

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Využitie separačných techník pre skrínigové vyšetrenie stavu
metabolizmu zo vzorky suchej kvapky krvi**

Dizertačná práca

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

**The application of separation techniques for the screening of metabolism
using dried blood spot sample**

Doctoral Thesis

Prehlasujem:

Prácu s názvom „Využitie separačných techník pre skrínigové vyšetrenie stavu metabolizmu zo vzorky suchej kvapky krvi“ som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č.121/2000 Sb., o autorskom práve, o právach súvisiacich s autorským právom a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. X/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 18.5.2022

Mgr. Lenka Laštovičková v.r.

Na tomto mieste by som rada poďakovala prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D. za odborné vedenie počas celého doktorského štúdia, za jeho čas, cenné rady, pripomienky, korektúry a za pomoc pri spisovaní tejto záverečnej práce. Tiež ďakujem všetkým členom biochemickej skupiny Katedry biologických a biochemických vied za vytvorenie príjemného kolektívu a pomoc pri riešení problémov. Poďakovanie patrí tiež všetkým dobrovoľným darcom za poskytnutie vzoriek krvi. V neposlednom rade patrí vďaka celej mojej rodine, priateľom a všetkým, ktorí ma v štúdiu akokoľvek podporovali. Špeciálne ďakujem svojmu manželovi za trpezlivosť počas posledných dní spisovania tejto práce.

ANOTÁCIA

Suchá kvapka krvi je jednoduchou a neinvazívnou metódou odberu vzorky. Keďže zmeny hladín niektorých aminokyselín, ketokyselín či mastných kyselín môžu byť spojené s rozvojom metabolických porúch (napríklad diabetes mellitus), môže byť suchá kvapka krvi použitá ako alternatívna vzorka pri skríningovom vyšetrení stavu metabolizmu. Pre túto štúdiu boli vzorky suchej kvapky krvi získané punkciou prstu 60 dobrovoľníkov. Celkovo boli optimalizované 3 rozličné metódy a vo vzorkách bolo stanovených 20 aminokyselín, 5 ketokyselín a 24, respektíve 18 mastných kyselín (percentuálne zastúpenie, resp. koncentrácia). Výsledky boli štatisticky spracované. Použité metódy sú dostatočne citlivé pre kvantifikáciu spomínaných analytov z veľmi malého množstva biologického materiálu obsiahnutého vo vzorke suchej kvapky krvi.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

aminokyseliny, chromatografia, ketokyseliny, mastné kyseliny, metabolomika, suchá kvapka krvi

ANNOTATION

The dried blood spot is a simple and non-invasive sample collection technique. It can be used as an alternative sample for the screening of metabolism in humans since changes in the levels of some fatty acids, amino acids, and keto acids can be associated with metabolic disorders (for example diabetes mellitus). The samples in this study were obtained from 60 volunteers by a finger prick. In total 3 different methods were optimized, 20 amino acids, 5 keto acids, and 24, respectively 18 fatty acids (percentage content, respectively concentration) were quantified. The data were statistically evaluated. All presented methods are sensitive enough for the determination of above-mentioned analytes from a small volume of a biological material in dried blood spot samples.

KEYWORDS

amino acids, chromatography, dried blood spot, fatty acids, keto acids, metabolomics

OBSAH

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK	9
ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK	10
ÚVOD	13
1 TEORETICKÁ ČASŤ	14
1.1 Suchá kvapka krvi	14
1.1.1 Výhody a nevýhody techniky suchej kvapky krvi	14
1.1.2 Odberový papier	16
1.1.3 Príprava vzorky suchej kvapky krvi	17
1.1.4 Skladovanie vzoriek suchej kvapky krvi a stabilita analytov	18
1.1.5 Vplyv hematokritu	19
1.1.6 Extrakcia vybraných analytov zo vzorky suchej kvapky krvi	20
1.1.7 Využitie techniky suchej kvapky krvi v praxi	22
1.2 Metódy stanovenia aminokyselín	23
1.3 Metódy stanovenia ketokyselín	31
1.4 Metódy stanovenia mastných kyselín	35
1.5 Asociácia vybraných metabolitov s ochoreniami	38
1.6 Referenčné hodnoty vybraných metabolitov	40
2 CIEĽ PRÁCE	44
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	45
3.1 Materiál	45
3.1.1 Vzorky	45
3.1.2 Chemikálie	46
3.1.3 Pomôcky a prístroje	48
3.1.4 Pracovné roztoky	50
3.2 Postup stanovenia vybraných aminokyselín	57
3.2.1 Príprava vzoriek	57

3.2.2	Príprava štandardov	57
3.2.3	Chromatografická analýza	57
3.3	Postup stanovenia vybraných ketokyselín	58
3.3.1	Príprava vzoriek	58
3.3.2	Príprava štandardov	59
3.3.3	Chromatografická analýza	59
3.4	Postup stanovenia vybraných mastných kyselín	60
3.4.1	Príprava vzoriek	60
3.4.2	Príprava štandardov	61
3.4.3	Chromatografická analýza	61
3.5	Analytické parametre metód	62
3.5.1	Linearita	62
3.5.2	Presnosť	63
3.5.3	Hranica detekcie.....	63
3.5.4	Hranica stanoviteľnosti	63
3.5.5	Výtlačnosť	64
3.5.6	Robustnosť	64
3.6	Štatistické spracovanie	64
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	66
4.1	Príprava vzorky	66
4.2	Stanovenie vybraných aminokyselín.....	68
4.2.1	Optimalizácia metódy kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou	69
4.2.2	Optimalizácia metódy kvapalinovej chromatografie s hmotnostne spektrometrickou detekciou	73
4.2.3	Referenčné hodnoty	75
4.3	Stanovenie vybraných ketokyselín.....	77
4.3.1	Optimalizácia metódy kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou	77

4.3.2	Referenčné hodnoty	81
4.4	Stanovenie vybraných mastných kyselín	82
4.4.1	Optimalizácia metódy plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačnou detekciou 82	
4.4.2	Referenčné hodnoty	85
4.5	Štatistické vyhodnotenie	86
5	ZÁVER	91
6	POUŽITÁ LITERATÚRA	92
7	PRÍLOHY	115

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A TABULIEK

Obrázok 1 Kyslo-katalyzovaná esterifikácia mastných kyselín a lipidov	37
Obrázok 2 Methylácia MK pyrolýzou soli sformovanej z TMSH v injektore GC.....	38
Obrázok 3 Reakcia diazomethanu s MK	38
Obrázok 4 Rozdiely v koncentrácii vybraných MK na okraji a v strede vzorky DBS	67
Obrázok 5 Spôsob vyrazenia terčiku	67
Obrázok 6 Chromatografický záznam stanovenia AK metódou HPLC-FLD	72
Obrázok 7 Chromatografický záznam stanovenia AK metódou HPLC-ESI-MS/MS.....	75
Obrázok 8 Chromatografický záznam stanovenia KK metódou HPLC-FLD	80
Obrázok 9 Chromatografický záznam stanovenia KK metódou HPLC-FLD	81
Obrázok 10 Korelačná matica ukazujúca výsledky štatistickej analýzy medzi jednotlivými AK, KK a MK za použitia Pearsonovho korelačného koeficientu (hodnoty r).....	88
Tabuľka 1 Prehľad derivatizačných činidiel používaných pri analýze AK	27
Tabuľka 2 Prehľad KK odvodených od AK	31
Tabuľka 3 Prehľad derivatizačných činidiel používaných pri analýze KK	33
Tabuľka 4 Referenčné hodnoty vybraných AK v krvných vzorkách	41
Tabuľka 5 Referenčné hodnoty vybraných KK v krvných vzorkách	42
Tabuľka 6 Referenčné hodnoty vybraných MK v krvných vzorkách	42
Tabuľka 7 Gradientová elúcia metódy HPLC-FLD	71
Tabuľka 8 Priemerná výťažnosť metódy HPLC-FLD pre stanovenie AK zo vzoriek DBS	71
Tabuľka 9 Optimalizované podmienky nastavenia MS detektora.....	73
Tabuľka 10 Priemerná výťažnosť metódy HPLC-ESI-MS/MS pre stanovenie AK zo vzoriek DBS.....	74
Tabuľka 11 Referenčné hodnoty vybraných AK v dospeljej populácii.....	76
Tabuľka 12 Priemerná výťažnosť metódy HPLC-FLD pre stanovenie KK zo vzoriek DBS ..	81
Tabuľka 13 Referenčné hodnoty vybraných KK v dospeljej populácii.....	82
Tabuľka 14 Referenčné hodnoty vybraných MK v dospeljej populácii	85
Tabuľka 15 Vplyv veku na koncentráciu testovaných analytov	87

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

2-ME	2-merkapt ethanol
3-MPA	3-merkaptopropiónová kyselina (z angl. 3-mercaptopropionic acid)
AIDS	syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti (z angl. acquired immune deficiency syndrome)
AK	aminokyseliny
AMQ	aminochinolín (z angl. aminoquinoline)
AQC	6-aminochinolyl- <i>N</i> -hydroxysukcinylnkarbamát (z angl. 6-aminoquinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl carbamate)
BCAA	aminokyseliny s rozvetveným reťazcom (z angl. branched-chain amino acids)
BCKA	ketokyseliny s rozvetveným reťazcom (z angl. branched-chain keto acids)
BHT	butylovaný hydroxytoluén
CE	kapilárna elektroforéza (z angl. capillary electrophoresis)
CMV	cytomegalovírus
DBS	suchá kvapka krvi (z angl. dried blood spot)
DBS-Cl	dimethylaminoazobenzénsulfonylchlorid
DDB	1,2-diamino-4,5-dimetoxybenzén
DESI	desorpčná ionizácia elektrosprejom (z angl. desorption electrospray ionization)
DMB	1,2-diamino-4,5-dimethyléndioxybenzén
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DNFB	2,4-dinitro-1-fluórbenzén
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazín (z angl. 2,4-dinitrophenylhydrazine)
DNS-Cl	dimethylaminonaftalénsulfonylchlorid
DNSH	dansylhydrazín
EDTA	kyselina ethyléndiaminotetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELSD	detektor rozptylu svetla (z angl. evaporative light scattering detector)
FID	plameňovo-ionizačný detektor (z angl. flame-ionization detector)
FMOC-Cl	9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid (z angl. 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride)
GC	plynová chromatografia (z angl. gas chromatography)
HBV	vírus hepatitídy B (z angl. hepatitis B virus)
HCT	hematokrit (z angl. haematocrit)
HCV	vírus hepatitídy C (z angl. hepatitis C virus)

HILIC	chromatografia s hydrofilnými interakciami (z angl. hydrophilic interaction chromatography)
HIV	vírus imunitnej nedostatočnosti (z angl. human immunodeficiency virus)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. high-performance liquid chromatography)
IEC	iónovo výmenná chromatografia (z angl. ion-exchange chromatography)
IS	interný/vnútorý štandard (z angl. internal standard)
KK	ketokyseliny
LOD	hranica detekcie (z angl. limit of detection)
LOQ	hranica stanoviteľnosti (z angl. limit of quantification)
MALDI	desorpcia/ionizácia laserom za účasti matrice (z angl. matrix-assisted laser desorption ionization)
MEKC	micelárna elektrokinetická chromatografia
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostný spektrometer (z angl. mass spectrometer)
MS/MS	tandemový hmotnostný spektrometer
NBD-Cl	7-chloro-4-nitrobenzoxadiazol
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NDA	naftalén-2,3-dikarboxaldehyd
NPD	4-nitro-1,2-fenyléndiamín (z angl. 4-nitro-1,2-phenylenediamine)
NPH	3-nitrofenylhydrazín (z angl. 3-nitrophenylhydrazine)
NQS	1,2-naftochinón-4-sulfonát (z angl. 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate)
NS	novorodenecký skríning
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd (z angl. <i>o</i> -phthalaldehyde)
OPD	<i>o</i> -fenyléndiamín (z angl. <i>o</i> -phenylenediamine)
PITC	fenylizotiokyanát (z angl. phenyl isothiocyanate)
PTC	fenyltiokarbamoyl (z angl. phenyl thiocarbamoyl)
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny (z angl. polyunsaturated fatty acids)
RRF	relatívny odozvový faktor (z angl. relative response factor)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RP-HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na obrátených fázach (z angl. reversed-phase high-performance liquid chromatography)
SPE	extrakcia na pevnej fáze (z angl. solid phase extraction)
TLC	chromatografia na tenkej vrstve (z angl. thin layer chromatography)

TMSH	hydroxid trimethylsulfóniový
UV	ultrafialový (z angl. ultraviolet)
Vis	viditeľný (z angl. visible)

ÚVOD

Veľkým trendom súčasnosti je ochrana životného prostredia a minimalizácia jeho záťaže tvorbou odpadov. Tento prístup sa rozmáha vo viacerých oblastiach nášho života, analytickú chémiu nevynímajúc. Odráža sa nielen v snahe zmenšiť prístroje, ale tiež v množstve materiálov a chemikálií použitých k analýze, čo je nielen ekologicky, ale aj ekonomicky prínosné. Citlivosť analytických techník naopak rastie, čo umožňuje testovať stále menšie množstvá vzoriek. Najmä v prípade vzoriek ľudského pôvodu je znateľný záujem o jednoduchú, rýchlu a pokiaľ možno neinvazívnu metódu odberu vzoriek. V snahe minimalizovať požiadavky spojené s klasickým odberom venóznej plnej krvi (akými sú odber kvalifikovaným zdravotníckym personálom a následný rýchly transport za dodržania definovanej teploty do analytických laboratórií) sa ako alternatíva ponúka možnosť odberu tzv. technikou suchej kvapky krvi (DBS). Táto technika odberu vzorky sa už niekoľko desaťročí štandardne používa pri skríningu vrodených metabolických porúch novorodencov (novorodenecký skríning - NS), avšak vďaka mnohým výhodám sa postupne rozširuje aj do ďalších oblastí. Hoc v niektorých prípadoch je tento typ odberu vzorky stále len vo výskumnej fáze, do budúcnosti ukazuje veľký potenciál ako alternatíva klasického odberu vzoriek plnej krvi, a to pri skríningových metabolických vyšetreniach či pri sledovaní účinku nasadenej liečby. Vzorka DBS by v týchto prípadoch mohla uľahčiť celý proces odberu a transportu vzoriek do laboratórií.

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 Suchá kvapka krvi

Po prvý raz bola táto technika odberu krvi použitá pri analýze hladín cukru v králičej krvi v roku 1913. Predstavil ju Ivar Christian Bang, ale aj napriek tomu, že ju následne vo svojich štúdiách použilo ešte niekoľko ďalších vedcov, sa táto technika stala známou až o pol storočia neskôr. V roku 1963 bola zo vzoriek DBS semikvantitatívne stanovená hladina fenylalanínu s cieľom odhaliť dedičnú metabolickú poruchu novorodencov – fenylketonúriu. Autorom tejto myšlienky bol Robert Guthrie. Vďaka jednoduchosti, spoľahlivosti a ekonomickej nenáročnosti sa Guthrieho test, a s ním spojený skrining novorodencov, postupne rozšírili do sveta. Hoc princíp samotného vyšetrenia je dnes už iný a medzi jednotlivými krajinami sa líši aj počet skrínovaných ochorení, typ vzorky ostáva rovnaký. Je ním DBS. Vďaka mnohým výhodám sa rozšírila aj do iných oblastí klinických analýz a v budúcnosti by mohla byť používaná ako alternatíva ku klasickému odberu vzoriek plnej krvi, najmä pri skriningu metabolických porúch či sledovaní úspešnosti nasadenej liečby (Guthrie a Susi., 1963; Kayton, 2007; Schmidt, 1986).

1.1.1 Výhody a nevýhody techniky suchej kvapky krvi

Jednou z hlavných výhod tejto techniky odberu vzorky je menej invazívny odber, ktorý nevyžaduje prítomnosť kvalifikovaného zdravotníckeho personálu. Vzorky môžu byť teda odobrané akoukoľvek dospelou osobou, vrátane pacienta samotného. Takmer bezbolestný odber vykonaný v známom prostredí môže byť uľahčením v prípade odberu vzoriek u detí alebo u pacientov trpiacich fóbiou z ihiel. Pomôcť môže aj v prípade geriatrických pacientov alebo iných pacientov so zníženou schopnosťou pohybu.

Pri procese schnutia krvnej škrvny dochádza k poškodeniu obálky vírusov (napr. HIV, HBV, CMV a iné), takže riziko nákazy pri práci s biologickým materiálom sa značne redukuje. Schnutie naopak napomáha zvýšeniu stability väčšiny analytov, takže vzorky môžu byť skladované aj bez nutnosti chladenia, napríklad pri izbovej teplote. S odľahčením možno povedať, že vzorky DBS môžu byť odobrané pacientom samotným doma a zaslané na analýzu do laboratórií poštou. Autori jednej štúdie poukazujú na fakt, že zaslaním vzoriek DBS miesto vzoriek plazmy možno, s ohľadom na lokálne podmienky, ušetriť až 200 eur. Taktiež uvádzajú, že približne 30 % vzoriek plazmy býva zaslaných chybné (za nedodržania správnych

podmienok či so zle vypísanou sprievodnou dokumentáciou) (van Amsterdam a Waldrop, 2010). Po zaschnutí môžu byť vzorky DBS jednoducho uložené na seba, takže pri skladovaní či transporte zaberajú menej miesta v porovnaní so vzorkami plazmy či plnej krvi. Jednoduchosť skladovania a prevozu vzoriek DBS je veľmi prínosná v prípade analýzy vzoriek v rozvojových krajinách, kde je transport za zníženej teploty vo väčšine prípadov neuskutočiteľný.

Ďalšou z výhod tejto techniky odberu vzorky je minimálne množstvo biologického materiálu potrebného k vytvoreniu krvnej škvrny. Pri klasickom odbere plnej krvi je nutný odber niekoľkých mililitrov. Miesto toho pri vzorkách DBS postačuje len niekoľko kvapiek (objem v desiatkach mikrolitrov), čo je veľmi prínosné, mimo iné aj v prípade experimentálnej práce so zvieratami, kedy je počet vzoriek obmedzený ako z fyziologického, tak aj z etického hľadiska. Pre lepšiu predstavu, priemerný objem krvi v tele laboratórnej myši je iba 1,5 ml. Pri nutnosti odberu viacerých vzoriek, napríklad pri sledovaní metabolizmu či účinku liečiv, je preto využitie DBS vzoriek viac než žiadané. Táto technika odberu vzorky je v súlade s 3R princípom (z angl. *r*eplacement, *r*eduction, *r*efinement), ktorého úlohou je zníženie počtu experimentov na zvieratách, či aspoň zlepšenie zaobchádzania s nimi.

Malé množstvo biologického materiálu k analýze vyžaduje použitie veľmi citlivých analytických techník, čo s ohľadom na veľmi rýchly rozvoj v tejto oblasti nie je dnes už vo väčšine prípadov problém. Viditeľne sa znižuje aj množstvo použitých chemikálií pri spracovaní a analýze takýchto vzoriek, čo je ekologicky aj ekonomicky prínosné. Práve kvôli nízkej kvantite analytov vo vzorke, možnej zmene ich štruktúry či ich úplnej degradácii, môže byť však analýza vzoriek DBS náročná. V niektorých prípadoch dokonca nemusí byť možné analyty z takéhoto typu vzorky stanoviť. Preto o DBS nemožno uvažovať ako o plnohodnotnej náhrade za vzorky plnej krvi či plazmy, ale len ako o vhodnej alternatíve pri niektorých konkrétnych vyšetreniach.

Jednou z nevýhod používania vzoriek DBS je potreba zavedenia referenčných hodnôt pre takýto typ materiálu a nemožnosť porovnania hladín vybraných analytov s výsledkami získanými z analýzy plazmy či plnej krvi. Ďalšou je vplyv matrice (celulóзовý filtračný papier) na extrakciu analytov, či rozdielne hodnoty hematokritu (HCT) v populácii. Ten má podľa rôznych štúdií vplyv na homogénne šírenie krvi filtračným papierom pri vzorkovaní a s ním spojenú migráciu analytov.

1.1.2 Odberový papier

Odberový filtračný papier pre aplikáciu vzoriek DBS musí spĺňať veľmi prísne kritériá kontroly kvality. Požadovanými vlastnosťami sú celistvosť, nulové chemické vylúhovanie a čo najmenší chromatografický efekt. Na trhu je niekoľko typov komerčne dostupných papierov, ktoré sa však môžu líšiť hrúbkou či veľkosťou pórov a ovplyvniť tak nasiakavosť papiera (Li a Tse, 2010). Ale tak ako je zachovaná porovnateľnosť odberových papierov v rámci jednej šarže, či medzi šarzami navzájom, by mali byť porovnateľné aj výsledky analýzy vzoriek DBS odobratých na filtračný papier rôznych výrobcov (Mei *et al.*, 2010). Niektoré štúdie ale podotýkajú, že tomu tak nie je. Najmä pri extrémnych hodnotách HCT či extrémne vysokých (prípadne nízkych) hladinách sledovaného analytu, sa výsledky môžu líšiť (Koster *et al.*, 2015; Rottinghaus *et al.*, 2014). Koster *et al.* napriek rozdielom vo výsledkoch naznačujú, že všetky testované papiere vykazovali rovnakú hodnotu HCT a podobnú závislosť výťažnosti na koncentrácii.

Filtračný papier pre odber vzoriek DBS je vyrobený zo 100% bavlny, ktorej chemickou podstatou je polysacharid zložený z niekoľkých monomérov D-glukózy, celulóza. V literatúre možno nájsť aj pokusy o použitie iných typov nosičov, ako je napríklad chromatografický papier (Shen *et al.*, 2012), alebo dokonca materiály nezaložené na báze celulózy, ako napríklad sklo (Crawford *et al.*, 2011), avšak ich použitie nie je významné. Glukózové podjednotky celulózy vytvárajú medzi sebou vodíkové väzby ako v rámci jedného polymérneho vlákna, tak aj medzi polymérnymi reťazcami celulózy navzájom. V suchom stave je teda polymér pevne viazaný k ďalším zložkám celulózy, ale prídavok vody či iných hydrofilných rozpúšťadiel spôsobuje bobtnanie. Dochádza k narušeniu vodíkovej väzby, disperzii rozpúšťadla do medzier a zväčšeniu objemu pórov. Po vysušení sa celulóza vráti do pôvodného stavu, avšak so zachytenými molekulami. Malé molekuly tak môžu cez vodíkové väzby priamo interagovať s celulózou alebo vyplniť medzery v štruktúre filtračného papiera. Zvýšený počet akceptorov vodíkových väzieb umožní väčšiu afinitu analytov k celulóze, čo môže viesť k menej efektívnej extrakcii (Li a Tse, 2010).

V prípade NS sa pre odber vzoriek DBS používa neošetrený filtračný papier. S cieľom zvýšiť efektívnosť extrakcie alebo stabilitu molekúl, či iným spôsobom pozitívne ovplyvniť charakter vzorky DBS, však môžu byť filtračné papiere chemicky ošetrené, a to buď priamo od výrobcu alebo manuálne pred odberom vzorky (aplikáciou vhodnej chemikálie a následným usušením na vzduchu). Chemicky ošetrené papiere boli pôvodne navrhnuté pre analýzu

nukleových kyselín a mali zabezpečiť lýzu buniek, denaturáciu proteínov alebo inaktiváciu patogénov (Wagner *et al.*, 2016).

1.1.3 Príprava vzorky suchej kvapky krvi

Koža v mieste vpichu musí byť pred samotným odberom vzorky dostatočne prekrvená, čoho možno docieľiť zahriatím a vhodnou masážou, ktorá zvýši prietok krvi k požadovanému miestu. Vzorka môže byť odobraná z prsta (dlaňová časť 3. alebo 4. prstu menej dominantnej ruky), ušného laloku či päty novorodenca. Pred samotným odberom je nutné miesto vpichu vydezinfikovať alkoholom a nechať voľne uschnúť. Koža je následne prepichnutá do hĺbky približne 2 mm jednorazovou sterilnou lancetou alebo ihlou. Prvá kvapka krvi sa otrie sterilným tampónom. Ďalšia dostatočne veľká kvapka krvi, vytvorená spontánne, bez stláčania, aby nedošlo k prímеси tkanivového moku, sa aplikuje na odberový filtračný papier jednorazovým priložením na vyznačenú plochu. Pokiaľ je to možné, plocha by mala byť homogénne zaplnená iba jednou kvapkou krvi. Z oboch strán by mala vykazovať rovnakú červenú farbu. Je nežiadúce dotýkať sa vyznačenej plochy pred aplikáciou vzorky, či po nej, aby nedošlo ku kontaminácii. Po aplikácii vzorky sa odberová kartička nechá 2-3 hodiny voľne zaschnúť v horizontálnej polohe tak, aby bola mimo dosah priameho slnečného žiarenia či iného zdroja tepla. Po zaschnutí môžu byť vzorky prekryté ochrannou vrstvou a uskladnené za požadovanej teploty v plastovom obale s možnosťou voľného prístupu vzduchu (nie hermeticky uzavreté obaly) (Deep *et al.*, 2012; Grüner *et al.*, 2015; Li a Tse, 2010; Mei *et al.*, 2001).

Vzorka DBS môže byť pripravená aj zo skúmavky s plnou krvou, a to maximálne 24 hodín po odbere. Krv je v tomto prípade dávkovaná v konkrétnom objeme kalibrovanou pipetou a jednorazovou plastovou špičkou zo vzdialenosti niekoľkých milimetrov nad odberovým filtračným papierom. Celý objem vzorky by mal byť dávkovaný plynule s prvým kontaktom krvi a filtračného papiera. Tento prípad prípravy vzorky DBS stráca výhodu neinvazívnosti odberu, avšak môže byť prínosný v prípade, že je odber plnej krvi vyžadovaný z dôvodu iného vyšetrenia a vzorka DBS umožňuje jednoduchší transport do vzdialeného laboratória. Podmienky schnutia a manipulácie so vzorkou sú rovnaké ako v predchádzajúcom prípade (Grüner *et al.*, 2015; Li a Tse, 2010).

1.1.4 Skladovanie vzoriek suchej kvapky krvi a stabilita analytov

Kvalita pripravených vzoriek DBS rapídne klesá vplyvom príliš vysokých teplôt či vlhkosti vzduchu, ktoré môžu podnietiť degradáciu analytov či rast baktérii a následne spôsobiť odchýlky v extrakcii. Z tohto dôvodu by vzorky mali byť pred uskladnením dostatočne vysušené a pred vzdušnou vlhkosťou chránené aj počas skladovania, a to pridaním desikantu. Skladové podmienky môžu byť monitorované pridaním indikátoru vlhkosti. Rizikové pre vzorky DBS je aj uskladnenie v hermeticky uzavretých nádobách či ich dlhšie státie v poštových schránkach v prípade zaslania poštou. Stabilita analytov môže byť pozitívne ovplyvnená znížením teploty skladovania z izbovej na 4 °C, či dokonca uchovávaním v mraziacom boxe pri -20 alebo -80 °C. (Deep *et al.*, 2012; Li a Tse, 2010; Mei *et al.*, 2001).

Pri rozhodovaní o použití vzoriek DBS je kľúčovou práve informácia o stabilite molekúl. Väčšina molekúl vykazuje v tekutej vzorke nižšiu stabilitu než po zaschnutí na filtračnom papieri. Hlavne pre stabilné molekuly preto technika DBS predstavuje vhodný spôsob dlhodobej konzervácie. Avšak menej stabilné molekuly môžu počas schnutia pozmeniť svoju štruktúru alebo úplne degradovať, čo je nežiaduce. V niektorých prípadoch sa dá stabilita pozitívne ovplyvniť súčasným pridaním ďalších, stabilizujúcich látok k vzorke samotnej alebo ich aplikáciou na filtračný papier ešte pred odberom vzorky (Li a Tse, 2010; Holen *et al.*, 2016; McDade *et al.*, 2007). Príkladom môže byť ošetrovanie filtračného papiera dithiotreitolom s cieľom stabilizovať molekulu glutationu. Ten bez prídavku redukčného činidla podlieha neenzymatickej oxidácii a enzymatickej degradácii (Kand'ár *et al.*, 2015). Podobne môže byť spomalená aj peroxidácia polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) prídavkom butylovaného hydroxytoluénu (BHT) (Metherel *et al.*, 2013).

Potrebu individuálneho prístupu k uskladneniu vzoriek DBS s ohľadom na stanovovaný analyt možno demonštrovať na niekoľkých príkladoch. Enzýmy zväčša pri vysokých teplotách podliehajú veľmi rýchlej degradácii. Výnimkou sú však lyzozomálne enzýmy, ktoré vykazujú dobrú stabilitu aj pri izbovej teplote, a preto môžu byť vzorky DBS využité k diagnostike lyzozomálnych ochorení (Lukacs *et al.*, 2003; Sewell *et al.*, 2012). C-reaktívny proteín (CRP) degraduje už po 3 dňoch skladovania za izbovej teploty. Avšak zníženie teploty na -20 °C predlžuje jeho stabilitu až na 1 rok (Brindle *et al.*, 2010; McDade *et al.*, 2004). Zatiaľ čo DNA je stabilná po dobu minimálne 1 roku aj pri teplote 37 °C, vo väčšine prípadov RNA v takýchto podmienkach degraduje. Jej stabilitu však možno zvýšiť uskladnením pri -70 °C (Aitken *et al.*, 2015; Leelawiwat *et al.*, 2009). Pokiaľ nie sú aminokyseliny (AK) v DBS vzorkách vystavené extrémnym podmienkam (teplota, vlhkosť), možno ich označiť za dlhodobo stabilné

(Strnadová *et al.*, 2007; Golbahar *et al.*, 2014). Väčšina ketokyselín (KK) je relatívne stabilná vo forme solí, ale ako voľné kyseliny môžu vykazovať nestabilitu a podliehať dekarboxylácii a polymerizácii (Cooper *et al.*, 1983). Ich stabilita vo vzorkách DBS nie je dostatočne zmapovaná. Autori jednej štúdie uvádzajú, že pyruvát je vo vzorkách DBS stabilný pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu minimálne 30 dní (Chuang *et al.*, 2009). Mastné kyseliny (MK) sú vo vzorkách DBS taktiež relatívne stabilné. Problematické sú ale PUFA, ktoré, ako bolo spomenuté vyššie, podliehajú peroxidácii. Ich stabilitu možno zvýšiť prídavkom BHT (Metherel *et al.*, 2013).

1.1.5 Vplyv hematokritu

Často diskutovaným problémom pri zavádzaní vzoriek DBS do praxe je vplyv HCT. Ten je úzko spojený s vlastnosťami krvi, a preto môže ovplyvniť jej správanie pri vzorkovaní na odberový filtračný papier. Vysoká hodnota HCT sa spája s vyššou viskozitou krvi, čo má za následok jej horšiu adsorpciu a šírenie filtračným papierom v porovnaní so vzorkami s nízkou hodnotou HCT. Objem krvi vo vyrazenom terčíku preto nemusí byť z tohto dôvodu jednotný (Deep *et al.*, 2012; de Kesel *et al.*, 2014; Chace *et al.*, 2014; Li a Tse, 2010). S tým môže súvisieť aj problém rozdielnej distribúcie sledovaného analytu vo vzorke DBS. Niektoré štúdie preto upozorňujú aj na dôležitosť výberu miesta vyrazenia terčíku (Holub *et al.*, 2006; O'Mara *et al.*, 2011). Holub *et al.* (2006) v súvislosti s rozdielnou hodnotou HCT vo vzorkách zaznamenali, že pokiaľ je vzorka DBS pripravená z krvi s nízkou hodnotou HCT, koncentrácia aminokyselín na okraji krvnej škvŕny je vyššia než v jej prostriedku.

Hodnota HCT je percentuálnym vyjadrením obsahu erytrocytov v celkovom objeme krvi. Líši sa nielen medzi jednotlivcami, ale je ovplyvnená aj zdravotným stavom každého človeka. U mužov je zvyčajná hodnota HCT $46\pm 6\%$, u žien $41\pm 5\%$. U určitých skupín (napríklad novorodenci, deti od 2 do 12 rokov) môže však hodnota HCT kolísať v rozmedzí 28-67 %. Navyše kapilárna krv v porovnaní s venóznou vykazuje vyššie hodnoty HCT (Denniff a Spooner, 2010; Kayiran *et al.*, 2003; Li a Tse, 2010; Walker *et al.*, 1990).

Jedným zo spôsobov, ako sa s týmto problémom vyrovnáť, je testovanie rozličných hodnôt HCT priamo pri validácii analytickej metódy a následné určenie rozmedzia, pre ktoré metóda poskytuje platné výsledky. Pri analýze vzoriek DBS by teda vždy musela byť stanovená aj hodnota HCT, aby bolo možné overiť správnosť metódy. Pokiaľ sa vzorky pripravujú z nezáraňlivej venóznej krvi, nie je problém zmerať hodnotu HCT priamo zo skúmavky s plnou krvou. V prípade prípravy vzorky punkciou prstu je však nutné zvoliť alternatívnu metódu. Možno napríklad zmerať koncentráciu draslíku, ktorého hladina koreluje s hodnotou

HCT. Ďalšou možnosťou ako predísť problému s efektom HCT je analýza celej vzorky DBS po pipetovaní konkrétneho objemu na odberový filtračný papier. Tento spôsob ale znemožňuje odber krvi pacientom doma, čo je uvádzané ako jedna z hlavných výhod používania vzorky DBS. S cieľom minimalizovať vplyv hodnoty HCT by mali byť aj kalibrátory pripravené z krvi s hodnotou HCT približne rovnou očakávanému mediánu testovanej populácie (Capiou *et al.*, 2013; den Burger *et al.*, 2015; de Kesel *et al.*, 2014; Denniff a Spooner, 2010).

1.1.6 Extrakcia vybraných analytov zo vzorky suchej kvapky krvi

Extrakcia analytov z pevnej (matrica filtračného papiera) do kvapalnej fázy (extrakčné rozpúšťadlo) predstavuje jeden z najkritickejších krokov v spracovaní vzorky DBS. V literatúre možno nájsť zmienky o extrakcii celej krvnej škvrny (Fan a Lee, 2012) alebo o použití takzvaných perforovaných (Li *et al.*, 2011a) či dokonca pred-vyrazených (Youhnovski *et al.*, 2011) vzoriek DBS, ale ich použitie nie je v praxi bežné. Obyčajne spracovanie vzorky začína vyrazením terčiku o priemere 3-8 mm z prostriedku vzorky DBS (Deep *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2010). Počet vyrazených terčikov sa môže s ohľadom na senzitivitu použitej metódy líšiť. Nasleduje extrakcia analytu, a ak je to nutné, jeho derivatizácia, pričom tieto dva kroky môžu byť vykonané v ľubovoľnom poradí.

Extrakčné činidlo je vybrané na základe fyzikálno-chemických vlastností. Jeho úlohou je opätovné rozpustenie analytov nášho záujmu, preto by malo byť dostatočne silné, aby prerušilo väzby medzi molekulami analytu a matricou filtračného papiera (Deep *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2013; Li a Tse, 2010). Bežne sa k extrakcii používajú organické rozpúšťadlá (napríklad methanol, hexán a iné) (Faller *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2012), vodné pufre (fosfátový pufor, pufre s obsahom solí a iné) (Jacomelli *et al.*, 2002; Kapur *et al.*, 2008), zmesi organických rozpúšťadiel a vodných roztokov či komerčne dostupné kity (Khan *et al.*, 2013a). Pre zvýšenie efektivity extrakcie možno použiť ultrazvuk či vortex, zmeniť pH, pridať k rozpúšťadlu povrchovo-aktívne látky (napríklad Tween, Triton X) alebo chelatačné činidlo (napríklad EDTA) (Lehmann *et al.*, 2013).

