, HiA = histamin, ADR = adrenalin, Dop = dopamin, Sero = serotonin

Následně byl vytvořen směsný vzorek 11 standardů (Ser, Pro, His, Phe, Arg, Lys, HisA, Ade, ADR, Dop, Sero), které s PITC činidlem reagovaly, a tato směs byla podrobena derivatizaci podle postupu uvedeného v kapitole 2.3.2.1. Optimalizací chromatografických podmínek bylo docíleno separace sledovaných derivátů s rozlišením větším než jednotkovým (obrázek 13). V příloze na obrázku P2 je ukázka další z optimalizovaných separací.

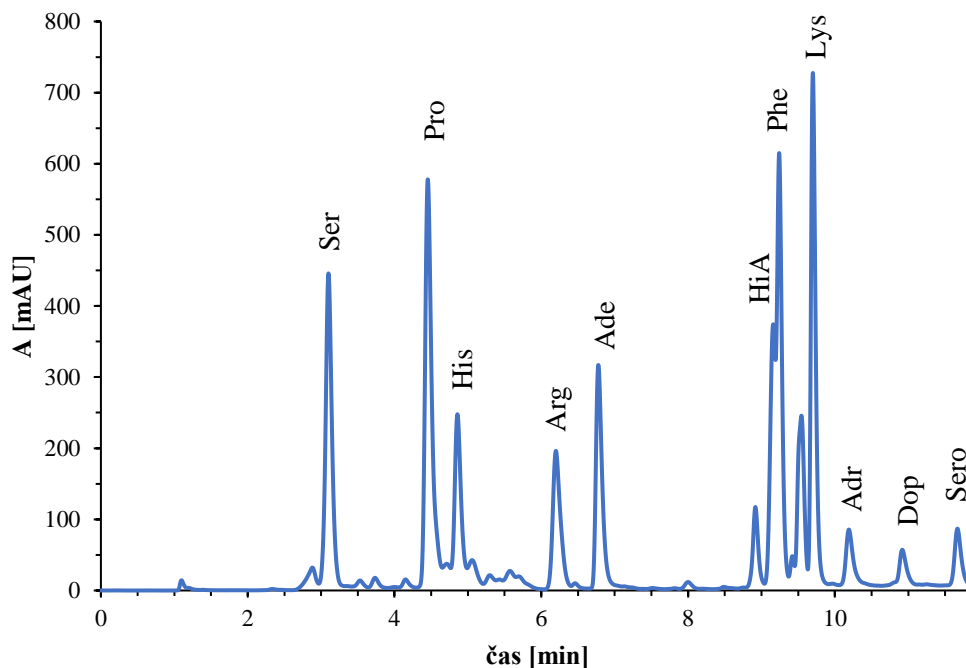


Obrázek 13 - Separace 11 standardů po derivatizaci PITC

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 14 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.

Pozn.: Ser = serin, Pro = prolin, His = histidin, Arg = arginin, Ade = adenosin, HiA = histamin, Phe = fenylalanin, Lys = lysin, Adr = adrenalin, Dop = dopamin, Sero = serotonin.

Výše zmíněné postupy lišící se pouze objemovými poměry komponent reakce jsou však časově zdlouhavé, a to především kvůli vkládání sušících mezikroků. Z tohoto důvodu byl testován upravený derivatizační postup bez sušících kroků. Do zkumavky bylo napipetováno 60 μ l každého standardu (Pro, Phe, Arg, His, Lys, Ser, HisA, Ade, Dop, Adr, Sero) a následně byl roztok vysušen pod proudem dusíku. Po vysušení byla sušina rozpuštěna ve 150 μ l H₂O, k čemuž bylo přidáno 25 μ l 1 M octanu sodného, 25 μ l TEA a závěrem 25 μ l PITC. Reakce probíhala na třepačce za laboratorní teploty po dobu 20 minut. Po proběhnutí reakce bylo k derivatizační směsi přidáno 150 μ l MetOH. Zfiltrovaná směs derivátů byla následně analyzována (obrázek 14). Při porovnání chromatografických záznamů analyzované směsi derivátů připravených se sušícími mezikroky (obrázek 13) a bez nich (obrázek 14) je patrné, že zjednodušená derivatizace proběhla u všech standardů, avšak vlivem matrice došlo k ovlivnění separace a došlo ke koeluci píku HiA a Phe a při použití kratší gradientové eluce (příloha obrázek P3) je pík Phe negativně ovlivněn neznámou nečistotou.



Obrázek 14 – Separace 11 standardů derivatizovaných PITC bez sušících kroků

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 14 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min, dávkování: 2 μ l; 254 nm.

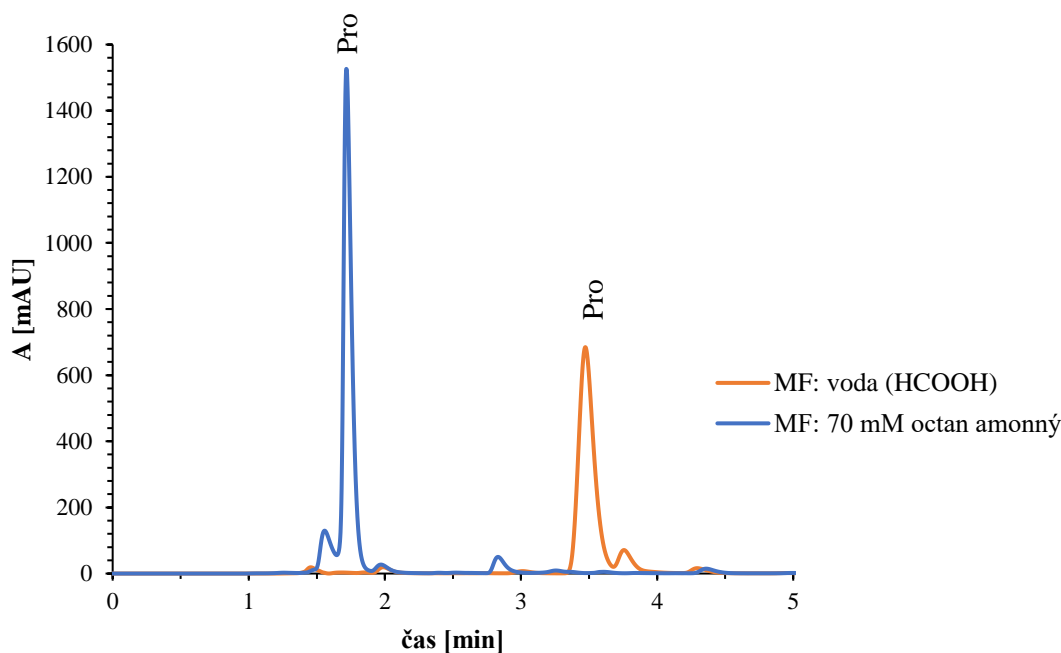
Pozn.: Ser = serin, Pro = prolin, His = histidin, Arg = arginin, Ade = adenosin, HiA = histamin, Phe = fenylalanin, Lys = lysin, Adr = adrenalin, Dop = dopamin, Sero = serotonin.

Pro ověření píků byly derivatizovány a následně analyzovány také standardy samostatně (Pro, Phe, Arg, His, Lys, Ser, HisA, Ade, Dop, Adr, Sero), navíc byly testovány také další zástupci BA a hydroxysloučenin (PheA, DETA, 1,7-DIA, Glu, Fen, Gal). Byl použit postup, kdy ke 100 μ l jednotlivých standardů bylo přidáno 50 μ l 1M octanu sodného, 50 μ l TEA a 50 μ l PITC. Derivatizační reakce probíhala 20 min při laboratorní teplotě a za neustálého třepání na třepače. Po proběhnutí reakce však objem zkumavky tvořil tři fáze, a po přidání 100 μ l MetOH došlo ke vzniku dvoufázového systému. Analyzována byla horní organická vrstva. Dle výsledných záznamů bylo ověřeno, že za těchto podmínek reagují AMK. Tento modifikovaný postup však nebyl úspěšný u BA a hydroxy sloučenin.

Na tyto standardy byly aplikovány další modifikace derivatizačních postupů zahrnujících především změny v objemech jednotlivých komponent reakce. Konkrétně byl testován vliv přidání polovičního množství TEA a PITC, přidání desetinného množství derivatizačního činidla PITC (5 μ l) s polovičním objemem dalších komponent v reakci (25 μ l) či zvýšení objemu standardu na 300 μ l. Všechny poměry se však kvůli vysokému pozadí jeví jako nevhodné. U zástupců hydroxysloučenin byla dále testována derivatizace za zvýšené

teploty, konkrétně za teploty 70 °C ve vodní lázni. Ani za těchto podmínek však derivatizace neproběhla.

Kromě octanu amonného (70 mM; pH = 6,55) jako mobilní fáze A byla také testována voda okyselená kyselinou mravenčí (pH = 2,46). Jak je z příloženého záznamu (obrázek 15) patrné, změna mobilní fáze silně ovlivňuje chromatografickou separaci, přičemž použití pufru značně snížilo retenci a šířku píku.



Obrázek 15 - Vliv mobilní fáze na separaci prolinu derivatizovaného PITC

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 °C; mobilní fáze A1: H₂O (HCOOH, pH 2,46) a B1: 100% ACN; mobilní fáze A2: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B2: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 30 % B, 8 min – 60 % B, 9 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.

Pozn.: Pro = prolin.

3.1.1 Reakce s PITC pro HPLC/MS

Pro HPLC/MS analýzu byl zvolen směsný vzorek 11 standardů (Pro, Phe, Arg, His, Lys, Ser, HisA, Ade, Dop, Adr, Sero), který byl připraven dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.2.1. Pro odstranění rušivých vlivů matrice byly deriváty extrahovány pomocí ethylacetátu. Po rozpuštění odparku derivátů pomocí MetOH následoval přídavek vody a přídavek ethylacetátu. Horní organická vrstva byla odebrána a vysušena pod proudem dusíku. K rozpuštění vyextrahovaných derivátů byl opět použit MetOH.

K analýze připraveného vzorku byly použity optimalizované chromatografické podmínky uvedené v kapitole 2.3.2.2.

Oproti spojení HPLC/UV musel být při spojení HPLC/MS snížen průtok mobilní fáze z 0,6 ml/min na 0,4 ml/min z důvodu snížení pracovního tlaku. Při tlaku nad 30 MPa docházelo k vymývání neznámých nečistot do hmotnostního spektrometru, což negativně ovlivňovalo odezvu. Pro separaci připravených derivátů byly porovnávány dva typy mobilní fáze a sledován jejich vliv na ionizaci vzniklých derivátů při záznamu kladných i záporných iontů.

První použitou mobilní fází (MF1) byla stejná směs jako u HPLC/UV stanovení (70 mM octan amonný s 60% ACN). Druhá mobilní fáze (MF2) byla zvolena na základě poznatků z literatury [63] a tvořila ji směs vody okyselené kyselinou mravenčí (0,05%) a 70% ACN.

