

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Využití techniky suché kapky krve a metody HPLC-MS
v metabolomice**

Dizertační práce

Školitel:

prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

Autor:

Mgr. Michal Kopčil

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Utilization of dried blood spot technique and HPLC-MS method
in metabolomics**

Doctoral thesis

Supervisor:

prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

Author:

Mgr. Michal Kopčil

2023

Prohlašuji:

Práci s názvem „Využití techniky suché kapky krve a metody HPLC-MS v metabolomice“ jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 24. 2. 2023

Mgr. Michal Kopčil v.r.

Na tomto místě bych rád poděkoval prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D. za jeho vedení po celý čas mého doktorského studia, za jeho čas, odborné rady, připomínky a korektury odborných publikací a v neposlední řadě za pomoc při sepisování této závěrečné práce. Velký dík patří také celému týmu biochemie na Katedře biologických a biochemických věd FChT UPa. Děkuji také všem dobrovolným dárcům za poskytnutí vzorků krve. V neposlední řadě bych také rád poděkoval mému partnerovi, rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

ANOTACE

V této práci je popsáno několik metabolitů, které je možné využít jako biomarkery pro diagnostiku řady onemocnění. K jejich stanovení je vhodné využít kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí kvůli její citlivosti a selektivitě. Dále je popsána technika odběru tzv. suché kapky krve, která se vyznačuje neinvazivním způsobem odběru vzorku, jednoduchým transportem a skladováním. Experimentální část je zaměřena na vývoj separačních metod pro stanovení aminokyselin, alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích krve získaných technikou suché kapky. Součástí práce je také optimalizace a validace metod zahrnující aplikaci na reálné vzorky a diskuze získaných výsledků.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Alantoin, aminokyseliny, HPLC-MS, kyselina močová, metabolomika, suchá kapka krve.

ANOTATION

This thesis describes several metabolites that can be used as biomarkers for the diagnosis of a number of diseases. For their determination, it is advisable to use liquid chromatography with mass spectrometry detection due to its sensitivity and selectivity. Furthermore, the dried blood spot collection technique is described, which is characterized by a non-invasive method of sample collection, simple transport, and storage. The experimental part is focused on the development of separation methods for the determination of amino acids, allantoin, and uric acid in blood samples obtained by the dried spot technique. Optimization and validation of methods including their application to real samples and discussion of obtained results are also included.

KEYWORDS:

Allantoin, amino acids, HPLC-MS, uric acid, metabolomics, dried blood spot.

Obsah

Seznam obrázků, tabulek a grafů	9
Seznam zkratk	11
Úvod.....	12
1 Teoretická část	13
1.1 Metabolomika	13
1.2 Vybrané metabolity	14
1.2.1 Aminokyseliny	14
1.2.1.1 Stanovení aminokyselin.....	15
1.2.1.2 Poruchy metabolismu aminokyselin.....	17
1.2.2 Kyselina močová.....	20
1.2.2.1 Stanovení kyseliny močové.....	21
1.2.3 Alantoin	21
1.2.3.1 Stanovení alantoinu	22
1.3 Technika suché kapky krve.....	22
1.3.1 Odběr vzorků technikou suché kapky krve.....	24
1.3.1.1 Typy odběrových karet.....	24
1.3.2 Technika suché kapky krve a kvantitativní analýza	26
1.3.2.1 Homogenita	26
1.3.2.2 Hematokrit.....	26
1.3.2.3 Vnitřní standard	27
1.3.2.4 Extrakce analytů	28
1.3.2.5 Kalibrace a vzorky pro kontrolu kvality.....	29
1.4 Analytické metody v metabolomice.....	30
1.4.1 Kapalinová chromatografie.....	30
1.4.1.1 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi	30
1.4.1.2 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	31
1.4.2 Hmotnostní spektrometrie.....	32
2 Cíl práce.....	35
3 Experimentální část.....	36
3.1 Materiál	36