Manuálna extrakcia väčšieho počtu vzoriek DBS môže byť zložitá a časovo náročná. Súčasný technologický stav však neumožňuje automatizáciu spracovania veľkého počtu vzoriek a on-line zapojenie s analytickým prístrojom. Alternatívou by mohla byť priama analýza vzoriek bez predchádzajúcej extrakcie, napríklad desorpčná ionizácia elektrosprejom (DESI) (Siebenhaar *et al.*, 2015; Wiseman a Kennedy, 2014; Wiseman *et al.*, 2010), priama analýza v reálnom čase (DART) (Crawford *et al.*, 2010), desorpcia/ionizácia laserom za účasti

matrice (MALDI) (Kobrynski *et al.*, 2016) a podobne. Avšak priama analýza vzorky bez predchádzajúcej separácie a bez odstránenia interferujúcich látok môže mať negatívny vplyv na citlivosť stanovenia. Preto je vo väčšine štúdií dodnes stále využívaná manuálna off-line extrakcia (Abu-Rabie, 2011; Déglou *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2010; Zimmer *et al.*, 2013).

Analyty môžu byť s ohľadom na ich vlastnosti a zvolený detektor pred separačným krokom derivatizované. Prípadne môže byť derivatizačné činidlo pridané k vzorkám DBS ešte pred samotnou extrakciou. Keďže nie je presne známe, aké reakcie môžu prebehnúť medzi derivatizačným činidlom a maticou filtračného papiera, je vhodné tento postup zvážiť. Hlavne veľmi agresívne derivatizačné činidlá, ako napríklad acetylchlorid, by mohli nečakane poškodiť filtračný odberový papier a negatívne tak ovplyvniť celý proces spracovania a analýzy vzorky (Li a Tse, 2010; Marangoni *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2016).

1.1.6.1 Použitie interného štandardu

Úlohou interného štandardu (IS) je odrážať správanie stanovovaných analytov a kompenzovať prípadné straty vzniknuté pri spracovaní vzoriek či spôsobené vplyvom matrice. Ideálne by IS mala byť stanovovaná látka značená stabilným izotopom. K jej detekcii je ale potrebný hmotnostný spektrometer (MS). Ekonomicky šetrnejšou metódou je teda použitie látky s čo najpodobnejšou štruktúrou a fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktorá sa prirodzene v analyzovanej vzorke nevyskytuje.

Správne pridanie IS k vzorkám DBS môže byť komplikované. Hoc v súčasnosti najpoužívanejšia metóda, pridanie IS do extrakčného rozpúšťadla s prvým krokom extrakcie, má reprodukovateľné výsledky, dá sa povedať, že v skutočnosti neodráža celkové správanie analytu. Za prvé, nedokáže zachytiť a reflektovať prípadnú degradáciu analytu počas doby skladovania a za druhé, neodráža správanie a možnú stratu analytu pri extrakcii vzorky. Preto sa v literatúre objavilo niekoľko pokusov o hľadanie prijateľnej alternatívy. Z analytického hľadiska by mal byť IS pridaný k vzorkám čo najskôr. V praxi to znamená spoločne s krvou pri príprave vzoriek DBS alebo tesne predtým. IS by mal bezproblémovo interagovať ako s krvou samotnou, tak aj s maticou filtračného papiera bez toho, aby ovplyvnil charakter pôvodnej vzorky (napríklad chromatografickým efektom). Podľa jednej z publikácií možno pridaním IS priamo do vzorky tekutej krvi dosiahnuť o niečo lepšie výsledky v porovnaní s metódou prídavku IS do extrakčného rozpúšťadla (van Baar *et al.*, 2013). Tento spôsob predpokladá úplné začlenenie IS do matrice krvi. V praxi je však takáto aplikácia IS veľmi

náročná z dôvodu zložitosti celej procedúry, ktorá by vyžadovala odber školenou osobou. Liu *et al.* preto navrhli použitie malých sklenených kapilár pokrytých z vnútornej strany vrstvou IS, ktoré by mali túto procedúru uľahčiť. Krv je do kapiláry natiiahnutá priložením konca kapiláry ku kvapke vytvorenej po punkcii a po interakcii s IS je koniec kapiláry priložený k filtračnému papieru pre vytvorenie DBS (Liu *et al.*, 2013). Ďalšou možnosťou, ktorá vykazuje výsledky porovnateľné s aplikáciou IS v prvom extrakčnom kroku, je pridanie IS na filtračný odberový papier v samostatnom kroku buďto pred alebo po aplikácii vzorky krvi, a to buď pipetovaním alebo sprejovaním. Výsledky výskumu naznačujú, že vhodnejšia je aplikácia IS pred odberom vzorky krvi. Z pohľadu distribúcie IS je vhodnejšia technika sprejovania. Navyše sa takýmto spôsobom možno vyhnúť nežiadaným chromatografickým efektom (Abu-Rabie, 2011; Abu-Rabie *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; van Baar *et al.*, 2013; Zimmer *et al.*, 2013).

1.1.7 Využitie techniky suchej kvapky krvi v praxi

Vzorka DBS sa štandardne používa k včasnej detekcii rozličných genetických a metabolických porúch novorodencov s cieľom zabrániť nezvratným zmenám organizmu alebo aspoň zmierniť príznaky ochorenia. Kapilárna krv z pätičky novorodenca je odobraná na filtračný papier zväčša 24-48 hodín po narodení a následne analyzovaná tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS/MS). Sledovanie zmeny koncentrácie jednotlivých analytov nemá taký informatívny charakter ako súčasné monitorovanie niekoľkých biomarkerov a ich vzájomné porovnanie. Tieto metabolické vzorce sú následne vyhodnocované vo vzťahu k rôznym ochoreniam (Carpenter a Wiley, 2002; Chace *et al.*, 2003; Deep *et al.*, 2012; Li a Tse, 2010; Morris *et al.*, 2014; Rinaldo *et al.*, 2008).

Metabolomika je pomerne nová vedná disciplína umožňujúca komplexné zmapovanie aktuálneho stavu organizmu. Kvalifikácia a kvantifikácia metabolitov v čase má veľký význam v skorom odhalení nádorových ochorení, predikcii vývoja ochorenia alebo monitorovaní úspešnosti liečby. Vzhľadom na potrebu analýzy veľkého množstva vzoriek pri hľadaní nových biomarkerov sa vzorka DBS ukazuje ako vhodná alternatíva (Jayavelu a Bar, 2014; Lima *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Už niekoľko štúdií naznačilo, že v tomto obore sú vzorky DBS schopné plne nahradiť vzorky plazmy (Kong *et al.*, 2011; Zukunft *et al.*, 2013). Možno ich použiť aj v metabolickom skríningu *post mortem*, napríklad v prípade náhlej smrti z neznámej príčiny (Chace *et al.*, 2001).

Cieľom toxikologických štúdií je určiť vzťah medzi chemickou zlúčeninou vstupujúcou do organizmu za určitým účelom a jej osudom v ňom (cesta, akou bude zlúčenina

metabolizovaná a vylúčená z organizmu). Veľmi často sú v týchto štúdiách nutné experimenty na zvieratách a práve vzorky DBS spĺňajú požiadavky 3R princípu, redukujú množstvo potrebného biologického materiálu a znižujú aj finančné náklady spojené s takýmto výskumom (Stove *et al.*, 2012). Ďalším odvetvím toxikológie je terapeutické monitorovanie liečiv. Pri podávaní farmaceutík je niekedy nutné sledovať hladinu aktívnej látky v organizme, aby sa dosiahlo čo najlepšieho účinku a pritom zamedzilo poškodeniu organizmu predávkovaním. Možnosť takmer bezbolestného odberu vzorky samotným pacientom je veľmi výhodná. Je však nutné minimalizovať riziko kontaminácie pri príprave vzorky, pokiaľ osoba dávajúca farmaceutikum a pripravujúca vzorku DBS je jedna a tá istá. Výsledky získané analýzou vzoriek DBS sú porovnateľné s plazmou. Možno preto dedukovať, že technika DBS je aj v tomto prípade vhodnou alternatívou (Kukec *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2017; Wilhelm *et al.*, 2014). Techniku DBS možno použiť aj vo forenznej toxikológii, napríklad pri skríningu užívania návykových látok ako kanabinoidy (Mercolini *et al.*, 2013), kokaín (Mercolini *et al.*, 2010), opiáty (Antelo-Dominiguez *et al.*, 2013) a podobne (Sadones *et al.*, 2014). Perspektívu má aj skríning fosfatidylethanolu, priameho metabolitu ethanolu, vo vzorkách DBS. Či už ako kontrola požitia alkoholu u účastníkov cestnej premávky alebo ako skríning novorodencov, u ktorých je predpokladaná prenatálna expozícia alkoholu (Bakhireva *et al.*, 2014; Bakhireva *et al.*, 2016; Sadones *et al.*, 2014).

Jednoduchosť a dostupnosť je dôvodom použitia vzoriek DBS aj v epidemiologických štúdiách. Pri procese schnutia dochádza k poškodeniu obalu vírusov, čo znižuje riziko infekcie pri práci s biologickými vzorkami. Naopak protilátky a nukleové kyseliny sú procesom schnutia dobre konzervované a umožňujú detegovať rozličné infekčné ochorenia (Parker a Cubitt, 1999), napríklad osýpky (Uzicanin *et al.*, 2011), ružienku (Hardelid *et al.*, 2008) či dokonca ebolu (Sarkar *et al.*, 2015). Vzorky DBS by mohli napomôcť aj zmonitorovaniu aktuálnej epidemiologickej situácie, či už asymptomatických ochorení alebo ochorení s dlhou inkubačnou dobou, ako napríklad AIDS (analýza HIV), chronická hepatitída (analýza HCV) a podobne (Toledo *et al.*, 2005).

1.2 Metódy stanovenia aminokyselín

AK sú základnou stavebnou zložkou proteínov, avšak spolu so svojimi derivátmi plnia mnoho ďalších biologických funkcií (napríklad chemickí poslovia v komunikácii medzi bunkami, medziprodukty metabolických pochodov a podobne). Do dnešného dňa bolo identifikovaných niekoľko stoviek rozličných AK, avšak na kódovaní proteínov sa podieľa len 21 z nich.

S výnimkou prolínu majú všetky AK na rovnakom uhlíkovom atóme naviazanú karboxylovú aj primárnu amino skupinu, preto sú označované ako α -aminokyseliny. Rovnako všetky, ale s výnimkou glycínu, majú centrum asymetrie, a preto sú opticky aktívne. Všetky α -AK obsiahnuté v bielkovinách majú formu L. D-AK sa vyskytujú v rastlinách a baktériách a tiež sú zložkou niektorých antibiotík (napr. valinomycin). Žiadna aminokyselina neabsorbuje vo viditeľnej oblasti elektromagnetického spektra, niekoľko z nich absorbuje v blízkej UV oblasti, ale nie vo významnej miere (Buha *et al.*, 2011; Garrett a Grisham, 2010; Voet a Voetová, 1995).

Väčšina metód využíva pri stanovení AK pred- alebo post- kolónovú derivatizáciu, a to kvôli zlepšeniu detekcie či chromatografickej separácie. Ideálne, ak derivatizácia prebieha v on-line zapojení so separačným krokom, čím sa zníži nutnosť manipulácie so vzorkou a eliminuje sa tiež prípadný problém s nestabilitou derivátov (Agrafiotou *et al.*, 2009; Bartolomeo a Maisano, 2006). Výhodou pred-kolónovej derivatizácie je neobmedzený čas priebehu reakcie, za predpokladu, že vznikajúce deriváty sú dostatočne stabilné. Neprimerane dlhá derivatizácia však môže znížiť reprodukovateľnosť a presnosť celej metódy. Reakcia by mala prebiehať za miernych reakčných podmienok (teplota, pH) a v rámci možností by mala byť selektívna. Vznik vedľajších produktov je nežiadúci, prípadný nadbytok derivatizačného činidla musí byť na kolóne dobre separovaný od produktov reakcie. Reakcia prebieha u všetkých AK súčasne, takže premena na derivatizačné produkty nemusí byť jednotná a relatívne koncentrácie týchto derivátov nemusia odpovedať pôvodným koncentráciám AK vo vzorke (Nováková, 2013; Rigas, 2013). Ďalšou možnosťou je post-kolónová derivatizácia, ktorá sa veľmi často používa v prípade nízkej stability produktov derivatizačnej reakcie. Na rozdiel od predchádzajúcej, táto reakcia môže prebiehať aj pri extrémnych teplotách či hodnotách pH, selektivita sa striktne nevyžaduje a vznik vedľajších produktov nepredstavuje problém. Musí ale prebiehať rýchlo. Za kolónou je už vzorka rozdelená, takže derivatizácia každej aminokyseliny prebieha zvlášť a je tak u všetkých AK jednotná (Blachier *et al.*, 2013; Csapó *et al.*, 2008; Nováková, 2013; Rigas *et al.*, 2013). Výber derivatizačného činidla závisí zväčša na voľbe typu separácie a tiež detekcie.

Jedným z najčastejšie používaných činidiel pre derivatizáciu AK je *o*-ftaldialdehyd (OPA). Reaguje iba s primárnymi AK. Reakcia so sekundárnymi AK sa dá zabezpečiť kombináciou dvoch derivatizačných činidiel, OPA a 9-fluorenyl-methyloxykarbonylchloridom (FMOC), alebo použitím chlórnanu sodného či vápenatého, ktoré pred reakciou s OPA premieňajú sekundárne amíny na primárne (Buha *et al.*, 2011; Pickering, 1989). OPA reaguje s AK v prítomnosti tiolových skupín za vytvorenia vysoko fluorescenčných produktov, tio-2-alkyl-

substituovaných izoindolov. Kvôli častým spontánnym prešmykom sa však tieto deriváty nevyznačujú vysokou stabilitou. Derivatizačná reakcia prebieha pri laboratórnej teplote a v prostredí s hodnotou pH asi 10. Ako SH-aditívum sa najviac používa 2-merkптоethanol (2-ME). V zmesi s OPA tvoria vysoko citlivé činidlo s dobrou selektivitou, schopné reagovať s väčšinou AK. Ďalšími nukleofilnými činidlami sú ethanthiol, 2-dimethylaminoethanthiol, 3-merkptopropiónová kyselina (3-MPA) a *N*-acetyl-L-cysteín (Hanszkó *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008, Rigas, 2013). Deriváty AK po reakcii s OPA možno detegovať fluorescenčne pri vlnovej dĺžke 330/465 nm (excitácia/emisia). Reakcia sa využíva v pred- aj post-kolónovej derivatizácii (Bartolomeo a Maisano, 2006; Blachier *et al.*, 2013; Hanczkó *et al.*, 2007; Molnár-Perl a Bozor, 1998; Pickering, 1989; Rigas, 2013).

Štruktúrne podobným derivatizačným činidlom je naftalén-2,3-dikarboxaldehyd (NDA), ktorý taktiež reaguje iba s primárnymi AK. Podmienkou priebehu reakcie je prítomnosť nukleofilných činidiel: kyanidov alebo 2-ME. Reakcia prebieha pri laboratórnej teplote a hodnote pH približne 9. Výsledným produktom derivatizačnej reakcie je *N*-2-substituovaný-1-kyanobenzizoindol (CBI), ktorý môže byť detegovaný na základe chemiluminiscenčných alebo fluorescenčných vlastností pri excitačnej vlnovej dĺžke 424 nm a emisnej vlnovej dĺžke 494 nm. Produkty reakcie AK s NDA sú stabilnejšie než pri reakcii s OPA. Detekčný limit je v porovnaní s inými činidlami nižší. Toto derivatizačné činidlo možno použiť v kombinácii s pred- aj post- kolónovou derivatizáciou (Rammouz *et al.*, 2007; Zotou a Notou, 2012; Zotou a Notou, 2013).

Z praktického hľadiska je najjednoduchšia priama detekcia AK, kedy sa elimináciou derivatizačného kroku zvýši rýchlosť celej analýzy a odstráni sa tiež problém s vedľajšími produktmi derivatizačnej reakcie či prípadným zvýškom derivatizačného činidla pri detekcii. Takúto detekciu umožňuje spojenie elektroforetických alebo chromatografických separačných metód s **hmotnostne spektrometrickým detektorom (MS)** (Giordano *et al.*, 2019; Jeong *et al.*, 2013; Soga a Heiger, 2000), prípadne iba samotná MS analýza vzorky v zapojení viacerých detektorov za sebou, známom ako tandemová hmotnostná spektrometria (Wang *et al.*, 2012). Práve MS/MS analýza AK (a acylkarnitínov) je neoddeliteľne spätá s diagnostikou vrodených metabolických porúch novorodencov v programe NS.

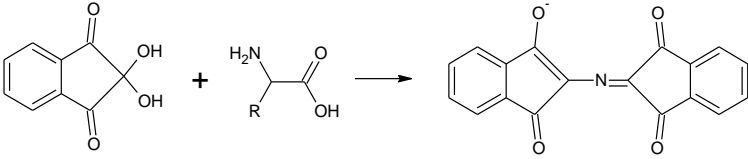
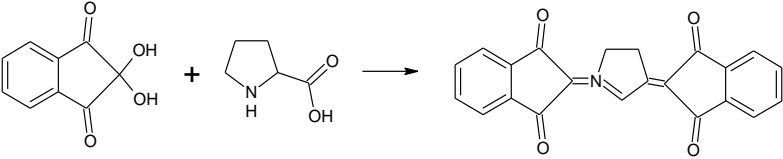
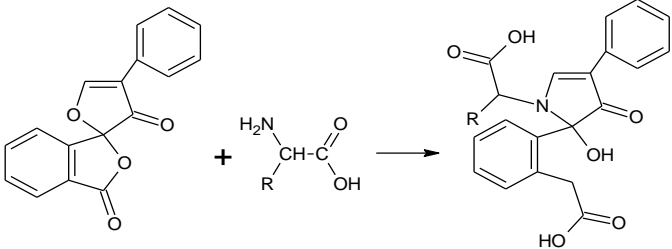
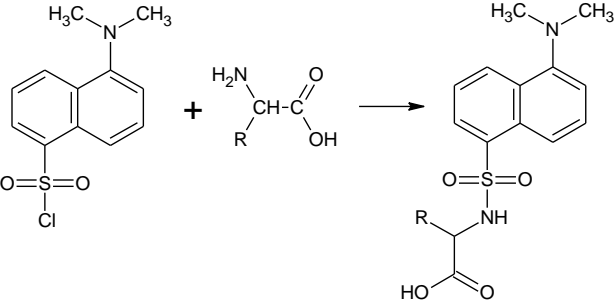
Plynová chromatografia (GC) je separačná metóda, ktorá sa využíva k analýze prchavých látok. Keďže AK takúto vlastnosť nemajú, je pred separáciou potrebná ich derivatizácia. Medzi hlavné derivatizačné metódy patrí silylácia, alkylácia a acylácia, pričom prvá spomenutá je z nich najpoužívanejšia. Hlavnou nevýhodou tejto derivatizačnej techniky je citlivosť na vlhké prostredie.

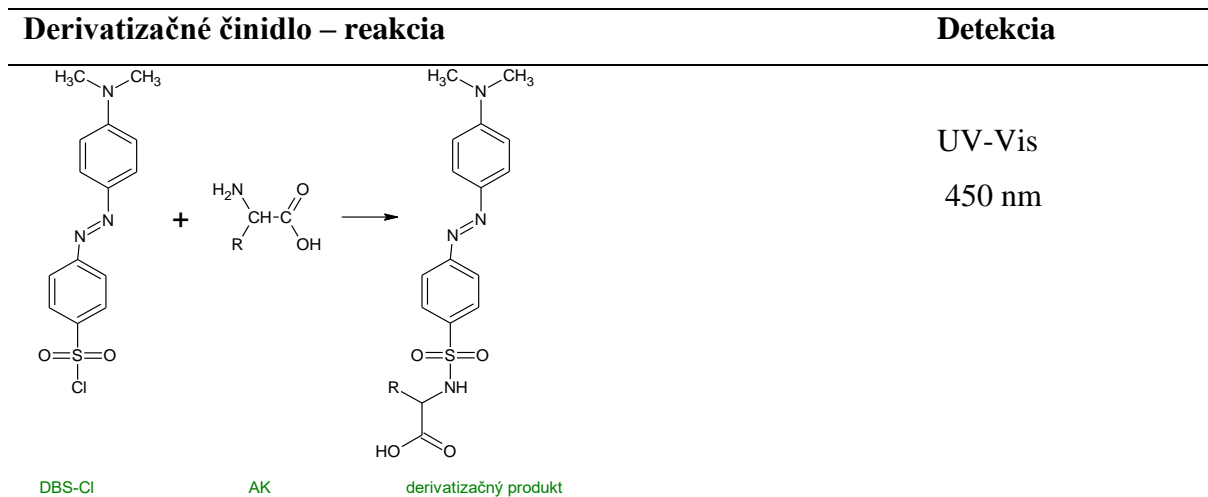
Reakcia prebiehajúca v takomto prostredí je slabá a jej produkty sú nestabilné (Blachier *et al.*, 2013; Botros *et al.*, 2009; Pasikanti *et al.*, 2008; Stenerson, 2011).

Kapilárna elektroforéza (CE) rovnako ako **iónovo-výmenná chromatografia (IEC)** využívajú amfotérny charakter AK. Karboxylová skupina má hodnotu pKa v rozmedzí 1,7 - 2,4 a pKa aminoskupiny sa pohybuje v rozmedzí 8,7 - 10,5. AK je teda možné stanoviť v kyslom prostredí (pH \approx 2) ako katióny, alebo v zásaditom prostredí (pH \approx 9) ako anióny. Na základe týchto vlastností sú teda AK najskôr separované a až následne derivatizované. Deriváty možno detegovať fluorescenčným, vodivostným, elektrochemickým, prípadne MS detektorom (Blachier *et al.*, 2013; Buha *et al.*, 2011; Csapó *et al.*, 2008; Tůma a Samcová, 2007). Jednou z najčastejšie používaných techník pre separáciu AK je **vysokoučinná kvapalinová chromatografia na reverznej fáze (RP-HPLC)**. Tá využíva rozdielnej afinity zložiek separovanej zmesi k stacionárnej kolóne, ktorá je v tomto prípade nepolárna. Detekcia môže byť refraktometrická, spektrofotometrická, chemiluminiscenčná, vodivostná, MS či fluorescenčná. Príklady derivatizačných činidiel, ktoré možno použiť pri týchto technikách separácie, sú uvedené v Tab. 1 (Biermann *et al.*, 2013; Blachier *et al.*, 2013; Buha *et al.*, 2011; Csapó *et al.*, 2008; Nováková, 2013).

Najnovšie trendy v analýze AK z biologických vzoriek zhrňuje prehľadný článok autorov Song *et al.* (Song *et al.*, 2018). V podstate všetky metódy stanovenia AK z biologických vzoriek môžu byť aplikované aj na analýzu vzoriek DBS. Je ale nutné počítať s menším objemom analyzovanej vzorky (desiatky mikrolitrov), a teda nižšou kvantitou stanovovaných analytov. Aplikované metódy by preto mali byť dostatočne citlivé. V NS našla uplatnenie metodika MS/MS (Wang *et al.*, 2012), v ďalších štúdiách potom prevažne HPLC metódy s rôznymi typmi detekcie. Napríklad HPLC-MS/MS (van Vliet *et al.*, 2020), HPLC-ESI-MS/MS (Giordano *et al.*, 2019), HPLC-FLD (Kandár *et al.*, 2009).

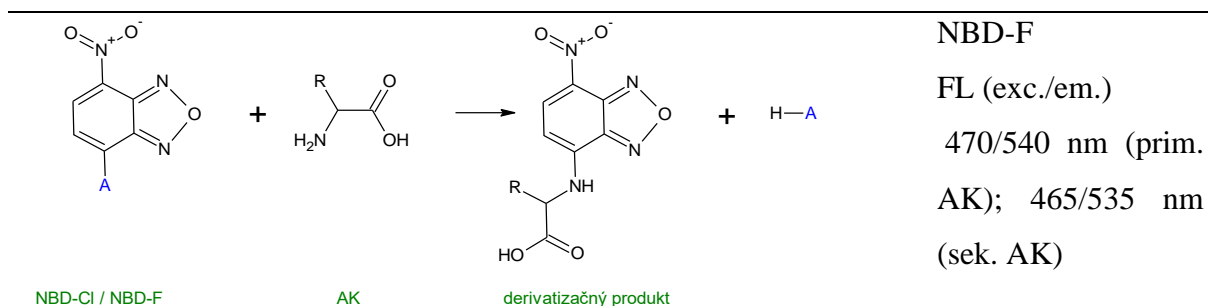
Tabuľka 1 Prehľad derivatizačných činidiel používaných pri analýze AK

Derivatizačné činidlo – reakcia	Detekcia
<p>A)</p>  <p>ninhydrín + AK → derivatizačný produkt</p> <p>B)</p>  <p>ninhydrín + Pro → derivatizačný produkt</p>	<p>UV-Vis</p> <p>570 nm (prim. AK)</p> <p>440 nm (sek. AK)</p>
<p>Podmienky: 100-120 °C, pH ≈ 5, prim. aj sekund. AK</p>	
<p>(Blachier <i>et al.</i>, 2013; Khan a Faiz, 2008; Pickering, 1989; Rigas, 2013)</p>	
 <p>fluoreskamín + AK → derivatizačný produkt</p>	<p>FL (exc./em.)</p> <p>390/475 nm</p>
<p>Podmienky: LT, pH ≈ 8-9, prim. AK</p>	
<p>(Bantan-Polak <i>et al.</i>, 2001; Benson a Hare, 1975; Rigas, 2013)</p>	
 <p>DNS-Cl + AK → derivatizačný produkt</p>	<p>UV-Vis</p> <p>286 nm</p> <p>FL (exc./em.)</p> <p>324/559 nm</p>
<p>Podmienky: 60-100 °C, pH ≈ 9,5, prim. aj sekund. AK</p>	
<p>(Callejón <i>et al.</i>, 2008; De Mey <i>et al.</i>, 2012; Kang <i>et al.</i>, 2006; Molnár-Perl, 2005)</p>	



Podmienky: LT, pH \approx 8, prim. aj sekund. AK

(De Mey *et al.*, 2012; Molnár-Perl, 2005)



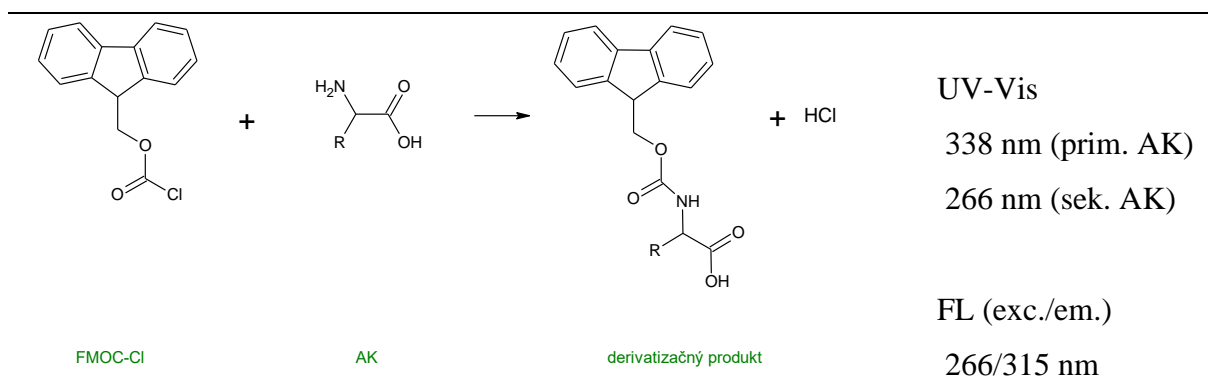
(za **A** možno dosadiť Cl alebo F)

Podmienky: 60 °C, pH \approx 8-9, prim. aj sekund. AK

NBD-Cl

FL (exc.) 464 nm

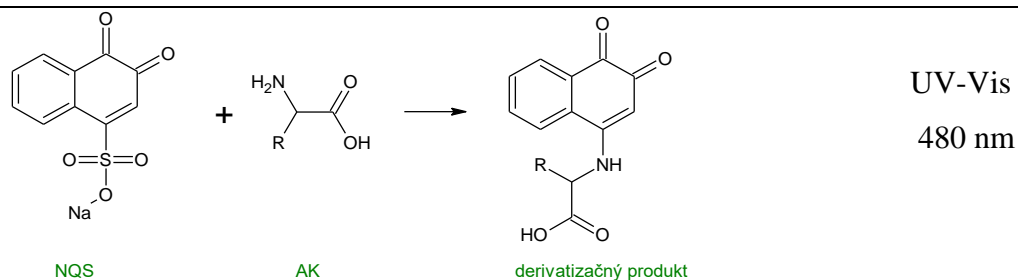
(Al-Majed a Al-Zehouri, 2001; Elbashir *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2002; Rigas, 2013; Watanabe a Imai, 1981; Watanabe a Imai, 1983)



Podmienky: pH \approx 7,7, prim. aj sekund. AK

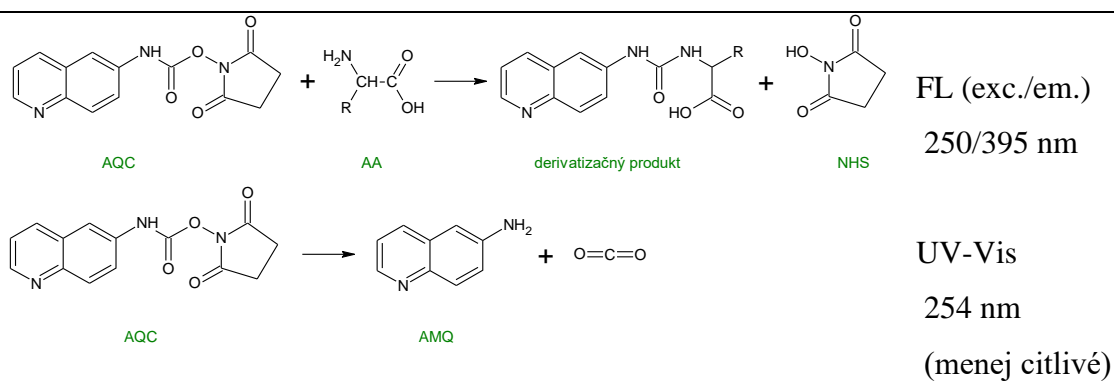
(Buha *et al.*, 2011; Cooper *et al.*, 2001; Zhon *et al.*, 2011)

Derivatizačné činidlo – reakcia	Detekcia
---------------------------------	----------



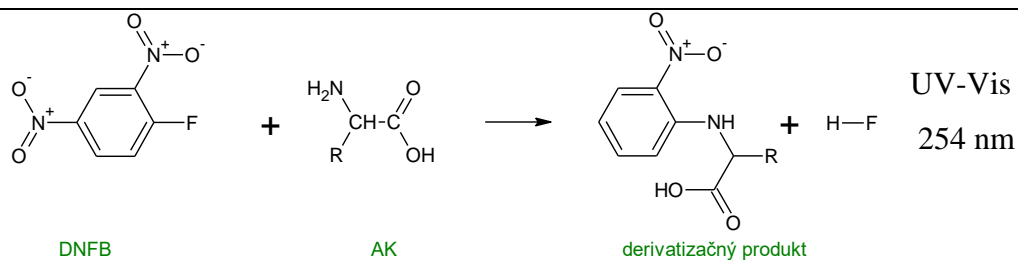
Podmienky: 65 °C, pH ≈ 10, prim. aj sekund. AK

(Elbashit *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2013b; Rigas, 2013; Saurina a Hernández-Cassou, 1994)



Podmienky: LT, pH ≈ 9, prim. aj sekund. AK

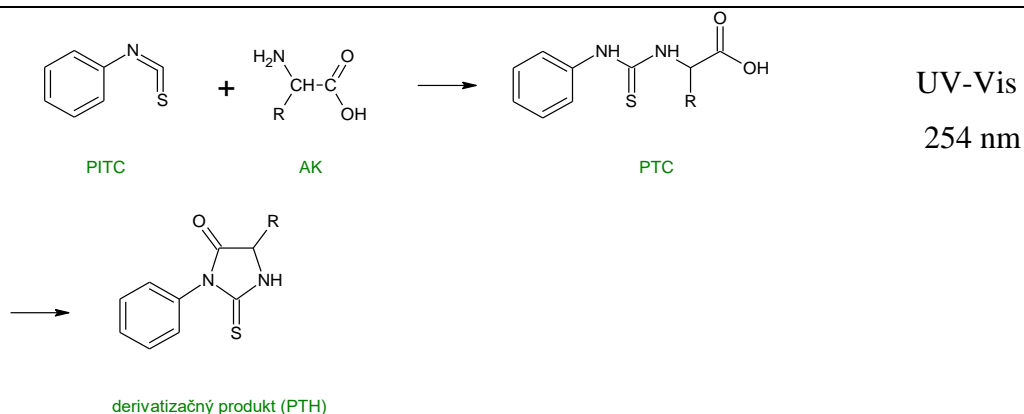
(Callejón *et al.*, 2008; Masuda a Dohmae, 2012; Salazar *et al.*, 2012)



Podmienky: 85 °C, prim. aj sekund. AK

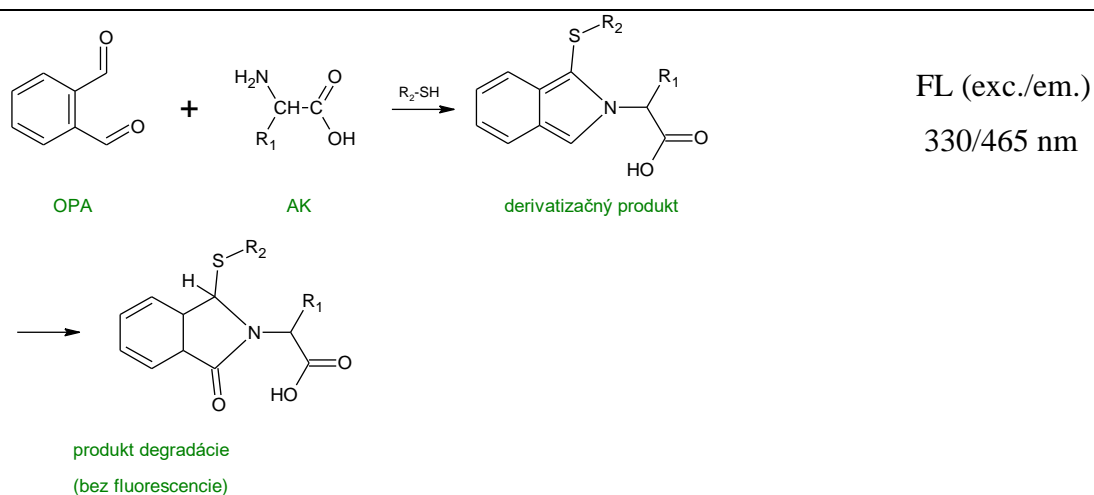
(Al-Sabha a Hamody, 2015; Boichenko *et al.*, 2011)

Derivatizačné činidlo – reakcia	Detekcia
---------------------------------	----------



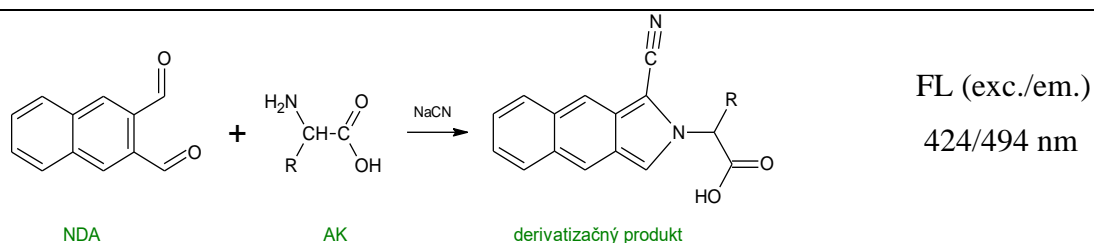
Podmienky: LT, prim. aj sekund. AK

(Blachier *et al.*, 2013; Kwanyuen a Burton, 2010; Sharma *et al.*, 2014)



Podmienky: LT, pH ≈ 10, prim. AK

(Bartolomeo a Maisano, 2006; Blachier *et al.*, 2013; Buha *et al.*, 2011; Hanczkó *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2017; Molnár-Perl a Bozor, 1998; Pereira *et al.*, 2008; Rigas, 2013)



Podmienky: LT, pH ≈ 9, prim. AK

(Rammouz *et al.*, 2007; Zotou a Notou, 2012; Zotou a Notou, 2013)

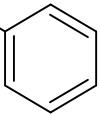
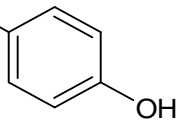
DNS-Cl: dansylchlorid, DBS-Cl: dabsylchlorid, NBD-Cl/F: 7-chloro-4-nitrobenzoxadiazol/4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, Fmoc-Cl: 9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid, NQS: 1,2-Naftochinón-4-sulfonát, AQC: 6-aminochinoly-N-hydroxysukcinylnkarbamát, NHS: N-hydroxysukcinimid, AMQ: 6-aminochinolín, DNFB: 2,4-dinitro-1-fluórbenzén, PITS: fenyliizotiokyanát, PTC: fenyliokarbamoyl, OPA: *o*-ftaldialdehyd, NDA: naftalén-2,3-dikarboxaldehyd

1.3 Metódy stanovenia ketokyselín

KK sú v ľudskom organizme súčasťou mnohých metabolických pochodov (napríklad citrátový cyklus, glykolýza či syntéza MK). Sú hlavným degradačným produktom AK v procese zvanom transaminácia. Prvým krokom je odstránenie α -aminoskupiny (aby mohol byť z organizmu odstránený nadbytok dusíku) a následne degradácia celej uhlíkovej kostry (Voet a Voetová, 1995). Pre prehľad KK vznikajúcich v tomto procese z príslušných AK vid' Tab. 2.