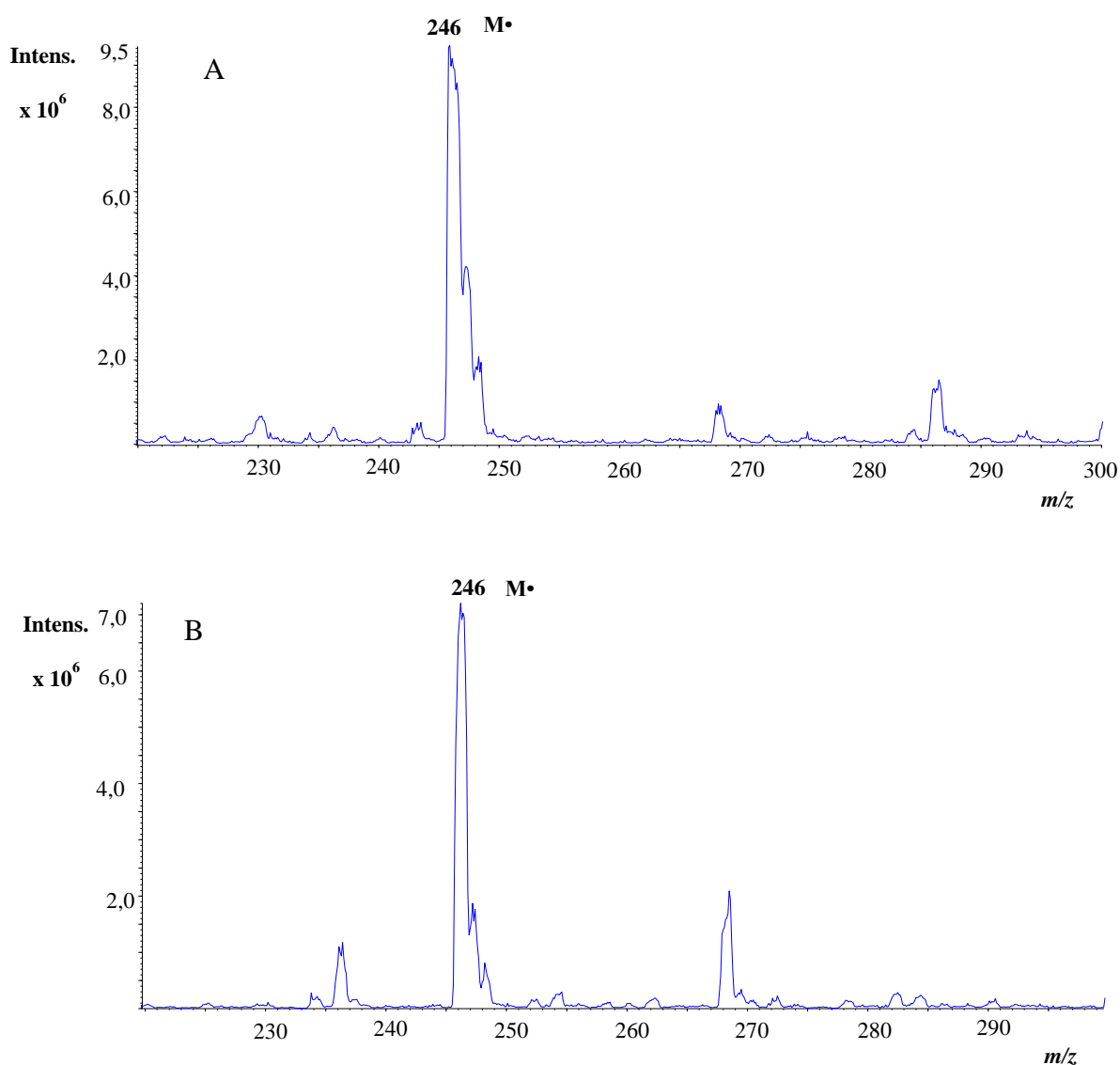
Derivatizační činidlo PITC o $M_r = 135$ g/mol reaguje s příslušnými látkami uvedenými v tabulce 2, za tvorby derivátů, jejichž M_r je též uvedená v tabulce.

Tabulka 2 – Souhrnné informace o separovaných látkách

Sloučenina	M_r [g/mol]	M_r derivátu [g/mol]
Adenosin	267	402
Adrenalin	183	318
Serotonin	176	311
Dopamin	153	288
Histidin	155	290
Serin	105	240
Lysin	146	281
Prolin	115	250
Histamin	111	246
fenylalanin	165	300
Arginin	174	309

Při použití MF1 byly pomocí MS detekovány téměř všechny deriváty s výjimkou derivátu serinu a adenosinu. Větší intenzita signálu byla pozorována při snímání kladných iontů. Zajímavostí je, že místo protonované molekuly byly ve spektru pozorovány radikály, které nejsou u ESI ionizace běžné. Při použití MF2 (0,05 % kyseliny mravenčí) jako mobilní fáze bylo v porovnání s MF1 (70 mM octan amonný) dosaženo vyšších signálů, jak lze vidět například u histaminu na obrázku 16, zároveň nedocházelo ke chvostování píků. Při porovnání záznamů při snímání kladných a záporných iontů bylo pozorováno „čistší“ spektrum, bez rušivých vlivů matrice při snímání záporných iontů, což je vidět na spektru argininu na obrázku

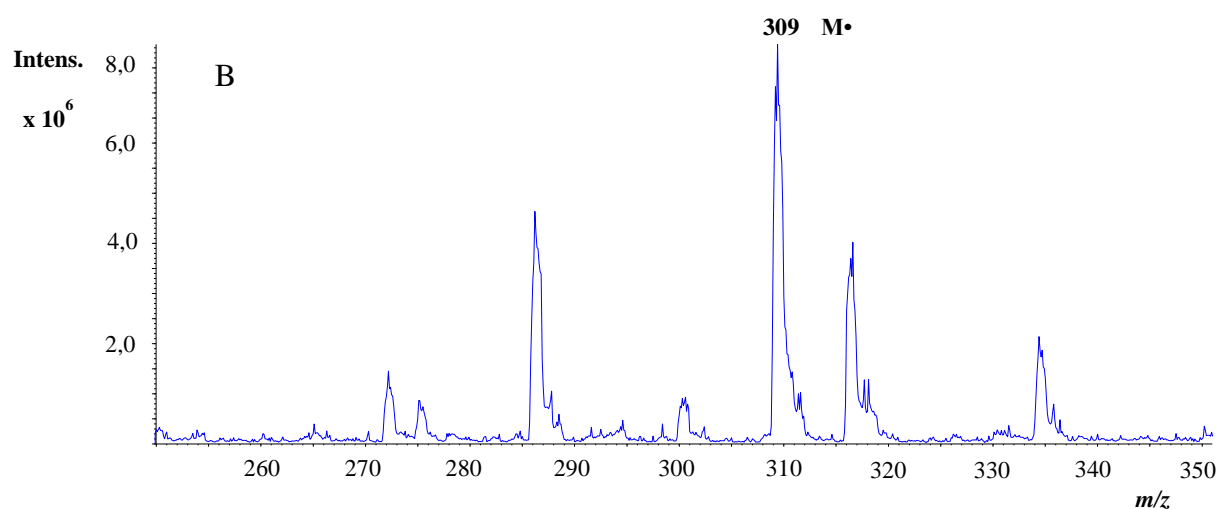
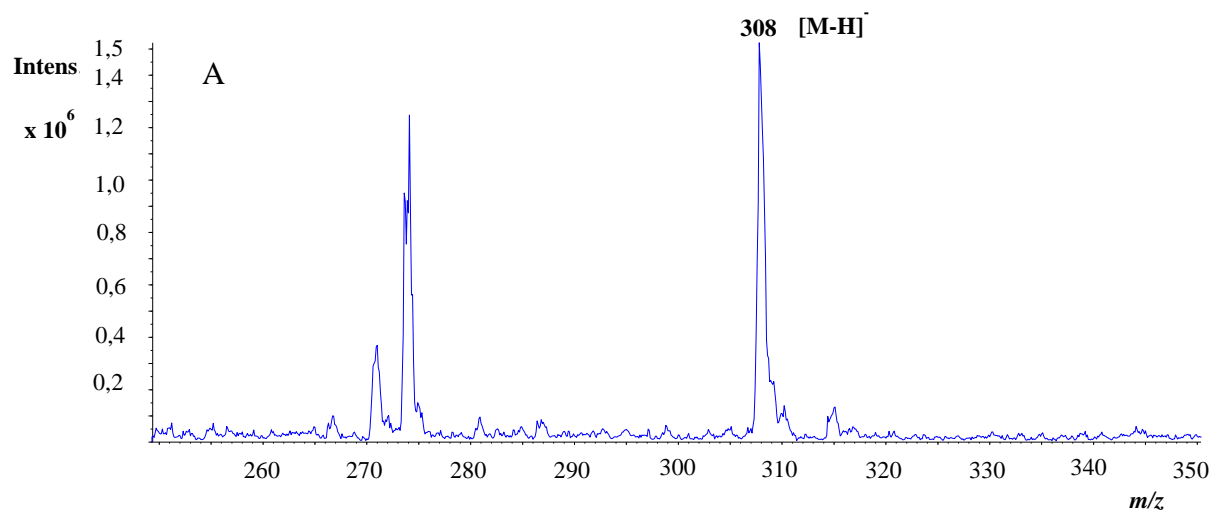
17, avšak intenzita iontů byla při snímání kladných iontů vyšší. Zajímavostí bylo spektrum dopaminu, kde při použití okyselené vody jako mobilní fáze byl pozorován široký pík molekulárního iontu (obrázek 18A), který v sobě zahrnoval jak radikál, tak protonovanou molekulu. Zároveň je pozorován ion s m/z o jednotku a dvě jednotky nižší. Pravděpodobně při ionizaci dochází k nějakým přesmykovým reakcím. Při změně mobilní fáze však k tomuto jevu nedocházelo a byl pozorován pouze radikál kation (obrázek 18B). V případě adenosinu byl ve spektru místo protonované molekuly či radikál kationtu pozorován ion o dvě jednotky nižší, což může být opět způsobeno přesmykem či zacyklením. Tato skutečnost však potvrzena prozatím nebyla. Pro ilustraci vlivu mobilní fáze a polarity vloženého napětí při hmotnostně spektrometrické detekci je v příloze na obrázku P4 uvedena ukázka hmotnostních spekter serotoninu.



Obrázek 16 - MS spektrum histaminu

Podmínky analýzy LC/MS: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 μ m); teplota 30 °C; gradient: 0 min – 10% B, 15 min - 100 % B; průtok 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm; ESI+

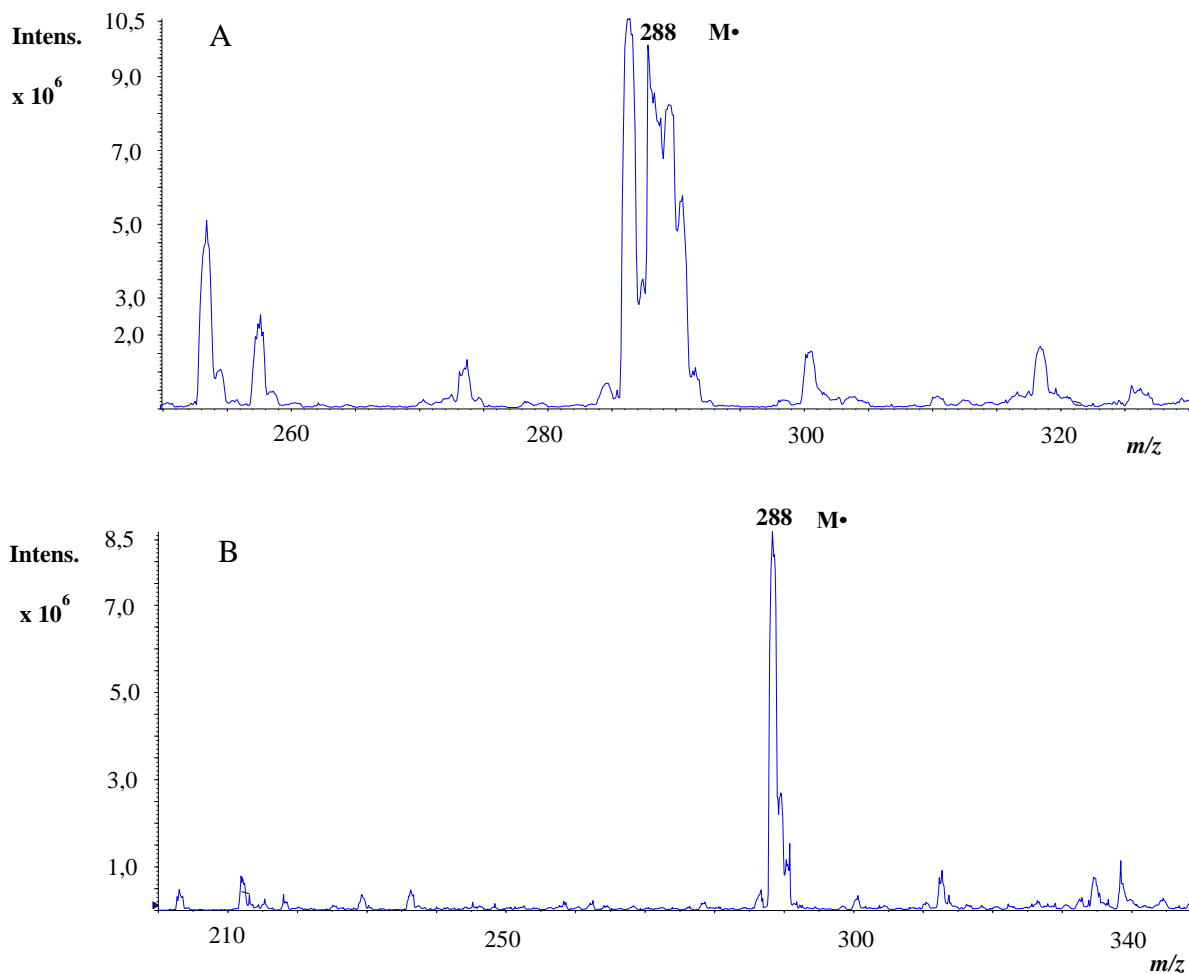
Pozn.: A) mobilní fáze A: 0,05% HCOOH; B = 70% ACN ve vodě; B) mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě



Obrázek 17 - MS spektrum argininu

Podmínky analýzy LC/MS: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 μ m); teplota 30 °C; mobilní fáze A: 0,05% HCOOH, B: 70% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 10% B, 15 min - 100 % B; průtok 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm

Pozn.: A) ESI-; B) ESI+

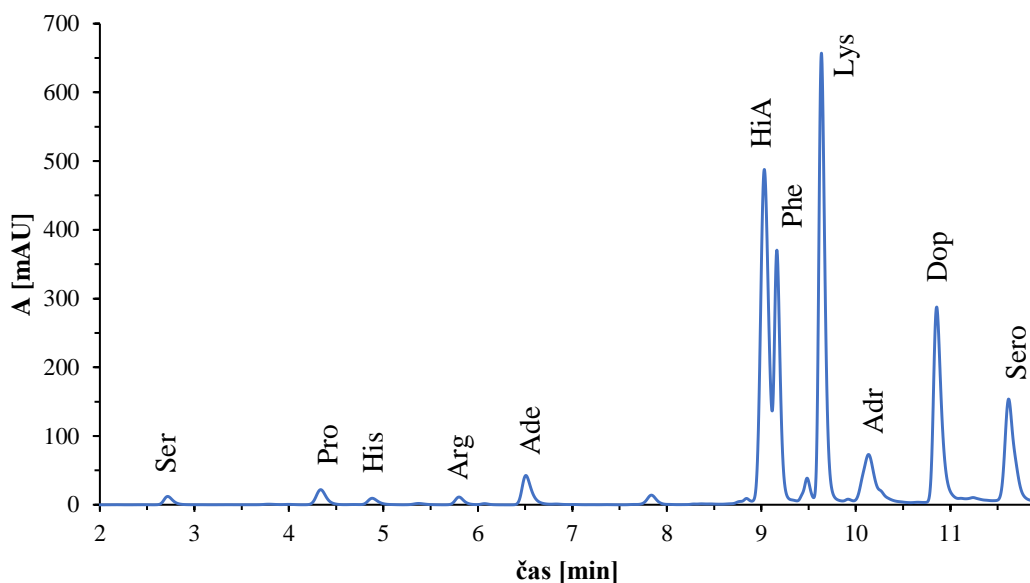


Obrázek 18 - MS spektrum dopaminu

Podmínky analýzy LC/MS: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 μ m); teplota 30 °C; gradient: 0 min – 10% B, 15 min - 100 % B; průtok 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm; ESI+

Pozn.: A) mobilní fáze A: 0,05% HCOOH, B: 70% ACN ve vodě; B) mobilní fáze A 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě

Směsný vzorek 11 standardů, při jehož přípravě byl použit extrakční krok, který byl analyzován pomocí HPLC/MS, byl za stejných podmínek proměřen pomocí HPLC/UV (obrázek 19). Jak je z obrázku patrné, extrakční účinnost pro většinu aminokyselin a adenosin byla velmi nízká ve srovnání s původním neextrahovaným vzorkem (obrázek 13).



Obrázek 19 – Separace 11 standardů derivatizovaných PITC po extrakci

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 14 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.

Pozn.: Ser = serin, Pro = prolin, His = histidin, Arg = arginin, Ade = adenosin, HiA = histamin, Phe = fenylalanin, Lys = lysin, Adr = adrenalin, Dop = dopamin, Sero = serotonin.

3.2 Derivatizace Bz-Cl

V rámci optimalizace derivatizace pomocí Bz-Cl byly testovány různé reakční postupy a poté různé chromatografické podmínky pro separaci vzniklých derivátů.

Pro optimalizaci derivatizace byl vybrán nejprve fenylalanin. Nejdříve byl jeho zásobní roztok ($c = 80$ mg/l) derivatizován Bz-Cl v zásaditém prostředí [85] po dobu 10 minut při laboratorní teplotě za třepání nebo pomocí ultrazvuku. Dle původní literatury byla reakce prováděna v silně zásaditém prostředí 30% NaOH, kromě tohoto roztoku byly pro zajištění zásaditého prostředí testovány další roztoky zásad o různé koncentraci (1 M NaOH; 0,5 M NaOH; 0,2 M NaOH; 7,5 % Na_2CO_3 ; 3,7 % Na_2CO_3 a 1% Na_2CO_3). Protože vzniklé deriváty měly být následně analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru bylo nutné optimalizovat i extrakci, aby se odstranil rušivý vliv matrice. Na základě poznatků z literatury [85] byl testován pentan a hexan. Po odpaření rozpouštědla byl derivát rozpuštěn ve vodě a analyzován na koloně Ascentis Express C18 (150 x 3 mm; 2,7 μ m) s využitím dvousložkové mobilní fáze voda/ACN.

Protože extrakce do pentanu a hexanu nebyla úspěšná a žádný derivát nebyl pozorovaný přistoupilo se k testování dalších extrakčních činidel. Kromě pentanu a hexanu, byl zvolen

toluen, ethylacetát, chloroform a diethylether. Po odebrání organické fáze, vysušení a přidání vody nedošlo u všech vzorků k očekávanému rozpuštění, ale ke tvorbě shluků a mléčného zakalení. Z tohoto důvodu byl ke vzorkům přidán podíl ACN. Po HPLC analýze opět nebyl pozorován žádný pík odpovídající Bz-Cl derivátu, pouze hydrolyzní produkt reakce (kyselina benzoová). Pro potvrzení, že derivát nekoeluuje s hydrolyzním produktem, byly testovány různé stacionární a mobilní fáze a různé profily gradientové eluce. I přes všechnu snahu nebyl pozorován žádný pík derivátu. Protože nebylo jasné, zda je problém v extrakci nebo samotné derivatizaci, byla provedena derivatizace dalších vybraných aminokyselin (Ser, Pro, His) a derivát byl analyzován z původní derivatizační směsi bez extrakce. Jednotlivé derivatizační směsi byly proměřeny na koloně Zorbax SB-Aq (3 x 150 mm; 3,5 μm), která při testování různých chromatografických podmínek poskytovala lepší rozlišení. Z chromatogramů však opět nebylo možné s přesností určit, zda derivatizace aminokyselin proběhla. Proto byla provedena extrakce těchto vzorků a extrakty byly proměřeny přímou infuzí pomocí hmotnostního spektrometru. V hmotnostních spektrech nebyl pozorován žádný derivát, proto lze s jistotou říct, že se potencionální derivát nepodařilo vyextrahovat. Otázkou však zůstává, jestli daná reakce proběhla.

Jelikož během derivatizačních reakcí docházelo ke tvorbě velkého množství hydrolyzních produktů, které negativně ovlivňují interpretaci chromatografických záznamů a narušují kvantitativní průběh reakce, byla provedena zkouška hydrolyzy činidla. Hydrolyza činidla byla testována v prostředí roztoků všech použitých zásad (1 M NaOH, 0,5 M NaOH, 0,2 M NaOH, 7,5 % Na₂CO₃, 3,5 % Na₂CO₃, 1 % Na₂CO₃) a navíc v pyridinu a TEA [36; 48]. Hydrolyza činidla byla nejmenší v prostředí pyridinu a TEA, proto se dále při optimalizaci používala tato činidla.

Na základě původního Schotten–Baumannova postupu [36] se extrakční činidlo účastní přímo reakce, je tedy přítomné v reakční směsi. Proto se v optimalizaci pokračovalo tímto způsobem. Pro testování byl použit serin a jako extrakční činidlo byl použit chloroform, ethylacetát nebo diethylether. Pro udržení zásaditého prostředí byl využit pyridin a TEA, kde nedochází k tak velké hydrolyze Bz-Cl. Reakce probíhala 30 min za neustálého míchání při laboratorní teplotě. Pro usnadnění extrakce vzniklých derivátů, které se v zásaditém prostředí vyskytují jako soli, byla následně reakční směs okyselena pomocí HCl. Podíl organické fáze byl vždy odebrán, vysušen a následně rozpuštěn v 50% ACN. Po porovnání všech záznamů opět nebylo zřejmé, zda reakce či následná extrakce proběhla. Stejný postup byl aplikován také na další zástupce AMK, BA a hydroxysloučenin, ale dle HPLC/UV záznamů nebylo možné určit píky derivátů. Proto byly vybrané vzorky analyzovány s využitím MS

přímou infuzí, kdy bylo zjištěno, že Bz-Cl zreagoval pouze s BA. Nebylo nám však jasné, proč derivát nelze pozorovat i s využitím HPLC/UV, i když ve své molekule obsahuje chromofor.

Dále byla práce zaměřena na derivatizaci BA, u kterých byly pozorovány první úspěšné výsledky. Derivatizace a extrakce AMK je vlivem tvorby solí v zásaditém prostředí velmi komplikovaná. Pro derivatizaci dalších zástupců BA byl vybrán pyridin jako prostředí a ethylacetát jako extrakčního činidla. Na HPLC/UV chromatogramech však opět nebyl patrný žádný pík derivátu.

Po spoustě dalších pokusů a konzultací s odborníky v oboru byl nakonec na vybrané standardy AMK, BA a hydroxysloučenin (PheA, DETA, 1,7-DIA, Fen, Glu, Gal, Phe, Pro, Lys) aplikován následující postup uvedený v kapitole 2.3.3.1. 50 μ l zásobního roztoku standardu bylo vysušeno a přidáno 25 μ l 100% ACN, 60 μ l pyridinu a směs byla důkladně promíchána. Dále bylo přidáno 30 μ l Bz-Cl a směs se nechala reagovat 1 hodinu za neustálého třepání. Derivát byl ze směsi extrahován různými extrakčními činidly. Jedním byla směs MetOH a chloroformu v poměru 1:2 a druhým extrakčním činidlem byl ethylacetát. Testovaný byl i přídatek 1 M uhličitanu amonného. Následně byla odebrána organická fáze (500 μ l), která byla odpařena a následně rozpuštěna v MetOH nebo v kombinaci s chloroformem v poměru 1:1. Některé vzorky byly před analýzou vhodně naředěny.

Výsledné extrakty byly analyzovány s využitím spojení HPLC/UV/MS (kapitola 2.3.3.2) pomocí mobilní fáze složené ze směsi vody okyselené kyselinou mravenčí (pH 2,46) a ACN [9; 36]. Z HPLC/MS chromatogramů bylo patrné, že rozpouštění derivátů ve směsi MetOH:chloroform je pro chromatografickou analýzu nevhodné z důvodu chvostování píků, proto byl dále pro rozpouštění používán pouze čistý MetOH. Při porovnání záznamů pro jednotlivé extrakty bylo zajímavé, že s využitím spektrofotometrického detektoru byly všechny chromatogramy po extrakci ethylacetátem shodné pro všechny deriváty a stejně tak po extrakci směsí MetOH a chloroformu. Ani jedna z pozorovaných látek však neodpovídala sledovanému derivátu. Zajímavostí je, že při porovnání záznamů s využitím různých extrakčních činidel už záznamy stejné nebyly. Do jednotlivých rozpouštědel přecházely jiné látky z derivatizační směsi. Jelikož spektrofotometrická detekce se zdá být pro monitorování derivátů nevhodná, ačkoli by deriváty na základě jejich struktury měly absorbovat v UV/VIS oblasti, byly sestrojeny rekonstruované iontové chromatogramy pro jednotlivé deriváty. Po rekonstrukci chromatogramů bylo zjištěno, že některá extrakční směs obsahuje cílový derivát, ale neposkytuje signál při UV/VIS detekci. Pomocí hmotnostního spektrometru byla potvrzena přítomnost všech derivátů až na prolin a fenol. V případě glukosy (obrázek 20) byla situace velmi komplikovaná, po sejmutí spektra v době eluce derivátů byla sice pozorována

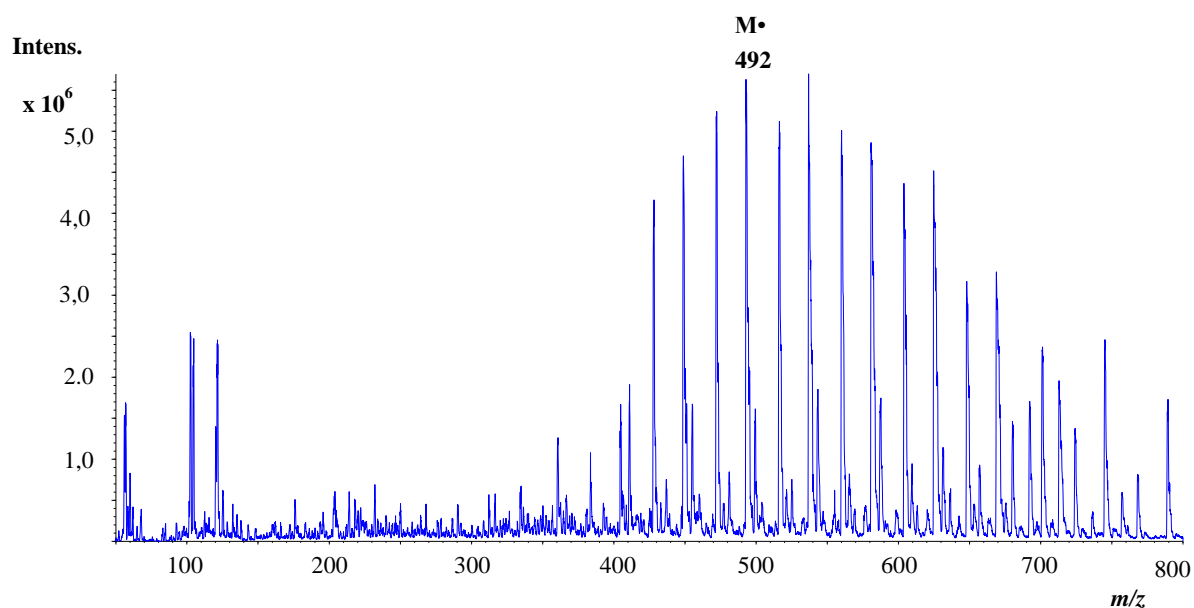
protonovaná molekula derivátů, ale zároveň velké množství velmi intenzivních iontů. Prozatím není jisté, z jakého důvodu k tomuto jevu došlo. Je možné, že vzhledem ke složité struktuře glukosy dochází k reakci na různých hydroxy skupinách a pak k tvorbě různých fragmentů nebo aduktů.