3.1.1	Vzorky	36
3.1.2	Chemikálie	36
3.1.3	Přístroje a pomůcky	38
3.1.4	Pracovní roztoky	39
3.2	Pracovní postup stanovení kyseliny močové a alantoinu.....	43
3.2.1	Příprava standardů	43
3.2.2	Zpracování vzorků	43
3.2.3	Test lýzy erytrocytů	43
3.2.4	Chromatografická analýza	44
3.3	Pracovní postup stanovení aminokyselin.....	44
3.3.1	Příprava standardů	44
3.3.2	Zpracování vzorků	45
3.3.3	Chromatografická analýza	45
3.4	Pracovní postup stanovení fenylalaninu a tyrosinu.....	46
3.4.1	Příprava standardů	46
3.4.2	Zpracování vzorků	47
3.4.3	Chromatografická analýza	47
3.5	Validace a analytické parametry metod	48
3.6	Statistická analýza dat	48
4	Výsledky a diskuze	49
4.1	Příprava vzorků	50
4.2	Stanovení kyseliny močové a alantoinu v krvi získané technikou suché kapky	52
4.2.1	Optimalizace metody LC-MS/MS	53
4.2.2	Validace metody stanovení kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích suché kapky krve	55
4.2.3	Stanovení koncentrace kyseliny močové a alantoinu v krvi získané technikou suché kapky u dobrovolných dárců	60
4.3	Stanovení aminokyselin v krvi získané technikou suché kapky	61
4.3.1	Optimalizace metody LC-MS/MS	61
4.3.2	Validace metody stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve.....	66
4.3.3	Stanovení koncentrace aminokyselin v krvi získané technikou suché kapky u dobrovolných dárců	69

4.4	Stanovení Fenylalaninu a Tyrosinu.....	72
4.4.1	Optimalizace metody LC-MS/MS	72
4.4.2	Validace metody stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve	74
4.4.3	Stanovení koncentrace fenylalaninu a tyrosinu v krvi získané technikou suché kapky u dobrovolných dárců.....	77
5	Závěr	80
6	Zdroje.....	81
7	Přílohy.....	93

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázky:

Obrázek 1 „Omická kaskáda“	13
Obrázek 2 Strukturní vzorce proteinogenních aminokyselin	15
Obrázek 3 Přehled metabolismu fenylalaninu a tyrosinu.....	18
Obrázek 4 Strukturní vzorec kyseliny močové	20
Obrázek 5 Strukturní vzorec alantoinu.....	22
Obrázek 6 Pět možných technik přidání vnitřního standardu ke vzorku suché kapky krve....	28
Obrázek 7 Princip ionizace elektrosprejem	33
Obrázek 8 Módy používané ve spojení s trojitým kvadrupólem.....	34
Obrázek 9 Chromatografický záznam stanovení alantoinu a kyseliny močové metodou HPLC-MS/MS.....	55
Obrázek 10 Chromatografický záznam stanovení aminokyselin metodou HPLC-MS/MS....	66
Obrázek 11 Chromatografický záznam stanovení fenylalaninu a tyrosinu metodou HPLC-MS/MS.....	74

Tabulky:

Tabulka 1 Přehled 13 potenciálně léčitelných aminoacidopatií	17
Tabulka 2 Souhrnná tabulka výhod a nevýhod použití techniky suché kapky krve	23
Tabulka 3 Příklady komerčně dostupných karet pro odběr vzorku technikou suché kapky ...	25
Tabulka 4 Navážky aminokyselin pro přípravu zásobních roztoků	40
Tabulka 5 Optimalizované přechody MRM pro kyselinu močovou a alantoin	53
Tabulka 6 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací kyseliny močové a alantoinu naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaženo ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %).....	58
Tabulka 7 Stabilita alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve skladovaných při laboratorní teplotě.....	59
Tabulka 8 Medián koncentrace alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích plné krve a suché kapky krve.....	60
Tabulka 9 Optimalizované přechody MRM pro stanovované aminokyseliny	62
Tabulka 10 Účinky matrice pro sledované aminokyseliny	63
Tabulka 11 Medián koncentrace aminokyselin ve vzorcích plné krve a suché kapky krve....	69