Tabuľka 2 Prehľad KK odvodených od AK

Všeobecný vzorec reakcie		
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{CH}-\text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{R} \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \backslash \\ \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	\longrightarrow	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ // \quad \quad // \\ \text{R}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \backslash \\ \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$
AK		KK
Aminokyselina	Ketokyselina	-R
Ala	PYR	$-\text{CH}_3$
Asp	oxalacetát	$-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{OH} \end{array}$
Glu	2-OG	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{OH} \end{array}$
Val	KIV	$-\text{HC} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ / \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Leu	KIC	$-\text{CH}_2-\text{HC} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ / \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Aminokyselina	Ketokyselina	-R
Ile	KMV	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-HC} \\ \\ \text{CH}_2\text{-CH}_3 \end{array}$
Phe	fenylpyruvát	$\text{-CH}_2\text{-}$ 
Tyr	4-hydroxyfenylpyruvát	$\text{-CH}_2\text{-}$ 

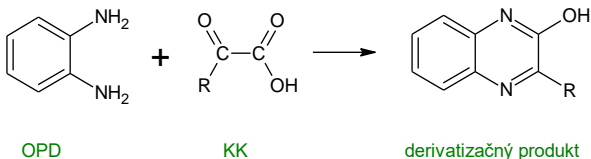
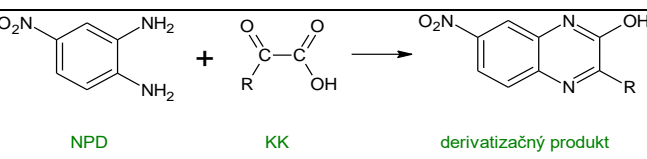
Podobne ako AK, ani KK sa nevyznačujú vlastnosťami, na základe ktorých by boli ľahko detekovateľné. Navyše sú to látky vysoko polárne a nestabilné. Preto sa pred analýzou vždy premieňajú na vhodné deriváty, ktoré zabezpečia zníženie polaritu a prípadne zvýšenie prchavosti. Derivatizácia je teda vždy pred-kolónová. Najčastejšie sa KK stanovujú na nepolárnych kolónach metódou **RP-HPLC** s využitím spektrofotometrickej (Mahar *et al.*, 2013), fluorescenčnej (Fujiwara *et al.*, 2020; Kand'ár *et al.*, 2009) alebo MS detekcie (Noguchi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018; Zimmermann *et al.*, 2014). Možno ich stanoviť aj metódou **GC**, avšak k reakcii je nutné pridať druhý derivatizačný krok (napríklad silyláciu), ktorým sa modifikujú hydroxylové skupiny a zvýši sa tak prchavosť analyzovaných derivátov. Tie sú následne detegované MS (Nguyen *et al.*, 2013). V prvom derivatizačnom kroku možno pre obe metódy použiť rovnaké derivatizačné činidlá, viď Tab. 3 (Fuchs *et al.*, 2009; Pailla *et al.*, 2000).

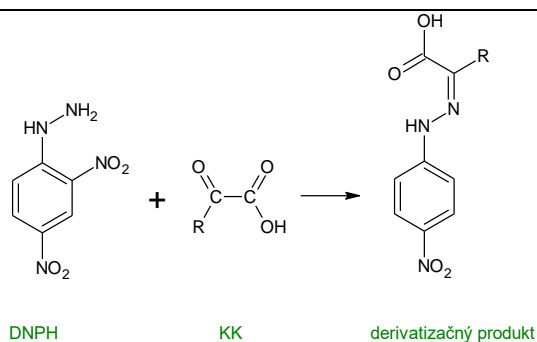
Najčastejšie používaným, veľmi selektívnym a citlivým derivatizačným činidlom pri analýze KK je ***o*-fenyléndiamín (OPD)**. Jeho nevýhodou je fotosenzitivita a ľahká oxidácia. Medziprodukty derivatizačnej reakcie s oxidovaným OPD môžu z dôvodu elúcie v podobných retenčných časoch negatívne ovplyvniť stanovenie KK. Riešením je rekryštalizácia OPD, najčastejšie z heptánu v olejovom kúpeli pri 100-120 °C, a následné uchovávanie činidla v tme a chlade (4 °C) pod inertným plynom (N₂). Roztok OPD musí byť pred každou analýzou pripravený čerstvo. Najčastejšie býva rozpustený v HCl s prídavkom 2-ME, ktorého úlohou je odstrániť kyslík z reakčnej zmesi. Pre rýchly a komplexný priebeh reakcie je nutné, aby derivatizačné činidlo bolo v 100 až 1000 násobnom nadbytku s ohľadom na stanovované KK. Väčšie množstvo spôsobuje pokles vo formácii derivatizačných produktov niektorých KK. Derivatizácia by mala byť pri 80 °C takmer kompletná pre všetky KK asi za 10 minút. S vyššou teplotou sa zvyšuje tiež formácia nežiaducich interferujúcich medziproduktov. Preto reakcia

často prebieha za miernejších teplotných podmienok dlhšiu dobu (napríklad 45 °C po dobu 1 hodiny). Derivatizácia je ukončená schladením zmesi v ľadovom kúpeli po dobu asi 15 minút. Vytvorené hydroxychinolínové deriváty sa vyznačujú vysokou fluorescenciou a môžu byť detegované UV/Vis detektorom pri 254 nm alebo fluorescenčným detektorom pri vlnovej dĺžke 340/420 nm (excitácia/emisia). Nežiaduce medziprodukty derivatizačnej reakcie interferujú v stanovení KK len pri UV detekcii (Fuchs *et al.*, 2009; Kieber a Mopper, 1983; Mühlhing *et al.*, 2003; Pailla *et al.*, 2000).

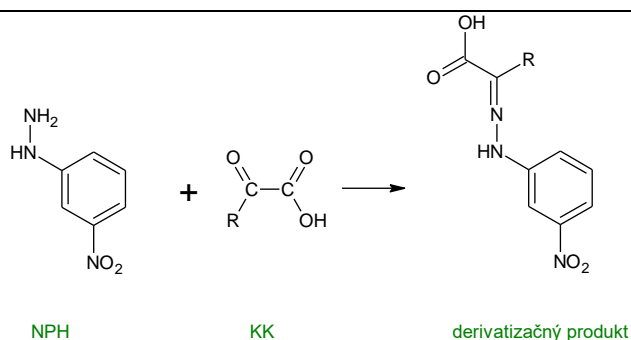
Rovnako ako v prípade AK, tiež pri stanovení KK zo vzoriek DBS možno použiť všetky metódy pre stanovenie KK z biologických materiálov, ale je nutné myslieť na dostatočnú citlivosť metód s ohľadom na malé množstvo analyzovanej vzorky. Stanovenie KK zo vzorky DBS nie je v praxi príliš rozšírené. Najčastejšie sa možno stretnúť so stanovením pyruvátu (Chuang *et al.*, 2009) či ketokyselín s rozvetveným reťazcom (BCKA) (Kand'ár *et al.*, 2009), len minimum štúdií sa venuje širšiemu spektru stanovovaných KK (Kand'ár *et al.*, 2022).

Tabuľka 3 Prehľad derivatizačných činidiel používaných pri analýze KK

Derivatizačné činidlo – reakcia	Detekcia
 <p>OPD + KK → derivatizačný produkt</p> <p>Podmienky: 45-80 °C</p>	<p>UV-Vis 254 nm</p> <p>FL (exc./em.) 340/420 nm</p>
(Fuchs <i>et al.</i> , 2009; Kieber a Mopper, 1983; Mühlhing <i>et al.</i> , 2003; Pailla <i>et al.</i> , 2000)	
 <p>NPD + KK → derivatizačný produkt</p> <p>Podmienky: 80 °C</p>	<p>UV/Vis 255 nm</p> <p>(Mahar <i>et al.</i>, 2013)</p>

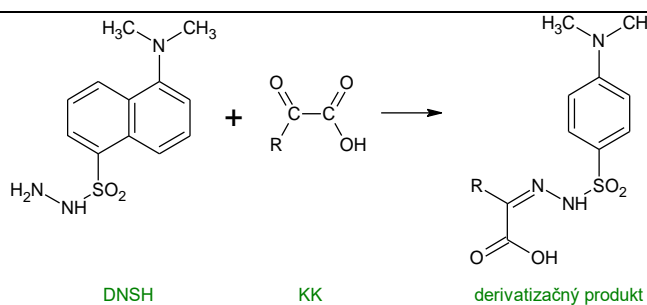
Derivatizačné činidlo – reakcia**Detekcia**UV-Vis
520 nm

Podmienky: 25 °C, neselektívne činidlo

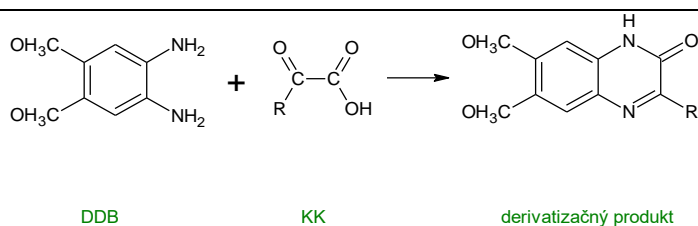
(Friedmann a Haugen, 1942; Garibotto *et al.*, 1991; Uchiyama *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2014)

MS

Podmienky: 0-30°C

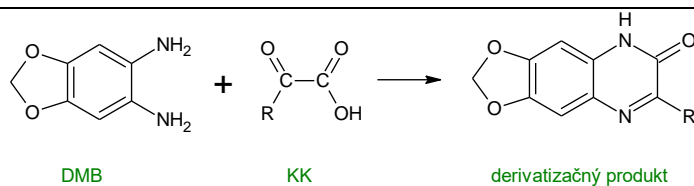
(Han *et al.*, 2013)UV-Vis
254 nmFL (exc./em.)
350/525 nm

Podmienky: 50 °C

(Donnarumma *et al.*, 2013)FL (exc./em.)
368/455 nm

Podmienky: 100 °C, kyslé pH, tma

(Hara *et al.*, 1985)

Derivatizačné činidlo – reakcia**Detekcia**

FL (exc./em.)
370/445 nm

Podmienky: 100 °C, kyslé pH

(Nakamura *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1988)

OPD: *o*-fenyldiamín, NPD: 4-nitro-1,2-fenyldiamín, DNPH: 2,4-dinitrofenylhydrazín, NPH: 3-nitrofenylhydrazín, DNSH: dansylhydrazín, DDB: 1,2-diamino-4,5-dimetoxybenzén, DMB: 1,2-diamino-4,5-dimetyléndioxybenzenu

1.4 Metódy stanovenia mastných kyselín

Zatiaľ čo sa MK voľne v prírode vyskytujú skôr vzácne, v esterifikovanej forme sú hlavnou zložkou lipidov. V ľudskom organizme plnia niekoľko dôležitých funkcií. Sú zdrojom energie, súčasťou biologických membrán či prekuzormi ďalších látok, napríklad eikosanoidov (prostaglandíny, tromboxany, leukotriény). Väčšina MK má párny počet uhlíkových atómov, pretože sú syntetizované spojením C₂ jednotiek. MK možno rozdeliť podľa prítomnosti dvojitej väzby v molekule na nasýtené (dvojité väzby nie sú prítomné) a nenasýtené (majú v molekule dvojité väzby). V prípade prítomnosti dvojitej väzby sa MK môže následne vyskytovať v dvoch stereoizoméroch – *cis* a *trans*. Za fyziologických podmienok sú u človeka dvojité väzby vždy v konformácii *cis*. *Trans* MK sa vyskytujú v mikroorganizmoch, v semenách niektorých rastlín a tuku či mlieku prežúvavcov. Bod topenia sa zvyšuje s rastúcou dĺžkou uhlíkového reťazca a naopak klesá s rastúcim počtom dvojitých väzieb. MK majú amfipatickú štruktúru (obsahujú hydrofóbnu aj hydrofilnú časť) a ich rozpustnosť vo vode sa s rastúcou dĺžkou reťazca znižuje (Kremmyda *et al.*, 2011; Tvrzická *et al.*, 2011; Voet a Voetová, 1995).

Priama detekcia MK je z dôvodu zlej absorpcie v UV/Vis oblasti a neprítomnosti chromoforu či fluoroforu náročná. Napriek tomu možno v literatúre nájsť niekoľko prác zaoberajúcich sa priamou detekciou nederivatizovaných MK v biologických materiáloch, a to metódami LC-MS/MS (Hellmuth *et al.*, 2012; Serafim *et al.*, 2019). Oveľa častejšie sa však MK pred analýzou premieňajú na vhodné deriváty.

Keďže sú MK hlavnou zložkou lipidov, možno stanoviť ich obsah v jednotlivých triedach lipidov, a to po ich prerozdelení metódou chromatografie na tenkej vrstve (TLC) (Čermák *et al.*, 2016), prípadne metódou kvapalinovej chromatografie s hydrofilnými interakciami (HILIC)

(Lísa *et al.*, 2011) či extrakciou na pevnej fáze (SPE) (Burdge *et al.*, 2000). Druhou možnosťou je stanovenie celkového obsahu MK vo vzorke bez rozdelenia do tried.

Elektroforetické stanovenie MK je rýchle a možno pri ňom vynechať krok derivatizácie. Nevýhodou je však nižšia citlivosť a limitácia v rozsahu stanovovaných MK. CE je vhodná iba pre stanovenie MK rozpustných vo vode (C2-C14). Pre MK s dlhším reťazcom je nutné použiť micelárnu elektrokinetickú chromatografiu (MEKC). Bez derivatizácie možno stanoviť len nenasýtené MK, ktoré vďaka dvojitej väzbe absorbujú v oblasti 200-250 nm. Nasýtené MK je nutné podľa typu použitého detektoru buďto derivatizovať (napríklad fenacylestery MK) alebo k detekcii využiť chromofory (napríklad dodecylbenzénsulfonát sodný, adenzínmonofosfát) (De Oliveira *et al.*, 2014; Gabriel *et al.*, 2015).

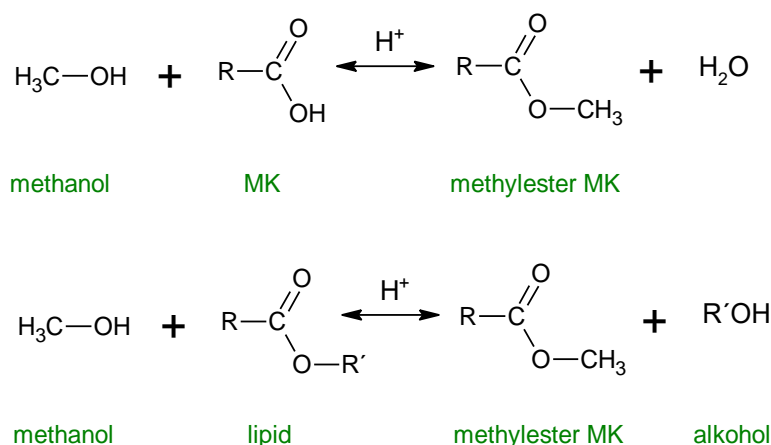
MK možno v spojení s pred- alebo post- kolónovou derivatizáciou stanoviť aj metódou **RP-HPLC** s rôznymi typmi detekcie (UV/Vis, fluorescenčný, chemiluminiscenčný, elektrochemický, ELSD, MS). Podľa typu použitého detektora je potrebné zvoliť vhodný spôsob derivatizácie (napríklad deriváty hydrazínu, kumarínu, *p*-aminofenolu, 2,4-dimetoxyanilínu a iné). Pre rozdelenie izomérov MK možno použiť argentačnú chromatografiu (Bielawska *et al.*, 2010; Lima a Abdalla, 2002; Tsuchiya *et al.*, 1984).

Úplne prvou (1952) a v súčasnosti aj najrozšírenejšou metódou pre stanovenie MK je **GC**. Používa sa v spojení s plameňovo-ionizačným detektorom (FID) alebo MS detektorom. Pred samotnou separáciou je nutné MK previesť na nízkomolekulárne nepolárne deriváty a prípadne zamaskovať obdobným spôsobom ďalšie polárne funkčné skupiny. Zlepší sa tak tvar pík a aj chromatografické rozlíšenie. Pred každou analýzou je nutné zvoliť čo najvhodnejšie derivatizačné činidlo. Deriváty MK môžu byť pripravené hydrolýzou (saponifikáciou) lipidov, esterifikáciou, modifikáciou hydroxylových skupín či prípadne dvojitých väzieb. Najrozšírenejšia je práve esterifikácia, a to konkrétne príprava methylesterov, menej často sa potom možno stretnúť s prípravou ethyl-, propyl-, izopropyl-, butyl- či izobutyl- esterov (Bielawska *et al.*, 2010; Christie, 1989).

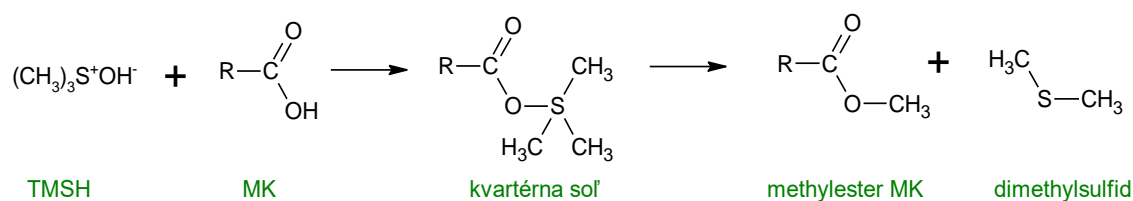
Esterifikácia MK môže prebiehať za prítomnosti kyslého alebo bázického katalyzátoru. V prvom prípade sú voľné MK esterifikované a lipidy s O-R väzbou transesterifikované zahriatím s veľkým nadbytkom bezvodého methanolu v prítomnosti kyslého katalyzátoru (Obr. 1). Najviac používanými činidlami sú 1-2% koncentrovaná H₂SO₄ v methanole či 5% (w/v) bezvodá HCl v methanole, ktorá sa pripravuje trochu náročným prebublávaním HCl do suchého methanolu. Túto procedúru možno nahradiť pomalým prídavkom acetylchloridu do vopred schladeného suchého methanolu. Medziproduktom tohto procesu je methylacetát, ktorý ale v derivatizačnej reakcii neinterferuje. Esterifikácia v oboch prípadoch (HCl aj H₂SO₄)

prebieha pri 50 °C cez noc. Zvýšením teploty možno reakciu urýchliť, prítomnosť vody bráni jej správne mu priebehu. K esterifikácii voľných MK sa používa aj 12-14% (w/v) roztok BF₃ v methanole. Jeho nevýhodou je nízka trvanlivosť aj pri skladovaní v chlade. Použitie príliš starého či príliš koncentrovaného činidla vedie k vzniku artefaktov a výraznej strate PUFA. Derivatizácia prebieha pri 100 °C od 2 minút (pre existujúce estery MK) až po hodinu a pol (sfingomyelíny). Nie príliš používaný, ale takmer rovnako účinný ako predchádzajúci, je roztok BCl₃ v methanole. Výhodou je, že nevykazuje žiadne vedľajšie reakcie (Bielawska *et al.*, 2010; Christie, 1989).

Bázicky katalyzovanú transesterifikáciu nemožno použiť k esterifikácii voľných MK ani sfingolipidov. Reakcia prebieha podobne ako v predchádzajúcom prípade, a to v prostredí bezvodého methanolu, ale v prítomnosti bázického katalyzátoru. Tým je najčastejšie 0,5mol/l methoxid sodný (CH₃ONa) v methanole. Toto činidlo je za izbovej teploty stabilné aj niekoľko mesiacov. Reakcia prebieha pri 50 °C po dobu asi 10 minút. Zatiaľ čo fosfoglyceroly sú pri izbovej teplote derivatizované za niekoľko minút, estery cholesterolu môžu vyžadovať aj dvojnásobne dlhší čas. Ďalšími derivatizačnými činidlami sú methoxid draselný či hydroxid draselný v methanole (Bielawska *et al.*, 2010; Christie, 1989). Methylestery MK môžu vzniknúť aj priamo v injektore GC, a to pyrolýzou kvartérnych amóniových solí. Na tento účel možno použiť viacero zlúčenín ako napríklad hydroxid tetramethylamónny, trimethylfenylamónny a iné. Najúčinnjšou je hydroxid trimethylsulfóniový (TMSH) (Obr. 2) (Bielawska *et al.*, 2010; Christie, 1989).

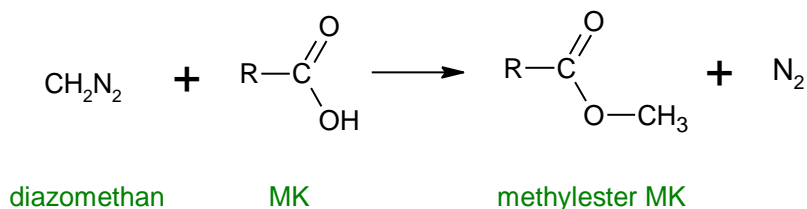


Obrázok 1 Kyslo-katalyzovaná esterifikácia masných kyselín a lipidov (upravené podľa Christie, 1989)



Obrázok 2 Methylácia MK pyrolýzou soli sformovanej z TMSH v injektore GC (upravené podľa Bielawska *et al.*, 2010)

Univerzálnym činidlom v organickej chémii je diazomethan. Ten v prítomnosti metanolu reaguje s MK veľmi rýchlo (Obr. 3). Najčastejšie je pripravený rozpustením v diethyléthere, ale aj pri skladovaní v tme, pri 4 °C a na peletách KOH, je roztok stabilný iba krátko. Pri dlhšom skladovaní sa môžu formovať polymérne medziprodukty, ktoré následne interferujú v GC analýze. Diazomethan je veľmi toxický, karcinogénny a potenciálne výbušný. Pri esterifikácii MK by mal byť preto poslednou voľbou (Christie, 1989).



Obrázok 3 Reakcia diazomethanu s MK (upravené podľa Bielawska *et al.*, 2010)

Pre analýzu voľných MK je methanol dostačujúcim rozpúšťadlom. V prípade analýzy nepolárnych lipidov (napríklad estery cholesterolu alebo triacylglyceroly) je nutné k analýze pridať ďalšie, nepolárne organické rozpúšťadlo (napríklad toluén alebo tetrahydrofurán) (Bielawska *et al.*, 2010; Christie, 1989).

Podobne ako v prípade AK a KK, aj v prípade MK možno metódy stanovenia z biologických materiálov aplikovať aj pri stanovení MK zo vzorky DBS. Takisto tu platí, že metódy musia byť dostatočne citlivé. V praxi sa najčastejšie stretávame s analýzou MK zo vzoriek DBS metódou GC-FID (Gunash *et al.*, 2019; Harris a Polreis, 2016; Marangoni *et al.*, 2004), prípadne GC-MS (Ingels *et al.*, 2011).

1.5 Asociácia vybraných metabolitov s ochoreniami

Ako je spomenuté vyššie, AK, KK aj MK, sa zúčastňujú najrozličnejších biologických procesov, vrátane regulácií metabolizmu. Za fyziologických podmienok sú ich hladiny v organizme ustálené (vhodne regulované) a dlhodobé zmeny (zníženie alebo zvýšenie koncentrácie konkrétneho analytu či skupiny analytov) môžu predznamenať výskyt

ochorenia. Preto ich pri analýze biologického materiálu možno použiť ako nešpecifické biomarkery odrážajúce aktuálny stav metabolizmu. Najčastejším ochorením, s ktorým sa zmeny v koncentrácii všetkých vybraných analytov spájajú, je *diabetes mellitus* (DM). Ide o chronické endokrinné metabolické ochorenie, ktoré vzniká v dôsledku absolútneho alebo relatívneho nedostatku inzulínu. DM 1. typu vzniká z dôvodu neschopnosti pankreatických buniek produkovať inzulín, 2. typ je charakterizovaný rezistenciou k inzulínu, ktorý je v tele síce prítomný, ale príslušné bunky naň nie sú schopné reagovať (poškodené receptory pre inzulín). Pôvod ochorenia je podmienený geneticky, dedičnosť je multifaktoriálna, postihnutých býva viacero enzýmov či transportných mechanizmov. Dominantnou zmenou je nárast koncentrácie glukózy v krvi. Príčinou hyperglykémie je mimo iné inhibícia glykolýzy a aktivácia glukoneogenézie. Hlavnými substrátmi pre glukoneogenéziu sú AK. V dôsledku aktivácie hormonálne senzitivnej lipázy a inhibície lipogenézie je v tukovom tkanive aktivovaná lipolýza a do krvného obehu sa vo veľkom množstve uvoľňujú MK. To inhibuje utilizáciu glukózy a prispieva k rozvoju hyperglykémie a inzulínorezistencie. Vďaka zvýšenej hladine MK je časť z nich reesterifikovaná za vzniku triacylglycerolov a secernovaná do krvi vo forme VLDL. Ich spracovanie tkanivami však nie je z dôvodu zníženej aktivity lipoproteínovej lipázy dostatočné a vzniká tak hypertriacylglycerolémia, čo je rizikový faktor rozvoja aterosklerózy. V kostrovom svalstve stúpa v dôsledku stimulácie BCKA dehydrogenázy oxidácia aminokyselín s rozvetveným reťazcom (BCAA), ktoré sa pre sval stávajú jedným z hlavných energetických substrátov. S aktiváciou proteolýzy a katabolizmom BCAA je spojená zvýšená syntéza alanínu a glutamínu a ich uvoľňovanie (spolu s ostatnými AK) do krvného riečiska (Holeček, 2006). Zvýšené hladiny AK (hlavne BCAA) spojené so zníženým katabolizmom pri obezite a DM, ale aj iné zmeny v metabolizme AK, môžu byť odzrkadlené aj v hladinách KK, keďže metabolické dráhy týchto dvoch skupín analytov sú navzájom prepojené (Zhang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2013). BCAA a BCKA plnia funkciu aj v rozvoji kardiovaskulárnych ochorení, ako bolo poukázané v štúdiu Walejko *et al.* (2021).

Ďalšími zaznamenanými sú zmeny v koncentrácii AK u ochorení obličiek či pečene. Napríklad u pacientov s chronickým ochorením obličiek bola preukázaná znížená hladina aromatických AK (Tyr a Trp) (Li *et al.*, 2011b). U renálneho bunkového karcinómu bola zase zistená zmena koncentrácie u 15 stanovovaných AK (Mustafa *et al.*, 2011). U pacientov s chronickou renálnou insuficienciou dochádza k hyperlipoproteinémii s nárastom koncentrácie triacylglycerolov a VLDL, čo býva spojené s rozvojom aterosklerózy. Hlavnou príčinou je pokles aktivít pečenej lipázy a lipoproteínovej lipázy v tukovom tkanive. Tiež dochádza k poklesu plazmatických koncentrácií väčšiny esenciálnych AK. Výrazne klesajú BCAA,

tryptofán a histidín. Naopak hladiny fenylalanínu a metionínu bývajú zvýšené. Koncentrácia väčšiny neesenciálnych AK stúpa, pravdepodobne z dôvodu prevahy proteolýzy nad proteosyntézou. Nárast je často popisovaný u citrulínu, cystínu, taurínu, glycínu, kyseliny asparágovej, ornitínu a alanínu. Tyrozín naopak klesá (Holeček, 2006). Pri cirhóze pečene zase dochádza k nárastu aromatických AK, ktorý je spôsobený zníženým katabolizmom v dôsledku redukcie populácie funkčných hepatocytov a k poklesu BCAA. Často sú zvýšené aj koncentrácie metionínu, histidínu a kyseliny asparágovej a glutámovej (Holeček, 2006; Holeček, 2018). Zmenu v koncentrácii AK možno sledovať aj pri nealkoholickej steatohepatitíde (Lake *et al.*, 2015).

Ďalšími ochoreniami, s ktorými je asociovaná zmena v koncentrácii AK, sú napríklad Alzheimerova choroba, reumatoidná artritída, chronická obštrukčná choroba pľúc, sepsa, či dokonca ťažká depresia (Song *et al.*, 2018). So schizofréniou či ďalšími psychotickými poruchami je spojená aj zmena v hladinách MK (Money a Bousman, 2013; Sethom *et al.*, 2010).

Zmeny v koncentrácii spomínaných analytov sa ukazujú byť sľubným diagnostickým markerom aj pri rozličných druhoch rakoviny (rakovina prostaty, prsníku, pľúc, chronická myeloidná leukémia a iné) (Song *et al.*, 2018). Zložité metabolické zmeny, ktoré sa dejú v dôsledku zvýšenej proliferácie nádorových buniek, sa dotýkajú metabolizmu sacharidov, proteínov aj lipidov. Zatiaľ čo zdravé bunky regulujú svoj anabolizmus aj katabolizmus s ohľadom na dostupné živiny, nádorové bunky rastú nekontrolovateľne, bez ohľadu na dostupnosť zdrojov (Amézaga *et al.*, 2018). Dostatočné množstvo MK napomáha zabezpečiť sekrécia lipidy mobilizujúceho faktoru, ktorý prostredníctvom stimulácie hormonálne senzitivity lipázy aktivuje lipolýzu v tukovom tkanive. Nádorové tkanivo ďalej intenzívne vychytáva AK, ktoré sú okrem proteosyntézy využité tiež pri syntéze nukleotidov, polyamínov a ďalších, pre nádor potrebných látok. Zmeny v spektre spomínaných analytov sú často závislé na type nádoru a tiež na tkanive, v ktorom sa nádor nachádza (Holeček, 2006). Na rozdiel od špecifických a cielených markerov, ktoré sú mnohokrát vyšetované až v prípade zdravotných komplikácií, je skrínovanie metabolického profilu všestrannejšie a pre jedinca menej zaťažujúce (Miyagi *et al.*, 2011).

1.6 Referenčné hodnoty vybraných metabolitov

Referenčné hodnoty vybraných metabolitov vo vzorkách zdravých dospelých jedincov sú uvedené v Tab. 4-6. V literatúre možno najčastejšie nájsť informácie o koncentrácii AK, či už

vo vzorkách plnej krvi, vo vzorkách plazmy alebo iného biologického materiálu. Informácie o koncentrácii KK vo vzorkách plnej krvi sa v literatúre bežne nevyskytujú, častejšie je určenie referenčného rozmedzia v plazme. V prípade MK je stanovenie referenčného rozmedzia problematické, keďže neexistuje jednotný spôsob prezentácie nameraných výsledkov. Veľa laboratórií vyhodnocuje percentuálne zastúpenie jednotlivých MK vo vzorke (ako napríklad Risé *et al.*, 2007). Týmto spôsobom je ale množstvo MK v krvi medzilaboratórne neporovnateľné, čo naznačujú vo svojej štúdií aj Schwertner a Mosser (1993). Len niekoľko štúdií prezentuje výsledky vo forme molárnej či hmotnostnej koncentrácie (napríklad Abdelmagid *et al.*, 2015; Kish-Trier *et al.*, 2016).

Tabuľka 4 Referenčné hodnoty vybraných AK v krvných vzorkách

	Koncentrácia ($\mu\text{mol/l}$)			
	Hagenfeldt a Arvidsson (1980) (plná krv)	Fekkes <i>et al.</i> (1995) (plazma)	Liu <i>et al.</i> (2020) (DBS)	Kand'ár <i>et al.</i> (2009) (DBS)
Arg	57,0 \pm 14,0	81,0 \pm 15,0	-	-
2-AM	22,0 \pm 7,0	24,0 \pm 6,4	-	-
Ala	310,0 \pm 62,0	379,0 \pm 75,0	-	-
Asn	84,0 \pm 30,0	54,0 \pm 8,0	-	-
Cit	37,0 \pm 5,0	36,0 \pm 7,4	-	-
Glu	137,0 \pm 35,0	52,0 \pm 18,0	-	-
Gln	509,0 \pm 106,0	570,0 \pm 69,0	-	-
Gly	288,0 \pm 48,0	196,0 \pm 42,0	-	-
His	84,0 \pm 12,0	82,0 \pm 11,0	-	-
Ile	58,0 \pm 9,0	82,0 \pm 16,0	25,8 \pm 7,5	55,8 \pm 14,4
Leu	119,0 \pm 12,0	142,0 \pm 23,0	89,3 \pm 24,6	195,4 \pm 47,2
Lys	153,0 \pm 21,0	180 \pm 27,0	-	-
Met	18,0 \pm 4,0	29,0 \pm 4,6	-	36,7 \pm 7,2
Phe	49,0 \pm 7,0	61,0 \pm 7,8	51,0 \pm 13,0	73,1 \pm 13,0
Pro	160,0 \pm 34,0	-	-	-
Ser	131,0 \pm 22,0	104,0 \pm 16,0	-	-
Thr	128,0 \pm 19,0	137,0 \pm 24,0	-	-
Trp	-	57,4 \pm 7,2	42,1 \pm 12,1	-

	Koncentrácia (μmol/l)			
	Hagenfeldt a Arvidsson (1980) (plná krv)	Fekkes <i>et al.</i> (1995) (plazma)	Liu <i>et al.</i> (2020) (DBS)	Kand'ár <i>et al.</i> (2009) (DBS)
Tyr	53,0 ± 11,0	67,0 ± 11,0	43,3 ± 11,1	52,0 ± 15,3
Val	201,0 ± 24,0	285,0 ± 48,0	152,0 ± 38,1	232,0 ± 48,6

Tabuľka 5 Referenčné hodnoty vybraných KK v krvných vzorkách

	Koncentrácia (μmol/l)		
	HMDB.CA (vzorka krvi*)	Foster <i>et al.</i> (1978) (sérum/plazma)	Kand'ár <i>et al.</i> (2009) (DBS)
2-OG	8,9 ± 2,7	-	-
PYR	63 ± 25,5	140,0 ± 118,0	-
KIV	11,0 ± 1,7	-	13,0 ± 3,0
KIC	33,5 ± 8,2	-	26,4 ± 6,1
KMV	22,7 ± 4,6	-	19,4 ± 5,6

*bližšie nešpecifikované, či ide o plnú krv, plazmu alebo sérum

Tabuľka 6 Referenčné hodnoty vybraných MK v krvných vzorkách

	Koncentrácia (μmol/l)		
	Abdelmagid <i>et al.</i> (2015) (plazma)	Kish-Trier <i>et al.</i> (2016) (plazma/sérum)	CDC.GOV * (sérum)
C14:0	63,6 ± 37,1	220,0 ± 200,0	947,5 ± 932,5
C15:0	17,8 ± 6,7	-	76,3 ± 73,7
C16:0	1631,1 ± 459,3	2465,0 ± 1375,0	8725 ± 7775
C17:0	-	-	75,1 ± 63,9
C18:0	489,5 ± 124,3	765,0 ± 485,0	1760 ± 1540
<i>cis</i> C18:1 n9	1285,5 ± 416,7	2320,0 ± 1580,0	10803,5 ± 10096,5
<i>all-cis</i> C18:2 n6	2233,8 ± 622,6	1690,0 ± 1310,0	8635 ± 7265
<i>all-cis</i> C18:3 n3	54,4 ± 25,1	77,5 ± 72,5	409,1 ± 393,9
<i>all-cis</i> C18:3 n6	23,5 ± 13,8	28,5 ± 21,5	198,1 ± 192,9
C20:0	4,9 ± 3,7	28,5 ± 17,5	60,8 ± 50,3

	Koncentrácia (μmol/l)		
	Abdelmagid <i>et al.</i> (2015) (plazma)	Kish-Trier <i>et al.</i> (2016) (plazma/sérum)	CDC.GOV * (sérum)
<i>cis</i> C20:1 n9	8,2 ± 4,9	-	70,21 ± 65,8
all- <i>cis</i> C20:3 n6	74,3 ± 30,4	255,0 ± 225,0	247 ± 218
all- <i>cis</i> C20:4 n6	393,0 ± 119,1	715,0 ± 375,0	1428,5 ± 1241,5
all- <i>cis</i> C20:5 n3	40,3 ± 28,3	47,5 ± 42,5	545,3 ± 544,7
C22:0	6,7 ± 5,3	-	110,8 ± 86,3
all- <i>cis</i> C22:6 n3	88,8 ± 36,8	212,5 ± 137,5	471,9 ± 446,15
C24:0	1,4 ± 2,4	-	88,9 ± 69,1
<i>cis</i> C24:1 n9	4,0 ± 5,3	95,0 ± 65,0	123,1 ± 92,0

* do štúdie zahrnutí jedinci starší 1 rok

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo zavedenie dostatočne citlivých separačných techník pre stanovenie vybraných analytov (aminokyseliny, ketokyseliny, mastné kyseliny) z malého množstva biologického materiálu obsiahnutého vo vzorke suchej kvapky krvi, ďalej analýza vzoriek od dobrovoľných darcov, nastavenie predbežného referenčného rozmedzia vybraných analytov v plnej krvi, štatistické spracovanie nameraných dát a zhodnotenie použitia techniky suchej kvapky krvi ako alternatívy k odberu plnej krvi pri metabolickom skríningu.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Vzorky

Štúdie sa celkovo zúčastnilo 60 dobrovoľníkov (32 žien a 28 mužov, priemerný vek v oboch skupinách bol 39 rokov). Všetci účastníci podpísali informovaný súhlas (viď Príloha 1). Pre zaradenie do štúdie nebolo potrebné splňať konkrétne podmienky, išlo o reprezentatívnu vzorku populácie. Od dobrovoľných darcov boli získané iba údaje o veku a pohlaví.