Extrakční účinnost ethylacetátu a MetOH s chloroformem byla u všech derivátů víceméně podobná. V rámci porovnání těchto činidel nejde jednoznačně určit, které z extrakčních činidel je vhodnější pro všechny deriváty. Každý z derivátů preferoval jiný typ extrakce. Pro potvrzení určení molekulové hmotnosti daného derivátu byly MS záznamy pořízené při snímání kladných i záporných iontů. Při snímání kladných iontů byla intenzita derivátů vyšší, avšak pozoruhodné je, že většinou byl pozorován radikál kation místo očekávané protonované molekuly, což pro ESI není běžné. Dále byly pozorovány adukty s amonným, sodným či draselným iontem. Pro podpoření ionizace byla vyzkoušena další mobilní fáze, kde okyselená voda byla nahrazena 10 mM mravenčanem amonným [8]. Bylo zjištěno, že použití pufru během separace ovlivňuje, respektive zvyšuje, ionizaci pouze u některých látek. Například u kyseliny gallové dochází ke zvýšení intenzity aduktu s amonným iontem (obrázek 21). Závěrem lze konstatovat, že nelze určit jednotnou metodu pro všechny stanovované látky, jelikož každá vyžaduje jiné extrakční, separační i ionizační podmínky.

V tabulce 3 jsou uvedeny souhrnné informace o jednotlivých standardech a o pozorovaných iontech v MS spektrech po reakci s Bz-Cl (140 g/mol).

Tabulka 3 - Souhrnné informace o derivatizovaných standardech

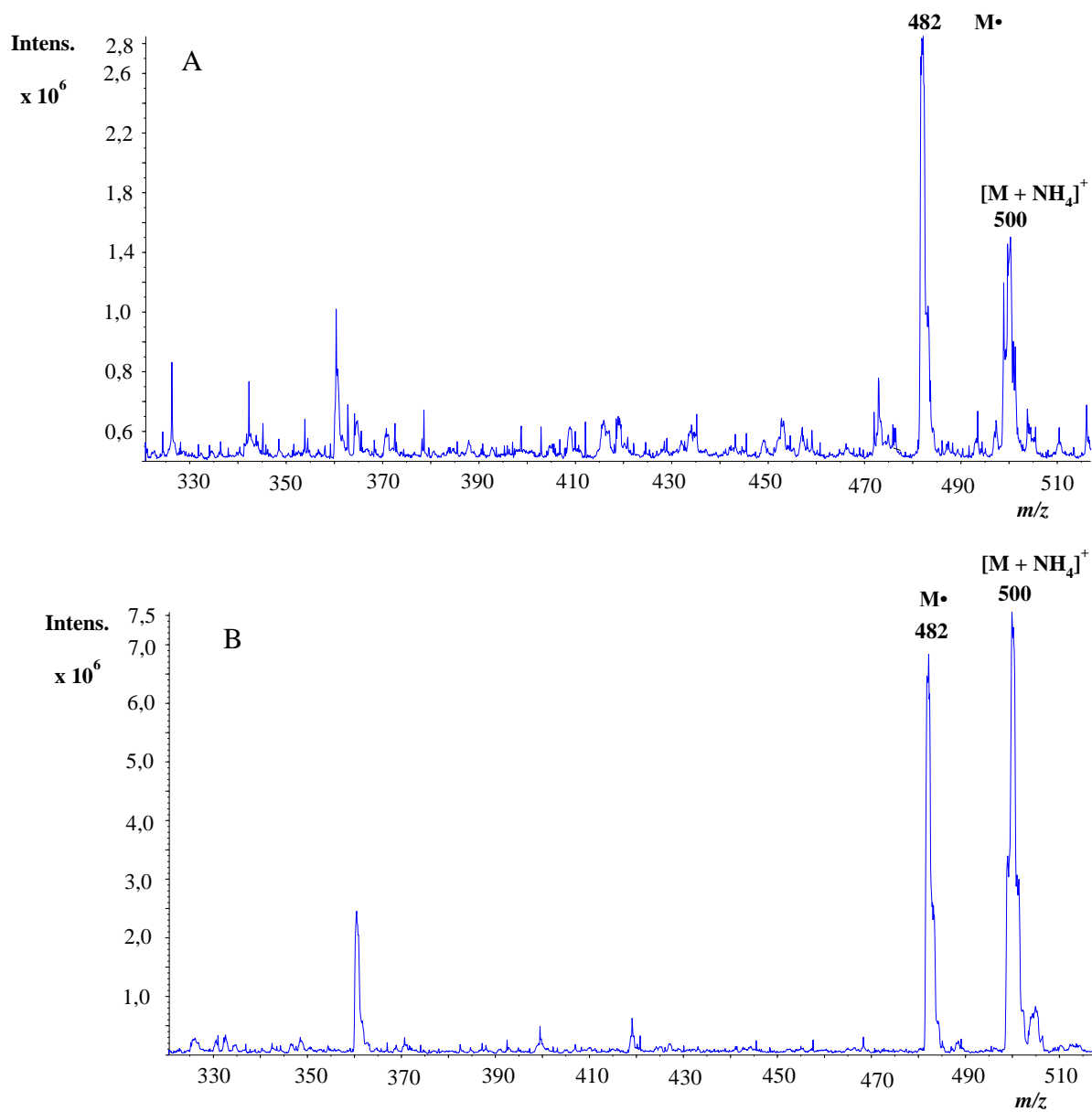
Sloučenina	M_r [g/mol]	Počet benzoylací	M_r derivátu [g/mol]
Fenylalanin	165	1 x	269
Lysin	146	2 x	354
Fenethylamin	121	1 x	225
		2 x	329
Diethylamin	73	1 x	177
1,7-diaminoheptan	130	1 x	234
		2 x	338
		3 x	443
Kys. gallová	170	3 x	482
Glukosa	180	1 x	284
		2 x	388
		3 x	492



Obrázek 20 – MS spektrum glukosy

Podmínky analýzy LC/MS: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 μ m); teplota 30 °C; mobilní fáze A: redestilovaná voda okyselená HCOOH (pH = 2,46), B: 100% ACN; gradient: 0 min – 5% B, 15 min - 100 % B; průtok 0,4 ml/min, dávkování: 2 μ l, 237 nm, CUR: 20 psi, IS: 4500 V, TEM: 400 °C, GS1: 40 psi, GS2: 50 psi, DP: 90 V, EP: 10 V, ESI+

Pozn.: extrakce ethylacetátem



Obrázek 21 - MS spektrum kys. gallové

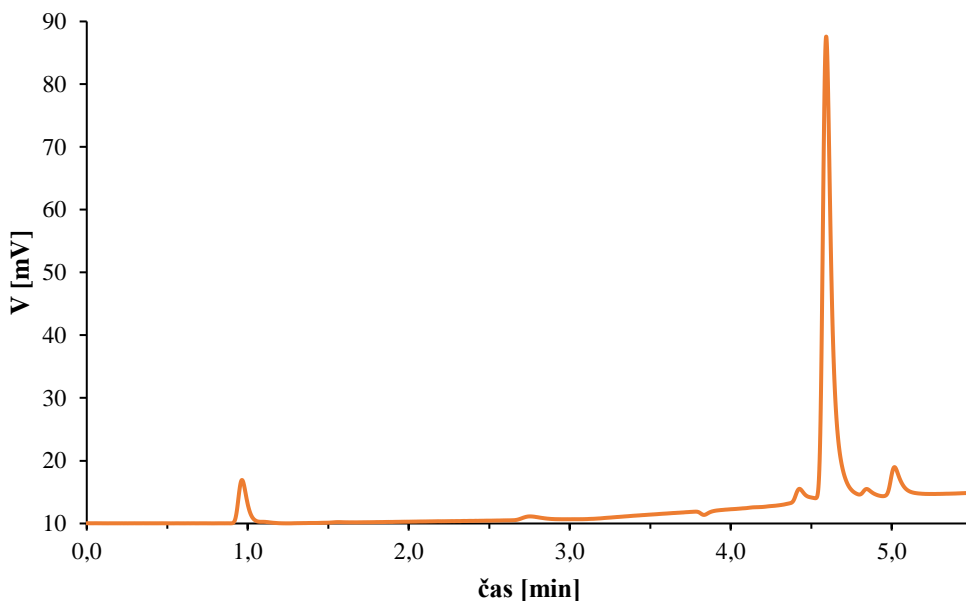
Podmínky analýzy LC/MS: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 μ m); teplota 30 °C; mobilní fáze B: 100% ACN; gradient: 0 min – 5% B, 15 min - 100 % B; průtok 0,4 ml/min, dávkování: 2 μ l, 237 nm, CUR: 20 psi, IS: 4500 V, TEM: 400 °C, GS1: 40 psi, GS2: 50 psi, DP: 90 V, EP: 10 V, ESI+

Pozn.: extrakce MetOH s chloroformem, A) mobilní fáze A: redistilovaná voda okyselená HCOOH (pH = 2,46), B) 10 mM mravenčan amonný

3.3 Další derivatizační činidla

3.3.1 Derivatizace Dns-Cl

Protože dansylderiváty fluoreskují, probíhala jejich separace na kapalinovém chromatografu, jehož součástí byl i fluorescenční detektor. Nejdříve bylo změřeno samotné derivatizační činidlo, kdy byl zásobní roztok o $c = 1 \text{ g/l}$ v ACN 300 x naředěn. Výsledný záznam je na obrázku 23.



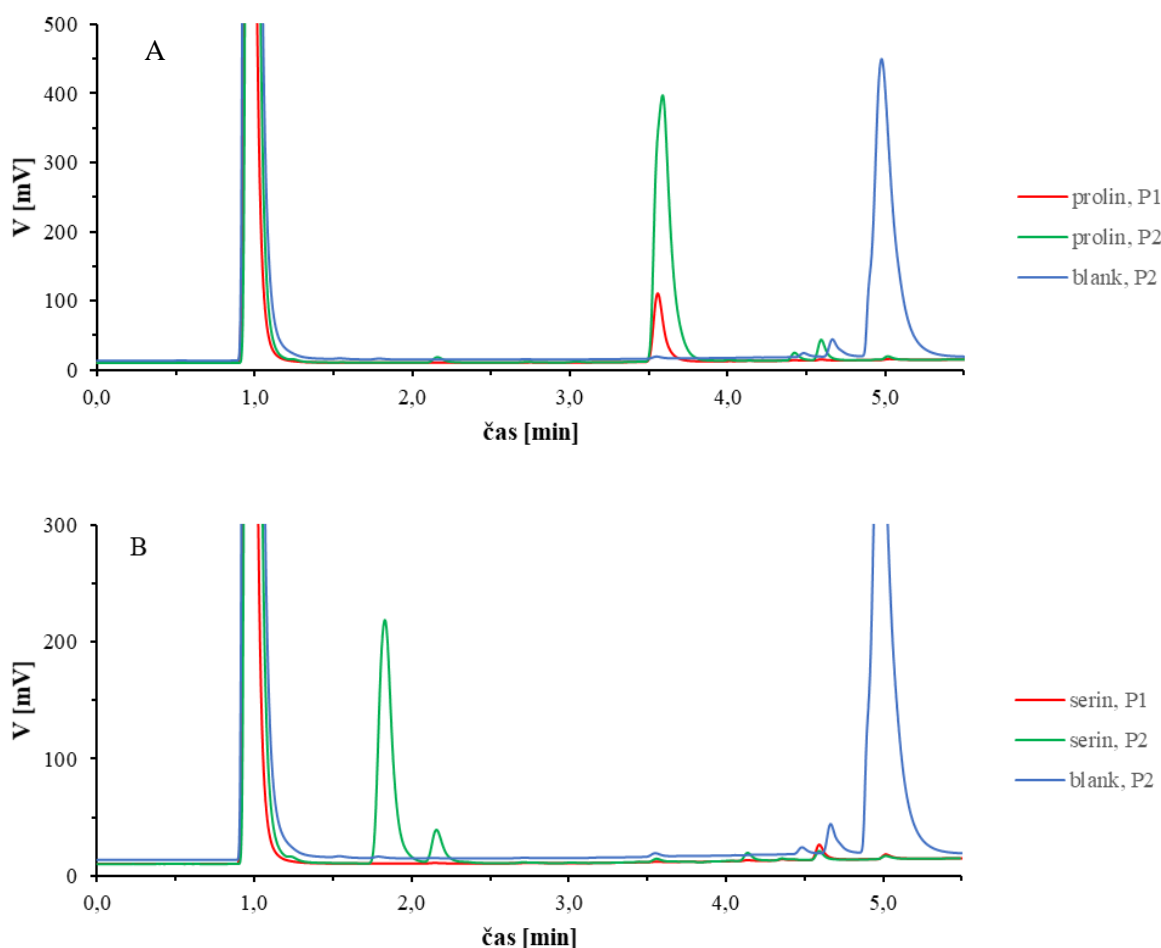
Obrázek 22 - Činidlo Dns-Cl, 300x ředěné