Tabulka 12 Přehled korelačních koeficientů závislosti koncentrace aminokyselin ve vzorcích DBS na jejich koncentraci v kapalně krvi.	71
Tabulka 13 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací fenylalaninu a tyrosinu naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaženo ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %).....	76
Tabulka 14 Medián koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích plné krve a suché kapky krve	77
Tabulka 15 Přehled korelačních koeficientů závislosti koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve na jejich koncentraci v kapalně krvi.	78
Tabulka 16 Přehled korelačních koeficientů závislosti koncentrace změřené metodou využívající stacionární fázi HILIC na koncentraci změřené metodou využívající reverzní stacionární fázi.....	79

Grafy:

Graf 1 Závislost plochy píků na síle elučního činidla.....	56
Graf 2 Vliv doby sonikace na účinnost extrakce kyseliny močové a alantoinu ze vzorku DBS	57
Graf 3 Závislost koncentrace kyseliny močové a alantoinu na objemu krve aplikované na odběrovou kartu	57
Graf 4 Závislost retenčních časů aminokyselin na iontové síle a pH mobilní fáze	65
Graf 5 Závislost koncentrace fenylalaninu a tyrosinu na objemu krve aplikovaném na odběrovou kartu	75

Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
ALA	Alantoin
AMK	Aminokyselina
BEH	Ethylenový hybridní můstek
DBS	Suchá kapka krve
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EMA	Evropská léková agentura
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
HCT	Hematokrit
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEM	Vrozené poruchy metabolismu
IMS	Spektrometrie pohyblivosti iontů
IQR	Interkvartilové rozpětí
IS	Vnitřní standard
KM	Kyselina močová
MRM	Monitorování vybraných reakcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
NP	Normální fáze
OPA	<i>orto</i> -Ftalaldehyd
PFP	Perfluorovaná fenylová fáze
PKU	Fenylketonurie
QC	Kontrola kvality
QqQ	Trojité kvadrupól
TYR	Tyrosinémie

Úvod

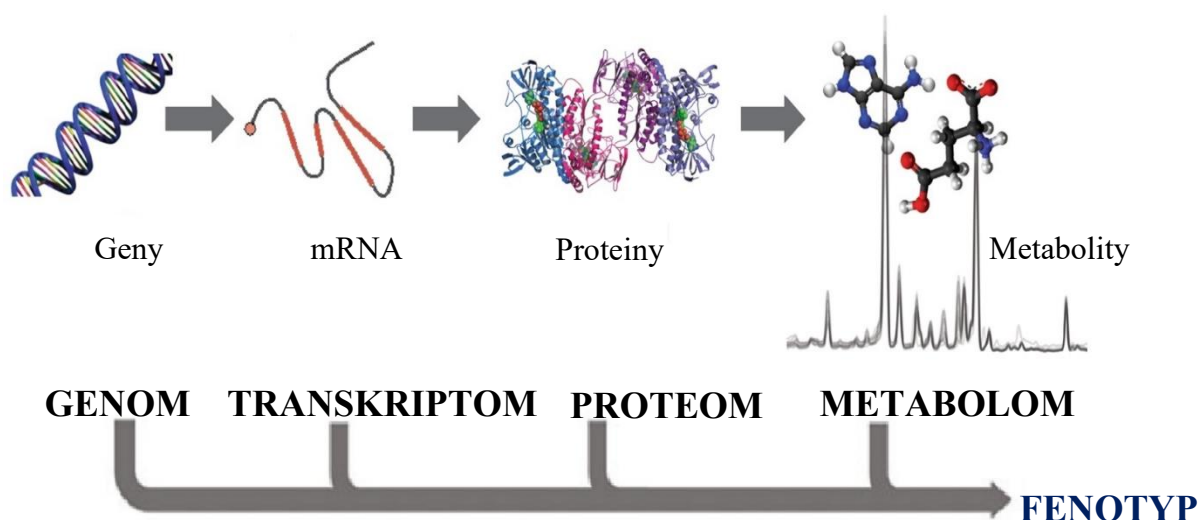
V současné době roste zájem o technologie, které jsou schopné profilovat biologické systémy. Jednou z těchto technologií je metabolomika, která se zabývá analýzou relativně malých molekul v biologických systémech. Hlavním cílem metabolomiky je porozumění metabolických drah s následným využitím pro predikci vzniku onemocnění, a analýza biomarkerů, které lze použít k diagnostice onemocnění nebo monitorování terapie. Pro metabolomické analýzy jsou neustále vyvíjeny nové metody, které jsou schopny stanovit až několik stovek metabolitů současně. Dosáhnout se toho dá v případě použití kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Právě tato kombinace umožňuje dostatečně selektivní, citlivé a poměrně rychlé analýzy v metabolomice.