Pred odberom vzoriek bol filtračný papier v prípade vzoriek pre stanovenie MK ošetrený antioxidantným roztokom (0,1% BHT v ethanole). Na odberové miesto filtračného papiera bolo pipetovaných 15 μ l roztoku BHT a následne bol papier ponechaný voľne zaschnúť pri laboratórnej teplote po dobu najmenej 30 minút. Takto ošetrené filtračné papiere boli skladované pri -20 °C po dobu nepresahujúcu 9 mesiacov. V prípade vzoriek pre stanovenie AK a KK nebol filtračný papier pred odberom vzoriek krvi nijak ošetrený.

Vzorky DBS boli získané z nedominantnej ruky, a to punkciou prostredného prstu sterilnou lancetou po tom, čo bolo miesto vpichu ošetrené alkoholickou dezinfekciou. Po zotretí prvej kvapky krvi buničinou bola ďalšia kvapka nasiaknutá na filtračný papierik (Whatman® 903 protein saver cards) jemným priložením, bez stláčania prstu či vrstvenia viacerých kvapiek na seba. Vzorky boli následne ponechané voľne zaschnúť pri laboratórnej teplote v horizontálnej polohe po dobu najmenej 2,5 hodiny a potom uskladnené na -20 °C v polypropylénovom, nie hermeticky uzavretom sáčku s desikantom, po dobu maximálne 9 mesiacov.

Vzorky použité na optimalizáciu metód boli získané od dobrovoľných darcov s hodnotou HCT vždy v referenčnom rozmedzí pre danú populáciu (0,40-0,52 pre mužov a 0,34-0,46 pre ženy). Hodnota HCT bola zmeraná okamžite po odbere vzoriek, a to mikrohematokritovou metódou z kapilárnej krvi. Vzorky DBS boli pripravené buďto po odbere krvi punkciou prstu, ako je popísané vyššie, alebo bolo na filtračný papierik pipetovaných 30 μ l plnej krvi automatickou mikropipetou. Plná krv bola v tomto prípade odobratá do skúmaviek s EDTA z kubitálnej žily kvalifikovaným zdravotníckym personálom.

3.1.2 Chemikálie

Aminokyseliny

2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

3-Merkaptopropionová kyselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

Acetonitril, hyper-grade pre HPLC (Merck, Darmstadt, Nemecko)

Aminokyseliny (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)

- L-alanín (Ala)
- L-2-aminomaslová kyselina (2-AM)
- L-arginín monochlorid (Arg)
- L-asparagín (Asn)
- L-asparagová kyselina (Asp)
- L-citrulín (Cit)
- L-glutámová kyselina (Glu)
- L-glutamín (Gln)
- glycín (Gly)
- L-histidín (His)
- L-izoleucín (Ile)
- L-leucín (Leu)
- L-lyzín monohydrochlorid (Lys)
- L-metionín (Met)
- L-norleucín (NLeu)
- L-fenylalanín (Phe)
- L-prolín (Pro)
- L-serín (Ser)
- L-threonín (Thr)
- L-tryptophán (Trp)
- L-tyrozín (Tyr)
- L-valín (Val)
- DL-norvalín (NVal)
- taurín (Tau)

Dihydrogénfosforečnan sodný, dihydrát (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

Ethanol, gradient-grade pre HPLC (LiChrosolv®, Merck, Darmstadt, Nemecko)

Hydrogénfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
o-Ftaldialdehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Kyanid draselný (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Kyselina mravčia pre LC-MS (Merck, Darmstadt, Nemecko)
Mravčan amónny pre LC-MS (Merck, Darmstadt, Nemecko)
Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

Ketokyseliny

1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzen, dihydrochlorid (DDB) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzen, dihydrochlorid (DMB) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
2-Merkaptoethanol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
Acetonitril, HPLC gradient grade (Merck, Darmstadt, Nemecko)
Chlorid sodný (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
Dithioničitan sodný (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Ketokyseliny (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

- pyruvát (PYR)
- 2-oxoglutarát (2-OG)
- 2-ketoisovalerát (KIV)
- 2-ketoisokapronát (KIC)
- 2-ketokapronát
- 2-ketomethylvalerát (KMV)

Kyselina chloristá (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
Kyselina chlorovodíková (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
o-Fenyléndiamín, dihydrochlorid (OPD) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)

Mastné kyseliny

2-Propanol (Merck, Darmstadt, Nemecko)
Acetylchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Butanol (Merck, Darmstadt, Nemecko)

Butylovaný hydroxytoluen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Deionizovaná voda (0,055 µS)
Dichlormethan (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)
Diethylether (Fluka, Sigma-Aldrich, Buchs, Švajčiarsko)
Ethanol gradient grade pre kvapalinovú chromatografiu LiChrosolv® (Merck, Darmstadt, Nemecko)
FAME Mix Supelco 37 Component Mix v CH₂Cl₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Fluorid boritý (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Hydrogénuhličitan draselný (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)
Mastné kyseliny – p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

- kyselina heneikosanová (C21:0)
- kyselina sapienová (*cis* C16:1 n10)
- kyselina *cis*-vakeénová (*cis* C18:1 n7)
- kyselina adrenová (*all-cis* C22:4 n6)
- kyselina osbondová (*all-cis* C22:5 n6)
- kyselina klupanodonová (*all-cis* C22:5 n3)

Methanol, gradient grade pre kvapalinovú chromatografiu (Merck, Darmstadt, Nemecko)
n-Hexán, gradient grade pre kvapalinovú chromatografiu (Merck, Darmstadt, Nemecko)

3.1.3 Pomôcky a prístroje

Analytické váhy Adventurer™Pro AV114C a predvážky Adventurer™Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švajčiarsko)
Automatické mikropipety Biohit (Biohit PLC., Helsinki, Fínsko) a Eppendorf Research® plus (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
Dierovačka, pinzeta, sterilná ihla
Filtračná aparátúra Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Filtračný papier na odber krvi Whatmann 903 (Whatmann, GmbH, Dassel, Nemecko)
Hlbokomraziaci box MDF-U 3086S (Sanyo Electric, Ósaka, Japonsko)
Inserty pre šróbovacie vialky ND8, 100 µl (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
Kadičky, odmerné banky, odmerné valce
Kolóna Ascentis® Express OH5 150 × 2,1 mm, 2,7 µm, opatrená predkolónou Ascentis® Express OH5 5 mm × 4,6 mm, 2,7 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Kolóna Ascentis® Express C18 150 × 4,6 mm, 5 µm, opatrená predkolónou Ascentis® Express C18 0,5 cm × 4,6 mm, 5 µm (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko)

Kolóna HP-88 100 m × 0,25 mm, 0,20 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Kolóna LiChroCart 125 × 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm, opatrená predkolónou LiChroCart 4 × 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm (Merck, Darmstadt, Nemecko)

Kolóna Restek Rtx: 60 m × 0,25 mm, 0,20 µm (Restek GmbH, Bad Homburg, Nemecko)

Kolónky na SPE extrakciu Bond Elut Si (Analytichem Instrumental, Harbor City, CA, USA)

Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, EU)

Krimpovacie kliešte (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Kvapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

- riadiaca jednotka CBM-20A
- čerpadlo LC-20AD
- chladený autosampler SIL-20AC
- termostat kolón CTO-20AC
- hmotnostný spektrometer LCMS-8045

Kvapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)

- riadiaca jednotka CBM-40
- degasér DGU-403
- čerpadlo LC-40B_{XR}
- autosampler SIL-40C_{XR}
- termostat kolón CTO-40C
- fluorescenčný detektor RF-20A_{XS}

Magnetické miešadlo Heidolph MR 3001K (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Švabach, Nemecko)

Manifold Visiprep™ pre vákuovú SPE extrakciu (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Membránová výveva (KNF Neuberger, Inc., Trenton, NJ, USA)

Nylonové filtre ISO-Disc™ pre filtrovanie vzorky, porozita 0,2 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Nylonové filtre pre filtrovanie mobilnej fázy; porozita 0,2 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Odstredivky Beckman GPR Centrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a Eppendorf MiniSpin Centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)

pH-meter inoLab, Level 2 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Nemecko)

Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Polypropylénové mikroskúmavky; 1,5 ml (Fisher Scientific, s. r. o., Pardubice, ČR)

Prístroj pre prípravu ultračistej vody Smart2Pure (TKA, Niederelbert, Nemecko)

Pyrex® skúmavky s teflonovým tesnením (Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Veľká Británia)

Sklenené vialky so skrutkovacím uzáverom (Fisher Scientific, s. r. o., Pardubice, ČR)

Sklenené vialky s krimpovacími víčkami (Fisher Scientific, s. r. o., Pardubice, ČR)

Sušiareň Memmert UFB 400 (Mettler GmbH & Co. KG, Schwabach, Nemecko)

Termoblok Thermo scientific, model 18821, Reacti-Therm™ Heating/Stirring Module (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Tlakové fľaše:

- Dusík: N₂ 4,0 UN 1066 (Linde Gas, Praha, ČR)
- Hélium: He 5,0 UN 1046 (Linde Gas, Praha, ČR)
- Vzduch: O₂ 20 %, N₂ 80 % UN 1956 (Linde Gas, Praha, ČR)
- Vodík: H₂ 5,0 (Linde Gas, Praha, ČR)

Ultrazvuková vaňa K12 (Kraintek s. r. o., Podhájska, Slovensko)

Vortex Reax top (Heidolph, Frankfurt, Nemecko)

3.1.4 Pracovné roztoky

Deionizovaná voda

Deionizovaná voda ($G = 0,055 \mu\text{S}$) určená na prepláchnutie HPLC systému bola prefiltrovaná cez nylonový filter s porozitou 0,2 μm a odvzdušnená ultrazvukom.

Stanovenie aminokyselín

Borátový pufo (asi 0,1 mol/l)

Navážka 0,310 g kyseliny boritej bola rozpustená v 50 ml deionizovanej vody a pH bolo upravené NaOH (6 mol/l) na hodnotu 9,3. Nakoniec bol pufo prefiltrovaný cez nylonový filter s porozitou 0,2 μm a uchovávaný pri 4 °C maximálne po dobu 1 týždňa.

Mobilná fáza A pre metódu HPLC-FLD (asi 10 mmol/l Na_2HPO_4 – acetonitril, 95:5, v/v);
pH $7,2 \pm 0,1$

V 950 ml deionizovanej vody bola rozpustená navážka 1,350 g Na_2HPO_4 . Po rozpustení bolo pridaných 50 ml acetonitrilu a pH mobilnej fázy bolo upravené HCl (asi 6 mol/l) na hodnotu 7,2. Mobilná fáza bola prefiltrovaná cez nylonový filter s porozitou 0,2 μm a odvzdušená ultrazvukom.

Mobilná fáza B pre metódu HPLC-FLD (asi 10 mmol/l Na_2HPO_4 – acetonitril, 35:65, v/v);
pH $7,2 \pm 0,1$

V 350 ml deionizovanej vody bola rozpustená navážka 0,500 g Na_2HPO_4 . Po rozpustení bolo pridaných 650 ml acetonitrilu a pH mobilnej fázy bolo upravené HCl (asi 6 mol/l) na hodnotu 7,2. Mobilná fáza bola prefiltrovaná cez nylonový filter s porozitou 0,2 μm a odvzdušená ultrazvukom.

Mobilná fáza A pre metódu HPLC-ESI-MS/MS (ACN - 10 mmol/l NH_3HCOOH , 90:10, v/v);
pH $4,5 \pm 0,1$

V 100 ml deionizovanej vody bola rozpustená navážka 0,630 g NH_3HCOOH . Po rozpustení bolo pridaných 900 ml ACN a pH mobilnej fázy bolo upravené HCOOH na hodnotu 4,5. Mobilná fáza bola prefiltrovaná cez nylonový filter s porozitou 0,2 μm a odvzdušená ultrazvukom.

Mobilná fáza B pre metódu HPLC-ESI-MS/MS (voda - 10 mmol/l NH_3HCOOH , 90:10, v/v);
pH $4,5 \pm 0,1$

V 100 ml deionizovanej vody bola rozpustená navážka 0,630 g NH_3HCOOH . Po rozpustení bolo pridaných 900 ml deionizovanej vody a pH mobilnej fázy bolo upravené HCOOH na hodnotu 4,5. Mobilná fáza bola prefiltrovaná cez nylonový filter s porozitou 0,2 μm a odvzdušená ultrazvukom.

Kyanid draselný (asi 40mmol/l)

V 2 ml deionizovanej vody bolo rozpustených asi 0,005 g kyanidu draselného. Roztok kyanidu bol uchovávaný pri 4 °C po dobu 1 týždňa.

Kyselina chlorovodíková (asi 1mmol/l)

Koncentrovaná kyselina chlorovodíková ((asi 11,95mol/l) o objeme 40 µl bola pipetovaná k 500 ml deionizovanej vody. Roztok bol uchovávaný pri 4 °C po dobu 1 mesiaca.

Roztok NDA (asi 5,5mmol/l)

Navážka 0,001 g NDA bola rozpustená v 1 ml etanolu. Roztok bol čerstvo pripravený pred každou analýzou.

Roztok OPA (asi 16,5mmol/l)

V 2,5 ml etanolu bolo rozpustených 5,5 mg OPA. Roztok bol čerstvo pripravený pred každou analýzou.

Zásobné roztoky AK pre metódu HPLC-FLD

Zásobné roztoky príslušných aminokyselín boli pripravené rozpustením konkrétnej navážky podľa nasledujúcej tabuľky v 10 ml deionizovanej vody. Zásobné roztoky boli skladované pri -80 °C.

Aminokyselina	Mr (g/mol)	Navážka (g)	Koncentrácia (µmol/l)
2-Aminomaslová kyselina	103,12	0,0069	6691,2
Alanín	89,09	0,0054	6061,3
Arginín	210,66	0,0105	4984,3
Asparagín	132,12	0,0069	5222,5
Asparágová kyselina	133,10	0,0067	5033,8
Fenylalanín	165,19	0,0125	7567,0
Glutamín	146,15	0,0076	5200,1
Glutámová kyselina	147,13	0,0085	5777,2
Glycín	75,07	0,0046	6127,6
Histidín	155,15	0,0105	6767,6
Izoleucín	131,18	0,0085	6479,6
Leucín	131,18	0,0096	7318,2
Lyzín	182,65	0,0100	5475,0
Metionín	149,21	0,0076	5093,5
Norleucín	131,17	0,0079	6022,7

Aminokyselina	Mr (g/mol)	Navážka (g)	Koncentrácia (μmol/l)
Norvalín	117,15	0,0107	9133,6
Serín	105,09	0,0058	5519,1
Taurín	125,14	0,0075	5993,3
Treonín	119,12	0,0063	5288,8
Tryptofán	204,23	0,0117	5728,8
Tyrozín	181,19	0,0115	6346,9
Valín	117,15	0,0075	6402,0

Zásobné roztoky AK pre metódu HPLC-ESI-MS/MS

Zásobné roztoky príslušných aminokyselín boli pripravené rozpustením konkrétnej navážky podľa nasledujúcej tabuľky v 25 ml deionizovanej vody. Zásobné roztoky boli skladované pri -80 °C.

Aminokyselina	Mr (g/mol)	Navážka (g)	Koncentrácia (μmol/l)
2-Aminomaslová kyselina	103,12	0,0242	9387,1
Alanín	89,09	0,0237	10640,9
Arginín hydrochlorid	210,66	0,0514	9759,8
Asparagín	132,12	0,0340	10293,7
Asparágová kyselina	133,10	0,0317	9526,7
Citrulín	175,19	0,0433	9886,4
Fenylalanín	165,19	0,0413	10000,6
Glutamín	146,15	0,0385	10537,1
Glutámová kyselina	147,13	0,0380	10331,0
Glycín	75,07	0,0190	10123,9
Histidín	155,15	0,0380	9797,0
Izoleucín	131,18	0,0321	9788,1
Leucín	131,18	0,0342	10428,4
Lyzín hydrochlorid	182,65	0,0449	9833,0
Metionín	149,21	0,0382	10240,6
Norleucín	131,17	0,0317	9666,8
Norvalín	117,15	0,0304	10379,9
Prolín	115,13	0,0307	10666,2

Aminokyselina	Mr (g/mol)	Navážka (g)	Koncentrácia ($\mu\text{mol/l}$)
Serín	105,09	0,0289	11000,1
Treonín	119,12	0,0292	9805,2
Tryptofán	204,23	0,0501	9812,5
Tyrozín	181,19	0,0044	971,4
Valín	117,15	0,0288	9833,5

Stanovenie ketokyselín

Hydroxid sodný (asi 1mmol/l)

Navážka 0,004 g NaOH bola rozpustená v 100 ml deionizovanej vody. Roztok bol uchovávaný pri +4 °C.

Chlorid sodný (asi 9,4%)

Navážka 0,470 g chloridu sodného bola rozpustená v 4,5 ml deionizovanej vody.

Chlorid sodný (asi 0,85%)

Roztok bol pripravený zriedením 90 μl asi 9,4% NaCl s 910 μl deionizovanej vody.

Ethanol (asi 10% roztok vo vode (v/v))

Roztok bol pripravený zmiešaním 100 μl ethanolu s 900 μl deionizovanej vody.

Ethanol (asi 25% roztok vo vode (v/v))

Roztok bol pripravený zmiešaním 250 μl ethanolu so 750 μl deionizovanej vody.

Kyselina chloristá (asi 1mol/l)

Roztok bol pripravený zriedením 85 μl koncentrovanej kyseliny chloristej (asi 11,65mol/l) s 915 μl deionizovanej vody.

Kyselina chloristá (asi 6,3mol/l)

Roztok bol pripravený zriedením 2 ml koncentrovanej kyseliny chloristej (asi 11,65mol/l) s 2 ml deionizovanej vody. Roztok bol uchovávaný pri +4 °C maximálne po dobu 1 mesiaca.

Kyselina chloristá (asi 1mmol/l)

Roztok bol pripravený zriedením 1,7 ml koncentrovanej kyseliny chloristej (asi 11,65mol/l) s 18,3 ml deionizovanej vody. Roztok bol uchovávaný pri +4 °C maximálne po dobu 1 mesiaca.

Kyselina chlorovodíková (asi 1mmol/l)

Roztok bol pripravený zriedením 84 µl koncentrovanej kyseliny (asi 11,95mol/l) s deionizovanou vodou na konečný objem 1000 ml. Roztok bol uchovávaný pri +4 °C maximálne po dobu 1 mesiaca.

Mobilná fáza A (25% ACN v deionizovanej vode)

Bolo zmiešaných 250 ml 100% ACN a 750 ml deionizovanej vody. Mobilná fáza bola následne prefiltrovaná cez nylonový filter s porozitou 0,2 µm a odvzdušená ultrazvukom.

Mobilná fáza B (100% ACN)

Cez nylonový filter s porozitou 0,2 µm bolo najskôr prefiltrovaných a potom v ultrazvuku odvzdušených 500 ml 100% ACN.

Roztok OPD (asi 25mmol/l)

Navážka 0,277 g OPD bola rozpustená v 25 ml deionizovanej vody. Následne bolo opatrne pridaných 10 ml koncentrovanej HCl a 25 ml deionizovanej vody. Alikvoty roztoku boli uchovávané pri -80 °C.

Roztok derivatizačného činidla (asi 4,1mmol/l DDB/ asi 4,4mmol/l DMB/asi 5,5mmol/l OPD) s 2-ME a dithioničitanom sodným

Navážka 0,049 g dithioničitanu sodného bola rozpustená v 5 ml deionizovanej vody. Po úplnom rozpustení bolo pridaných 590 µl koncentrovanej HCl a 0,7 ml 2-ME (asi 14,3mol/l). Následne bola zmes doplnená deionizovanou vodou na objem 10 ml. V takto pripravenej zmesi bola rozpustená navážka 10 mg DDB/DMB/OPD. Alikvoty pripravených derivatizačných činidiel boli uchovávané pri -80 °C.

Zásobné roztoky KK

Zásobné roztoky príslušných KK boli pripravené rozpustením konkrétnej navážky podľa nasledujúcej tabuľky v 10 ml 1mmol/l kyseliny chlorovodíkovej. Zásobné roztoky boli skladované pri -80 °C.

Ketokyselina	Mr (g/mol)	Navážka (g)	Koncentrácia (μmol/l)
2-OG	168,08	0,0077	4581,2
2-Ketokapronát	152,1	0,0054	3549,6
3-Methyl-2-oxobutyrát (KIV)	138,1	0,0054	3910,2
3-Methyl-2-oxovalerát (KMV)	152,1	0,0071	4667,1
4-Methyl-2-oxovalerát (KIC)	152,1	0,0069	4535,6
Pyruvát	110,0	0,0068	6179,6

Stanovenie mastných kyselín

Butylovaný hydroxytoluen (asi 1% roztok)

Navážka 0,005 g bola rozpustená v 5 ml ethanolu. Roztok bol pripravený tesne pred aplikáciou na odberové kartičky.

Derivatizačná zmes methanol:acetylchlorid (25:2, v/v)

K vychladenému methanolu bol opatrne po stene sklenenej skúmavky pridaný acetylchlorid v pomere 25:2. Derivatizačná zmes bola pripravená k okamžitému použitiu.

Hydrogénuhličitan draselný (asi 6% roztok)

Navážka 0,600 g KHCO_3 bola rozpustená v 9,4 ml deionizovanej vody. Roztok bol uchovávaný pri +4 °C.

Zásobný roztok kyseliny heneikosanovej (C21:0)

Navážka 0,010 g kyseliny heneikosanovej (C21:0), interného štandardu pre stanovenie MK, bola rozpustená v 10 ml ethanolu. Roztok bol uchovávaný pri -20 °C. Pracovné roztoky používané pri stanovení MK boli riedené v methanole a taktiež uchovávané pri -20 °C.

Zásobné roztoky MK v hexáne (400 μg/ml)

Navážka 0,004 g príslušných MK bola rozpustená v 10 ml hexánu. Takto boli pripravené roztoky kyseliny sapienovej (*cis* C16:1 n10), *cis*-vaccénovej (*cis* C18:1 n7), adrenovej (all-*cis* C22:4 n6), osbondovej (all-*cis* C22:5 n6) a kyseliny klupanodonovej (all-*cis* C22:5 n3). Roztoky boli uchovávané pri -80 °C.

Elučná zmes hexán:diethylether (95:5, v/v)

Zmes bola pripravená zmiešaním 95 dielov hexánu a 5 dielov diethyletheru čerstvo pred každým použitím.

3.2 Postup stanovenia vybraných aminokyselín

Vzorky boli po elúcii priamo analyzované metódou HPLC-ESI-MS/MS, bez nutnosti derivatizácie.

3.2.1 Príprava vzoriek

Zo vzorky DBS bol vyseknutý terčik o priemere 6 mm a vložený do plastovej mikroskúmavky. K terčiku bolo pridaných 150 μ l roztoku IS v 75% ACN (norvalín o koncentrácii 10 μ mol/l) a po 30 minútach elúcie v ultrazvukovej vani bola vzorka scentrifugovaná (1970 \times g, 5 min, 4 °C). Následne bolo 100 μ l takto pripravenej vzorky prepipetovaných do insertu chromatografickej vialky a analyzované metódou HPLC-ESI-MS/MS.

3.2.2 Príprava štandardov

Zásobné roztoky jednotlivých AK (asi 10mmol/l v 1mmol/l kyseline chlorovodíkovej a asi 1mmol/l v 1mmol/l kyseline chlorovodíkovej) boli nariadené pre vytvorenie zmesného štandardu. Najvyšší bod kalibrácie bol získaný lyofilizáciou 1 ml takto pripraveného zmesného štandardu a jeho následným rozpustením v 1 ml plnej krvi. Ostatné body kalibrácie boli pripravené riedením tohto najvyššieho bodu plnou krvou. Približne 30 μ l takto pripravených štandardov v plnej krvi bolo pipetovaných na odberový filtračný papier, kde boli ponechané zaschnúť za dodržania rovnakých podmienok ako pri odbere reálnych vzoriek.

3.2.3 Chromatografická analýza

Kolóna:	Kolóna Ascentis [®] Express OH5 150 \times 2,1 mm; 2,7 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Mobilná fáza A:	ACN - 10 mmol/l NH ₃ HCOOH (90:10, v/v); pH 4,5 \pm 0,1
Mobilná fáza B:	voda - 10 mmol/l NH ₃ HCOOH (90:10, v/v); pH 4,5 \pm 0,1
Prietok mobilnej fázy:	0,25 ml/min
Dávkovaný objem:	2 μ l

Autosampler: 8 °C
Teplota kolóny: 37 °C

Časový program:

0,00 min	95 % B
08,00 min	47 % B
08,50 min	47 % B
08,51 min	95 % B
15,00 min	95 % B
15,01 min	STOP

Detektor: ESI-MS/MS

Parametre iónového zdroja:

kapilárne napätie	5 kV
prietok zahrievacieho plynu	10 l/min
prietok sušiacieho plynu	10 l/min
prietok nebulizačného plynu	2 l/min
teplota rozhrania	300 °C
desolvatačná teplota	250 °C
teplota v zahrievacom bloku	400 °C
detekčný mód	pozitívny MRM

Kvalitatívne stanovenie: porovnanie retenčných časov a MRM prechodov so známymi štandardmi

Kvantitatívne stanovenie: metóda kalibračnej krivky (plocha píku vzorky/plocha píku vnútorného štandardu)

3.3 Postup stanovenia vybraných ketokyselín

3.3.1 Príprava vzoriek

Zo vzorky DBS bol vyseknutý terčik o priemere 6 mm a vložený do plastovej mikroskúmavky. K terčiku bolo pridaných 200 µl roztoku IS v 1mmol/l kyseline chlorovodíkovej (2-ketokapronát o koncentrácii 2 µmol/l). Po 60 minútach elúcie bolo do mikroskúmavky pridaných 50 µl 6,3mol/l kyseliny chloristej. Obsah skúmavky bol premiešaný (60 s)

a po 10 minútach inkubácie pri 4 °C stočený (4430 × g, 4 °C, 10 min). Do čistej plastovej mikroskúmavky bolo odobratých 150 µl supernatantu a pridaných 150 µl derivatizačnej zmesi, ktorá pozostávala zo 150 µg OPD, 25mmol/l dithioničitanu sodného, 0,7mol/l kyseliny chlorovodíkovej a 1mol/l 2-ME. Následne prebiehala pri 55 °C inkubácia po dobu 30 minút. Po schladení na laboratórnu teplotu bola zmes prefiltrovaná cez nylonový filter o porozite 0,2 µm, prepipetovaná do insertu chromatografickej vialky a analyzovaná metódou HPLC-FLD.

3.3.2 Príprava štandardov

Zásobné roztoky jednotlivých KK (asi 10 mmol/l v 1mmol/l kyseline chlorovodíkovej) boli nariadené 0,85% roztokom NaCl tak, aby vytvorili sériu zmesných štandardov s rôznymi koncentraciami pre zostavenie kalibračnej krivky. K 50 µl takto pripravených roztokov bolo pridaných 950 µl plnej krvi (v prípade nulového bodu kalibrácie to bolo 50 µl 0,85% roztoku NaCl a 950 µl plnej krvi). Približne 30 µl takto pripravených štandardov bolo pipetovaných na odberový filtračný papier, kde boli ponechané zaschnúť za dodržania rovnakých podmienok ako pri odbere reálnych vzoriek.

3.3.3 Chromatografická analýza

Kolóna:	Kolóna LiChroCart 125 × 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm (Merck, Darmstadt, Nemecko)
Predkolóna:	Predkolóna LiChroCart 4 × 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm (Merck, Darmstadt, Nemecko)
Mobilná fáza A:	25% ACN vo vode (v/v)
Mobilná fáza B:	100% ACN
Prietok mobilnej fázy:	0,5 ml/min
Dávkovaný objem:	10 µl
Autosampler:	4 °C
Teplota kolóny:	37 °C
Časový program:	
0,00 min	2 % B
03,00 min	2 % B

03,01 min	35 % B
13,00 min	38 % B
13,01 min	100 % B
18,00 min	100 % B
18,01 min	2 % B
22,00 min	STOP

Detektor: fluorescenčný
 λ (excitácia) = 350 nm
 λ (emisía) = 410 nm
stredná citlivosť
zosilnenie $\times 16$

Kvalitatívne stanovenie: porovnanie retenčných časov so známymi štandardmi

Kvantitatívne stanovenie: metóda kalibračnej krivky (plocha píku vzorky/plocha píku vnútorného štandardu)

3.4 Postup stanovenia vybraných mastných kyselín

3.4.1 Príprava vzoriek

Zo vzorky DBS bol vyseknutý terčik o priemere 6 mm a vložený do sklenenej pyrex skúmavky. K terčíku bolo pridaných 200 μ l roztoku IS v methanole (C21:0 o koncentrácii 6,75 μ g/ml) a po 1 hodine elúcie bol terčik sterilnou ihlou zo skúmavky vybraný. K roztoku bolo následne pridaných 300 μ l predpripraveného derivatizačného činidla (methanol:acetylchlorid; 25:2, v/v). Derivatizácia prebiehala 1 hodinu pri teplote 100 °C. Zmes bola po schladení na laboratórnu teplotu neutralizovaná prídavkom 400 μ l asi 6% KHCO₃. Nasledovala dvojnásobná extrakcia methylesterov MK do 500 μ l hexánu (10-minutové vytrepávanie a centrifugácia 1225 \times g, 5 minút, 4 °C). Spojené extrakty boli odparené pod prúdom N₂ a potom redisolvované v 100 μ l dichlormethanu. Takto pripravené vzorky boli prepipetované do insertov chromatografických vialiek a analyzované metódou GC-FID.

3.4.2 Príprava štandardov

Zásobný roztok FAME bol dávkovaný bez úprav v splitovacom móde priamo na kolónu prístroja GC-FID a výsledky boli použité ako pre kvalitatívne stanovenie (porovnanie retenčných časov), tak pre kvantitatívne stanovenie (výpočet koncentrácie MK vo vzorke cez relatívne odozvové faktory (RRF)). Zásobné roztoky ostatných MK (400 µg/ml v hexáne), ktoré boli použité pre kvalitatívne stanovenie, boli najskôr odparené pod prúdom dusíku, potom rozpustené v 200 µl methanolu a derivatizované na methylestery pridaním 300 µl derivatizačnej zmesi. Ďalšie kroky boli následne totožné s postupom popísaným v podkapitole 3.4.1

3.4.3 Chromatografická analýza

Kolóna:	HP-88 100 m × 0,25 mm; 0,20 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
Nosný plyn:	hélium
Prietok nosného plynu:	3 ml/min
Dávkovaný objem:	1 µl
Split mód:	10:1
Teplota nástreku:	250 °C
Doba analýzy:	101 min (pozn. 57 min pre separáciu MK, zvyšok na vyplavenie cholesterolu)
Teplota detektoru:	250 °C
Prietok plynov v detektore:	
○ H ₂	30 ml/min
○ vzduch	400 ml/min
○ make-up (hélium)	25 ml/min

Teplotný gradient:

Nárast (°C/min)	Teplota (°C)	Čas (min)
	80	3
10	180	3
1	220	1
5	240	40

Kvalitatívne stanovenie: porovnanie retenčných časov so známymi štandardmi

Kvantitatívne stanovenie:

- percentuálne zastúpenie vypočítané z celkového množstva vyhodnocovaných MK vo vzorke podľa vzorca $c_x = (\text{Area}_x \times 100) / \sum \text{Area}_1 + \text{Area}_2 + \dots + \text{Area}_n$, kde n je počet vyhodnocovaných MK, Area je plocha píku
- MK s dominantným zastúpením boli prezentované tiež výpočtom z RRF, ako hmotnostná koncentrácia: $c_x = (\text{RRF} \times c_{\text{IS}} \times \text{Area}_x) / \text{Area}_{\text{IS}}$, ktorá bola následne prepočítaná na koncentráciu molárnu

3.5 Analytické parametre metód

Kvôli relatívne problematickej príprave štandardov MK v matrici vzorky DBS (nepolárne MK nie sú dobre rozpustné v polárnej matrici plnej krvi) bolo rozhodnuté, že jediným parametrom metódy pre stanovenie MK bude presnosť. Tá bola určená zo vzoriek DBS od dobrovoľného darcu s normálnou hodnotou HCT bez prídavku akýchkoľvek štandardov (s výnimkou aplikácie interného štandardu pri spracovaní vzorky).

Analytické parametre metódy pre stanovenie AK boli určené z lyofilizovaného zmesného štandardu, ktorý bol následne rozpustený v plnej krvi, zatiaľ čo metódy pre stanovenie KK bol použitý vodný zmesný štandard nariadený plnou krvou. V oboch prípadoch bola následne krv aplikovaná na filtračný papier, sledujúc rovnaké kroky ako pri aplikácii skutočných vzoriek od dobrovoľných darcov. Pre stanovenie LOD a LOQ bola pripravená špeciálna kalibračná krivka zo zmesných štandardov rozpustených vo vode. Limity boli potom vypočítané zo smerodatnej odchýlky interceptu a sklonu regresnej čiary.

3.5.1 Linearita

Linearita vyjadruje schopnosť metódy v určitom rozsahu koncentrácií poskytovať signál priamo úmerný koncentrácii analytu vo vzorke. Tento vzťah je vyjadrený rovnicou regresie ($y = kx + Q$), ktorá pozostáva zo smernice (k) a absolútneho čísla (Q). Smernica poukazuje na nárast závislej premennej (y) pri náraste nezávislej premennej (x), zatiaľ čo absolútne číslo predstavuje hodnotu závislej premennej, keď nezávislá premenná je rovná nule. Kalibračnú závislosť možno znázorniť krivkou.