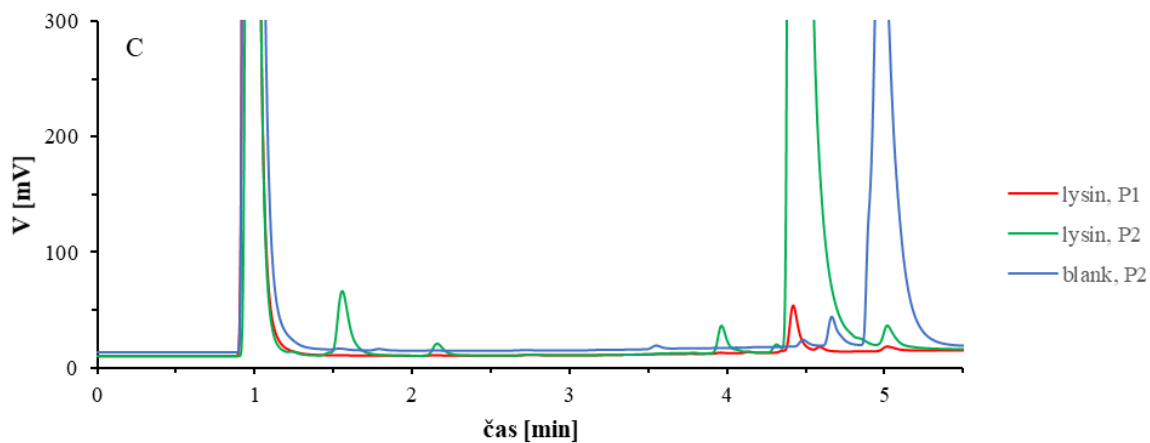
Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μm); teplota 30 $^{\circ}\text{C}$; mobilní fáze A: redestilovaná voda okyselená HCOOH (pH 2,46), B: 100% ACN; gradient: 0 min – 25 % B, 2 min – 35 % B, 4 min – 80 % B, 5 min – 100 % B; průtok 0,8 ml/min, dávkování: 2 μl ; $\lambda_{\text{ex}} = 264$, $\lambda_{\text{em}} = 497$

Postup derivatizace převzatý z literatury [54] byl nejprve testován pomocí vybraných standardů BA (DETA, PheA, 1,7-DIA). Vždy 1 ml standardu ($c = 5 \text{ g/l}$) byl smíchán se 150 μl 2M NaOH a 300 μl nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po promíchání byl ke směsi přidán 1 ml Dns-Cl činidla ($c = 1 \text{ g/l}$). Reakce probíhala 60 min na vodní lázni při teplotě 50 $^{\circ}\text{C}$ a za nepřístupu světla. Narozdíl od postupu uvedeného v literatuře byl do postupu přípravy vzorku zahrnut také extrakční krok. Porovnávány byly extrakce dvěma různými extrakčními rozpouštědly, a to ethylacetátem a chloroformem. Ke zreagované směsi byly vždy napipetovány 3 ml extrakčního rozpouštědla a obsah vialky byl třepán po dobu 10 minut. Dále byla vždy organická fáze odebrána, vysušena, a nakonec rozpuštěna v 500 μl ACN. Odezva pro jednotlivé deriváty byla srovnatelná v obou extraktech. Pro další experimenty byl však vybrán ethylacetát, se kterým je lepší manipulace.

Stejný postup (P1), ovšem s nižší počáteční koncentrací standardního roztoku (1 g/l), byl aplikován na následující standardy: PheA, DETA, 1,7-DIA, Lys, Pro, Ser, Glu, Fen a Gal. Po reakci následovala extrakce do ethylacetátu. Pro porovnání byl na stejnou směs standardů aplikován další zjednodušený, modifikovaný postup (P2) dle literatury [84]. Do Eppendorfovy zkumavky bylo nejprve naváženo 10 mg uhličitanu lithného a následně byl pipetován 1 ml standardního roztoku a 0,5 ml činidla Dns-Cl ($c = 0,02 \text{ M}$ v ACN). Reakce probíhala při laboratorní teplotě pouze 5 minut za neustálého třepání a za nepřístupu světla.

Pro ukázkou jsou zobrazeny výsledky reakcí Dns-Cl s AMK (obrázek 24) a hydroxyloučeninami (obrázek 25). Píky v retenčním čase 1 min a 5 min náleží hydrolyzním produktům reakce. Dle záznamů lze říct, že Dns-Cl pravděpodobně zreagoval s prolinem, serinem a kys. gallovou, a to jednodušším a časově méně náročným postupem (P2), avšak bez zařazení extrakčního kroku. Z důvodu poruchy přístrojového vybavení však nebylo možné dále v ověřování a optimalizaci metody pokračovat.

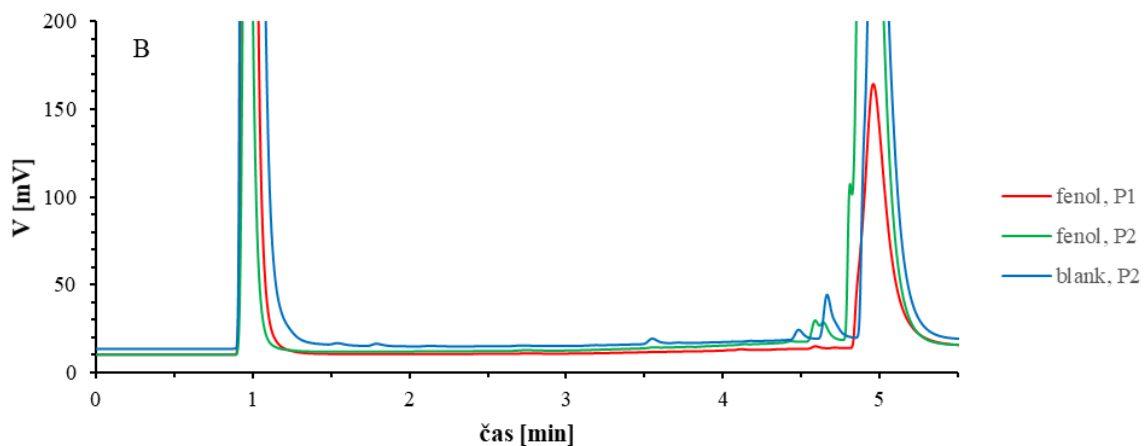
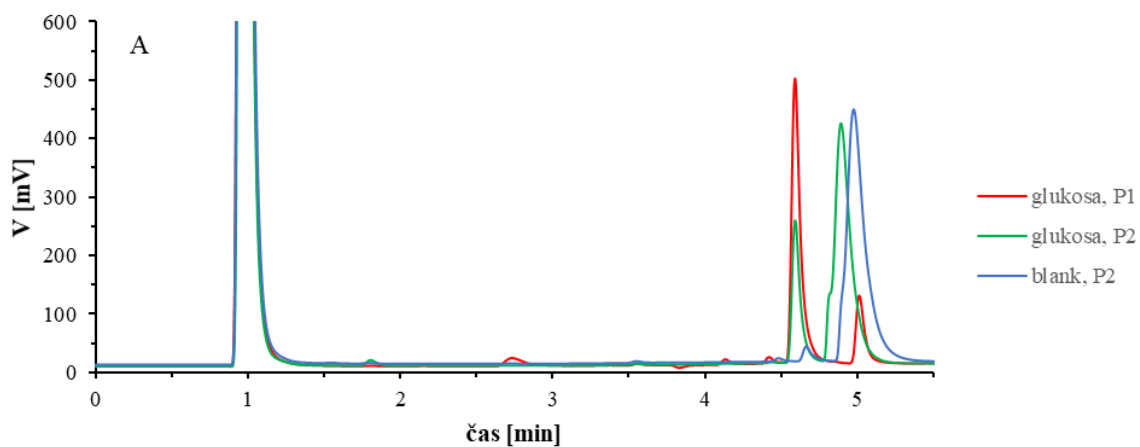


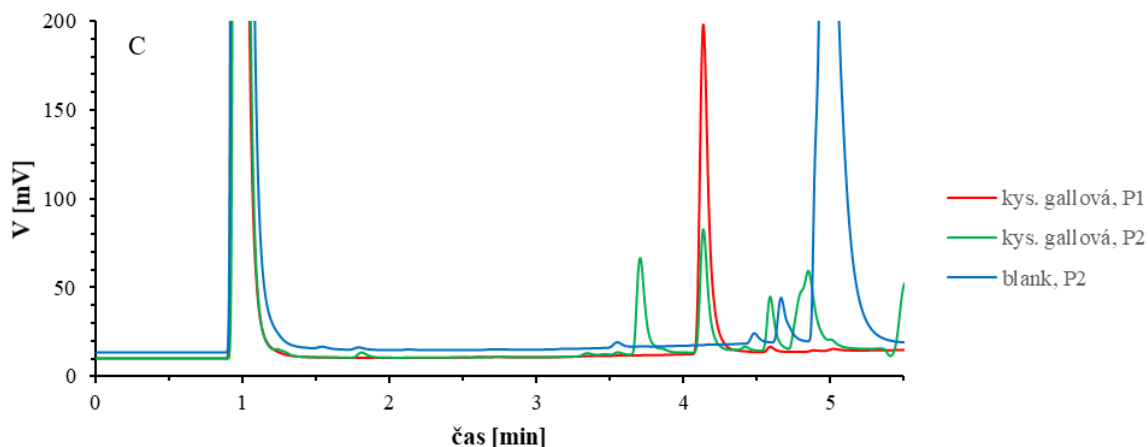


Obrázek 23 – Reakce Dns-Cl s AMK různými derivatizačními postupy

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; mobilní fáze A: redestilovaná voda okyselená HCOOH (pH 2,46); B: 100% ACN; gradient: 0 min – 25 % B, 2 min – 35 % B, 4 min – 80 % B, 5 min – 100 % B; průtok 0,8 ml/min; dávkování: 2 μ l; λ_{ex} = 264, λ_{em} = 497

Pozn.: derivatizační postup 1 (P1), derivatizační postup 2 (P2); A) prolin, B) serin, C) lysin





Obrázek 24 – Reakce Dns-Cl s hydroxysloučeninami různými derivatizačními postupy

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 °C; mobilní fáze A: redestilovaná voda okyselená HCOOH (pH 2,46); B: 100% ACN; gradient: 0 min – 25 % B, 2 min – 35 % B, 4 min – 80 % B, 5 min – 100 % B; průtok 0,8 ml/min; dávkování: 2 μ l; $\lambda_{\text{ex}} = 264$, $\lambda_{\text{em}} = 497$

Pozn.: derivatizační postup 1 (P1), derivatizační postup 2 (P2), A) glukosa, B) fenol, C) kys. gallová

3.3.2 Derivatizace PIC

Standardní roztok glukosy a kyseliny gallové byl derivatizován také činidlem PIC dle následujícího upraveného postupu [61], který zahrnoval reakci 100 μ l standardu vysušeného pod proudem dusíku s 200 μ l TEA a 200 μ l PIC. Avšak ani tento postup nebyl pro zvolené standardy vhodný a derivát nebyl pozorován.

Z časových důvodů již v dalších experimentech nebylo pokračováno.

4 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo najít vhodné derivatizační činidlo schopné reagovat s látkami, které se běžně vyskytují v biologických vzorcích a obsahují ve své struktuře aminovou nebo hydroxylovou funkční skupinu. Testována byla celkem tři různá derivatizační činidla, přičemž byla optimalizována jak samotná derivatizační reakce, tak i následná extrakce a separace derivátů.