Velký důraz je také kladen na odběr vzorků pro metabolomické studie. Vzhledem k potřebě velkých souborů vzorků pro jednotlivé studie je snahou zabezpečit co nejméně invazivní odběr vzorku, jeho jednoduchý transport do laboratoře a v neposlední řadě stabilitu analytů a s tím i spojené uchovávání vzorků v biobankách. Tyto požadavky splňuje technika suché kapky krve, která se běžně využívá při novorozeneckém screeningu vrozených metabolických poruch novorozenců. Tato alternativní technika odběru vzorku by mohla mít potenciál být implementována i v metabolomických studiích, či při monitorování účinku nasazené léčby a nahradit tak klasický odběr vzorku krve.

1 Teoretická část

1.1 Metabolomika

V poslední době narůstá počet „omických“ technologií, které jsou schopné profilovat biologické systémy. Jedním z těchto „omických“ přístupů je metabolomika, která se zabývá identifikací a kvantifikací metabolitů (<1500 Da) v biologickém systému [1]. Metabolomika je koncovým bodem tzv. „omické kaskády“ (Obrázek 1), a je tedy nejbližší fenotypu. To znamená, že změna koncentrace jednoho nebo více metabolitů se může projevit změnou fenotypu [2].



Obrázek 1 „Omic kaskáda“ (upraveno dle [3])

Současné metabolomické technologie jsou schopné přesné analýzy stovek až tisíců metabolitů. Díky tomu metabolomika poskytuje podrobnou charakterizaci metabolických fenotypů, včetně metabolických poruch, které jsou základem onemocnění. Dále jsou tyto technologie schopné objevit nové biomarkery, které lze použít k diagnostice onemocnění nebo k monitorování terapie [4]. Z pohledu metabolického inženýrství mohou získaná data přispět ke zvýšení produkce terapeutik a biopaliv buňkami, lepším výnosům plodin a strategiím pro obnovitelnou energii [2].

Metabolomiku můžeme rozdělit do dvou velkých skupin, metabolické profilování a metabolický fingerprinting neboli tzv. otisk prstu.

Metabolické profilování

Tato skupina je také označována jako cílená metabolomika. Zabývá se analýzou skupin metabolitů souvisejících s určitou metabolickou dráhou nebo třídou sloučenin. Ve většině případů je metabolické profilování spíše přístupem založeným na hypotézách než přístupem vytvářející hypotézu. Na základě kladených otázek jsou vybrány metabolity, pro jejichž stanovení jsou následně vyvinuty specifické a převážně kvantitativní metody. Získaná data pak slouží k hodnocení adaptace organismu po expozici xenobiotiky nebo po změně životního prostředí. Data mohou být využita také k diagnostice onemocnění, případně sestavení databází, které umožňují lepší porozumění biologickým systémům [5, 6].

Metabolický fingerprinting

Můžeme jej označit jako necílenou metabolomiku. Využívá přístupy, které se snaží odhalit co nejvíce odlišných rysů v jedné analýze a v kombinaci s vícerozměrnou statistikou identifikovat biomarkery, které odlišují nemocné od kontrolní skupiny. Cílem tedy není identifikovat každý pozorovaný metabolit, ale porovnat vzorce metabolitů, tzv. otisky prstů, které se mění vlivem onemocnění, expozicí toxinům nebo genetických změn [5, 6].