3.5.2 Presnosť

Presnosť metódy je definovaná ako miera zhody medzi výsledkami získanými opakovanou analýzou tej istej vzorky v dopredu určených podmienkach. Podľa podmienok, pri ktorých analýza prebieha, rozlišujeme opakovateľnosť (analýzy sú vykonané v krátkom časovom úseku na tom istom zariadení, tou istou osobou; používa sa aj označenie presnosť v sérii) a reprodukovateľnosť (analýzy sú vykonané s väčším časovým rozptylom na rovnakom zariadení, ale rôznymi pracovníkmi; používa sa aj označenie presnosť v čase). Zatiaľ čo prvá zo spomínaných vlastností charakterizuje precíznosť metódy, druhá charakterizuje jej stabilitu počas celej doby používania. Presnosť metódy nebýva v celom stanovovanom rozsahu koncentrácií rovnaká. Mierou rozptylu výsledkov, teda nepresnosti, je smerodajná odchýlka (SD), resp. variačný koeficient (CV).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - AVG)^2}{n - 1}}$$
$$CV (\%) = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

kde SD je štandardná odchýlka merania, x je koncentrácia vždy jednej zo vzoriek v sérii, AVG je aritmetický priemer koncentrácií, n je počet vzoriek.

3.5.3 Hranica detekcie

Hranica detekcie (LOD) je definovaná ako najnižšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré možno odlíšiť od náhodného šumu prístroja a metódy. Ak je hodnota analytu nad LOD, výsledok možno vydať kvalitatívne, ale nie nutne kvantitatívne. Existuje niekoľko vzťahov pre výpočet LOD. V tejto práci bol použitý výpočet na základe rovníc kalibračnej krivky

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_a}{b}$$

kde S_a je SD interceptu, b je smernica kalibračnej krivky.

3.5.4 Hranica stanoviteľnosti

Hranica stanoviteľnosti (LOQ) je definovaná ako najnižšia koncentrácia analytu, ktorá môže byť stanovená s požadovanou hodnotou neistoty. Ak je hodnota analytu nad LOQ, výsledok možno vydať kvantitatívne. Podobne ako v prípade LOD, aj tu existuje niekoľko vzťahov pre výpočet. V tejto práci bol použitý výpočet na základe rovníc kalibračnej krivky

$$LOD = \frac{10 \cdot S_a}{b}$$

3.5.5 Výťažnosť

Výťažnosť (recovery) je schopnosť metódy detegovať všetok analyt prítomný v analyzovanej vzorke. Je mierou účinnosti danej metódy. Vyjadrená je podielom nameranej a skutočne pridanej koncentrácie daného analytu

$$Recovery (\%) = \frac{x_1 - x_0}{A} \cdot 100$$

kde x_1 je koncentrácia analytu vo vzorke s prídavkom, x_0 je koncentrácia analytu vo vzorke bez prídavku, A je známa koncentrácia pridaného analytu.

3.5.6 Robustnosť

Robustnosť je schopnosť metódy poskytovať prijateľné výsledky merania aj v prípade, že dôjde k malým odchýlkam od zloženia vzorky alebo meracieho postupu. Tento parameter udáva spoľahlivosť analytickej metódy pri rutinnom používaní. V prípade chromatografického stanovenia môže ísť napríklad o zmenu teploty separácie, pH mobilnej fázy a podobne.

3.6 Štatistické spracovanie

Dáta boli spracované programom GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Všetky testy boli vykonané na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Pre porovnanie rozdielov medzi skupinou žien a mužov boli výsledky najskôr podrobené testu normality (štyri zabudované testy v programe GraphPad Prism (Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk, and Kolmogorov-Smirnov test). Dáta, ktoré prešli týmito testami, boli považované za dáta s Gaussovským rozložením a ďalej boli spracované nepárovým t-testom. V prípade, že dáta mali rozdielne rozptyly (F-test), bola aplikovaná Welchova korekcia. Dáta, ktoré neprešli testom normality, boli ďalej analyzované neparametrickým Mann-Whitney testom.

Pre analýzu vplyvu veku bola v prípade Gaussovského rozloženia (4 testy normality spomenuté vyššie) použitá jednocestná ANOVA a Tukeyho post-hoc test. V prípade významne rozdielnych smerodajných odchýlok boli namiesto týchto testov použité Brown-Forsythe

a Welch ANOVA test. Za splnenia predpokladu nerovnomerného Gaussovského rozloženia boli dáta spracované testom Kruskal-Wallis a Dunn-Sidák post-hoc testom.

Vzťah medzi jednotlivými AK, KK a MK bol vyhodnotený cez korelačnú maticu pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu.

Za štatisticky významné boli považované p hodnoty nižšie ako 0,05.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

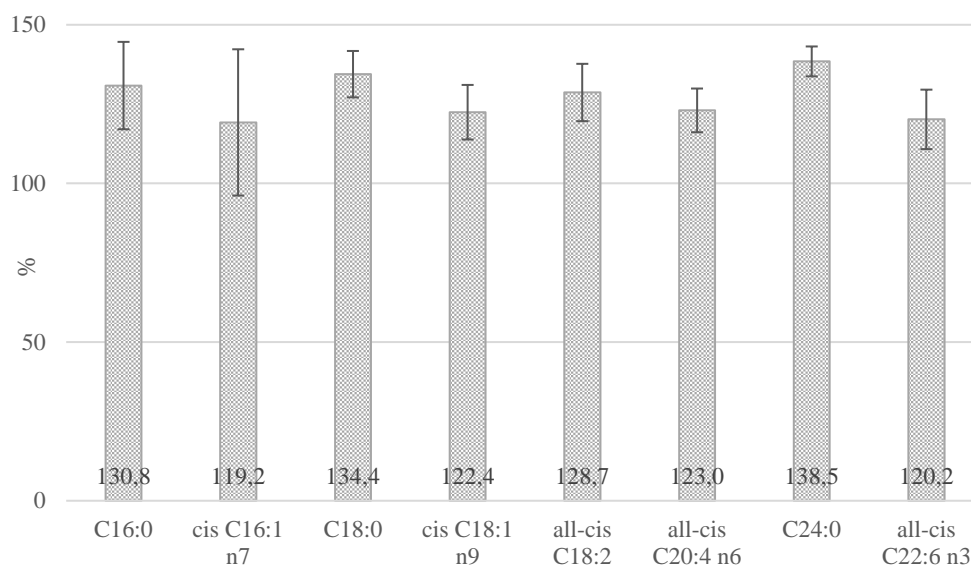
Skriningové vyšetrenie stavu metabolizmu je dôležitým indikátorom zdravotného stavu jedinca. Týmto spôsobom môžu byť v ranom štádiu zachytené rozličné metabolické poruchy, prípadne možno takýmto spôsobom sledovať účinok nasadenej liečby. Najčastejšie sú za týmto účelom vyšetrované klasické vzorky – plná krv alebo plazma (Mihalik *et al.*, 2012; Paolino *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2003; Wurtz *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2013). Pre veľké množstvo výhod, akými sú rýchly, jednoduchý a takmer bezbolestný odber vzorky, taktiež možnosť samoodberu, výborná stabilita väčšiny analytov za izbovej teploty, a tým pádom jednoduchý transport vzorky do laboratória, sa ako alternatíva pre tieto analýzy ponúka vzorka DBS.

Na trhu je dostupných niekoľko rôznych typov filtračných papierov určených pre odber vzorky DBS. Všetky sú vyrobené zo 100% bavlnených vlákien, ale môžu sa líšiť vo veľkosti pórov alebo hrúbke a ovplyvniť tak nasiakavosť krvi do štruktúry papiera (Li a Tse, 2010). Podľa niektorých štúdií sa najmä pri extrémnych koncentráciách stanovovaných analytov rozdiely vo výsledkoch analýzy medzi vzorkami na rôznych filtračných papieroch objavujú. Ďalšie štúdie naopak naznačujú, že výsledky sú medzi sebou porovnateľné bez ohľadu na použitý filtračný papier (Koster *et al.*, 2015; Rottinghaus *et al.*, 2014). V tejto štúdii sa pre reprodukovateľnosť výsledkov pracovalo po celú dobu s jedným konkrétnym typom filtračného papiera, a to Whatman® 903. Odberový papier bol neošetrený, iba odberové miesto pre stanovenie MK bolo z dôvodu podporenia stability PUFA (Metherel *et al.*, 2013) ošetrené pred odberom vzorky roztokom BHT.

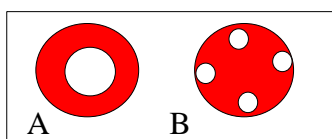
4.1 Príprava vzorky

Dodržiavanie správneho postupu prípravy vzorky DBS môže mať zásadný vplyv na výsledok celej analýzy. Preto by pri odbere vzoriek plnej krvi mali byť dodržiavané zásady zhrnuté v podkapitole 1.1.3. Napríklad podľa Lawson *et al.* (2016) má vplyv na stanovenie analytov zo vzorky DBS vrstvenie viacerých kvapiek krvi na seba. Výsledky našej štúdie ale naznačujú, že opakované nasiaknutie filtračného papiera plnou krvou neprodukuje odlišné výsledky v porovnaní so vzorkami nasiaknutými na jedno priloženie. Podobne nevýznamným faktorom je pri analýze podľa našich výsledkov aj množstvo nanesej krvi na filtračný papier, pokiaľ je splnená požiadavka na minimálny objem 30 μ l. Menší objem krvi na filtračnom papieri totiž nezaručí dostatočné nasiaknutie papiera v celom objeme vyseknutého terčika (priemer cca

6 mm) a takéto vzorky by mali byť z ďalšej analýzy vyradené. K neprílišnej významnosti tohto faktoru pravdepodobne prispieva uniformita použitých papierov a ich rovnaké zloženie aj medzi šaržami navzájom, čo vo výsledku podporuje homogénne rozloženie vzorky krvi v ploche vyseknutého terčiku, a to bez ohľadu na jej počiatkové množstvo. Naopak, potvrdený bol mierny chromatografický efekt pri aplikácii krvi na filtračný papier. Podobne ako v iných štúdiách (Holub *et al.*, 2006; Lawson *et al.*, 2016; O'Mara *et al.*, 2011) sme aj v našich experimentoch zaznamenali mierne zvýšené koncentrácie stanovovaných analytov na okraji vzorky DBS v porovnaní s prostriedkom (ukážka rozdielov pri analýze MK, vid' Obr. 4). Lawson *et al.* (2016) testovali vzorky pripravené zo 75 μl plnej krvi. Je ale dôležité podotknúť, že pri bežnom odbere vzorky krvi punkciou je objem podstatne menší (cca 30-40 μl), takže vytvorená DBS má len o niečo málo väčšiu plochu než vysekávaný terčik. A teda väčšina zo vzorky je obsiahnutá práve vo vyseknutom terčiku. V našom experimente sme pracovali so vzorkou o objeme 30 μl . Terčiky z periférie boli vyseknuté spôsobom uvedeným na Obr. 5. Aj napriek uvedeným skutočnostiam je potrebné dbať na zachovanie pravidiel správneho spracovania vzorky a terčik pre analýzu vysekávať vždy z prostriedku škrvny, aby bolo zaručené homogénne nasiaknutie vyseknutého terčika.



Obrázok 4 Rozdiely v koncentrácii vybraných MK na okraji a v strede vzorky DBS (n = 3, HCT = 0,42) Hodnoty predstavujú koncentrácie MK v terčiku vyseknutom z okraja vzorky vztiahnuté ku hladine v terčiku vyseknutom zo stredu vzorky DBS (považované za 100 %).



Obrázok 5 Spôsob vyrazenia terčiku: **A** z centra DBS vzorky – 1 vyrazený terčik zo stredu (\varnothing 6 mm), **B** z okraja vzorky DBS - 4 vyrazené terčiky z okraja (\varnothing 3 mm)

Ďalším zdrojom chýb pri stanovení by mohol byť prenos analytov medzi vzorkami navzájom, a to zariadením na vyseknutie terčiku z DBS. Naše experimenty ukázali, že k minoritnému prenosu predovšetkým analytov o vysokej koncentrácii skutočne dochádza, tento prenos však významne neovplyvňoval následnú analýzu. Tomuto prenosu je navyše možné jednoducho zabrániť, a to vyseknutím čistého terčiku medzi dvomi vzorkami.

Okrem vyššie spomínaných externých faktorov, ktoré možno pri odbere vzorky relatívne jednoducho ovplyvniť, má nesporný vplyv na stanovenie analytov aj hodnota HCT (de Kesel *et al.*, 2014; Chace *et al.*, 2014, Li a Tse, 2010). Vyššia hodnota HCT je spojená s vyššou viskozitou krvi, a teda horším nasiaknutím krvi do filtračného papiera, respektíve horším šírením matricou tohto filtračného papiera. Naopak nižšia hodnota HCT je spojená s nižšou viskozitou, a teda rýchlejšim šírením v matrici filtračného papiera. Tento efekt musí byť zohľadnený pri validácii metodiky analýzy zo vzorky DBS. Do budúca možno použiť niektorú z metód predikcie hodnoty HCT zo vzorky DBS (Capiou *et al.*, 2013; den Burger *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2018), čo však zvyšuje nielen časovú náročnosť, ale aj ekonomické náklady testov. Pre skrínigové účely sa preto javí zatiaľ dostačujúce predpokladať u vzoriek normálnu hodnotu HCT a v prípade znížených či zvýšených koncentrácií sledovaných analytov pozvať pacienta na klasické vyšetrenie. Napríklad pri metóde stanovenia KK zo vzoriek DBS bol mierny vplyv hodnoty HCT potvrdený. U vzoriek s nižšou hodnotou HCT bol v koncentrácii stanovovaných KK pozorovaný mierny nárast (Kand'ár *et al.*, 2022).

4.2 Stanovenie vybraných aminokyselín

Najčastejšie sa pri stanovení AK v biologických vzorkách používajú chromatografické techniky, a to v zapojení s rozličnými druhmi detekcie ako napríklad fluorescenčná, UV, elektrochemická alebo MS. Väčšina z týchto spôsobov detekcie vyžaduje úpravu vlastností AK pred- alebo post- kolónovou derivatizáciou pre zvýšenie signálu zachytávaného detektorom (viď Tab. 1, str. 27-30). Práve kvôli možnosti detekcie bez predchádzajúcej derivatizácie sa stále rozširujúcej stáva zapojenie MS detektora. Jeho jedinou nevýhodou sú vysoké obstarávacie a prevádzkové náklady.

V tejto práci bola pri analýze vzoriek optimalizovaná derivatizácia AK a analýza vzniknutých derivátov metódou HPLC-FLD. Zavedená metóda vykazuje dostatočnú citlivosť, presnosť aj správnosť. Je vhodná pre použitie na pracoviskách, ktoré nedisponujú MS detektorom. V rámci rozvoja analytických metód aj samotného pracoviska bol v r. 2019 zakúpený nový prístroj, a to HPLC-ESI-MS/MS. Metóda analýzy AK bola optimalizovaná

doktorandom Mgr. Michalom Kopčilom. Novo zavedená metóda nevyžaduje derivatizáciu, je veľmi jednoduchá a časovo nenáročná. Preto bolo pri analýze reálnych vzoriek prístupné k analýze práve touto metódou.

4.2.1 Optimalizácia metódy kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou

Detekcia AK skrz ich prirodzenú fluorescenciu je aplikovateľná iba na AK obsahujúce aromatické jadro, to znamená Trp, Tyr, Phe. Ostatné AK prirodzene nefluoreskujú, a preto je potrebné ich pred analýzou previesť na vhodné deriváty. K tomuto účelu možno použiť niekoľko derivatizačných činidiel (vid' kapitola 1.2). V tejto práci boli testované 2 derivatizačné činidlá, a to NDA a OPA. Obe derivatizačné činidlá sú štruktúrne podobné, líšia sa len o jedno aromatické jadro (vid' Tab. 1, str. 30), čo ale spôsobuje, že vzniknuté deriváty majú odlišnú polaritu. V oboch prípadoch je možné činidlami derivatizovať iba primárne AK.

OPA reaguje s primárnymi AK v prítomnosti thiolových skupín za tvorby thio-2-alkyl-substituovaných isoindolových derivátov s vysokou mierou fluorescencie. Reakcia prebieha za izbovej teploty pri mierne alkalickom pH (9,7-10). Produkty derivatizačnej reakcie sú značne nestabilné, preto je nutné deriváty pripravovať tesne pred analýzou (Rigas, 2013). V našom prípade bola využitá schopnosť autosampleru pridať derivatizačné činidlo do reakcie priamo v karuseli chromatografického prístroja. Ako donor thiolových skupín boli použité 2-ME a 3-MPA. Deriváty OPA/3-MPA sa vyznačujú lepšou stabilitou v porovnaní s OPA/2-ME, avšak 3-MPA vnáša do reakcie jednu karboxylovú skupinu navyše, čo spôsobí zníženie polaritu vznikajúcich derivátov, a tým pádom horšiu retenciu na C18 nepolárnej kolóne (Hanczkó *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Rigas, 2013). Práve z tohto dôvodu sa nám AK po derivatizácii OPA/3-MPA nedarilo na kolóne dostatočne separovať ani po vyskúšaní niekoľkých gradientov. Výsledky derivatizácie OPA/2-ME boli lepšie.

Ďalším z testovaných činidiel bolo NDA. Toto derivatizačné činidlo vnáša do produktov derivatizačnej reakcie jedno benzénové jadro navyše, čím znižuje ich polaritu, takže sa lepšie zachytávajú na nepolárnej kolóne. Preto bolo možné miesto kolóny s plne poréznymi časticami (LiChroCart Purospher Star RP-18e, 125 × 4 mm, 5 μm) použiť kolónu s povrchovo poréznymi časticami (Ascentis® Express C18, 150 × 4,6 mm, 5 μm), čím sa výrazne skrátil čas analýzy (o polovicu). Deriváty AK s NDA sú navyše v porovnaní s OPA stabilnejšie (Zotou a Notou, 2013). Aj v tomto prípade reakcia prebieha za prítomnosti nukleofilného činidla pri laboratórnej teplote za mierne alkalického pH (okolo 9). Najčastejšie je to za prítomnosti KCN. V tejto práci

bolo okrem KCN otestované aj použitie 3-MPA a 2-ME. Derivatizácia však za daných podmienok prebiehala iba v prítomnosti KCN.

Pri optimalizácii derivatizačného kroku sa testovalo niekoľko možností. Podobne ako v iných publikáciách, aj v tejto práci bol použitý borátový pufr, pretože v porovnaní s fosfátovým pufrum vykazovali produkty derivatizačnej reakcie vyššiu fluorescenciu (Hanczkó *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Rigas, 2013). Potvrdilo sa tiež, že na intenzitu fluorescencie má vplyv pH použitého pufru. Ďalším predmetom skúmania bolo množstvo pridaného KCN a NDA pri zachovaní množstva borátového pufru a dávkovanej vzorky. V prípade KCN, ak bolo pridané menšie množstvo, intenzita fluorescencie u väčšiny AK vzrástla. Príliš malé množstvo pridaného NDA naopak spôsobilo pokles intenzity fluorescencie. Na základe získaných výsledkov testov bola metóda upravená nasledovne: k 100 μ l vzorky bolo pridaných 300 μ l borátového pufru (pH 9,3), 20 μ l KCN a 20 μ l NDA.

Pre rozdelenie derivátov AK boli použité 2 nepolárne C18 kolóny. Jedna s plne poréznyimi časticami (LiChroCart Purospher Star RP-18e, 125 \times 4 mm, 5 μ m) a druhá s povrchovo poréznyimi časticami, ktorá skracuje difúznu dráhu separovaných látok, a tým skracuje aj čas analýzy a zlepšuje rozlíšenie (Ascentis[®] Express C18, 150 \times 4,6 mm, 5 μ m). Na týchto kolónach bola optimalizovaná separácia použitím rozličných gradientov. Optimalizoval sa tiež prietok mobilnej fázy kolónou.

Procesom optimalizácie prešlo aj samotné spracovanie vzorky. Otestované boli rozdielne spôsoby elúcie (100% ethanol, 80% ethanol, 60% ethanol, 40% ethanol, kombinovaná elúcia – najskôr ethanol, potom voda a opačne), z ktorých najúčinnjším sa ukázalo použitie 80% ethanolu.

Konečné podmienky po optimalizácii metódy vyzerali takto: zo vzorky DBS bol vyseknutý terčík o priemere 6 mm, ku ktorému bol pridaný ethanolický roztok IS (20 μ l norleucínu o koncentrácii asi 90 μ mol/l) a okamžite aj 200 μ l 80% ethanolu. Po 15 minútach elúcie pri laboratórnej teplote boli vzorky scentrifugované a zvrchu bolo odobraných 100 μ l roztoku do čistej mikroskúmavky. K nim bolo pripipetovaných 300 μ l borátového pufru (pH 9,3), 20 μ l KCN a 20 μ l NDA. Inkubácia prebiehala 15 min v tme pri laboratórnej teplote. Pred HPLC analýzou boli vzorky prefiltrované cez nylonový filter o porozite 0,2 μ m. Separácia vzniknutých derivátov prebiehala na kolóne Ascentis[®] Express C18 (150 \times 4,6 mm, 5 μ m) opatrenej predkolónou Ascentis[®] Express C18 (0,5 cm \times 4,6 mm, 5 μ m). Ako mobilná fáza A bola použitá zmes 10mmol/l Na₂HPO₄ a acetonitrilu v pomere 95:5 (v/v), mobilnou fázou B bola zmes 10mmol/l Na₂HPO₄ a acetonitrilu v pomere 35:65 (v/v). U oboch mobilných fáz bolo

upravené pH na hodnotu 7,2. Na kolónu bolo dávkovaných 5 µl vzorky, separácia prebiehala s využitím gradientovej elúcie (viď Tab. 7) a prietok mobilnej fázy kolónou bol 0,75 ml/min. Deriváty boli detegované fluorescenčným detektorom pri emisnej/excitačnej vlnovej dĺžke 420/480 nm.

Tabuľka 7 Gradientová elúcia metódy HPLC-FLD

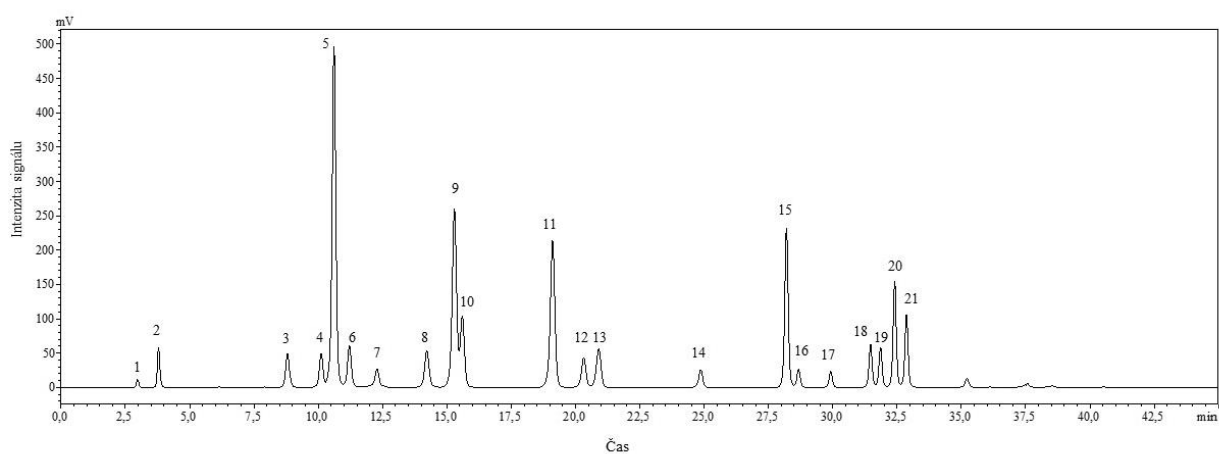
00,01 min	20 % B
20,00 min	32 % B
35,00 min	54,5 % B
35,01 min	100 % B
40,00 min	100 % B
40,01 min	20 % B
45,00 min	STOP

Metódou bolo celkovo detegovaných 21 AK, kvantifikovaných bolo 20 z nich. Problémovou AK bol lyzín, ktorý má v štruktúre dve aminoskupiny, takže pri derivatizácii môže vzniknúť viac derivátov, čo môže byť dôvodom veľmi vysokého variačného koeficientu pri stanovení presnosti metódy. Z dôvodu nepresnosti merania bol preto lyzín z analýz reálnych vzoriek vyradený. Oproti metóde HPLC-ESI-MS/MS nie je možné touto metódou detegovať ani sekundárnu AK prolín. Navyše však možno kvantifikovať aminokyseliny taurín a kyselinu asparágovú, ktoré v metóde s MS detekciou chýbajú. Analytické parametre metódy pre stanovenie vybraných 20 AK sú zobrazené v Prílohe 1. Kalibračné krivky všetkých AK boli lineárne v celom rozsahu testovaných koncentrácií. U väčšiny AK je hodnota CV presnosti v sérii aj medzi sériami pod 10 %. Jedinou výnimkou je kyselina asparágová, kde sa CV presnosti v sérii aj medzi sériami pohybuje okolo 15 %. Kyselina asparágová bola problémovou aj v metóde HPLC-ESI-MS/MS, kde bola kvôli nízkej intenzite signálu z analýz vyradená úplne. Priemerná výťažnosť pre jednotlivé AK sa pohybovala v rozmedzí 91-109 % s priemerným CV 6,5 % (viď Tab. 8). Chromatografický záznam stanovenia AK metódou HPLC-FLD je uvedený na Obr. 6.

Tabuľka 8 Priemerná výťažnosť metódy HPLC-FLD pre stanovenie AK zo vzoriek DBS

	AVG (%)	SD (%)	CV (%)
2-AM	108,30	6,90	6,40

	AVG (%)	SD (%)	CV (%)
Ala	102,9	7,1	6,9
Arg	91,5	6,6	7,2
Asn	103,5	6,9	6,7
Asp	105,4	12,6	12,0
Cit	105,9	8,1	7,7
Gln	104,6	4,9	4,7
Glu	94,2	7,6	8,1
Gly	103,9	6,0	5,8
His	101,5	7,2	7,1
Ile	107,6	7,2	6,7
Leu	105,9	5,2	4,9
Met	102,9	4,1	4,0
Phe	106,9	5,9	5,5
Ser	93,5	6,2	6,6
Tau	103,9	6,3	6,1
Thr	104,5	6,0	5,7
Trp	95,8	7,5	7,8
Tyr	105,2	5,2	4,9
Val	105,2	5,1	4,9



Obrázok 6 Chromatografický záznam stanovenia AK metódou HPLC-FLD

Vzorka zmesného štandardu rozpusteného v plnej krvi (S4), chromatografické podmienky uvedené v kapitole 4.2.1. Píky: **1**, Asp, **2**, Glu, **3**, Asn, **4**, His, **5**, Gln, **6**, Ser, **7**, Cit, **8**, Arg, **9**, Gly, **10**, Thr, **11**, Ala, **12**, Tyr, **13**, Tau, **14**, 2-AM, **15**, Val, **16**, Met, **17**, Trp, **18**, Ile, **19**, Phe, **20**, Leu, **21**, NLeu.

4.2.2 Optimalizácia metódy kvapalinovej chromatografie s hmotnostne spektrometrickou detekciou

Ako je popísané vyššie, s kúpou nového prístroja na Katedru biologických a biochemických vied do skupiny biochémie bola od r. 2019 mimo iné optimalizovaná aj nová metóda analýzy AK vo vzorkách. Optimalizácia tejto metódy bude podrobne popísaná v dizertačnej práci Mgr. Michala Kopčila (predpokladaná obhajoba v roku 2023), preto je v tejto práci popísaná iba veľmi stručne. V skratke, v rámci optimalizácie spracovania vzorky DBS boli testované rozdielne elučné činidlá (90%, 85%, 80% a 75% ACN; 80% ACN s prídavkom 10mmol/l HCl, 1mmol/l HCl či 0,1mmol/l HCl; 90% methanol, 75% ethanol či mobilná fáza) aj spôsoby elúcie (státie, miešanie, ultrazvuk). Pri optimalizácii chromatografických podmienok boli použité dve rozdielne HPLC kolóny (HS-F5, 150 × 2,1 mm, 3 μm a Ascentis® Express OH5, 150 × 2,1 mm, 3 μm), vyskúšané rozličné zloženia mobilnej fázy (vrátane zmeny pH) aj rozdielne gradienty. MS detektor pracoval v pozitívnom móde, procesom optimalizácie prešli aj kolízne energie použité tak, aby vzniknuté ióny boli čo najstabilnejšie a vyznačovali sa vysokou intenzitou. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri podmienkach uvedených v kapitole 3.2. Optimalizované MRM prechody sú uvedené v Tab. 9.

Tabuľka 9 Optimalizované podmienky nastavenia MS detektora

	Prekurzor (m/z)	Kolízna energia (V)	Produkt (m/z)	
2-AM	104	11	58	41
Ala	90	22	44	
Arg	175	12	70	60
Asn	133	15	74	87
Cit	176	23	70	159
Gln	147	16	84	130
Glu	148	15	84	56
Gly	76	13	30	
His	156	14	110	83
Ile	132	86	86	69
Leu	132	11	86	44
Lys	147	17	84	130

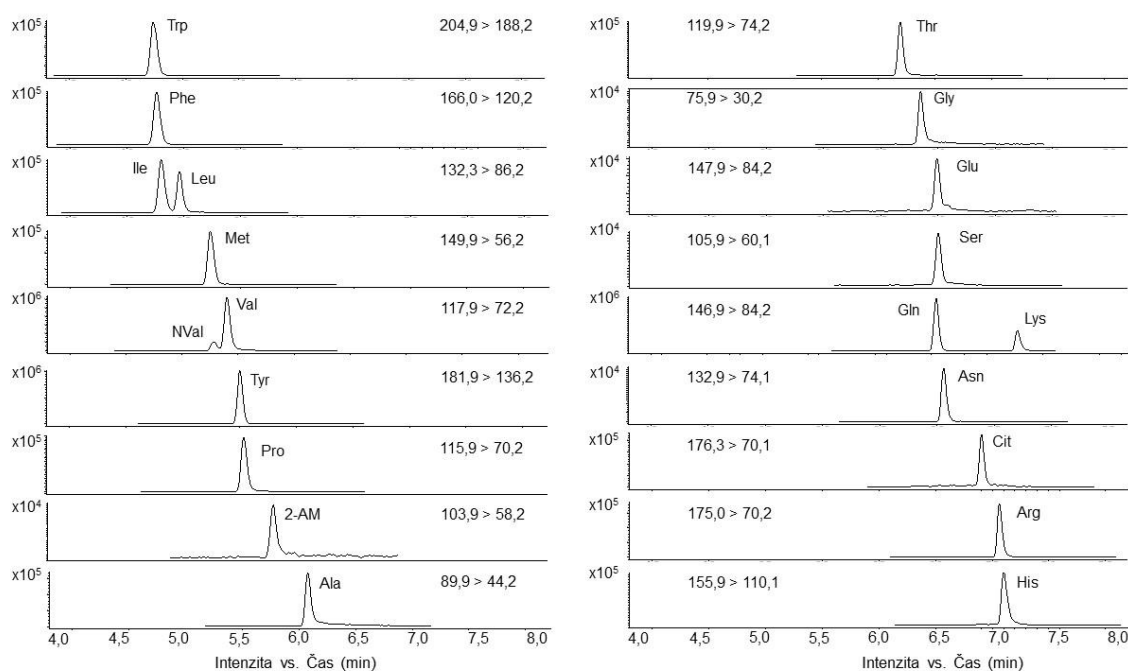
	Prekurzor (m/z)	Kolízna energia (V)	Produkt (m/z)	
Met	150	16	56	104
NVal	118	11	72	
Phe	166	11	72	103
Pro	116	15	70	43
Ser	106	11	60	42
Thr	120	12	74	56
Trp	205	8	188	146
Tyr	182	13	136	91
Val	118	12	72	55

Celkovo bolo detegovaných 21 AK, kvantifikovaných bolo 20 z nich. Problémovou bola kyselina asparágová, ktorá má za daných podmienok zlú intenzitu signálu, preto bola z analýz vyradená. Oproti metóde s FLD detekciou však nerobí problém sekundárna AK, prolín, ani AK s dvomi aminoskupinami, lyzín. Analytické parametre tejto metódy sú uvedené v Prílohe 2. Kalibračné krivky všetkých AK boli lineárne v celom rozsahu testovaných koncentrácií. U väčšiny AK je hodnota CV presnosti v sérii pod 5 % a medzi sériami pod 10 %. Priemerná výťažnosť pre jednotlivé AK sa pohybovala v rozmedzí 94-105 % s priemerným CV 5,1 % (viď Tab. 10). Chromatografický záznam stanovenia AK metódou HPLC-ESI-MS/MS je uvedený na Obr. 7.

Tabuľka 10 Priemerná výťažnosť metódy HPLC-ESI-MS/MS pre stanovenie AK zo vzoriek DBS

	AVG (%)	SD (%)	CV (%)
2-AM	102,5	0,7	0,6
Ala	98,5	0,2	0,2
Arg	105,3	9,3	8,8
Asn	94,4	5,8	6,1
Cit	96,3	5,4	5,6
Gln	102,2	3,5	3,4
Glu	96,1	5,2	5,4
Gly	97,2	9,6	9,9
His	101,3	9,7	9,6

	AVG (%)	SD (%)	CV (%)
Ile	97,0	2,0	2,1
Leu	100,3	6,0	6,0
Lys	94,7	6,8	7,2
Met	98,2	2,2	2,2
Phe	96,8	1,5	1,5
Pro	101,8	7,3	7,2
Ser	100,2	2,6	2,6
Thr	101,9	3,0	3,0
Trp	95,0	8,9	9,3
Tyr	94,1	4,5	4,8
Val	96,7	6,6	6,9



Obrázok 7 Chromatografický záznam stanovenia AK metódou HPLC-ESI-MS/MS

Vzorka zmesného štandardu rozpusteného v plnej krvi (S4), chromatografické podmienky uvedené v kapitole 3.2.3.

4.2.3 Referenčné hodnoty

Zatiaľ čo súčasťou plnej krvi sú erytrocyty, leukocyty aj trombocyty, pri získaní krvnej plazmy sú práve tieto zložky centrifugáciou oddelené. Zloženie plnej krvi a plazmy je preto vo výsledku odlišné, a tak sa tiež môže líšiť aj koncentrácia vybraných metabolitov

vo vzorkách. Napríklad v štúdií Foster *et al.* (1978) bola koncentrácia stanovovaných metabolitov vždy vyššia v plazme, než v plnej krvi, avšak významný rozdiel bol zaznamenaný iba pre laktát a pyruvát. Z tohto dôvodu preto nie je správne automaticky používať referenčné hodnoty analytov ustanovené pre plazmu, ale je nutné po validácii metodiky zistiť referenčné rozmedzie platné pre plnú krv. Pri pravidelnom monitorovaní pacienta možno navyše nastaviť individualizované referenčné rozmedzie, ktoré má následne pre pacienta väčšiu výpovednú hodnotu. To platí pre všetky skupiny analytov stanovovaných v tejto práci.

Z analýzy 60 vzoriek DBS získaných od dobrovoľných darcov punkciou prstu bolo stanovené predbežné referenčné rozmedzie pre hodnoty vybraných AK v plnej krvi pre dospelú populáciu (viď Tab. 11). Z referenčných hodnôt získaných z literatúry a uvedených v Tab. 4 (str. 41) je zrejmé, že väčšina AK má podobnú koncentrácia ako v plazme, tak vo vzorkách plnej krvi. Výrazný rozdiel je vidno u kyseliny glutámovej, ktorej koncentrácia sa javí byť vyššia v plnej krvi, a to 102 -172 $\mu\text{mol/l}$ (Hagenfeldt a Arvidsson, 1980), pričom v plazme je udávaná hodnota 34-70 $\mu\text{mol/l}$ (Fekkes *et al.*,1995). Koncentrácia v našom experimente je veľmi podobná hladine udávanej v plnej krvi. U ostatných AK je referenčné rozmedzie tiež podobné tomu uvádzanému v odbornej literatúre. Odlišuje sa akurát hladina AK izoleucínu, ktorá je v našom prípade vyššia než hodnoty udávané pre plnú krv či priamo vzorky DBS. Táto hodnota je dokonca vyššia než hodnota publikovaná pre vzorky plazmy. Na tomto mieste je ale nutné podotknúť, že limitáciou stanovenia predbežného referenčného rozmedzia v našej štúdií je pomerne malá skupina vzoriek, ktorá nemusí plne reflektovať zastúpenie v populácii, a teda nemusí byť dostatočne reprezentatívna.