Jedním z činidel použitých ke kvalitativnímu stanovení zástupců AMK, BA a hydroxysloučenin bylo činidlo Bz-Cl, jež velmi ochotně reagovalo s BA. V případě vybraných AMK a hydroxy sloučenin, reakce ne vždy proběhla. I když dle struktury by benzoyl deriváty měly absorbovat v UV/VIS oblasti, jevila se spektrofotometrická detekce jako nevhodná a deriváty byly detekovány pouze pomocí hmotnostní spektrometrie.

Dále bylo zvoleno činidlo PITC, které dobře reagovalo s AMK, BA a hormony. I když původní derivatizační postup je kvůli zařazení sušících mezikroků zdlouhavý, během optimalizace se ukázalo, že sušení není nutné. PITC deriváty byly z derivatizační směsi extrahovány ethylacetátem a jejich separace a detekce proběhla pomocí systému HPLC/MS.

Posledním z testovaných derivatizačních činidel byl Dns-Cl. Derivatizace byla provedena pomocí dvou odlišných postupů, které se lišily především časem reakce. Experiment však musel být přerušen z důvodu poruchy přístroje, proto nemohlo být ověřeno, zda derivatizace probíhá či ne.

Diplomová práce není dokončena v plném rozsahu, a to z důvodu poruch přístrojového vybavení a mimořádné situace vyhlášené vládou ČR. Diplomová práce však může sloužit jako pilotní studie pro další práce.

5 SEZNAM LITERATURY

- [1] MUSILOVÁ, Jindra a Zdeněk GLATZ. Metabolomika - základní pojmy, strategie a metodologie. *Chem. Listy* [online]. 2011, , 745-751 [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/download/1039/1039/>
- [2] TARKOWSKI, Petr. *Úvod do metabolomiky* [online]. [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/10.%20Metabolomika.pdf>
- [3] NEWGARD, Christopher. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand?. *Cell Metabolism* [online]. 2017, 25(1), 43-56 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.09.018. ISSN 15504131. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413116305034>
- [4] ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B., F. PRIEGO-CAPOTE a M.D. LUQUE DE CASTRO. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2010, 29(2), 111-119 [cit. 2020-01-12]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.12.003. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993609002891>
- [5] KAUSHIK, Akash a Ralph DEBERARDINIS. Applications of metabolomics to study cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2018, 1870(1), 2-14 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.bbcan.2018.04.009. ISSN 0304419X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X18300507>
- [6] ISSAQ, Haleem, Stephen FOX, King CHAN a Timothy VEENSTRA. Global proteomics and metabolomics in cancer biomarker discovery. *Journal of Separation Science* [online]. 2011, 34(24), 3484-3492 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1002/jssc.201100528. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201100528>
- [7] GRINIAS, J. Using benzoyl chloride derivatization to improve small-molecule analysis in biological samples by LC-MS/MS. *LC GC North America* [online]. 2017, 35(10), 760-768 [cit. 2019-12-17]. ISSN 1527-5949.
- [8] WONG, Jenny-Marie, Paige MALEC, Omar MABROUK, Jennifer RO, Monica DUS a Robert KENNEDY. Benzoyl chloride derivatization with liquid chromatography–mass spectrometry for targeted metabolomics of neurochemicals in biological samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, 1446, 78-90 [cit. 2019-10-17]. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.006. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967316304095>

- [9] FLESZAR, Mariusz, Jerzy WIŚNIEWSKI, Małgorzata KRZYTEK-KORPACKA, Błażej MISIAK, Dorota FRYDECKA, Joanna PIECHOWICZ, Katarzyna LORENC-KUKUŁA a Andrzej GAMIAN. Quantitative Analysis of l-Arginine, Dimethylated Arginine Derivatives, l-Citrulline, and Dimethylamine in Human Serum Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometric Method. *Chromatographia* [online]. 2018, 81(6), 911-921 [cit. 2019-11-18]. DOI: 10.1007/s10337-018-3520-6. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-018-3520-6>
- [10] PEREZ, Marta, Victor LADERO, Begoña REDRUELLO et al. Mastitis Modifies the Biogenic Amines Profile in Human Milk, with Significant Changes in the Presence of Histamine, Putrescine and Spermine. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(9) [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1371/journal.pone.0162426. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162426>
- [11] MAO, Hui-ming, Bing-guan CHEN, Xian-ming QIAN a Zhongmin LIU. Simultaneous determination of twelve biogenic amines in serum by high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal* [online]. 2009, 91(2), 176-180 [cit. 2019-11-18]. DOI: 10.1016/j.microc.2008.10.005. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X08001318>
- [12] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [13] KORECKÁ, Lucie, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ a Alexander ČEGAN. *Obecná biochemie: pro speciální chemicko-biologické obory*. První vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-470-3.
- [14] KODÍČEK, Milan. Biochemické pojmy: výkladový slovník. *VŠCHT PRAHA* [online]. VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002/
- [15] VISSER, Wouter, Nanda VERHOEVEN-DUIF, Roel OPHOFF, Steven BAKKER, Leo KLOMP, Ruud BERGER a Tom DE KONING. A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based method for the quantification of d-amino acids in body fluids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, 1218(40), 7130-7136 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.07.087. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311011265>
- [16] YANG, Ye, Teresa FAN, Andrew LANE a Richard HIGASHI. Chloroformate derivatization for tracing the fate of Amino acids in cells and tissues by multiple stable isotope resolved metabolomics (mSIRM). *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, 976, 63-73 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1016/j.aca.2017.04.014. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267017304579>
- [17] TŮMA, Petr a Jan GOJDA. Rapid determination of branched chain amino acids in human blood plasma by pressure-assisted capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2015, 36(16), 1969-1975 [cit.

- 2020-01-16]. DOI: 10.1002/elps.201400585. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201400585>
- [18] FORTESCHI, Mauro, Salvatore SOTGIA, Stefano ASSARETTI, Dionigia ARRU, Debora CAMBEDDA, Elisabetta SOTGIU, Angelo ZINELLU a Ciriaco CARRU. Simultaneous determination of aromatic amino acids in human blood plasma by capillary electrophoresis with UV-absorption detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2015, 38(10), 1794-1799 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1002/jssc.201500038. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201500038>
- [19] DADÁKOVÁ, Eva, Martin KRÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry* [online]. 2009, 116(1), 365-370 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609002040>
- [20] MALE, Keith a John LUONG. Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, 926(2), 309-317 [cit. 2019-11-18]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01056-1. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301010561>
- [21] JAIN, Archana a Krishna VERMA. Strategies in liquid chromatographic methods for the analysis of biogenic amines without and with derivatization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, 109, 62-82 [cit. 2019-10-17]. DOI: 10.1016/j.trac.2018.10.001. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993618304655>
- [22] KRÍŽEK, Martin, František VÁCHA, Pavel VEJSADA a Tamara PELIKÁNOVÁ. Formation of biogenic amines in fillets and minced flesh of three freshwater fish species stored at 3 °C and 15 °C. *Acta Veterinaria Brno* [online]. 2011, 80(4), 365-372 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.2754/avb201180040365. ISSN 0001-7213. Dostupné z: <https://actavet.vfu.cz/80/4/0365/>
- [23] MAYER, H.K., G. FIECHTER a E. FISCHER. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217(19), 3251-3257 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.027. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309013831>
- [24] GOSETTI, Fabio, Eleonora MAZZUCCO, Maria GENNARO a Emilio MARENCO. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, 405(2-3), 907-916 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1007/s00216-012-6269-z. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-6269-z>
- [25] STOJKOVIĆ, Nikola, Snežana CEKIĆ, Milica RISTOV, Marko RISTIĆ, Davor ĐUKIĆ, Maša BINIĆ a Dragan VIRIJEVIĆ. Histamine and Antihistamines / Histamin i

- antihistamini. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* [online]. 2015, 32(1), 7-22 [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.1515/afmnai-2015-0001. ISSN 2217-2521. Dostupné z: <http://content.sciendo.com/view/journals/afmnai/32/1/article-p7.xml>
- [26] VEREGUT, Veronica, Monica FLORESCU a Mihaela BADEA. Classic and Modern Methods for Detection of Serotonin. *Sensing in Electroanalysis* [online]. University Press Centre, Pardubice, Czech Republic, 2012, (7), 97-106 [cit. 2020-03-04]. ISSN 978-80-7395-564-9. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/58379/VeregutV_ClassicAndModern_2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [27] MURTADA, Khaled, Fernando DE ANDRÉS, Ismael GALVÁN, Ángel RÍOS a Mohammed ZOUGAGH. LC-MS determination of catecholamines and related metabolites in red deer urine and hair extracted using magnetic multi-walled carbon nanotube poly(styrene-co-divinylbenzene) composite. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, 1136 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121878. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002321931150X>
- [28] AZARYAN, A., T. LIGOR, B. BUSZEWSKI, A. TEMERDASHEV, E. DMITRIEVA a E. GASHIMOVA. LC-MS/MS Determination of Catecholamines in Urine Using FMO-CI Derivatization on Solid-Phase Extraction Cartridge. *Chromatographia* [online]. 2018, 81(11), 1487-1494 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1007/s10337-018-3610-5. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-018-3610-5>
- [29] BACHRACH, Uriel. Polyamines and carcinogenesis. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* [online]. 2012, 29(4), 165-174 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.2478/v10283-012-0023-5. ISSN 2217-2521. Dostupné z: <http://content.sciendo.com/view/journals/afmnai/29/4/article-p165.xml>
- [30] BUYUKUSLU, Nihal a Seda EROZ. Polyamines and cancer; The role of diet polyamines in patients with cancer. *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences* [online]. 2015 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.5455/musbed.20150313041849. ISSN 2146-3654. Dostupné z: <http://www.clinexphealthsci.com/sayilar/113/buyuk/123-1281.pdf>
- [31] Organická chemie - hydroxysloučeniny. *MojeChemie* [online]. 2011 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: https://www.mojechemie.cz/Organick%C3%A1_Chemie:Hydroxyslou%C4%8Deniny
- [32] ZHAO, Shuang, Xian LUO a Liang LI. Chemical Isotope Labeling LC-MS for High Coverage and Quantitative Profiling of the Hydroxyl Submetabolome in Metabolomics. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, 88(21), 10617-10623 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02967. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b02967>
- [33] ZHANG, Tian-Yi, Sha LI, Quan-Fei ZHU, Qing WANG, Dilshad HUSSAIN a Yu-Qi FENG. Derivatization for liquid chromatography-electrospray ionization-mass

- spectrometry analysis of small-molecular weight compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, 119 [cit. 2019-10-17]. DOI: 10.1016/j.trac.2019.07.019. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993619302948>
- [34] TANG, Zhongmei a F. GUENGERICH. Dansylation of Unactivated Alcohols for Improved Mass Spectral Sensitivity and Application to Analysis of Cytochrome P450 Oxidation Products in Tissue Extracts. *Analytical Chemistry* [online]. 2010, 82(18), 7706-7712 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1021/ac1015497. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac1015497>
- [35] CHU, Jie-Mei, Chu-Bo QI, Yun-Qing HUANG, Han-Peng JIANG, Yan-Hong HAO, Bi-Feng YUAN a Yu-Qi FENG. Metal Oxide-Based Selective Enrichment Combined with Stable Isotope Labeling-Mass Spectrometry Analysis for Profiling of Ribose Conjugates. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, 87(14), 7364-7372 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01614. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b01614>
- [36] OEHLKE, Johannes, Michael BRUDEL a Ingolf BLASIG. Benzoylation of sugars, polyols and amino acids in biological fluids for high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1994, 655(1), 105-111 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/0378-4347(94)00067-0. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378434794000670>
- [37] VUCKOVIC, Dajana. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, 403(6), 1523-1548 [cit. 2020-01-12]. DOI: 10.1007/s00216-012-6039-y. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-6039-y>
- [38] FERNÁNDEZ-PERALBO, M.A. a M.D. LUQUE DE CASTRO. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2012, 41, 75-85 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.trac.2012.08.011. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993612002725>
- [39] ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B., F. PRIEGO-CAPOTE a M.D. CASTRO. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2010, 29(2), 120-127 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.12.004. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993609002908>
- [40] BAGHDADY, Yehia a Kevin SCHUG. Review of in situ derivatization techniques for enhanced bioanalysis using liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science* [online]. 2016, 39(1), 102-114 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1002/jssc.201501003. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201501003>