1.2 Vybrané metabolity

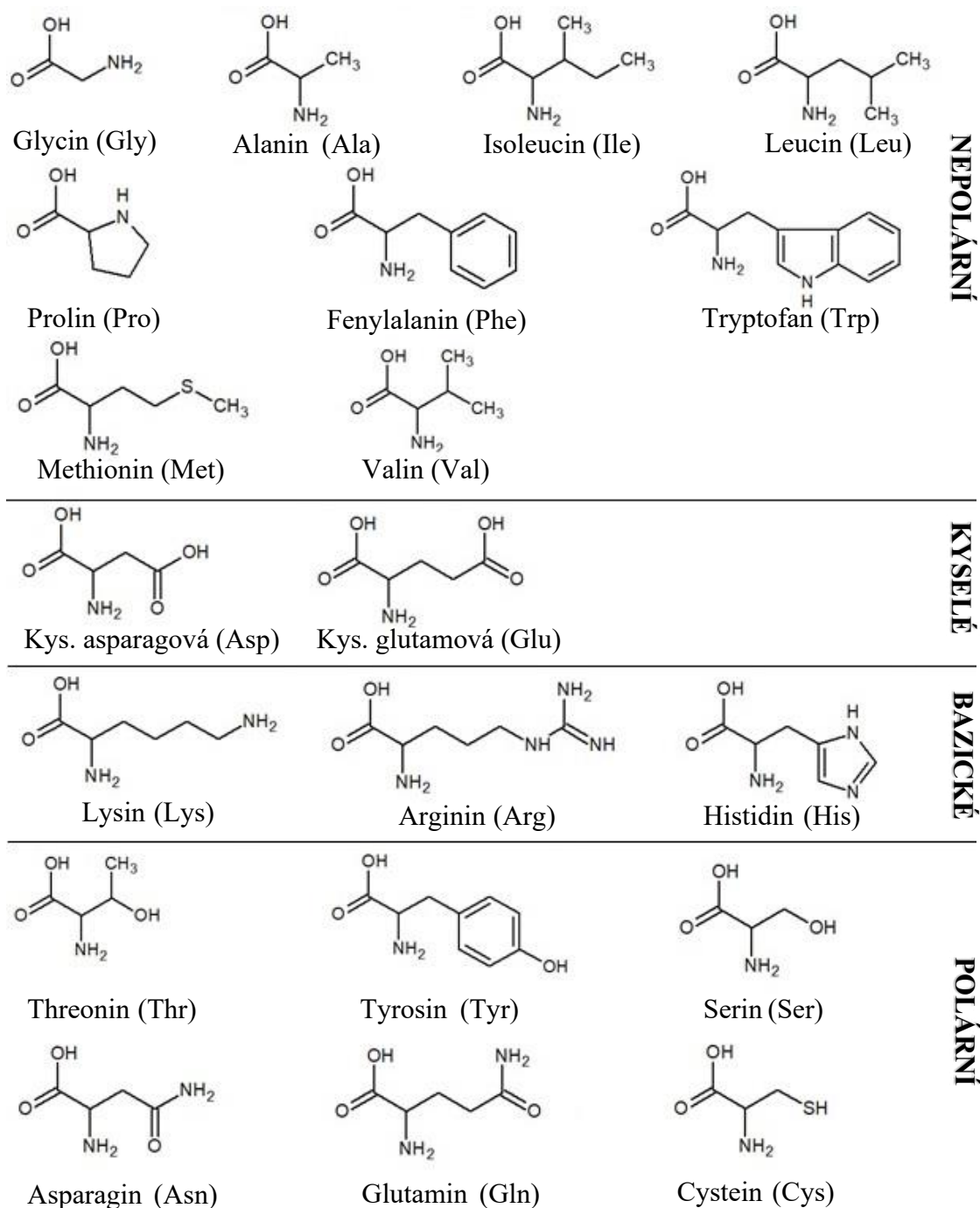
1.2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) jsou organické sloučeniny, které tvoří peptidy a proteiny. Každá AMK je tvořena aminoskupinou, karboxylovou skupinou, atomem vodíku a postranním řetězcem, který je napojen na α -uhlík. Výjimkou je prolin, ten jako jediný z 20 proteinogenních AMK má cyklickou strukturu a obsahuje sekundární aminoskupinu. AMK jsou klasifikovány podle chemických vlastností postranního řetězce R a podle rozpustnosti je můžeme rozdělit do čtyř skupin: nepolární, kyselé, bazické a polární (

Obrázek 2). Kromě glycinu obsahují AMK alespoň jeden asymetrický uhlík, tím pádem mohou existovat v jedné ze dvou enantiomerních forem L- nebo D-aminokyselin [7].