Tabuľka 11 Referenčné hodnoty vybraných AK v dospeljej populácii

	Koncentrácia ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	MIN ($\mu\text{mol/l}$)	MAX ($\mu\text{mol/l}$)
2-AM	21,3	9,4	2,9	59,6
Ala	419,7	99,2	237,5	709,7
Arg	86,6	24,1	33,1	135,9
Asn	85,0	21,8	51,9	146,1
Cit	48,3	10,2	28,4	78,3
Glu	178,2	41,0	105,9	314,2
Gln	475,8	76,8	295,4	654,1

Gly	348,7	109,2	127,5	636,3
His	105,4	18,3	71,9	148,9
Ile	131,2	40,2	58,6	235,0
Leu	175,2	57,7	70,1	399,4
Lys	263,5	69,8	155,3	455,00
Met	31,1	9,7	14,9	68,1
Phe	88,1	17,9	51,6	129,3
Pro	222,1	65,8	81,5	363,6
Ser	235,2	109,5	83,9	497,8
Thr	120,9	27,9	67,2	198,5
Trp	60,8	10,4	43,0	88,9
Tyr	70,3	16,1	27,4	107,4
Val	249,6	55,1	126,9	377,2

4.3 Stanovenie vybraných ketokyselín

Najčastejšie sú KK v biologických vzorkách stanovované po derivatizácii metódou RP-HPLC, po prídavku druhého derivatizačného činidla však možno KK stanoviť aj metódou GC. V tejto práci boli skúšané obe metódy, avšak metóda GC-MS sa ukázala pre stanovenie KK v biologických vzorkách (v našom prípade plazma, plná krv) menej citlivá, a z dôvodu nutnosti dvojitej derivatizácie zložitejšia a finančne náročnejšia (aj s ohľadom na nutnosť disponovať MS detektorom). Preto bola pre použitie vzorky DBS optimalizovaná metóda HPLC-FLD.

4.3.1 Optimalizácia metódy kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou

V našej pracovnej skupine bola v r. 2009 zavedená metóda analýzy BCKA zo vzoriek DBS práve metódou HPLC-FLD (Kand'ár *et al.*, 2009). Ako derivatizačné činidlo bol použitý OPD, ktorého veľkou nevýhodou je vysoká karcinogenita a mutagenita. S cieľom rozšíriť spektrum stanovovaných KK a prípadne nahradiť OPD bezpečnejším derivatizačným činidlom, boli okrem OPD testované ďalšie tri derivatizačné činidlá, a to dansylhydrazín, DDB a DMB.

Ako prvý bol optimalizovaný krok elúcie KK zo vzoriek DBS. Testované boli rôzne extrakčné činidlá, a to deionizovaná voda, kyselina chlorovodíková o rôznych koncentráciách (1mol/l, 100mmol/l, 10mmol/l a 1mmol/l), 1mmol/l NaOH, 100% ethanol a tiež 10% a 25%

ethanol vo vode (v/v). Vo väčšine prípadov dochádzalo pri elúcii KK do roztoku aj k uvoľňovaniu hemoglobínu zo štruktúry filtračného papiera, čo sa prejavilo červeným zafarbením roztoku. Preto muselo byť k vzorkám ďalej pridané deproteinačné činidlo, ideálne v takom množstve, aby došlo k čo najmenšiemu nariedeniu vzorky. Tieto požiadavky spĺňal prídavok 50 µl 1mol/l kyseliny chloristej. Tá nemusela byť pridaná k vzorkám po elúcii 100% ethanolom a 1mol/l HCl, ktoré červené zafarbenie nevykazovali. Ako najlepšie elučné činidlo sa javila byť 1mmol/l HCl. Optimalizovaný bol ďalej čas a podmienky elúcie (státie, miešanie), ktorá prebiehala pri laboratórnej teplote. Ukázalo sa, že miešanie nemá na elúciu výrazný vplyv a optimálnym časom bolo 60 minút.

Na základe štruktúrnej podobnosti s testovanými analytmi a tiež neprítomnosti v ľudskej krvi, bol ako interný štandard po vzore z ostatných štúdií (Hara *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1988) vybraný 2-oxokapronát. Skúšané boli dva spôsoby použitia interného štandardu, a to aplikácia na filtračný papier pred odberom vzorky krvi a potom prídanie štandardu do elučného činidla v prvom kroku spracovania vzorky. Prvý zo spôsobov aplikácie IS nevykazoval reprodukovateľné výsledky. Navyše je pre použitie v klinickej praxi menej praktický. Preto bol zvolený druhý spôsob, a to prídanie IS ako súčasť elučného činidla.

Ďalším krokom bola optimalizácia kroku derivatizácie. V prípade činidla OPD, vychádzajúc z predchádzajúcej práce (Kand'ár *et al.*, 2009), boli optimalizované podmienky pre stanovenie viacerých KK, nielen BCKA. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté po prídavku OPD k supernatantu po elúcii 1mmol/l HCl a deproteínácii 1mol/l kyselinou chloristou v pomere 1:1 a následnej 30-minútovej inkubácii zmesi pri 55 °C. Testované pritom boli rozdielne pomery vzorka:voda:OPD (1:0:1, 5:1:4, 5:2:3, 5:3:2, 5:4:1). Týmto spôsobom sa okrem BCKA podarilo stanoviť ešte dve KK, a to 2-OG a fenylpyruvát.

Dansylhydrazín pre derivatizáciu 2-OG vo svojej práci použili Donnarumma *et al.* (2013). Toto derivatizačné činidlo má však samo o sebe vysokú fluorescenciu, preto bolo stanovenie analytov o nízkej koncentrácii zo vzorky DBS (len niekoľko desiatok mikrolitrov plnej krvi) komplikované. Nepodarilo sa získať deriváty KK s dostatočne veľkou intenzitou fluorescencie pre detekciu, preto bolo od použitia tohto derivatizačného činidla upustené.

Ďalším z testovaných činidiel bol 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzén (DDB), ktorý vo svojej štúdií pre simultánne stanovenie 9 KK použili Hara *et al.* (1985). DDB reaguje s KK v kyslom prostredí za vzniku 3-substituovaných-6,7-dimethoxy-2(IH)-chinoxalínových derivátov. Pri rozpustení derivatizačného činidla v deionizovanej vode s následným prídavkom koncentrovanej HCl, dithioničitanu sodného a 2-ME dochádzalo k vzniku nežiadúcej zrazeniny. Preto bola najskôr pripravená zmes HCl, dithioničitanu sodného a 2-ME a až

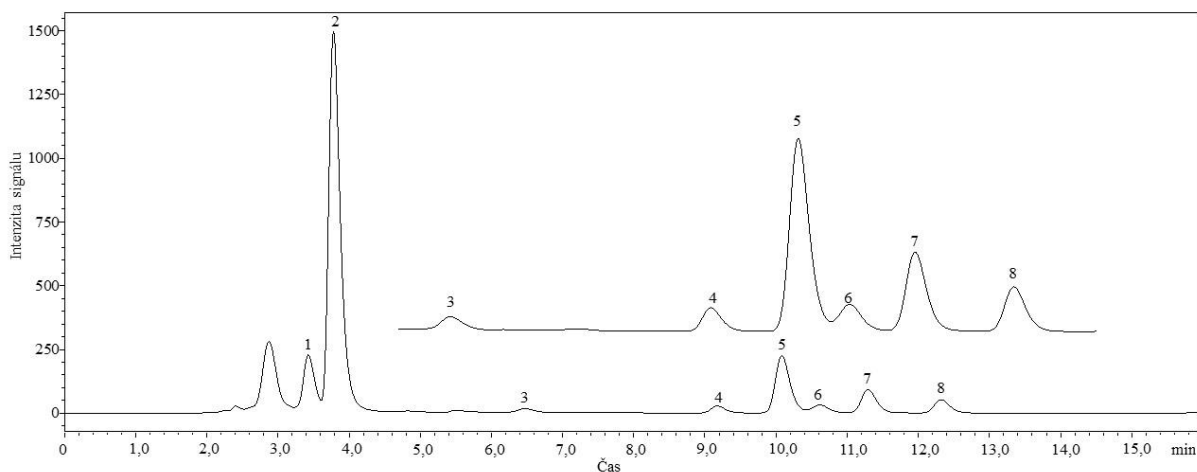
následne bol v tejto zmesi DDB rozpustený. Takýmto spôsobom prípravy sa vzniku zrazeniny predišlo. Optimalizované boli následne čas (15, 30 a 60 minút) a teplota derivatizácie (40, 70 a 100 °C). Intenzita pík derivátov príslušných KK vzrastala so zvyšujúcim sa časom aj teplotou inkubácie. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté po 60 minútovej inkubácii pri teplote 100 °C. Procesom optimalizácie prešlo tiež množstvo pridaného DDB do reakcie. Bolo testovaných niekoľko pomerov vzorka:DDB:deionizovaná voda, a to konkrétne 5:3:0, 5:2:1, 5:1:2. So zvyšujúcim sa množstvom derivatizačného činidla v reakcii rástla aj intenzita pík stanovovaných KK. Táto intenzita bola viditeľne vyššia než v prípade derivátov KK s OPD, čím sa potvrdila zmienka v štúdií autorov Hara *et al.* (1985) o väčšej citlivosti tejto metódy pri stanovení KK. Vzniknuté deriváty vykazovali stabilitu minimálne 42 hodín pri laboratórnej teplote.

Ako posledné bolo testované derivatizačné činidlo 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzén (DMB). Podľa Nakamura *et al.* (1987) je citivosť stanovenia KK po derivatizácii DMB 1,6x vyššia než po derivatizácii DDB a 150x vyššia v porovnaní s OPD. DDB a DMB sa štrukturálne líšia iba v postrannom reťazci. Obe činidlá sú pripravované v kyslom prostredí (HCl) a k obohm sú pridávané rovnaké stabilizátory (dithioničitan sodný a 2-ME). Aj podľa literatúry je príprava oboch činidiel podobná. Preto bolo u DMB pristúpené k rovnakej optimalizácii derivatizačného kroku, ako v prípade DDB.

Ďalej bol optimalizovaný krok separácie vzniknutých derivátov na nepolárnej kolóne LiChroCart 125 × 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 µm (Merck, Darmstadt, Nemecko). Bolo testovaných niekoľko mobilných fáz, ktoré boli zmesou vody a organického rozpúšťadla (ACN, ethanol), ako v izokratickej, tak v gradientovej elúcii. Keď bol ako organický modifikátor použitý ethanol, boli niektoré deriváty KK ťažko oddeliteľné od interferujúcich látok. Preto bol miesto ethanolu použitý ACN. Pri separácii produktov derivatizačnej reakcie na nepolárnej kolóne sa ako problémový javil pík 2-oxoglutarátu, ktorý bol rozmytý. Tento problém nebol detegovaný pri použití činidiel DDB a DMB. U všetkých metód bol problém s detekciou 4-OH-fenylpyruvátu v reálnych vzorkách, čo bolo pozorované už v štúdií Nakamura *et al.* (1987). Absencia píku v reálnej vzorke je pravdepodobne spôsobená jeho veľmi nízkou hladinou v krvi. Keďže sa pri použití DMB nedarilo od seba oddeliť píky fenylpyruvátu a 2-oxokapronátu (IS), bola voda v mobilnej fáze nahradená 25mmol/l Na₂HPO₄ (pH 7,2). Zmenou zložky mobilnej fázy a optimalizáciou chromatografických podmienok sa problém so separáciou podarilo vyriešiť, avšak v rámci zachovania jednoduchosti metódy (menej komplikovaná príprava mobilnej fázy, u ktorej následne nie je nutná úprava pH a tiež dlhšia životnosť

chromatografickej kolóny) sa nakoniec od použitia pufrovanej mobilnej fázy, a tým aj činidla DDM upustilo.

Produkty derivatizačnej reakcie KK s DDB vykazovali v porovnaní s OPD vyššiu intenzitu fluorescencie a po optimalizácii chromatografických podmienok bolo touto metódou možné stanoviť až sedem KK (2-OG, pyruvát, 2-oxobutykrát, fenylpyruvát, KIV, KIC a KMV – vid' Obr. 8). Napriek jasným benefitom v citlivosti metódy sa pri analýze reálnych vzoriek napokon pristúpilo k použitiu činidla OPD, a to z dôvodu značne nižšej finančnej náročnosti. Na tomto mieste je vhodné poznamenať, že v prípade použitia metódy pre skriningové vyšetrenie je podstatné zachovanie pomeru cena : výkon, t.z. drahé derivatizačné činidlo, ktorým možno zachytiť navyše len o dve KK viac (2-oxobutykrát a fenylpyruvát), by zbytočne predražilo celkovú cenu vyšetrenia, bez podstatného diagnostického efektu.



Obrázok 8 Chromatografický záznam stanovenia KK metódou HPLC-FLD

Vzorka DBS. Chromatografické podmienky: separácia prebiehala na kolóne LiChroCart 125 × 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μm opatrenej predkolónou LiChroCart 4 × 4 mm, Purospher Star RP-18e, 5 μm (Merck, Darmstadt, Nemecko). Mobilnou fázou A bol 25% ACN, mobilnou fázou B 100% ACN. Gradientová elúcia prebiehala nasledovne 0-13 min, 10-27 % B (lineárne), 13-16 min, 100 % B. Prietok mobilnej fázy bol 0,5 ml/min, teplota kolóny 37 °C a deriváty boli detegované fluorescenčne pri 370/445 nm (excitácia/emisia). Píky: **1**, 2-OG, **2**, PYR, **3**, 2-oxobutykrát, **4**, KIV, **5**, KIC, **6**, fenylpyruvát, **7**, 2-ketokapronát (IS), **8**, KMV.

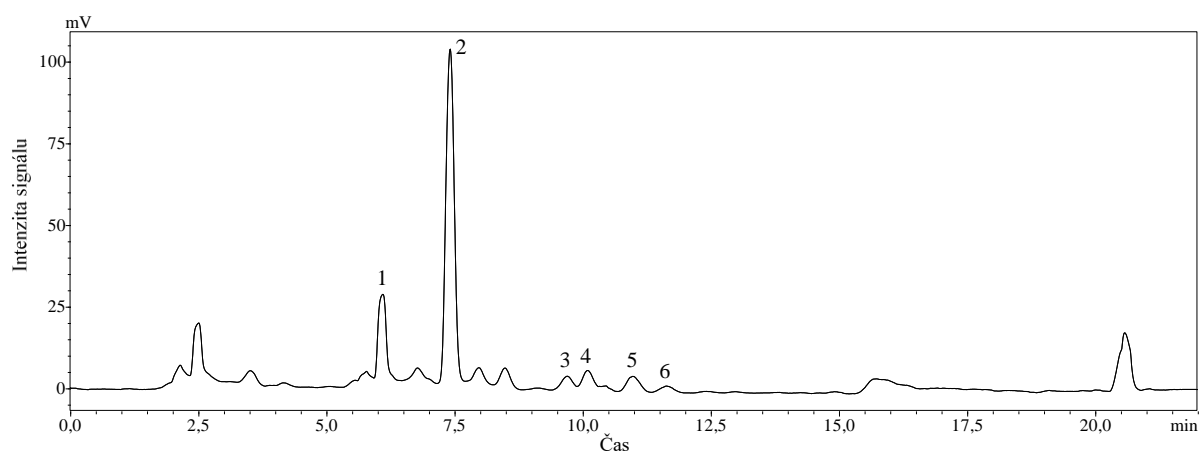
Vzorky boli vyhodnotené metódou kalibračnej krivky. Pre jej zostrojenie boli odskúšané tri rozličné spôsoby prípravy štandardných vzoriek. KK sú látky dobre rozpustné vo vode a dostatočne polárne, aby sa rozpustili aj v prostredí plnej krvi. Je teda možné pripraviť vodné roztoky štandardov, následne vodu odpariť pod prúdom dusíku (čo sa ukázalo ako veľmi časovo náročná metóda), alebo vzorky lyofilizovať. Oba spôsoby však viedli k nežiadúcim stratám KK. Preto bola zvolená tretia možnosť, a to prídavok štandardov k plnej krvi tak, aby matrica ostala prakticky nezmenená. Maximálne sa teda počítalo s prídavkom jedného dielu štandardov

rozpustených vo fyziologickom roztoku k 9 dielom plnej krvi. Takto pripravený zmesný štandard v krvi bol následne pipetovaný na filtračný papier a ďalší postup bol rovnaký ako v prípade prípravy klasických vzoriek.

Celkovo bolo metódou detegovaných a kvantifikovaných 5 KK. Analytické parametre metódy sú uvedené v Prílohe 2. Kalibračné krivky všetkých KK boli lineárne v celom rozsahu testovaných koncentrácií. U väčšiny KK je hodnota CV presnosti v sérii pod 5 % a medzi sériami pod 10 %. Priemerná výťažnosť pre jednotlivé KK sa pohybovala v rozmedzí 101-107 % s priemerným CV 4,7 % (viď Tab. 12). Chromatografický záznam stanovenia hydroxichinolinových derivátov KK metódou HPLC-FLD je uvedený na Obr. 9.

Tabuľka 12 Priemerná výťažnosť metódy HPLC-FLD pre stanovenie KK zo vzoriek DBS

	AVG (%)	SD (%)	CV (%)
2-OG	106,7	5,8	5,4
PYR	103,9	3,6	3,5
KIV	103,2	5,1	4,9
KIC	104,8	4,2	4,0
KMV	101,8	6,0	5,9



Obrázok 9 Chromatografický záznam stanovenia KK metódou HPLC-FLD
Vzorka DBS, chromatografické podmienky uvedené v kapitole 3.3.3. Píky: **1**, 2-OG, **2**, pyruvát, **3**, KIV, **4**, KIC, **5**, 2-ketokapronát (IS), **6**, KMV.

4.3.2 Referenčné hodnoty

Predbežné referenčné rozmedzie vybraných KK pre dospelú populáciu bolo stanovené zo vzoriek DBS získaných od dobrovoľných darcov punkciou prstu (n = 60, viď Tab. 13).

Na základe informácií získaných z literatúry a uvedených v Tab. 5 (str. 42) je zrejmé, že hladiny 2-OG, KIV, KIC a KMV sú pri porovnaní vzoriek plnej krvi a plazmy/séra veľmi podobné. Podľa Foster *et al.* (1978) je rozmedzie hladiny pyruvátu v sére/plazme pomerne široké (22,0-258,0 $\mu\text{mol/l}$) zatiaľ čo iný zdroj udáva koncentráciu v krvi 37,5-88,5 $\mu\text{mol/l}$ (HMDB.CA). Hodnoty pyruvátu v našich vzorkách sa približujú hornému rozmedziu intervalu hodnôt z literatúry. Hodnoty ostatných KK sa zhodujú so stanoveným referenčným rozmedzím udávaným v literatúre.

Tabuľka 13 Referenčné hodnoty vybraných KK v dospeljej populácii

	Koncentrácia ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	MIN ($\mu\text{mol/l}$)	MAX ($\mu\text{mol/l}$)
2-OG	10,6	4,9	1,5	21,7
PYR	220,4	68,6	126,3	435,7
KIV	14,9	4,2	7,8	30,5
KIC	28,8	8,8	7,0	48,5
KMV	24,7	8,2	6,4	48,6

4.4 Stanovenie vybraných mastných kyselín

4.4.1 Optimalizácia metódy plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačnou detekciou

MK sa nevyznačujú vlastnosťami, ktoré by umožnili ich priamu detekciu v biologických vzorkách, preto je potrebné ich pred analýzou previesť na vhodné deriváty. V tejto práci boli MK stanovované metódou GC-FID, a teda cieľom derivatizácie bolo zvýšenie prchavosti stanovovaných látok. Toho bolo docielené prevedením MK na methylestery, ethylestery či butylestery, a to za použitia týchto derivatizačných činidiel: methanolický roztok acetylchloridu, BF_3 v methanole, BF_3 v ethanole a BF_3 v butanole. V praxi sa najčastejšie stretávame s prevedením MK na methylestery (Gunash *et al.*, 2019; Marangoni *et al.*, 2004). Nakoniec bol tento spôsob derivatizácie použitý aj na vzorky DBS, a to prostredníctvom methanolického roztoku acetylchloridu, ktorý bol pripravený pomalým pridávaním acetylchloridu k vychladenému methanolu po stene skúmavky. Tento postup prípravy derivatizačného činidla bol inšpirovaný článkom Christie *et al.* (1989). Priamy prídavok

acetylchloridu k eluátu vzorky DBS v malých objemoch v našom experimente viedol k výraznej exotermickej reakcii, ktorej následkom bolo vystrelenie vzorky mimo skúmavku. Preto bol postup nahradený bezpečnejšou predprípravou derivatizačnej zmesi spomenutou vyššie.

Optimalizovaný bol tiež krok elúcie MK zo vzorky DBS. Priama derivatizácia vzoriek bez predchádzajúcej elúcie sa vyznačovala veľkou variabilitou výsledkov a nepresnosťou v stanovení MK. Keďže sú MK amfipatické (obsahujú hydrofóbnu aj hydrofilnú časť) a ich rozpustnosť vo vode sa s rastúcou dĺžkou reťazca znižuje, bolo potrebné zvoliť rozpúšťadlo s dostatočnou extrakčnou silou. Podľa Christie *et al.* (1989) je pre analýzu voľných MK dostatočným elučným činidlom metanol, ale v prípade stanovenia nepolárnych lipidov (ako sú cholesterol estery a triacylglyceroly) je vhodné pre správny priebeh reakcie pridať do zmesi ďalšie, menej polárne elučné činidlo. V našom prípade bol ako elučné činidlo testovaný metanol, a to buď samostatne alebo v kombinácii s hexánom (pomer metanol:hexán bol 2:1, v/v). Obidve zvolené elučné činidlá vykazovali porovnateľné výsledky, preto bolo z dôvodu zachovania jednoduchosti metódy vybraný metanol, v ktorom bol nakoniec rozpustený aj interný štandard. Tým bola heneikosanová kyselina (C21:0), ktorá spĺňa základné požiadavky kladené na vnútorný štandard, a to že nie je bežným komponentom analyzovaných vzoriek a svojimi fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami je podobná stanovovaným analytom.

Optimalizované boli tiež teplota (laboratórna teplota, 37 °C a 60 °C), čas (10 min – 24 hod) a spôsob elúcie (státie, trepanie, ultrazvuk). Ukázalo sa, že zvýšená teplota, či dodatočný efekt miešania či ultrazvukovania vzorky, nemá na elúciu vybraných analytov žiadny významný vplyv. Naopak so vzrastajúcim časom elúcie rástla aj intenzita eluovaných MK, avšak maximálne do 1 hodiny.

Ďalej boli optimalizované čas a teplota derivatizácie (10 min – 3 hodiny, a 50, 75 a 100 °C). So vzrastajúcim časom derivatizácie sa zvyšovala aj intenzita píkov MK, najviac však do času 1 hodiny. Dlhšia derivatizácia sa prejavila len nepatrným nárastom intenzity píkov. Vyššia teplota mala na výslednú intenzitu píkov stanovovaných MK pozitívny vplyv. Najlepšie výsledky dosiahnuté pri teplote 100 °C a čase derivatizácie 1 hodina. Deriváty MK boli následne zo vzorky extrahované. Testované boli opakované extrakcie s rôznymi objemami hexánu, ktorý sa ako rozpúšťadlo pre extrakciu derivátov MK používa bežne (Gunash *et al.*, 2019; Harris a Polreis, 2016). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté použitím dvojnásobnej extrakcie s 500 µl hexánu.

Pre opätovné rozpustenie derivátov MK po odparení rozpúšťadla pod prúdom dusíka boli použité metanol, hexán, 2-propanol a dichlormethan. Všetky štyri organické rozpúšťadlá

poskytovali porovnateľné výsledky. Aby však bol možný výpočet RRF a kvantifikácia MK vo vzorke, na rozpustenie odparku bol použitý dichlormethan, teda rovnaké rozpúšťadlo v akom je pripravený štandard FAME37.

Testovaných bolo tiež niekoľko teplotných gradientov, a to na dvoch rôznych kolónach (HP-88 100 m × 0,25 mm, 0,20 μm a Restek Rtx: 60 m × 0,25 mm, 0,20 μm). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté použitím dlhšej HP-88 kolóny, ktorá je vyrobená špeciálne pre separáciu FAME, a gradientu popísaného v podkapitole 3.4.3. Vo vzorkách sa na konci analýzy objavoval pík cholesterolu, ktorý v prípade nevyplavenia z kolóny interferoval so stanovením ďalšej vzorky. V literatúre sa nám tento problém nepodarilo zaznamenať. Pík bol z kolóny vyplavený zvýšením teploty na konci gradientu (celkový čas analýzy bol kvôli tomu 101 minút, hoc posledná MK eluovala približne v 57. minúte). V snahe skrátiť čas analýzy odstránením cholesterolu zo vzoriek po derivatizácii sme vychádzali z článku Mashavave *et al.* (2016), kde bola na prečistenie vzorky použitá SPE. Ukázalo sa ale, že týmto krokom v prípade analýzy malého množstva biologického materiálu obsiahnutého vo vzorke DBS dochádza okrem odstránenia cholesterolu tiež k nežiadúcim stratám MK (nedetekovateľných bolo 50 % z celkového počtu stanovovaných MK), preto bolo od extrakcie upustené a chromatografická analýza bola časovo náročnejšia.

V rámci vyhodnotenia nameraných údajov sme volili dva rôzne spôsoby prezentácie množstva MK vo vzorke, a to percentuálne zastúpenie a koncentráciu. Jednoduchou, rýchlou a najviac používanou metódou vyhodnotenia je práve percentuálne zastúpenie MK vo vzorke, avšak jeho veľkou nevýhodou je nemožnosť porovnania výsledkov s inými pracoviskami, čo vo svojej štúdií naznačujú aj Schwertner a Mosser (1993). V prípade zmeny počtu stanovovaných MK dochádza k zmene percentuálneho zastúpenia a neľahkej interpretácii výsledkov. Vhodným by bolo použitie klasickej kalibračnej krivky, ktoré je však v tomto prípade zložité, pretože MK sú v plnej krvi veľmi zle rozpustné. Preto nemožno pripraviť krvnú kalibráciu ako v prípade stanovenia AK či KK. Možno však stanoviť hmotnostnú koncentráciu výpočtom z RRF (prípadne následne prepočítať na koncentráciu molárnu). Takéto vyjadrenie výsledkov je medzilaboratórne porovnateľné, vyžaduje však disponibilitu štandardami všetkých vyhodnocovaných MK.

Celkovo bolo metódou vo vzorke DBS detegovaných 25 MK a v podobe percentuálneho zastúpenia kvantifikovaných 24 z nich. Z analýzy bola z dôvodu nízkej intenzity signálu vyradená kyselina tetrakosapentaenová (all-*cis* C24:5 n6). V podobe koncentrácie boli kvantifikované tie MK, ku ktorým boli dostupné štandardy pre výpočet RF, a to bolo celkovo 18 MK. Analytické parametre metódy sú uvedené v Prílohe 3. U väčšiny MK je hodnota CV

presnosti pod 10 % ako pri percentuálnom vyjadrení, tak pri koncentračnom vyjadrení výsledku. Vo všetkých prípadoch s výnimkou α -linolénovej kyseliny (all-*cis* C18:3 n3) bola hodnota CV presnosti metódy nižšia pri stanovení percentuálneho zastúpenia. Chromatografický záznam stanovenia FAME metódou GC-FID je uvedený v Prílohe 4 a Prílohe 5.

4.4.2 Referenčné hodnoty

Podobne ako v predchádzajúcich prípadoch, aj tu boli predbežné referenčné hodnoty vybraných MK stanovené z analýzy vzoriek DBS 60 dobrovoľných darcov. Referenčné rozmedzie, ktoré možno nájsť v odbornej literatúre, je pomerne široké. Napríklad pre kyselinu palmitovú (C16:0) sa hodnoty môžu pohybovať v rozsahu 950-16500 $\mu\text{mol/l}$ (CDC.GOV), podľa iného zdroja je to rozsah 1172-2090 $\mu\text{mol/l}$ (Abdelmagid *et al.*, 2015) či podľa ďalšieho 1090-3840 $\mu\text{mol/l}$ (Kish-Trier *et al.*, 2016). Pre kyselinu arachidovú (C20:0) to je rozsah 11-111 $\mu\text{mol/l}$ (CDC.GOV), či podľa iných zdrojov 11-46 $\mu\text{mol/l}$ (Kish-Trier *et al.*, 2016) alebo 1-9 $\mu\text{mol/l}$ (Abdelmagid *et al.*, 2015). Pre kyselinu nervonovú (*cis* C24:1 n9) je obdobne vidno v závislosti na použítom odbornom zdroji markantný rozdiel v referenčnom rozmedzí. Podľa Abdelmagid *et al.* (2015) sú jej plazmatické hodnoty maximálne 9,3 $\mu\text{mol/l}$, zatiaľ čo Kish-Trier *et al.* (2016) uvádzajú maximálne hodnoty v rovnakom type vzorky niekoľko násobne vyššie, a to 30-260 $\mu\text{mol/l}$. Zaujímavé je, že ani pre MK s dominantným zastúpením, ako je kyselina palmitová či kyselina olejová, sa hodnoty nezhodujú. Porovnanie nami získaných výsledkov (zobrazených v Tab. 14) s údajmi z literatúry je preto veľmi komplikované. Práve v tomto prípade je najviac viditeľný benefit individualizovanej medicíny a rovnako individuálne nastaveného referenčného rozmedzia pre testovaného jedinca, obzvlášť potom v prípadoch monitorovania diabetických pacientov po nastavení liečby. Pri skriningových vyšetreniach je nutné myslieť na nastavenie referenčného rozmedzia z reprezentatívneho zastúpenia populácie (s ohľadom na možné demografické rozdiely v zložení stanovovaných analytov spojených tiež s rozdielnymi stravovacími návykmi).

Tabuľka 14 Referenčné hodnoty vybraných MK v dospeljej populácii

	Koncentrácia ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	MIN ($\mu\text{mol/l}$)	MAX ($\mu\text{mol/l}$)
C14:0	6,5	2,9	2,7	14,7

	Koncentrácia ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	MIN ($\mu\text{mol/l}$)	MAX ($\mu\text{mol/l}$)
C15:0	1,7	0,7	0,7	3,5
C16:0	170,5	43,6	106,4	296,5
C17:0	1,7	0,4	1,1	3,1
C18:0	81,8	20,6	55,6	127,8
<i>cis</i> C18:1 n9	98,3	35,5	62,1	249,2
<i>all-cis</i> C18:2 n6	102,1	24,9	57,3	208,5
<i>all-cis</i> C18:3 n3	2,2	1,5	0,9	10,1
<i>all-cis</i> C18:3 n6	0,8	0,5	0,1	2,3
C20:0	1,6	0,3	1,0	2,5
<i>cis</i> C20:1 n9	1,0	0,4	0,5	2,4
<i>all-cis</i> C20:3 n6	5,8	1,5	3,4	9,6
<i>all-cis</i> C20:4 n6	35,1	6,2	19,1	50,6
<i>all-cis</i> C20:5 n3	2,3	0,4	1,5	3,8
C22:0	3,7	0,8	2,4	7,0
<i>all-cis</i> C22:6 n3	7,9	2,0	3,4	13,4
C24:0	5,4	1,9	3,3	16,7
<i>cis</i> C24:1 n9	7,7	4,2	1,8	37,0

4.5 Štatistické vyhodnotenie

V tejto štúdií boli analyzované vzorky DBS od 60 dobrovoľníkov. Celkovo bolo tromi rozličnými metódami kvantifikovaných 20 AK, 5 KK a 24, respektíve 18 MK (vyjadrené v podobe percentuálneho zastúpenia, respektíve koncentrácie). Napriek tomu, že väčšina sledovaných analytov bola vyššia u mužov, štatisticky významné rozdiely ($\alpha = 0,05$) boli potvrdené iba pre 5 AK (arginín, alanín, glutamín, prolín a valín), 3 KK (KIV, KIC, KMV) a 8 MK (kyselina myristová, palmitová, steárová, olejová, linolová, α -linolénová, gondová a arachidonová). Výsledky sú zobrazené v Prílohe 6. Vyššie hladiny AK u mužov boli nájdené aj v štúdiách (Kand'ár *et al.*, 2016; Mittelstrass *et al.*, 2011). Čo sa KK týka, rozdiel medzi pohlaviami v iných štúdiách nájdený nebol (Kand'ár *et al.*, 2009; Pailla *et al.*, 2000). Vyššie hladiny AK u mužov môžu byť dôsledkom inej telesnej štruktúry a väčšej svalovej hmoty v porovnaní so ženami. U MK je sledovaná veľká heterogenita výsledkov vo vzťahu

k pohlaviu, aj keď väčšina štúdií uvádza zvýšenú kyselinu linolovú a červenovú u žien (Lohner *et al.*, 2013). Variabilita výsledkov môže byť spôsobená tým, že kompozíciu MK v krvi vo veľkej miere ovplyvňujú stravovacie návyky jedincov. Zatiaľ čo plazma odráža krátkodobý príjem MK v potrave, červené krvinky sú považované za marker dlhodobého príjmu. Podľa jednej zo štúdií poskytuje analýza plnej krvi ucelenejší obraz o celkovom stave MK v ľudskom organizme (Risé *et al.*, 2007).

Pre sledovanie vzťahu medzi vekom a koncentráciami vybraných analytov, boli utvorené tri vekové skupiny: < 30 rokov, 30 – 45 rokov, ≥ 45 rokov. Štatisticky významné rozdiely ($\alpha = 0,05$) boli nájdené u 2 AK (asparagín, serín) a 2 MK (α - a γ -linolénová kyselina). Závislosť na veku nebola preukázaná ani u jednej z testovaných KK. Koncentrácia asparagínu aj serínu s vekom klesala, zatiaľ čo koncentrácia γ -linolénovej kyseliny s vekom rástla. U α -linolénovej kyseliny bol pozorovaný mierny pokles koncentrácie s vekom. Pailla *et al.* sledovali štatisticky významný pokles koncentrácie KK u osôb starších 60 rokov (Pailla *et al.*, 2000). V našej štúdií sa tento nález nepodarilo potvrdiť, čo ale môže byť spôsobené malou vzorkou dobrovoľníkov, z ktorých len 5 osôb bolo starších ako 60 rokov. Všetky štatisticky významné výsledky sú zhrnuté v Tab. 15.