- [41] WU, Yiman a Liang LI. Dansylation Metabolite Assay: A Simple and Rapid Method for Sample Amount Normalization in Metabolomics. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, 86(19), 9428-9433 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1021/ac503359v. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac503359v>
- [42] JONES, Barry a James GILLIGAN. O-phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *Journal of Chromatography A* [online]. 1983, 266, 471-482 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)90918-5. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301909185>
- [43] ZHENG, Xiao, An KANG, Chen DAI et al. Quantitative Analysis of Neurochemical Panel in Rat Brain and Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2012, 84(22), 10044-10051 [cit. 2019-10-17]. DOI: 10.1021/ac3025202. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac3025202>
- [44] ZHOU, Ruokun, Chiao-Li TSENG, Tao HUAN a Liang LI. IsoMS: Automated Processing of LC-MS Data Generated by a Chemical Isotope Labeling Metabolomics Platform. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, 86(10), 4675-4679 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1021/ac5009089. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac5009089>
- [45] BARANOWSKA, Irena a Joanna PŁONKA. Monitoring of biogenic amines and drugs of various therapeutic groups in urine samples with use of HPLC. *Biomedical Chromatography* [online]. 2016, 30(4), 652-657 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1002/bmc.3614. ISSN 02693879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.3614>
- [46] HÄKKINEN, Merja, Antti ROINE, Seppo AURIOLA et al. Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* [online]. 2013, 941, 81-89 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.10.009. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023213005473>
- [47] DOUŠA, Michal. Derivatizační techniky v HPLC. *HPLC.CZ* [online]. c1999-2020 [cit. 2020-01-11]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Tip/derivatizace.htm>
- [48] Derivatizace v HPLC. *VŠCHT PRAHA* [online]. [cit. 2020-01-12]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/7%202019%20HPLC%20Derivatizace.pdf>
- [49] QI, Bao-Ling, Ping LIU, Qiu-Yi WANG, Wen-Jing CAI, Bi-Feng YUAN a Yu-Qi FENG. Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, 59, 121-132 [cit. 2019-10-17]. DOI: 10.1016/j.trac.2014.03.013. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599361400096X>
- [50] CREASY, William. Postcolumn derivatization liquid chromatography/mass spectrometry for detection of chemical-weapons-related compounds. *Journal of the*

- American Society for Mass Spectrometry* [online]. 1999, 10(5), 440-447 [cit. 2019-10-17]. DOI: 10.1016/S1044-0305(99)00005-7. ISSN 1044-0305. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1016/S1044-0305\(99\)00005-7](http://link.springer.com/10.1016/S1044-0305(99)00005-7)
- [51] Schotten-Baumann Reaction. *Organic Chemistry Portal* [online]. 2002-2020 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schotten-baumann-reaction.shtm>
- [52] BARREIRA, Eveline, José PARENTE a José DE ALENCAR. Separation and determination of aliphatic amines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1987, 398, 381-386 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)96531-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301965318>
- [53] ÖZDESTAN, Özgül a Ali ÜREN. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta* [online]. 2009, 78(4-5), 1321-1326 [cit. 2019-11-18]. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.02.001. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914009001301>
- [54] JONÁKOVÁ, Miroslava. *Vývoj metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách*. Univerzita Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- [55] INDYK, Harvey a David WOOLLARD. Determination of free myo-inositol in milk and infant formula by high-performance liquid chromatography. *The Analyst* [online]. 1994, 119(3) [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1039/an9941900397. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=an9941900397>
- [56] KODANI, Shinya, Hisayuki KOMAKI, Sho ISHIMURA, Hikaru HEMMI a Mayumi OHNISHI-KAMEYAMA. Isolation and structure determination of a new lantibiotic cinnamycin B from *Actinomadura atramentaria* based on genome mining. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2016, 43(8), 1159-1165 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1007/s10295-016-1788-9. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-016-1788-9>
- [57] RAKOTOMANGA, S., A. BAILLET, F. PELLERIN a D. BAYLOCQ-FERRIER. Liquid chromatographic analysis of monosaccharides with phenylisocyanate derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1992, 10(8), 587-591 [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1016/0731-7085(92)80084-Z. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/073170859280084Z>
- [58] BJÖRKQVIST, Börje. Separation and determination of phenyl isocyanate-derivatized carbohydrates and sugar alcohols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1981, 218, 65-71 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)82047-6. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300820476>

- [59] BJÖRKQVIST, Börje. Separation and determination of aliphatic and aromatic amines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1981, 204, 109-114 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)81645-3. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300816453>
- [60] BJÖRKQVIST, Börje a Hannu TOIVONEN. Separation and determination of aliphatic alcohols by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1978, 153(1), 265-270 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)89883-0. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300898830>
- [61] KIM, Byoung-Hyoun, Suk LEE, Hye LEE a Jong OK. Reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomedical Chromatography* [online]. 2003, 17(6), 396-403 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1002/bmc.254. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.254>
- [62] HARIHARAN, M., Sundar NAGA a Ted VANNOORD. Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection with precolumn derivatization using phenyl isothiocyanate. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1993, 621(1), 15-22 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/0378-4347(93)80071-B. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843479380071B>
- [63] ZHENG, Guihua, Wenwen JIN, Pei FAN, Xiaonan FENG, Yun BAI, Tao TAO a Longjiang YU. A novel method for detecting amino acids derivatized with phenyl isothiocyanate by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2015, 392, 1-6 [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1016/j.ijms.2015.08.004. ISSN 13873806. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387380615002535>
- [64] PALEGO, Lionella, Gino GIANNACCINI, Giuseppe SACCOMANNI et al. Modified RP-LC of Phenylthiocarbamyl Amino Acid Adducts in Plasma Acetonitrile Extracts Using Multiple Internal Standards and Photo-Diode UV Detection. *Chromatographia* [online]. 2010, 71(3-4), 291-297 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1365/s10337-009-1423-2. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1365/s10337-009-1423-2>
- [65] MARTIN, M.A., B. LIN a B. DEL CASTILLO. The use of fluorescent probes in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1988, 6(6-8), 573-583 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1016/0731-7085(88)80071-2. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0731708588800712>
- [66] DAI, Zhaolai, Zhenlong WU, Sichao JIA a Guoyao WU. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2014, 964, 116-127 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.03.025.

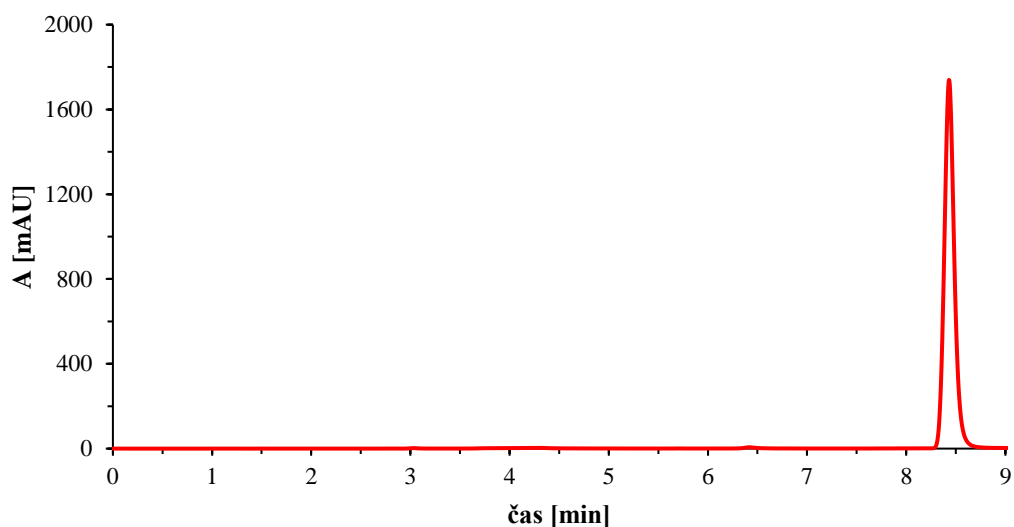
- [67] PERUCHO, J., R. GONZALO-GOBERNADO, E. BAZAN, M. CASAREJOS, A. JIMÉNEZ-ESCRIG, M. ASENSIO a A. HERRANZ. Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids* [online]. 2015, 47(5), 963-973 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1007/s00726-015-1925-1. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-015-1925-1>
- [68] KANĎÁR, Roman, Petra DRÁBKOVÁ, Tereza TOIFLOVÁ a Alexander ČEGAN. Determination of Selected Amino Acids in Serum of Patients with Liver Disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2016, 25(6), 1227-1239 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.17219/acem/63751. ISSN 1899-5276. Dostupné z: <http://www.advances.umed.wroc.pl/en/article/2016/25/6/1227/>
- [69] EINARSSON, S., B. JOSEFSSON a S. LAGERKVIST. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1983, 282, 609-618 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)91638-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300916388>
- [70] JÁMBOR, A. a I. MOLNÁR-PERL. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, 1216(15), 3064-3077 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.068. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309001447>
- [71] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [72] KENKEL, John. *Analytical chemistry for technicians*. 3rd ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. ISBN 15-667-0519-3.
- [73] HARVEY, David. *Modern analytical chemistry*. Boston: McGraw-Hill, 2000. ISBN 00-723-7547-7.
- [74] KEALEY, D. a P. HAINES. *Analytical chemistry*. Oxford: Bios, 2002. Instant notes. ISBN 18-599-6189-4.
- [75] DONG, M. *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2006. ISBN 978-0-471-72789-7.
- [76] Instrumentation of HPLC. In: *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications* [online]. 2020 [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/High-performance-liquid-chromatography-hplc.jpg>

- [77] DOUŠA, Michal. Teorie HPLC. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2020 [cit. 2020-01-11]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [78] Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. *Michal Holčapek: Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice* [online]. Pardubice: M. Holčapek a Univerzita Pardubice, c2006-2020 [cit. 2019-10-20]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>
- [79] SOWERS, Mark, Jason HERRING, William ZHANG, Hui TANG, Yang OU, Wei GU a Kangling ZHANG. Analysis of glucose-derived amino acids involved in one-carbon and cancer metabolism by stable-isotope tracing gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* [online]. 2019, 566, 1-9 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.ab.2018.10.026. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269718310959>
- [80] GRAY, Nicola, Rabiya ZIA, Adam KING et al. High-Speed Quantitative UPLC-MS Analysis of Multiple Amines in Human Plasma and Serum via Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl- N -hydroxysuccinimidyl Carbamate: Application to Acetaminophen-Induced Liver Failure. *Analytical Chemistry* [online]. 2017, 89(4), 2478-2487 [cit. 2019-11-18]. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04623. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04623>
- [81] FELDER, Thomas, Susanne RING-DIMITRIOU, Simon AUER et al. Specific circulating phospholipids, acylcarnitines, amino acids and biogenic amines are aerobic exercise markers. *Journal of Science and Medicine in Sport* [online]. 2017, 20(7), 700-705 [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.1016/j.jsams.2016.11.011. ISSN 14402440. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S144024401730244X>
- [82] SAKAGUCHI, Yohei, Hideyuki YOSHIDA, Tadashi HAYAMA, Miki ITOYAMA, Kenichiro TODOROKI, Masatoshi YAMAGUCHI a Hitoshi NOHTA. Selective liquid-chromatographic determination of native fluorescent biogenic amines in human urine based on fluorous derivatization. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, 1218(33), 5581-5586 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.076. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311007370>
- [83] CHAN, E.C.Y, P.Y WEE, P.Y HO a P.C HO. High-performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with pre-column 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 2000, 749(2), 179-189 [cit. 2020-01-15]. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00423-0. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434700004230>
- [84] KLIKAROVÁ, Jitka, Jana ŠEBKOVÁ, Jan FISCHER a Lenka ČESLOVÁ. *Determination of proline in meads using high performance liquid chromatography* [online]. University of Pardubice, 2019, , 15-26 [cit. 2020-04-28]. ISBN 978-80-7560-243-5. Dostupné z: <https://hdl.handle.net/10195/74269>

- [85] HOLČAPEK, M., H. VIRELIZIER, J. CHAMOT-ROOKE, P. JANDERA a C. MOULIN. Trace Determination of Glycols by HPLC with UV and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detections. *Analytical Chemistry* [online]. 1999, 71(13), 2288-2293 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1021/ac981087y. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac981087y>