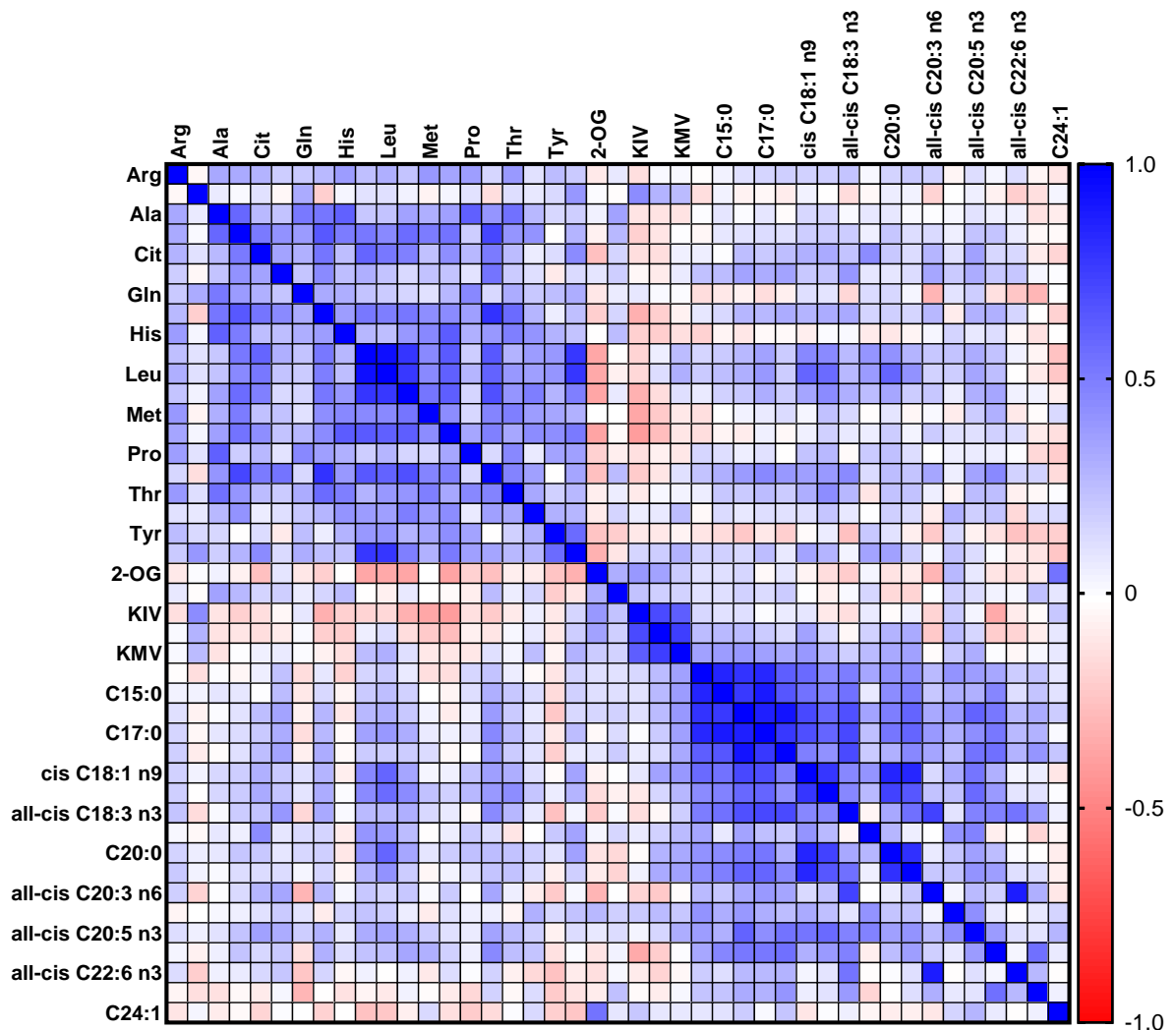
Tabuľka 15 Vplyv veku na koncentráciu testovaných analytov

	A	B	C	p	p (A vs. B)	p (A vs. C)	p (B vs. C)
Koncentrácia AK ($\mu\text{mol/l}$)							
Asn	90,93	89,88	74,95	*	-	*	-
Ser	275,60	249,20	185,30	*	-	*	-
Koncentrácia MK ($\mu\text{mol/l}$)							
all-cis C18:3 n3	1,97	1,62	1,72	***	***	*	-
all-cis C18:3 n6	0,54	0,79	0,97	**	-	**	-

Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty (n = 19 pre skupinu A, n = 20 pre skupinu B, n = 21 pre skupinu C). Dáta s normálnym rozložením boli otestované jednocestnou ANOVA a Tukeyho metódou mnohonásobného porovnania (za predpokladu rozdielnych SD boli miesto toho použité Brown-Forsytheho a Welch ANOVA testy). Dáta, ktoré neprešli testom normality boli analyzované Kruskal-Wallisovým testom s Dunneho metódou mnohonásobného porovnania). Všetky testy boli robené na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Štatisticky významné výsledky sú označené nasledovne: * $p < 0,050$; ** $p < 0,010$; *** $p < 0,0005$. **A** – veková skupina < 30 rokov, **B** – veková skupina 30 - 45 rokov, **C** – veková skupina ≥ 45 rokov.

Pre vyhodnotenie vzťahov medzi koncentráciami jednotlivých analytov navzájom bol použitý Pearsonov korelačný koeficient. Výsledky ukazuje Obr. 10. U niektorých testovaných analytov bol nájdený štatisticky významný vzťah (viď Príloha 6). Väčšina štatisticky

významných korelácií bola pozitívna, čo znamená, že zvyšovanie koncentrácie jedného analytu zvyšuje koncentráciu iného analytu. Štatisticky významné negatívne korelácie, kedy rastúca koncentrácia jedného analytu je sprevádzaná poklesom koncentrácie iného analytu, boli nájdené iba u 14 porovnaní – väčšinou šlo o analyty 2-OG a KIV. Najviac pozitívnych korelácií bolo sledovaných medzi analytmi jednej triedy navzájom. Nie je prekvapujúce, že analyty sa v rámci jednotlivých metabolických cyklov vzájomne ovplyvňujú.



Obrázok 10 Korelačná matrica ukazujúca výsledky štatistickej analýzy medzi jednotlivými AK, KK a MK za použitia Pearsonovho korelačného koeficientu (hodnoty r)

Každý štvorček predstavuje jeden analyt. Poradie analytov zhora nadol (a zľava doprava) je nasledovné: Arg, 2-AM, Ala, Asn, Cit, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, 2-OG, PYR, KIV, KIC, KMV, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, *cis* C18:1 n9, *all-cis* C18:2 n6, *all-cis* C18:3 n6, *all-cis* C18:3 n3, C20:0, C20:1, *all-cis* C20:3 n6, *all-cis* C20:4 n6, *all-cis* C20:5 n3, C22:0, *all-cis* C22:6 n3, C24:0, *cis* C24:1 n9. Modrá farba prislúcha pozitívnej koreláci, červená negatívnej. Odtiene farby predstavujú stupeň korelácie.

Najsilnejšou pozitívnou koreláciou v triede AK ($r = 0,944$) bol vzťah medzi leucínom a izoleucínom. Pozitívne korelácie boli nájdené aj u ostatných BCAA ($r > 0,780$). Ďalšia silná korelácia bola sledovaná medzi AK serínom a glycínom ($r = 0,803$). V ľudskom organizme

serín vzniká v obličkách práve utilizáciou glycínu (Holeček, 2006), takže by sa dalo očakávať, že spotrebovaním glycínu sa zvýši koncentrácia serínu. Avšak výsledky naznačujú odlišný mechanizmus, a to čím viac glycínu v organizme máme, tým viac serínu sa vyprodukuje, pričom hladina glycínu neklesne. To môže byť spôsobené tým, že spätná premena serínu na glycín je zase jeho hlavnou cestou odbúravania (Holeček, 2006). Medzi KK navzájom boli sledované iba pozitívne korelácie. Z nich najsilnejšia bola medzi KIC a KMV ($r = 0,753$). Najsilnejšie pozitívne korelácie v triede MK ($r > 0,800$) boli medzi MK s dlhým reťazcom (t.z. MK s 12-18 uhlíkmi). Najvýraznejší vzťah bol medzi C16:0 a C18:0, teda medzi kyselinou palmitovou a steárovou ($r = 0,922$). Keďže kyselina palmitová (C16:0) je prvou MK tvorenou pri syntéze v ľudskom organizme, a teda prekursorom pre syntézu vyšších MK, tento vzťah nie je prekvapujúci. Podobne významné pozitívne korelácie ($r > 0,800$) boli aj u niektorých MK s veľmi dlhým reťazcom, konkrétne u kyseliny olejovej (*cis* C18:1 n9), kyseliny arachidovej (C20:0) a kyseliny gondovej (C20:1).

Významné korelácie boli sledované aj medzi niektorými AK a KK. Práve medzi týmito dvomi skupinami bolo nájdených najviac štatisticky významných negatívnych korelácií. S najvyššími hodnotami sú to korelácie medzi fenylalanínom a KIV ($r = -0,388$) a medzi fenylalanínom a 2-OG ($r = -0,358$). U BCAA (leucín, izoleucín, valín) by sa dala očakávať pozitívna korelácia ku KK, ktoré z nich vznikajú (KIC, KMV, KIV). Avšak štatisticky významná pozitívna korelácia bola preukázaná iba medzi izoleucínom a KMV ($r = 0,261$). Trochu prekvapivou je korelácia valínu s kyselinou nervonovou (*cis* C24:1 n9) s hodnotou $r = 0,546$ o vysokej štatistickej významnosti ($p < 0,001$).

V tejto štúdii bolo potvrdených niekoľko vzťahov medzi stanovovanými analytmi navzájom, ale aj vplyv veku či pohlavia na ich koncentrácie. Limitujúcimi faktormi štúdie je relatívne malá vzorka dobrovoľníkov, kvôli ktorej nebolo možné urobiť viacero štatistických porovnaní, napríklad vplyv pohlavia a veku na hladiny testovaných analytov súčasne. Dobrovoľníci boli vybraní náhodne, v dotazníku nebol zisťovaný ich aktuálny zdravotný stav ani prípadná suplementácia v ich výžive. Pred odberom vzorky bol vznesený ústne dotaz na výskyt diabetu u dobrovoľníka. V prípade vyvrátenia ochorenia bola vzorka odobratá a zahrnutá do analýzy. Výsledky teda môžu byť do istej miery ovplyvnené napríklad neodhaleným ochorením (nediagnostikovaní diabetici), iným ochorením ovplyvňujúcim zloženie stanovovaných analytov v krvi (nádorové ochorenia) alebo suplementáciou BCAA v strave (športovci). Do budúca sa preto ponúka možnosť pracovať s väčšou skupinou dobrovoľných darcov, rozšíriť vstupný dotazník a podmienky zahrnutia či vylúčenia vzoriek z experimentu, prípadne okrem vzoriek DBS odobrať aj vzorky plnej krvi a stanoviť vzťah

medzi plazmatickými koncentráciami daných analytov a koncentráciami vo vzorke DBS. Tak by bolo možné stanoviť jednak presnejšie referenčné rozmedzie daných analytov v populácii, prípadne tzv. DBS-plazma korekčný faktor, ktorý by umožnil prepočet koncentrácie analytu vo vzorke DBS na množstvo analytu v plazme (van Vliet *et al.*, 2020).

5 ZÁVER

V tejto práci boli optimalizované separačné metódy pre stanovenie vybraných analytov vo vzorkách plnej krvi získaných technikou DBS. Napriek tomu, že pre tento typ vzorky existujú určité analytické obmedzenia (vplyv HCT, citlivosť analytických techník) kvôli ktorým môže byť použitie vzorky DBS miesto vzoriek plnej krvi či plazmy náročnejšie, pre účely skríningu je vzorka DBS viac než vhodná. Všetky metódy prezentované v tejto práci sú výsledkom procesu optimalizácie a výberu na základe pomeru ceny a výkonu. Vykazujú dostatočnú citlivosť pre stanovenie vybraných AK, KK a MK z niekoľkých mikrolitrov plnej krvi vo vzorke DBS a ich analytické parametre sú vo všetkých prípadoch uspokojivé. Metódy boli použité k analýze 60 vzoriek získaných punkciou prstu od dobrovoľných darcov. Vo vzorkách boli stanovené koncentrácie 20 AK, 5 KK a 18 MK. Z nameraných údajov bolo vytvorené predbežné referenčné rozmedzie v plnej krvi dospeljej populácie. Výsledky boli ďalej podrobené štatistickej analýze. Bolo odhalených niekoľko zaujímavých súvislostí. Aj keď väčšina analytov sa vo vyššej koncentrácii nachádzala u mužov, štatisticky významný rozdiel bol potvrdený iba pre 16 z nich. Vplyv veku na koncentrácie testovaných analytov bol signifikantný u dvoch AK a dvoch MK. Niekoľko štatisticky významných korelácií bolo objavených ako medzi analytmi jednej skupiny, tak aj medzi analytmi rôznych skupín navzájom.

Na základe množstva benefitov techniky DBS a s ohľadom na dostatočne citlivé metódy optimalizované v tejto práci možno povedať, že vzorka DBS je vhodnou alternatívou pre skrínung metabolizmu a prípadné odhalenie chorobných stavov, ktoré sú so zmenami hladín vybraných analytov asociované.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

ABDELMAGID S.A., S.E. CLARKE, D.E. NIELSEN *et al.* Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PLoS One*. 2015, **10**, 1-16.

ABU-RABIE P. Direct analysis of DBS: emerging and desirable technologies. *Bioanalysis*. 2011, **3**, 1675–1678.

ABU-RABIE P., P. DENNIFF, N. SPOONER *et al.* Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**, 8779-8786.

AGRAFIOTOU, P., S. SOTIROPOULOS and A. PAPPA-LOUISI. Direct RP-HPLC determination of underivatized amino acids with online dual UV absorbance, fluorescence, and multiple electrochemical detection. *Journal of Separation Science*. 2009, **32**, 949-954.

AITKEN, S.C., C.L. WALLIS, W. STEVENS *et al.* Stability of HIV-1 nucleic acid in dried blood spot samples for HIV-1 drug resistance genotyping. *PLoS ONE*. 2015, **10**, 1-10.

AL-MAJED, A.A. and J. AL-ZEHOURI. Use of 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole (NBD-F) for the determination of ramipril in tablets and spiked human plasma. *Il Farmaco*. 2001, **56**, 291-296.

AL-SABHA T.N. and I.A. HAMODY. Selective spectrophotometric determination of some primary amines using 2,4-dinitrofluorobenzene reagent. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, **8**, 465–473.

AMÉZAGA J., S. ARRANZ, A. URRUTICOECHEA *et al.* Altered Red Blood Cell Membrane Fatty Acid Profile in Cancer Patients. *Nutrients*. 2018, **10**, 1-13.

ANTELO-DOMINIGUEZ Á., J.Á. COCHO, M.J. TABERNERO *et al.* Simultaneous determination of cocaine and opiates in dried blood spots by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2013, **117**, 235–241.

BAKHIREVA L.N., L. LEEMAN, R.D. SAVICH *et al.* The validity of phosphatidylethanol in dried blood spots of newborns for the identification of prenatal alcohol exposure. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014, **38**, 1078–1085.

BAKHIREVA L.N., S. SHRESTHA, H.L. GUTIERREZ *et al.* Stability of phosphatidylethanol in dry blood spot cards. *Alcohol and Alcoholism*. 2016, **51**, 275–280.

BANTAN-POLAK, T., M. KASSAI and K.B.GRANT. A comparison of fluorescamine and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde fluorogenic reagents for microplate-based detection of amino acids. *Analytical Biochemistry*. 2001, **297**, 128-136.

BARTOLOMEO, M. P. and F. MAISANO. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2006, **17**, 131-137.

BIELAWSKA, K., I. DZIAKOWSKA and W. ROSZKOWSKA-JAKIMIEC. Chromatographic determination of fatty acids in biological material. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2010, **20**, 526–537.

BIERMANN, M., B. BARDL, S. VOLLSTÄDT *et al.* Simultaneous analysis of the non-canonical amino acids norleucine and norvaline in biopharmaceutical-related fermentation processes by a new ultra-high performance liquid chromatography approach. *Amino Acids*. 2013, **44**, 1225-1231.

BLACHIER F., G. WU and Y. YIN. *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*. Vienna: Springer Vienna, 2013, 217-229, ISBN 978-3-7091-1327-1.

BOICHENKO, A.P., O.S. CHERNYSHOVA, A.Y. KULIKOV *et al.* Properties of 2,4-dinitrophenyl derivatives of amino acids as analytical forms for high-performance liquid chromatography. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2011, **84**, 957-963.

BOTROS, L., D. SAKKAS and E. SELI. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Molecular Human Reproduction*. 2009, **14**, 679-690.

BRINDLE, E., M. FUJITA, J. SHOFER *et al.* Serum, plasma, and dried blood spot high-sensitivity c-reactive protein enzyme immunoassay for population research. *Journal of Immunological Methods*. 2010, **362**, 112–120.

BUHA, S. M., A. PANCHAL, H. PANCHAL *et al.* HPLC-FLD for the simultaneous determination of primary and secondary amino acids from complex biological sample by pre-column derivatization. *Journal of Chromatographic Science*. 2011, **49**, 118-123.

BURDGE G.C., P. WRIGHT, A.E. JONES *et al.* A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *British Journal of Nutrition*. 2000, **84**, 781-7.

CALLEJÓN, R. M., W. TESHAYE, M. J. TORIJA *et al.* HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *European Food Research and Technology*. 2008, **227**, 93-102.

CAPIAU S., V.V. STOVE, W.E. LAMBERT *et al.* Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**, 404-410.

CARPENTER K.H. and V. WILEY. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clinica Chimica Acta*. 2002, **322**, 1-10.

CATRINCK, T.C.P.G., A. DIAS, M.C.S..AGUIAR *et al.* A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2014, **25**, 1194-1199.

CDC.GOV. Centers for Disease Control and Prevention. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: https://wwwn.cdc.gov/Nchs/Nhanes/2011-2012/FAS_G.htm#LBXMRG

CHACE D.H., J.C. DIPERNA, B.L. MITCHELL *et al.* Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. *Clinical Chemistry*. 2001, **47**, 1166-1182.

CHACE D.H., T.A. KALAS and E.W. NAYLOR. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clinical Chemistry*. 2003, **49**, 1797–1817.

CHACE, D.H., V.R. DE JESÚS and A.R. SPITZER. Clinical chemistry and dried blood spots: increasing laboratory utilization by improved understanding of quantitative challenges. *Bioanalysis*. 2014, **6**, 2791–2794.

CHRISTIE, W.W. *Gas Chromatography and Lipids : a practical guide*. Bridgwater: Oily Press, 1989, 320 p., ISBN 0-9514171-0-X.

CHUANG, C.K., T.J. WANG, C.Y. YEUNG *et al.* A method for lactate and pyruvate determination in filter-paper dried blood spots. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**, 8947–8952.

COOPER A.J.L., J.Z. GINOS and A. MEISTER. Synthesis and properties of the α -keto acids. *Chemical Reviews*. 1983, **83**, 331.

COOPER, C., N. PACKER and K. WILLIAMS. Amino acid analysis protocols [online]. Totowa, N.J.: Humana Press, 2001, 265 p. Methods in molecular biology. ISBN 08-960-3656-1.

CRAWFORD E., J. GORDON, J.T. WU *et al.*, Direct analysis in real time coupled with dried spot sampling for bioanalysis in a drug-discovery setting. *Bioanalysis*. 2011, **3**, 1217-1226.

CSAPÓ, J., C. ALBERT, K. LÓKI *et al.* Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. *Acta Universitatis Sapientiae*. 2008, **1**, 5-29.

ČERMÁK T., P. LAŠTOVIČKA, V. MUŽÁKOVÁ *et al.* Association of fatty acid profile in plasma lipid fractions with HbA1c in type 2 diabetic patients. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2016, **36**, 23-33.

DEEP, A., P. KUMAR, A. KUMAR *et al.* Dry blood spot technique: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2012, **15**, 90-94.

DÉGLON J., A. THOMAS, Y. DAALI *et al.* Automated system for on-line desorption of dried blood spots applied to LC/MS/MS pharmacokinetic study of flurbiprofen and its metabolite. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, **54**, 359–367.

DE KESEL, P.M., S. CAPIAU, W.E. LAMBERT *et al.* Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis*. 2014, **6**, 1871-1874.

DE MEY, E., G. DRABIK-MARKIEWICZ, H. DE MAERE *et al.* Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2012, **130**, 1017-1023.

DEN BURGER J.C., A.J. WILHELM, A.C. CHAHBOUNI *et al.* Haematocrit corrected analysis of creatinine in dried blood spots through potassium measurement. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**, 621-627.

DENNIFF P. and N. SPOONER The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis*. 2010, **2**, 1385-95.

DE OLIVEIRA, M.A.L., B.L.S. PORTO, I.D.L. FARIA *et al.* 20 years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis. *Molecules*. 2014, **19**, 14094-14113.

DONNARUMMA F., R. WINTERSTEIGER, M. SCHOBER *et al.* Simultaneous quantitation of alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural in plasma by HPLC with UV and fluorescence detection. *Analytical Sciences*. 2013, **29**, 1177-1182.

ELBASHIR, A.A., A.A. AHMED, S.M. ALI AHMED *et al.* 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt (NQS) as an analytical reagent for the determination of pharmaceutical amine by spectrophotometry. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2012, **47**, 219-232.

ELBASHIR, A.A., F.E.O. SULIMAN and H.Y. ABOUL-ENEIN. The application of 7-Chloro-4-nitrobenzoxadiazole (NBD-Cl) for the analysis of pharmaceutical-bearing amine group using spectrophotometry and spectrofluorimetry techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2011, **46**, 222-241.

FALLER A., B. RICHTER, M. KLUGE *et al.* LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, **401**, 1163-1166.

FAN L. and J.A. LEE. Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated environment. *Bioanalysis*. 2012, **4**, 345-347.

FEKKES D., A. VAN DALEN, M. EDELMAN *et al.* Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde. *Journal of Chromatography B, Biomedical Applications*. 1995, **669**, 177-186.

FOSTER K.J., K.G. ALBERTI, L. HINKS *et al.* Blood intermediary metabolite and insulin concentrations after an overnight fast: reference ranges for adults, and interrelations. *Clinical Chemistry*. 1978, **24**, 1568-1572.

FUCHS, M., J. ENGEL, M. CAMPOS *et al.* Intracellular alpha-keto acid quantification by fluorescence-HPLC. *Amino Acids*. 2009, **36**, 1–11.

FUJIWARA T., A. HATTORI, T. ITO *et al.* Analysis of intracellular α -keto acids by HPLC with fluorescence detection. *Analytical Methods*. 2020, **12**, 2555-2559.

GABRIEL, H., T.V. AMELIA, F. CRISTINA *et al.* Capillary electrophoresis in the analysis of polyunsaturated fatty acids. *Acta Medica Marisiensis*. 2015, **61**, 378-381.

GARIBOTTO G., P. ANCARANI, R. RUSSO *et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of branched-chain keto acid hydrazone derivatives: optimization of techniques and application to branched-chain keto acid balance studies across the forearm. *Journal of Chromatography*. 1991, **572**, 11-23.

GARRETT, R. and C.M. GRISHAM. *Biochemistry. 4th ed.* Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2010, s. 70-92. ISBN 0495109355.

GIORDANO, G., A. GUCCIARDI, P. PIRILLO *et al.* Quantification of underivatized amino acids on dry blood spot, plasma, and urine by HPLC-ESI-MS/MS. *Amino Acid Analysis*. 2019, **2030**, 153-172.

GOLBAHAR, J., D.D. ALTAYAB and E. CARREON. Short-term stability of amino acids and acylcarnitines in the dried blood spots used to screen newborns for metabolic disorders. *Journal of Medical Screening*. 2014, **21**, 5–9.

GRÜNER, N., O. STAMBOULI and R.S. ROSS. Dried blood spots - preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, **97**, 1-9.

GUNASH J., J.J. ARISTIZABAL-HENAO and K.D. STARK. Quantitating fatty acids in dried blood spots on a common collection card versus a novel wicking sampling device. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2019, **145**, 1-6.

GUTHRIE, R. and A. SUSI. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963, **32**, 338-343.

HAGENFELDT L. and A. ARVIDSSON. The distribution of amino acids between plasma and erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. 1980, **100**, 133-141.

HAN, J., S. GAGNON, T. ECKLE *et al.* Metabolomic analysis of key central carbon metabolism carboxylic acids as their 3-nitrophenylhydrazones by UPLC/ESI-MS. *Electrophoresis*. 2013, **34**, 2891–2900.

HANCZKÓ, R., A. JÁMBOR, A. PERL *et al.* Advances in the *o*-phthalaldehyde derivatizations. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1163**, 25-42.

HARA, S., Y. TAKEMORI, M. YAMAGUCHI *et al.* Determination of α -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. 1985, **344**, 33-39.

HARDELID P., D. WILLIAMS, C. DEZATEUX *et al.* Agreement of rubella IgG antibody measured in serum and dried blood spots using two commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Medical Virology*. 2008, **80**, 360–364.

HARRIS W.S. and J. POLREIS. Measurement of the Omega-3 Index in Dried Blood Spots. *Annals of Clinical and Laboratory Research*. 2016, **4**, 1-7.

HELLMUTH, C., M. WEBER, B. KOLETZKO *et al.* Nonesterified fatty acid determination for functional lipidomics: comprehensive ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantitation, qualification, and parameter prediction. *Analytical Chemistry*. 2012, **84**, 1483–1490.

HMDB.CA. The Human Metabolome Database [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://hmdb.ca/>

HOLEČEK M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition and Metabolism*. 2019, **15**, 1-12.

HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006, 288 s. ISBN 978-80-247-1562-9.

HOLEN, T., F. NORHEIM, T.E. GUNDERSEN *et al.* Biomarkers for nutrient intake with focus on alternative sampling techniques: Analytics, validation, and applications. *Genes & Nutrition*. 2016, **11**, 1-20.

HOLUB M., K. TUSCHL, R. RATSCHMANN *et al.* Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **373**, 27-31.

INGELS A.S., P. DE PAEPED, K. ANSEEUW *et al.* Dried blood spot punches for confirmation of suspected γ -hydroxybutyric acid intoxications: validation of an optimized GC-MS procedure. *Bioanalysis*. 2011, **20**, 2271-2281.

JACOMELLI G., V. MICHELI, L. PERUZZI *et al.* Simple non-radiochemical HPLC-linked method for screening for purine metabolism disorders using dried blood spot. *Clinica Chimica Acta*. 2002, **324**, 135-139.

JAYAVELU N.D. and N.S. BAR. Metabolomic studies of human gastric cancer: review. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, **20**, 8092-8101.

JEONG J.S., S.K. KIM, S.R. PARK. Amino acid analysis of dried blood spots for diagnosis of phenylketonuria using capillary electrophoresis-mass spectrometry equipped with a sheathless electrospray ionization interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, **405**, 8063-8072.

KANĎÁR, R., M. KOPČIL a L. LAŠTOVIČKOVÁ. Determination of selected α -keto acids in dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022, **214**, 1-7.

KANĎÁR, R., P. DRÁBKOVÁ, T. TOIFLOVÁ *et al.* Determination of selected amino acids in serum of patients with liver disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2016, **25**, 1227-1239.

KANĎÁR R., P. ŽÁKOVÁ, J. JIROŠOVÁ *et al.* Determination of branched chain amino acids, methionine, phenylalanine, tyrosine and α -keto acids in plasma and dried blood spot samples using HPLC with fluorescence detection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009, **47**, 565-572.

KANĎÁR, R., X. ŠTRAMOVÁ, P. DRÁBKOVÁ *et al.* Determination of total glutathione in dried blood spot samples using a high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2015, **53**, 879–885.

KANG, X., J. XIAO, X. HUANG *et al.* Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **366**, 352-356.

KAPUR S., S. KAPUR and D. ZAVA. Cardiometabolic risk factors assessed by a finger stick dried blood spot method. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2008, **2**, 236-241.

KAYIRAN S.M., N. OZBEK, M. TURAN *et al.* Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. *Clinical and laboratory haematology*. 2003, **25**, 9-16.

KAYTON, A. Newborn screening: a literature review. *Neonatal Network : NN*. 2007, **26**, 85-95.

KHAN, A.S. and F. FAIZ. Amino acid analysis using ion exchange resins. *Journal of Natural Sciences and Mathematics*. 2008, **84**, 1-17.

KHAN H.A., A.S. ALHOMIDA, H.A. MADANI *et al.* Carnitine and acylcarnitine profiles in dried blood spots of patients with acute myocardial infarction. *Metabolomics*. 2013a, **9**, 828-838.

KHAN, P.S., P.R. REDDY and V.K. REDDY. *International journal of chemtech research*. 2013b, **5**, 2941-2946. ISSN 0974-4290.

KIEBER D.J. and K. MOPPER. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of α -keto acid quinoxalinol derivatives. *Journal of Chromatography*. 1983, **281**, 131-149.

KISH-TRIER E., E.L SCHWARZ, M. PASQUALI *et al.* Quantitation of total fatty acids in plasma and serum by GC-NCI-MS. *Clinical Mass Spectrometry*. 2016, **2**, 11-17.

KOBRYNSKI L.J., G.K. YAZDANPANA, D. KOONTZ *et al.* MALDI-TOF-MS assay to detect the hemizygous 22q11.2 deletion in DNA from dried blood spots. *Clinical Chemistry*. 2016, **62**, 287-292.

KOGA, R., Y. MIYOSHI, K. TODOROKI *et al.* *Liquid Chromatography (Second Edition) Applications*. Amsterdam: Elsevier, 2017, 87–106, ISBN 978-0-12-805392-8.

KONG S.T., H.S. LIN, J. CHING *et al.* Evaluation of dried blood spots as sample matrix for gas chromatography/mass spectrometry based metabolomic profiling. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**, 4314-4318.

KOSTER, R.A., R. BOTMA, B. GREIJDANUS *et al.* The performance of five different dried blood spot cards for the analysis of six immunosuppressants. *Bioanalysis*. 2015, **7**, 1225-1235.

KREMMYDA L.S., E. TVRZICKÁ, B. STANKOVÁ *et al.* Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc, Czech Republic*. 2011, **155**, 195–218.

KUKEC R.R., I. GRABNAR, A. MRHAR *et al.* A simple dried blood spot method for clinical pharmacological analyses of etoposide in cancer patients using liquid chromatography and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*. 2016, **452**, 99–105.

KWANYUEN, P. and J. W. BURTON. A modified amino acid analysis using PITC derivatization for soybeans with accurate determination of cysteine and half-cystine. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010, **87**, 127-132.

LAKE A.D., P. NOVAK, P. SHIPKOVA *et al.* Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids*. 2015, **47**, 603–615.

LAWSON, A. J., L. BERNSTONE and S. K. HALL. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. *Journal of Medical Screening*. 2016, **23**, 7-16.

LEELAWIWAT, W., N.L. YOUNG, T. CHAOWANACHAN *et al.* Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: Stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand. *Journal of Virological Methods*. 2009, **155**, 109–117.

LEHMANN,S., C. DELABY, J. VIALARET *et al.* Current and future use of „dried blood spot“ analyses in clinical chemistry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013, **51**, 1897-1909.

LI F., J. ZULKOSKI, D. FAST *et al.* Perforated dried blood spots: a novel format for accurate microsampling. *Bioanalysis*. 2011a, **3**, 2321-2333.

LI Y., A.G. TANG and S. MU. HPLC-FLD determination of serum aromatic amino acids: application in chronic kidney disease patients. *Clinica Chimica Acta*. 2011b, **412**, 1032-1035.

LI W. and F.L.S. TSE. Dried Blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography*. 2010, **24**, 49-65.

LIMA A.R., M.L. BASTOS, M. CARVALHO *et al.* Biomarker discovery in human prostate cancer: an update in metabolomics studies. *Translational Oncology*. 2016, **9**, 357–370.

LIMA, E.S. and D.S.P. ABDALLA. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **465**, 81-91.

LÍSA M., E. CÍFKOVÁ and M. HOLČAPEK. Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**, 5146-5156.

LIU J., R.G. COOKS, Z. OUYANG. Enabling quantitative analysis in ambient ionization mass spectrometry: internal standard coated capillary samplers. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**, 5632–5636.

LIU L., X. JIN, Y. WU *et al.* A novel dried blood spot detection strategy for characterizing cardiovascular diseases. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2020, **7**, 1-10.

LOHNER S., K. FEKETE, T. MAROSVOLGYI *et al.* Gender differences in the long-chain polyunsaturated fatty acid status: systematic review of 51 publications. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2013, **62**, 98-112.

LORENZO, M.P., A. VILLASEÑOR, A. RAMAMOORTHY *et al.* Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: Application to bipolar disorder study. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2013, **34**, 1701-1709.

LUKACS, Z., P. SANTAVUORI, A. KEIL *et al.* Rapid and simple assay for the determination of tripeptidyl peptidase and palmitoyl protein thioesterase activities in dried blood spots. *Clinical Chemistry*. 2003, **49**, 509-511.

MAHAR, K.P., K.U. ABBASI, M.Y. KHUHAWAR *et al.* HPLC determination of α -keto acids in human serum and urine after derivatization with 4-nitro-1,2-phenylenediamine. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*. 2013, **14**, 16 – 25.

MARANGONI F., C. COLOMBO and C. GALLI. A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip in humans: applicability to nutritional and epidemiological studies. *Analytical Biochemistry*. 2004, **326**, 267–272.

MASHAVAVE, G., P. KUONA, W. TINAGO *et al.* Dried blood spot omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated fatty acid levels in 7–9 year old Zimbabwean children: a cross sectional study. *BMC Clinical Pathology*. 2016, **16**, 1-10.

MASUDA, A. and N. DOHMAE. Amino acid analysis of sub-picomolar amounts of proteins by precolumn fluorescence derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *BioScience Trends*. 2012, **5**, 231-238.

MCDADE, T.W., J. BURHOP and J. DOHNAL. High-sensitivity enzyme immunoassay for C-reactive protein in dried blood spots, *Clinical Chemistry*. 2004, **50**, 652-654.

MCDADE, T.W., S.A. WILLIAMS, J.J. SNODGRASS *et al.* What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*. 2007, **44**, 899-925.

MEI, J.V., J.R. ALEXANDER, B.W. ADAM *et al.* Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *The Journal of Nutrition*. 2001, **131**, 1631-1636.

MEI, J.V., S.D. ZOBEL, E.M. HALL *et al.* Performance Properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis*. 2010, **2**, 1397-1403.

MERCOLINI L., R. MANDRIOLI, G. GERRA *et al.* Analysis of cocaine and two metabolites in dried blood spots by liquid chromatography with fluorescence detection: A novel test for cocaine and alcohol intake. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**, 7242–7248.

MERCOLINI L., R. MANDRIOLI, V. SORELLA *et al.* Dried blood spots: Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its main metabolites. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1271**, 33– 40.

METHEREL, A.H., R.C. HOGG, L.M. BUZINKIEVICH *et al.* Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. *Lipids in Health and Disease*. 2013, **12**, 1-9.

MIHALIK S.J., S.F. MICHALISZYN, J. DE LAS HERAS *et al.* Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012, **35**, 605-611.

MITTELSTRASS K., J.S. RIED, Z. YU *et al.* Discovery of sexual dimorphisms in metabolic and genetic biomarkers. *PLoS Genetics*. 2011, **7**, 1-12.

MIYAGI Y., M. HIGASHIYAMA, A. GOCHI *et al.* Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One*. 2011, **6** , 1-12.

MOLNÁR-PERL, I. and I. BOZOR. Comparison of the stability and UV and fluorescence characteristics of the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-l-cysteine reagents and those of their amino acid derivatives. *Journal of Chromatography A*. 1998, **798**, 37-46.

MOLNÁR-PERL, I. Quantitation of amino acids and amines by chromatography methods and protocols. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. ISBN 04-445-2050-3.

MONEY T.T. and C.A. BOUSMAN. Metabolomics of psychotic disorders. *Metabolomics*. 2013, **3**, 1-7.

MORRIS M., K. FISCHER, K. LEYDIKER *et al.* Reduction in newborn screening metabolic false-positive results following a new collection protocol. *Genetics in medicine*. **2014**, *16*, 477-483.

MUSTAFA A., S. GUPTA, G.R. HUDES *et al.* Serum amino acid levels as a biomarker for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 2011, **186**, 1206-1212.

MÜHLING J., M. FUCHS, M.E. CAMPOS *et al.* Quantitative determination of free intracellular α -keto acids in neutrophils. *Journal of Chromatography B*. 2003, **789**, 383–392.

NAKAMURA, M., S. HARA, M. YAMAGUCHI *et al.* 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for α -keto acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1987, **35**, 687-692.

NGUYEN D.T., G. LEE and M.J. PAIK. Keto acid profiling analysis as ethoxime/tert-butyltrimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2013, **913-914**, 48-54.

NOGUCHI K., T. MIZUKOSHI, H. MIYANO *et al.* Development of a New LC-MS/MS Method for the Quantification of Keto Acids. *Chromatography*. 2014, **35**, 117-123.

NOVÁKOVÁ, L. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.