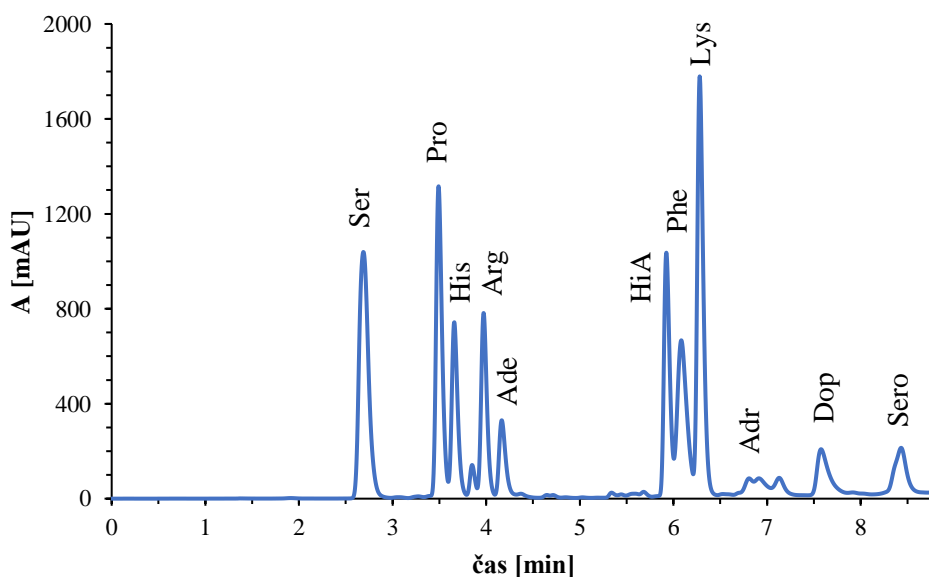
6 PŘÍLOHA

Obrázek P1 – Analýza činidla PITC	77
Obrázek P2 - Separace 11 standardů po derivatizaci PITC	77
Obrázek P3 – Separace 11 standardů derivatizovaných PITC bez sušících kroků	78
Obrázek P4 - MS spektrum serotoninu	79



Obrázek P1 – Analýza činidla PITC

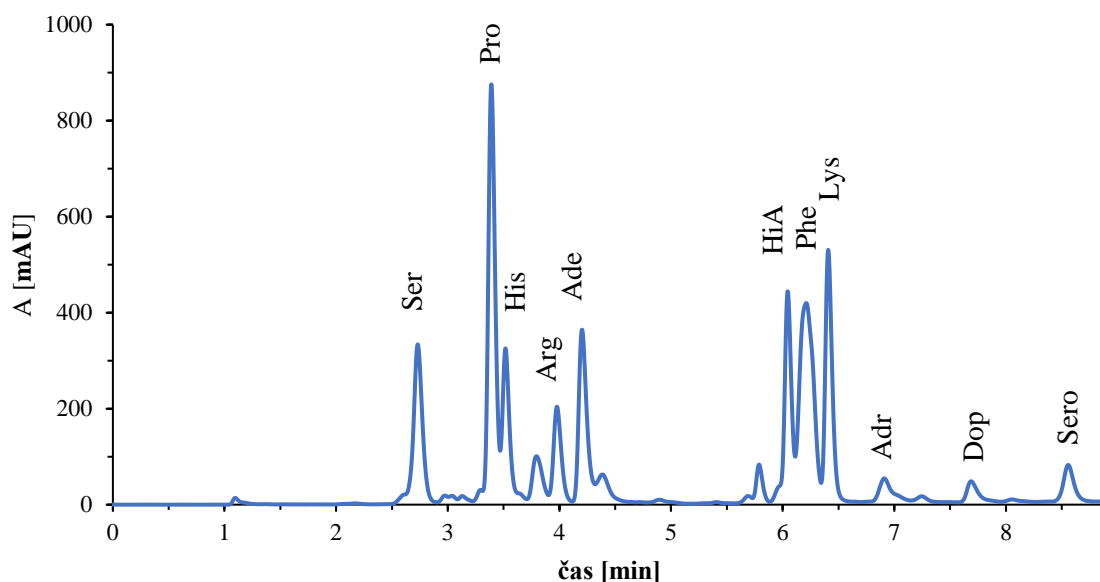
Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 $^{\circ}$ C; mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 30 % B, 3 min – 60 % B, 9 min 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.



Obrázek P2 - Separace 11 standardů po derivatizaci PITC

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 °C; mobilní fáze A: 70mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 10 % B, 2,5 min – 30 % B, 4,5 min – 50 % B, 8,5 min – 80 % B, 9,5 min – 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.

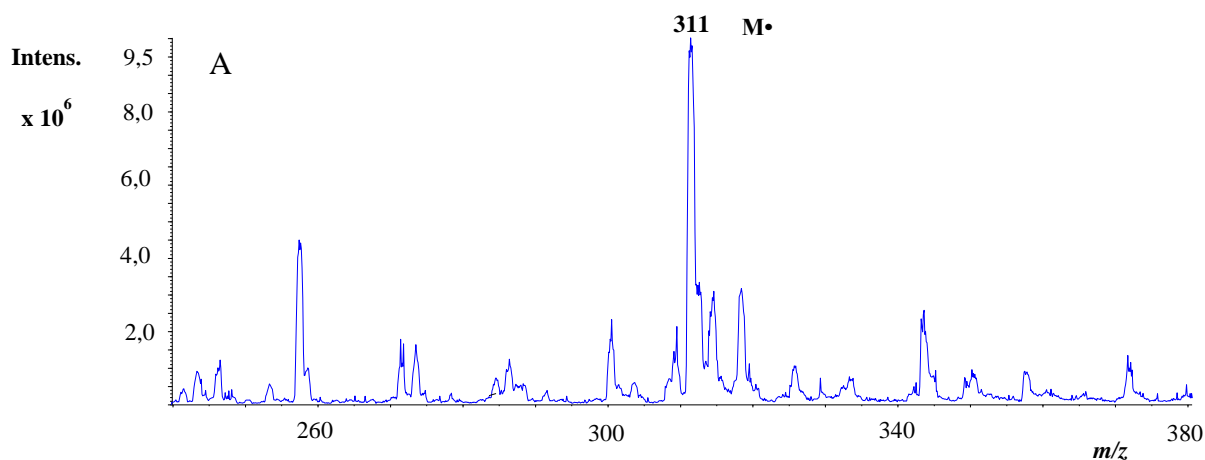
Pozn.: Ser = serin, Pro = prolin, His = histidin, Arg = arginin, Ade = adenosin, HiA = histamin, Phe = phenylalanin, Lys = lysin, Adr = adrenalin, Dop = dopamin, Sero = serotonin.

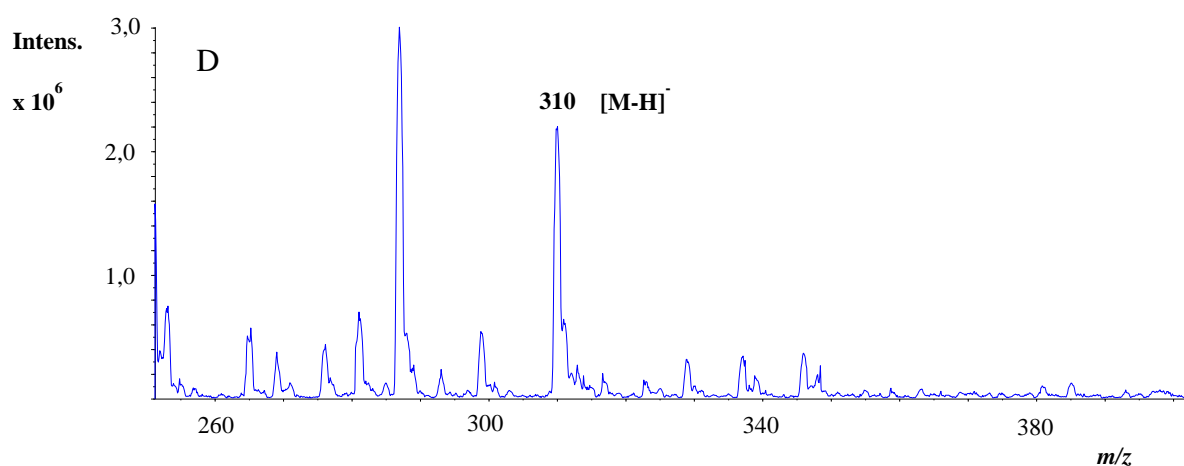
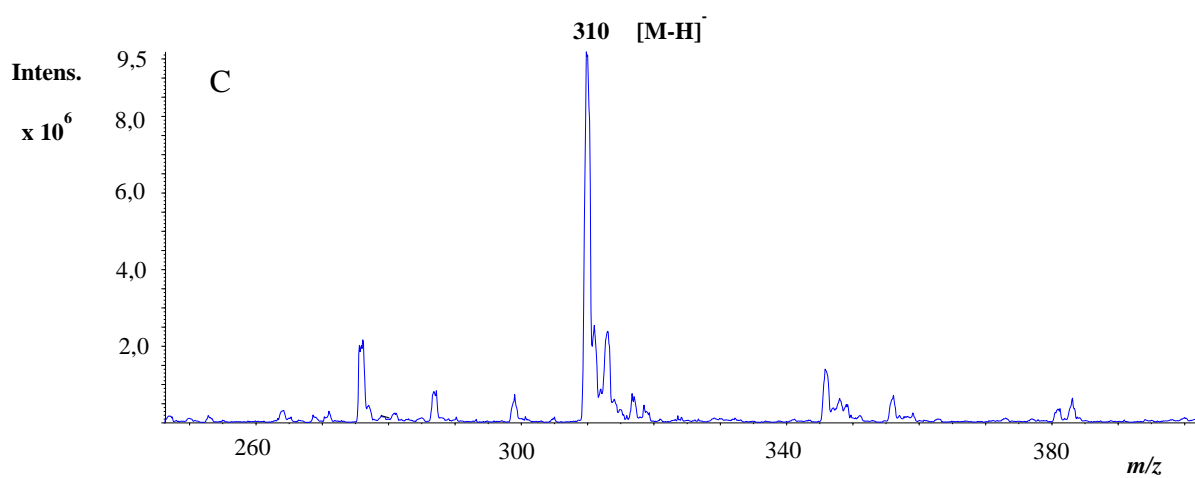
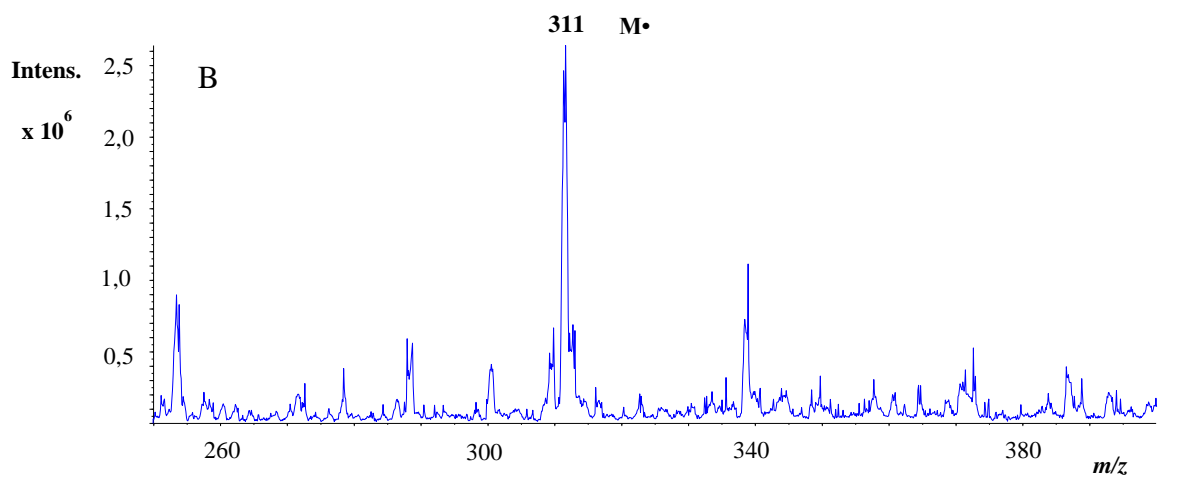


Obrázek P3 – Separace 11 standardů derivatizovaných PITC bez sušících kroků

Podmínky analýzy: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm; 3,5 μ m); teplota 30 °C; mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; gradient: 0 min – 10 % B, 2,5 min – 30 % B, 4,5 min – 50 % B, 8,5 min – 80 % B, 9,5 min 100 % B; průtok 0,6 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm.

Pozn.: Ser = serin, Pro = prolin, His = histidin, Arg = arginin, Ade = adenosin, HiA = histamin, Phe = fenylalanin, Lys = lysin, Adr = adrenalin, Dop = dopamin, Sero = serotonin.





Obrázek P4 - MS spektrum serotoninu

Podmínky analýzy LC/MS: Zorbax SB-Aq (15 cm x 3 mm x 3,5 μ m); teplota 30 $^\circ$ C; gradient: 0 min – 10 % B, 15 min – 100 % B; průtok 0,4 ml/min; dávkování: 2 μ l; 254 nm

Pozn.: A) mobilní fáze A: 0,05% HCOOH, B: 70% ACN ve vodě, ESI+; B) mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě; ESI+; C) mobilní fáze A: 0,05% HCOOH, B: 70% ACN ve vodě, ESI-; D) mobilní fáze A: 70 mM octan amonný (pH 6,55), B: 60% ACN ve vodě, ESI-