OE, T., M. MAEKAWA, R. SATOH *et al.* Combining [C-13(6)]-phenylisothiocyanate and the Edman degradation reaction: a possible breakthrough for absolute quantitative proteomics together with protein identification. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2010, **24**, 173-179.

OGASAWARAA, Y., T. HIROKAWAA, K. MATSUSHIMA *et al.* A novel method for the analysis of 3-mercaptopyruvate using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2013, **931**, 56–60.

O'MARA M., B. HUDSON-CURTIS, K. OLSON *et al.* The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood samples. *Bioanalysis*. 2011, **3**, 2335-2347.

PAILLA K., F. BLONDE-CYNOBER, C. AUSSEL *et al.* Branched-chain keto-acids and pyruvate in blood: measurement by HPLC with fluorimetric detection and changes in older subjects. *Clinical Chemistry*. 2000, **46**, 848–853.

PAOLINO G., V. HUBER, S. CAMERINI *et al.* The fatty acid and protein profiles of circulating CD81-positive small extracellular vesicles are associated with disease stage in melanoma patients. *Cancers*. 2021, **13**, 1-19.

PARKER S.P. and W.D. CUBITT. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *Journal of Clinical Pathology*. 1999, **52**, 633–639.

PASIKANTI, K. K., P. C. HO and E. C. Y. CHAN. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of Chromatography B*. 2008, **871**, 202-211.

PEREIRA, V., M. PONTES, J.S. CÂMARA *et al.* Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1189**, 435-443.

PICKERING, M.V. Ion-exchange chromatography of free amino acids. *Bio Separations*. 1989, **7**, 484-490.

RAMMOUZ, G., M. LACROIX, J.C. GARRIGUES *et al.* The use of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde for the analysis of primary amines using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*. 2007, **21**, 1223-1239.

RICHARDSON G., D. MARSHALL and B.G. KEEVIL. Prediction of haematocrit in dried blood spots from the measurement of haemoglobin using commercially available sodium lauryl sulphate. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2018, **55**, 363-367.

RIGAS, P.G. Post-column labeling techniques in amino acid analysis by liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, **405**, 7957-7992.

RINALDO P., T.M. COWAN and D. MATERN. Acylcarnitine profile analysis. *Genetics in Medicine*. 2008, **10**, 151–156.

RISÉ P., S. ELIGINI, S. GHEZZI *et al.* Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*. 2007, **76**, 363-369.

ROTTINGHAUS, E.K., R.S. BEARD, E. BILE *et al.* Evaluation of dried blood spots collected on filter papers from three manufacturers stored at ambient temperature for application in HIV-1 drug resistance monitoring. *PLoS One*. 2014, **9**, 1-5.

SADONES N., S. CAPIAU, P.M. DE KESEL *et al.* Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. *Bioanalysis*. 2014, **6**, 2211-2227.

SALAZAR, C., J.M. ARMENTA and V. SHULAEV. An UHPLC-ESI-MS/MS assay using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization for targeted amino acid analysis: application to screening of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Metabolites*. 2012, **2**, 398-428. ISSN 2218-1989.

SARKAR S., M.P. SINGH and R.K. RATHO. Dried blood spot for Ebola testing in developing countries. *The Lancet. Infectious Diseases*. 2015, **15**, 1005.

SAURINA, J. and S. HERNÁNDEZ-CASSOU. Determination of amino acids by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Chromatography A*. 1994, **676**, 311-319.

SCHMIDT, V. Ivar Christian Bang (1869–1918), founder of modern clinical microchemistry. *Clinical Chemistry*. 1986, **32**, 213–215.

SCHWERTNER H.A. a E.L. MOSSER. Comparison of lipid fatty acids on a concentration basis vs weight percentage basis in patients with and without coronary artery disease or diabetes. *Clinical Chemistry*. 1993, **39**, 659-663.

SERAFIM V., D.A. TIUGAN, N. ANDREESCU *et al.* Development and Validation of a LC–MS/MS-Based Assay for Quantification of Free and Total Omega 3 and 6 Fatty Acids from Human Plasma. *Molecules*. 2019, **24**, 360-371.

SETHOM M.M., S. FARES, N. BOUAZIZ *et al.* Polyunsaturated fatty acids deficits are associated with psychotic state and negative symptoms in patients with schizophrenia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2010, **83**, 131-136.

SEWELL, A.C., M.E. HASKINS and U. GIGER. Dried Blood spots for enzymatic diagnosis of lysosomal storage diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*. 2012, **41**, 548–557.

SHARMA, G., S.V. ATTRI, B. BEHRA *et al.* Analysis of 26 amino acids in human plasma by HPLC using AQC as derivatizing agent and its application in metabolic laboratory. *Amino Acids*. 2014, **46**, 1253-1263.

SHEN, Z., P. KANG and S.V. RAHAVENDRAN. Metabolite profiling of dasatinib dosed to Wistar Han rats using automated dried blood spot collection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, **67-68**, 92-97.

SHEN, Z., Z. SUN, L. WU *et al.* Rapid method for the determination of amino acids in serum by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2002, **979**, 227-232.

SIEBENHAAR, M., K. KÜLLMER, F. DE BARROS *et al.* Personalized monitoring of therapeutic salicylic acid in dried blood spots using a three-layer setup and desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**, 7229-7238.

SOGA T. and D.N. HEIGER. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2000, **72**, 1236-1241.

SONG Y., CH. XU, H. KUROKI *et al.* Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, **147**, 35-49.

STENERSON, K. K. The derivatization and analysis of amino acids by GC-MS. Reporter US [online]. 2011, 25.3 [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/reporter-us/pdf/the-derivatization.pdf>

STOVE C.P., A.S.M.E. INGELS, P.M.M. DE KESEL *et al.* Dried blood spots in toxicology: From the cradle to the grave? *Critical Reviews in Toxicology*. 2012, **42**, 230-243.

STRNADOVÁ, K.A., M. HOLUB, A. MÜHL *et al.* Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots. *Clinical Chemistry*. 2007, **53**, 717–722.

THOMAS A., H. GEYER, W. SCHÄNZER *et al.* Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **403**, 1279–1289.

TOLEDO A.C. Jr., J.N. JANUÁRIO, R.M. REZENDE *et al.* Dried blood spots as a practical and inexpensive source for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus surveillance. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005, **100**, 365-370.

TSUCHIYA, H., T. HAYASHI, M. SATO *et al.* Simultaneous separation and sensitive determination of free fatty acids in blood plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1984, **309**, 43-52.

TŮMA P. a E. SAMCOVÁ. Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou. *Chemické Listy*. 2007, 101, 200–207.

TVRZICKÁ, E., L.S. KREMMYDA, B. STANKOVÁ *et al.* Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc, Czech Republic.* 2011, **155**, 117–130.

UCHIYAMA S., Y. INABA and N. KUNUGITA. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B.* 2011, **879**, 1282-1289.

UZICANIN A., I. LUBEGA, M. NANUYNJA *et al.* Dried blood spots on filter paper as an alternative specimen for measles diagnostics: detection of measles immunoglobulin M antibody by a commercial enzyme immunoassay. *Journal of Infectious Diseases.* 2011, **204**, 564-569.

VAN AMSTERDAM, P. and C. WALDROP. The application of dried blood spot sampling in global clinical trials. *Bioanalysis.* 2010, **2**, 1783–1786.

VAN BAAR B.L., T. VERHAEGHE, O. HEUDI *et al.* IS addition in bioanalysis of DBS: results from EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis.* 2013, **5**, 2137-2145.

VAN VLIET K., W.G. VAN GINKEL, E. VAN DAM *et al.* Dried blood spot versus venous blood sampling for phenylalanine and tyrosine. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2020, **15**, 1-8.

VOET, D. a J.G. VOETOVÁ. *Biochemie.* Praha: Victoria Publishing a.s., 1995, 1360 s., ISBN 80-85605-44-9.

WAGNER M., D. TONOLI, E. VAREGIO *et al.* The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews.* 2016, **35**, 361–438.

WALEJKO J.M., B.A. CHRISTOPHER, S.B. CROWN *et al.* Branched-chain α -ketoacids are preferentially reaminated and activate protein synthesis in the heart. *Nature Communications.* 2021, **12**, 1-14.

WALKER, H.K., W.D. HALL and J.W. HURST. *Clinical Methods: The history, physical, and laboratory examinations. 3rd edition.* Boston: Butterworths, 1990, 718-719, ISBN-10:0-409-90077-X.

WANG C., H. ZHU, Z. CAI *et al.* Newborn screening of phenylketonuria using direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2013, **405**, 3159-3164.

WANG C., W. ZHANG, F. SONG *et al.* A simple method for the analysis by MS/MS of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening. *Amino Acids.* 2012, **42**, 1889-1895.

WANG L., A.R. FOLSOM, Z.J. ZHENG *et al.* Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2003, **78**, 91-98.

WANG Q., T. SUN, Y. CAO *et al.* A dried blood spot mass spectrometry metabolomic approach for rapid breast cancer detection. *Onco Targets and Therapy.* 2016, **11**, 1389-1398.

WANG Z.J., K. ZAITSU and Y. OHKURA. High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in human serum and urine using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a precolumn fluorescence derivatization reagent. *Journal of Chromatography.* 1988, **430**, 223-231.

WATANABE, Y. and K. IMAI. High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Analytical Biochemistry.* 1981, **116**, 471-472.

WATANABE, Y. and K. IMAI. Liquid chromatographic determination of amino and imino acids and thiols by postcolumn derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole. *Analytical Chemistry.* 1983, **55**, 1786-179.

WEBER J., S. OBERFELD, A. BONSE *et al.* Validation of a dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of citalopram, mirtazapine and risperidone and its active

metabolite 9-hydroxyrisperidone using HPLC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **140**, 347–354.

WILHELM A.J., J.C.G. DEN BURGER and E.L. SWART. Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014, **53**, 961–973.

WISEMAN J.M. and J.H. KENNEDY. Analysis of dried blood spots using DESI mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*. 2014, **1198**, 291-297.

WISEMAN J.M., C.A. EVANS, C.L. BOWEN *et al.* Direct analysis of dried blood spots utilizing desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *The Analyst*. 2010, **135**, 720-725.

WONG P., R. PHAM, B.A. BRUENNER *et al.* Increasing efficiency for dried blood spot analysis: prospects for automation and simplified sample analysis. *Bioanalysis*. 2010, **2**, 1787–1789.

WURTZ P., P. SOININEN, A.J. KANGAS *et al.* Branched-chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in young adults. *Diabetes Care*. 2013, **36**, 648-655.

YOUGHNOVSKI N., A. BERGERON, M. FURTADO *et al.* Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2011, **25**, 2951-2958.

YU, Z., N. ZHOU, H. QIAO *et al.* Identification, cloning, and expression of L-amino acid oxidase from marine *Pseudoalteromonas* sp. B3. *The Scientific World Journal*. 2014, **2014**, 1-8.

ZHANG J., L. YAN, W. CHEN *et al.* Metabonomics research of diabetic nephropathy and type 2 diabetes mellitus based on UPLC-*oa*TOF-MS system. *Analytica Chimica Acta*. 2009, **650**, 16-22.

ZHANG S., X. ZENG, M. REN *et al.* Novel metabolic and physiological function of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2017, **8**, 1-12.

ZHANG Y., B. YIN, R. LI *et al.* Determination of Branched-Chain Keto Acids in Serum and Muscles Using High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules*. 2018, **23**, 1-12.

ZHOU Y., L. QIU, Q. XIAO *et al.* Obesity and diabetes related plasma amino acid alterations. *Clinical Biochemistry*. 2013, **46**, 1447-1452.

ZHOU, W., X. ZHANGA and G. DUANA. Liquid-chromatography quantitative analysis of 20 amino acids after derivatization with FMOC-Cl and its application to different origin Radix isatidis. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2011, **58**, 509-515.

ZIMMER D., S. HASSLER, B. BETSCHART *et al.* Internal standard application to dried blood spots by spraying: investigation of the internal standard distribution. *Bioanalysis*. 2013, **5**, 711-719.

ZIMMERMANN M., U. SAUER and N. ZAMBONI. Quantification and mass isotopomer profiling of α -keto acids in central carbon metabolism. *Analytical Chemistry*. 2014, **86**, 3232-3237.

ZOTOU, A. and M. NOTOU. Enhancing fluorescence LC analysis of biogenic amines in fish tissues by precolumn derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Food Analytical Methods*. 2013, **6**, 89-99.

ZOTOU, A. and M. NOTOU. Study of the naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde pre-column derivatization of biogenic mono- and diamines in mixture and fluorescence-HPLC determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **403**, 1039-1048.

ZUKUNFT S., M. SORGENFREI, C. PREHN *et al.* Targeted metabolomics of dried blood spot extracts. *Chromatographia*. 2013, **76**, 1295–1305.

7 PRÍLOHY

Príloha 1 Informovaný súhlas s účasťou v štúdiu.....	116
Príloha 2 Analytické parametre metódy HPLC-FLD pre stanovenie AK zo vzoriek DBS...	117
Príloha 3 Analytické parametre metódy HPLC-ESI-MS/MS pre stanovenie AK zo vzoriek DBS.....	118
Príloha 4 Analytické parametre metódy GC-FID pre stanovenie MK zo vzoriek DBS.....	120
Príloha 5 Chromatografický záznam stanovenia MK metódou GC-FID	121
Príloha 6 Chromatografický záznam stanovenia MK vo vzorke DBS metódou GC-FID.....	122
Príloha 7 Vplyv pohlavia na koncentrácie testovaných analytov	123
Príloha 8 Štatisticky významné korelácie medzi jednotlivými AK, MK a KK (Pearsonov korelačný koeficient)	124

Príloha 1 Informovaný súhlas s účasťou v štúdiu

INFORMOVANÝ SOUHLAS

k poskytnutí vzorku biologického materiálu pro výzkumné účely

Já,, naroden/a svým podpisem stvrzují, že jsem byl/a srozumitelným způsobem a v dostatečném rozsahu informován/a o důvodech k poskytnutí vzorku své krve a způsobu jeho využití. S poskytnutím vzorku své krve k daným účelům souhlasím. Rovněž souhlasím s využitím výsledků k vědeckým a výukovým účelům za podmínky, že tyto údaje budou prezentovány a publikovány pouze v anonymní formě.

Souhlasím / nesouhlasím* s anonymním využitím mého biologického materiálu v dalším výzkumu. Beru na vědomí, že v případě nesouhlasu bude můj vzorek po zpracování pro tento výzkumný účel náležitě zlikvidován a biologický materiál nebude poskytnut dalším stranám. Vzorky budou skladovány a zpracovávány anonymně, s informovaným souhlasem bude nakládáno v souladu s platnou legislativou ČR a platnými pravidly GDPR.

* nehodící se škrtněte/vybranou variantu označte

Vdne.....

.....

(podpis)

Príloha 2 Analytické parametre metódy HPLC-FLD pre stanovenie AK zo vzoriek DBS

	A CV (%)	B CV (%)	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)	AVG smernice KK	SD interceptu ($\mu\text{mol/l}$)
2-AM	3,5	4,9	1,7	5,0	0,0062	0,0031
Ala	3,5	6,6	22,5	68,3	0,0059	0,0403
Arg	7,3	9,6	1,4	4,2	0,0057	0,0024
Asn	6,9	9,1	1,8	5,5	0,0049	0,0027
Asp	15,4	16,1	0,6	1,7	0,0054	0,0009
Cit	7,6	9,2	1,3	4,1	0,0059	0,0024
Gln	5,1	8,2	4,0	12,2	0,0055	0,0067
Glu	5,8	6,8	2,3	7,0	0,0060	0,0042
Gly	5,2	8,5	4,2	12,8	0,0064	0,0082
His	6,8	8,6	1,0	3,0	0,0050	0,0015
Ile	2,0	4,4	2,7	8,2	0,0060	0,0049
Leu	2,3	2,7	4,0	12,1	0,0063	0,0076
Met	4,3	8,2	2,2	6,6	0,0056	0,0037
Phe	4,3	7,6	4,3	13,0	0,0057	0,0074
Ser	5,3	8,2	4,3	12,9	0,0055	0,0071
Tau	2,0	4,2	2,1	6,3	0,0059	0,0037
Thr	6,4	8,8	3,7	11,1	0,0055	0,0061
Trp	7,3	9,6	1,2	3,8	0,0040	0,0015
Tyr	3,0	8,6	3,1	9,3	0,0058	0,0054
Val	3,5	5,8	4,4	13,3	0,0061	0,0081

Presnosť v sérii (**A**, $n = 10$) a presnosť medzi sériami (**B**, $n = 5$), LOD, LOQ a parametre 10 kalibračných kriviek (**KK**) pre stanovenie AK zo vzoriek DBS metódou HPLC-FLD. LOD a LOQ boli vypočítané podľa rovníc: $\text{LOD} = 3,3 Sa/b$; $\text{LOQ} = 10 Sa/b$, kde Sa je smerodajná odchýlka interceptu a b je priemerná smernica kalibračnej krivky. Intercept predstavuje hodnotu na osi x , ak hodnota osi y je nulová. Ukazuje, aký signál dáva metóda, ak je meraná vzorka s nulovou koncentráciou daného analytu.

Príloha 3 Analytické parametre metódy HPLC-ESI-MS/MS pre stanovenie AK zo vzoriek DBS

	A – nízka koncentr. CV (%)	A – vysoká koncentr. CV (%)	B – nízka koncentr. CV (%)	B – vysoká koncentr. CV (%)	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)	Pracovný rozsah KK ($\mu\text{mol/l}$)	R ²	Smernica KK (SD)	Intercept (SD) ($\mu\text{mol/L}$)
2-AM	1,7	9,3	6,2	6,5	0,3	1,0	1,0-75,1	0,989	0,0061 (0,0004)	0,0001 (0,0006)
Ala	2,9	1,9	9,5	7,4	2,5	7,7	7,7-851,3	0,993	0,0033 (0,0002)	-0,0021 (0,0025)
Arg	0,5	2,6	7,7	3,1	0,6	1,9	1,9-273,3	0,994	0,0164 (0,0012)	-0,0055 (0,0031)
Asn	9,1	3,4	10,6	0,0	0,4	1,2	1,2-144,1	0,994	0,0027 (0,0001)	0,0004 (0,0003)
Cit	0,2	2,6	9,1	7,6	0,3	0,8	0,8-79,1	0,994	0,0108 (0,0005)	0,0020 (0,0009)
Gln	5,5	3,1	8,5	7,4	2,4	7,4	7,4-1369,8	0,997	0,0076 (0,0004)	-0,0126 (0,0056)
Glu	3,3	5,5	5,1	8,7	0,6	1,8	1,8-186,0	0,998	0,0075 (0,0003)	0,0012 (0,0014)
Gly	1,2	3,0	4,0	2,7	5,9	17,8	17,8-809,9	0,988	0,0004 (0,0001)	0,0008 (0,0007)
His	3,1	1,8	6,9	5,5	0,4	1,3	1,3-195,9	0,994	0,0147 (0,0009)	-0,0002 (0,0020)
Ile	2,7	4,7	4,8	7,6	0,3	1,0	1,0-195,8	0,997	0,0416 (0,0023)	-0,0003 (0,0040)
Leu	3,8	5,2	2,5	1,1	1,1	3,4	3,4-312,9	0,996	0,0141 (0,0007)	0,0039 (0,0047)
Lys	4,0	1,7	6,1	7,4	1,4	4,4	4,4-295,0	0,993	0,0169 (0,0015)	-0,0171 (0,0074)
Met	4,0	5,7	2,4	7,0	0,2	0,5	0,5-102,4	0,997	0,0142 (0,0005)	-0,0018 (0,0007)
Phe	1,7	4,8	8,0	0,1	0,3	0,9	0,9-140,0	0,995	0,0375 (0,0021)	-0,0022 (0,0033)
Pro	3,6	4,2	0,0	2,9	0,9	2,8	2,8-384,0	0,997	0,0449 (0,0019)	-0,0038 (0,0125)
Ser	1,5	4,6	7,8	3,8	3,6	11,1	11,1-264,0	0,984	0,0022 (0,0002)	0,0020 (0,0024)

	A – nízka koncentr. CV (%)	A – vysoká koncentr. CV (%)	B – nízka koncentr. CV (%)	B – vysoká koncentr. CV (%)	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)	Pracovný rozsah KK ($\mu\text{mol/l}$)	R^2	Smernica KK (SD)	Intercept (SD) ($\mu\text{mol/L}$)
Thr	5,7	3,0	1,5	9,0	1,2	3,7	3,7-353,1	0,992	0,0028 (0,0001)	0,0009 (0,0010)
Trp	3,9	4,2	8,8	8,7	0,2	0,6	0,6-117,8	0,997	0,0338 (0,0014)	-0,0045 (0,0019)
Tyr	2,5	5,2	4,4	6,1	0,4	1,3	1,3-155,4	0,996	0,0043 (0,0003)	0,0004 (0,0006)
Val	2,7	3,8	7,0	7,2	1,9	5,8	5,8-590,0	0,996	0,0208 (0,0007)	-0,0083 (0,0121)
2-OG	6,9	5,4	9,2	8,3	0,1	0,1	0,1-25,7	0,999	0,0136 (0,0001)	0,0181 (0,0001)
PYR	4,7	4,4	5,1	5,2	3,3	9,9	9,9-243,6	0,999	0,0189 (0,0004)	0,0724 (0,0187)
KIV	3,8	3,4	6,1	5,9	0,2	0,6	0,6-27,5	0,999	0,0088 (0,0001)	-0,0001 (0,0006)
KMV	3,9	3,1	6,2	5,9	0,5	1,6	1,6-50,5	0,999	0,0120 (0,0002)	-0,0001 (0,0019)
KIC	4,5	4,2	7,4	7,0	0,6	1,8	1,8-54,2	0,999	0,0201 (0,0004)	-0,0035 (0,0037)

Presnosť v sérii (**A**, $n = 10$) a presnosť medzi sériami (**B**, $n = 6$), LOD, LOQ a priemerné parametre 10 kalibračných kriviek (KK) pre stanovenie AK zo vzoriek DBS metódou HPLC-ESI-MS/MS a KK metódou HPLC-FLD. LOD a LOQ boli vypočítané podľa rovníc: $\text{LOD} = 3,3 Sa/b$; $\text{LOQ} = 10 Sa/b$, kde Sa je smerodajná odchýlka interceptu a b je priemerná smernica kalibračnej krivky. Intercept predstavuje hodnotu na osi x , ak hodnota osi y je nulová. Ukazuje, aký signál dáva metóda, ak je meraná vzorka s nulovou koncentráciou daného analytu.

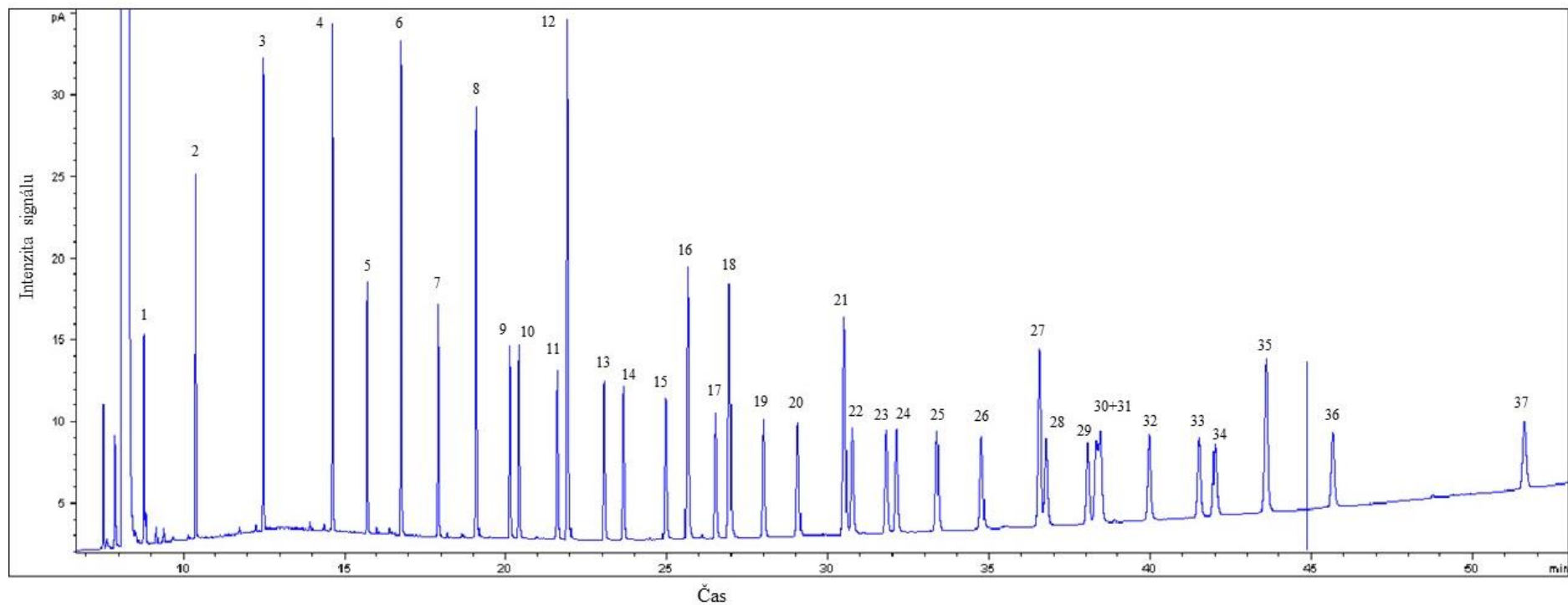
Príloha 4 Analytické parametre metódy GC-FID pre stanovenie MK zo vzoriek DBS

	RRF*	Percentuálne zastúpenie		Koncentrácia	
		AVG (SD) (%)	CV (%)	AVG (SD) ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)
C14:0	1,069	1,08 (0,08)	7,46	6,4 (0,6)	9,7
C15:0	1,080	0,27 (0,02)	5,48	1,6 (0,1)	6,4
C16:0	1,032	24,82 (0,32)	1,28	126,7 (5,5)	4,4
<i>cis</i> C16:1 n10	-	1,20 (0,02)	1,54	-	-
<i>cis</i> C16:1 n7	-	0,06 (0,01)	12,88	-	-
C17:0	1,043	0,39 (0,02)	4,11	1,9 (0,1)	5,5
C18:0	1,044	19,27 (0,79)	4,10	89,7 (4,7)	5,2
<i>cis</i> C18:1 n9	1,039	16,07 (0,32)	1,97	74,9 (2,1)	2,8
<i>cis</i> C18:1 n7	-	1,53 (0,07)	4,80	-	-
all-cis C18:2 n6	1,069	17,74 (0,35)	1,95	85,8 (3,2)	3,7
all-cis C18:3 n6	1,057	0,15 (0,02)	13,49	0,7 (0,1)	11,5
all-cis C18:3 n3	1,046	0,21 (0,01)	6,23	1,0 (0,1)	8,7
C20:0	1,003	0,40 (0,04)	8,93	1,6 (0,2)	10,4
<i>cis</i> C20:1 n9	1,021	0,19 (0,02)	10,54	0,7 (0,1)	12,7
all-cis C20:3 n6	1,086	1,82 (0,02)	1,35	8,2 (0,3)	3,9
all-cis C20:4 n6	1,007	8,10 (0,16)	1,99	34,0 (1,3)	3,7
all-cis C20:5 n3	1,172	0,53 (0,03)	4,95	2,6 (0,2)	6,9
C22:0	1,011	0,59 (0,02)	4,19	2,2 (0,1)	4,8
all-cis C22:4 n6	-	1,15 (0,04)	3,14	-	-
all-cis C22:5 n6	-	0,27 (0,04)	16,40	-	-
all-cis C22:5 n3	-	0,82 (0,06)	6,85	-	-
all-cis C22:6 n3	1,116	2,16 (0,10)	4,72	9,3 (0,5)	5,4
C24:0	1,018	0,64 (0,07)	10,26	2,3 (0,3)	12,1
<i>cis</i> C24:1 n9	1,005	0,55 (0,08)	14,07	1,9 (0,3)	14,3

$$*RRF = (\text{Area}_x/c_x) / (\text{Area}_{IS}/c_{IS})$$

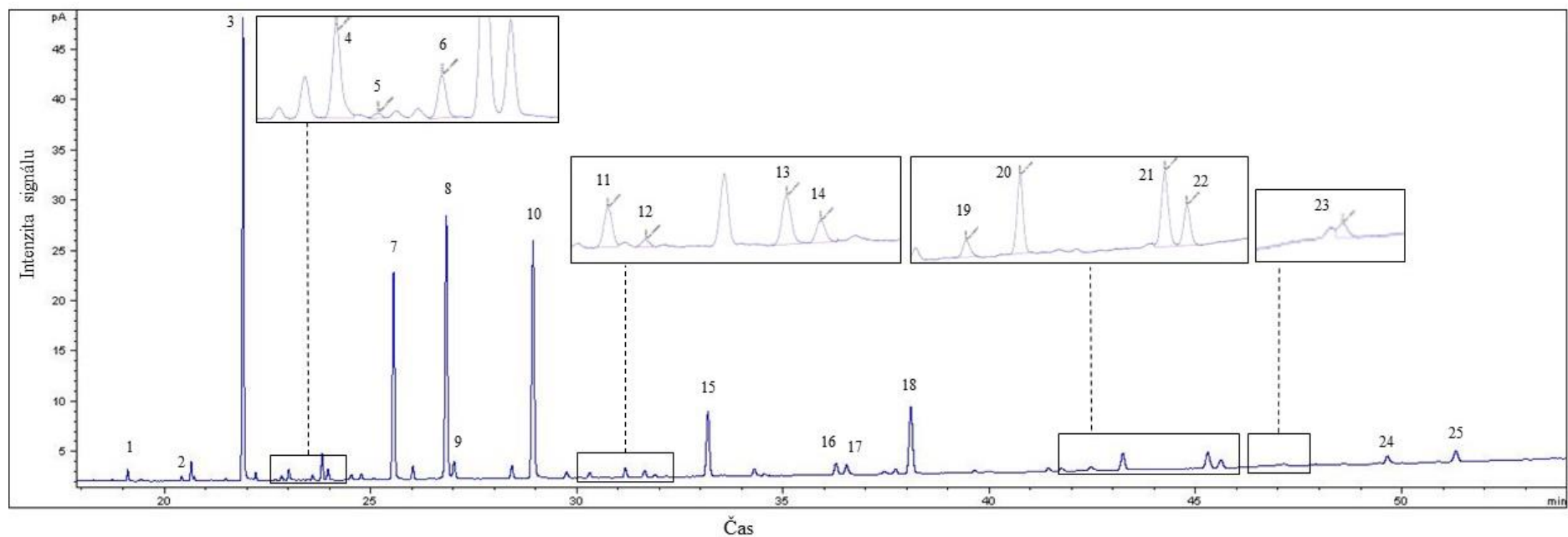
Presnosť metódy stanovenia MK zo vzoriek DBS metódou GC-FID (presnosť v sérii, n = 10). Zobrazené sú oba spôsoby vyjadrovania výsledkov (percentuálne zastúpenie aj koncentrácia spočítaná z RRF).

Príloha 5 Chromatografický záznam stanovenia MK metódou GC-FID



Vzorka zmesného štandardu FAME37. Píky: **1**, C4:0, **2**, C6:0, **3**, C8:0, **4**, C10:0, **5**, C11:0, **6**, C12:0, **7**, C13:0, **8**, C14:0, **9**, *cis* C14:1 n5, **10**, C15:0, **11**, *cis* C15:1 n5, **12**, C16:0, **13**, *cis* C16:1 n7, **14**, C17:0, **15**, *cis* C17:1 n7, **16**, C18:0, **17**, *trans* C18:1 n9, **18**, *cis* C18:1 n9, **19**, *all-trans* C18:2 n6, **20**, *all-cis* C18:2 n6, **21**, C20:0, **22**, *all-cis* C18:3 n6, **23**, *all-cis* C18:3 n3, **24**, *cis* C20:1 n9, **25**, C21:0, **26**, *all-cis* C20:2 n6, **27**, C22:0, **28**, *all-cis* C20:3 n9, **29**, *all-cis* C20:3 n6, **30**, *cis* C22:1 n9, **31**, *all-cis* C20:4 n6, **32**, C23:0, **33**, *all-cis* C22:2 n6, **34**, *all-cis* C20:5 n3, **35**, C24:0, **36**, *cis* C24:1 n9, **37**, *all-cis* C22:6 n3. Chromatografické podmienky uvedené v kapitole 3.4.3.

Príloha 6 Chromatografický záznam stanovenia MK vo vzorke DBS metódou GC-FID



Vzorka DBS. Píky: **1**, C14:0, **2**, C15:0, **3**, C16:0, **4**, *cis* C16:1 n10, **5**, *cis* C16:1 n7, **6**, C17:0, **7**, C18:0, **8**, *cis* C18:1 n9, **9**, *cis* C18:1 n7, **10**, all-*cis* C18:2 n6, **11**, C20:0, **12**, all-*cis* C18:3 n6, **13**, all-*cis* C18:3 n3, **14**, *cis* C20:1 n9, **15**, C21:0 (IS), **16**, C22:0, **17**, all-*cis* C20:3 n6, **18**, all-*cis* C20:4 n6, **19**, all-*cis* C20:5 n3, **20**, C24:0, **21**, *cis* C24:1 n9, **22**, all-*cis* C22:4 n6, **23**, all-*cis* C22:5 n6, **24**, all-*cis* C22:5 n3, **25**, all-*cis* C22:6 n3. Chromatografické podmienky uvedené v kapitole 3.4.3.

Príloha 7 Vplyv pohlavia na koncentrácie testovaných analytov

Koncentrácia AK ($\mu\text{mol/l}$)				Koncentrácia KK ($\mu\text{mol/l}$)				Koncentrácia MK ($\mu\text{mol/l}$)			
	Muži	Ženy	p		Muži	Ženy	p		Muži	Ženy	p
Arg	93,5	80,7	*	2-OG	11,3	9,9	-	C14:0	7,4	5,8	*
2-AB	21,7	20,9	-	PYR	227,8	213,8	-	C15:0	1,9	1,6	-
Ala	446,6	396,1	*	KIV	16,3	13,7	**	C16:0	187,4	155,7	**
Asn	89,8	80,7	-	KIC	32,3	25,7	**	C17:0	1,8	1,6	-
Cit	50,2	46,6	-	KMV	27,5	22,3	**	C18:0	88,5	75,9	*
Glu	181,0	175,8	-					<i>cis</i> C18:1 n9	115,1	83,6	****
Gln	514,4	442,0	***					<i>all-cis</i> C18:2 n6	110,6	94,6	*
Gly	369,3	330,8	-					<i>all-cis</i> C18:3 n6	0,9	0,7	*
His	107,5	103,6	-					<i>all-cis</i> C18:3 n3	1,8	1,8	-
Ile	139,6	123,8	-					C20:0	2,4	1,5	-
Leu	188,2	163,8	-					<i>cis</i> C20:1 n9	1,2	0,9	**
Lys	263,6	263,3	-					<i>all-cis</i> C20:3 n6	6,2	5,4	-
Met	31,4	30,9	-					<i>all-cis</i> C20:4 n6	36,8	33,5	*
Phe	87,9	88,4	-					<i>all-cis</i> C20:5 n3	2,3	2,3	-
Pro	246,6	200,5	**					C22:0	3,6	3,8	-
Ser	251,4	221,0	-					<i>all-cis</i> C22:6 n3	7,8	7,9	-
Thr	127,8	114,8	-					C24:0	5,3	5,5	-
Trp	61,0	60,6	-					<i>cis</i> C24:1 n9	7,4	8,0	-
Tyr	72,0	68,8	-								
Val	266,2	235,1	*								

Dáta sú prezentované ako priemerné hodnoty (n = 28 pre mužov, n = 32 pre ženy). Dáta s normálnym rozložením boli otestované nepárovým t-testom (za predpokladu rozdielnych SD bola aplikovaná Welchova korekcia). Dáta, ktoré neprešli testom normality boli analyzované neparametrickým Mann-Whitney testom. Všetky testy boli robené na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Štatisticky významné výsledky sú označené nasledovne: * $p < 0,050$; ** $p < 0,010$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$.