V metabolismu mají AMK řadu funkcí. Jsou strukturními jednotkami proteinů a substráty biologicky významných látek. Kyselina glutamová, asparagová, γ -aminomáselná a taurin působí jako neurotransmitery, kdy regulují synaptický přenos a paměť. Na modulaci syntézy proteinů a inhibici katabolismu proteinů se podílejí AMK s rozvětveným řetězcem, mezi něž

patří leucin, isoleucin a valin. Fenylalanin a tyrosin se podílejí na biosyntéze biogenních aminů a katecholaminů [8].



Obrázek 2 Strukturní vzorce proteinogenních aminokyselin

1.2.1.1 Stanovení aminokyselin

Pro stanovení AMK existují dva běžně využívané přístupy. Buď jsou AMK analyzovány v jejich přirozené formě, nebo se provádí analýza jejich derivátů. Zatímco se analýza AMK

tradičně provádí plynovou chromatografií (GC) s derivatizací trimethylsilanem nebo kapalinovou chromatografií (HPLC) s postkolonovou derivatizací ninhydrinem nebo předkolonovou derivatizací *orto*-ftalaldehydem (OPA), mnoho dnešních analytických platforem je založeno na kombinaci chromatografie s hmotnostní spektrometrií (MS) [9].

HPLC-MS technika byla široce přijata k separaci AMK na kolonách s reverzní stacionární fází. AMK jsou vysoce polární analyty, což má za následek špatnou retenci na kolonách s reverzní fází. Navíc jsou jejich molekulové hmotnosti ve stejném rozmezí jako nespecifické signály eluentů nebo matrice, proto se provádí derivatizace AMK. K derivatizaci existuje celá řada činidel. Mezi využívaná činidla jak pro fluorescenční detekci, tak pro HPLC-MS patří například OPA nebo DANSYLchlorid. Pro MS detekci se pak hojně využívá např. dibenzylethoxymethylenmalonát (DEEMM), benzylethylethoxymethylenmalonát (EBEMM), 1-brombutan, diisopropylfosfit a 2,4-dinitrofluorobenzen [8, 10, 11]. Derivatizace je také využívána při rutinním stanovení AMK ze suchých kapek krve při novorozeneckém screeningu, kdy se AMK převádí na příslušné butylestery [12].

Pro stanovení AMK bez derivatizace se využívá nejčastěji hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC, z angl. hydrophilic interaction liquid chromatography) ve spojení s MS. Retenční chování AMK při tomto stanovení je velmi závislé na volbě pufru a na pH mobilní fáze. Nejčastěji používaným pufrem je mravenčan amonný v koncentracích 5-30 mmol/l v rozmezí pH od 3 do 6 v závislosti na zvolené analytické koloně. Pro HILIC separace AMK se nejvíce využívají kolony s amidovou nebo C18 hybridní stacionární fází (BEH, z angl. ethylene bridged hybrid). Výhodou použití HILIC metody je stanovení AMK v jejich nativní formě, na druhou stranu zde dochází ke snížení citlivosti detekce v důsledku snížení ionizace vysokou koncentrací pufru [13–15].

Separace enantiomerů a konstitučních izomerů AMK současnými MS metodami je stále problematická, pokud není současně použita i specifická chromatografie. Možným řešením je použití spektrometrie pohyblivosti iontů s hmotnostní spektrometrií (IMS-MS, z angl. ion-mobility spectrometry-mass spectrometry). Izomery mají stejnou hmotnost, téměř identický retenční čas a podléhají stejné fragmentaci v tradičních HPLC-MS/MS metodách. V IMS jsou však analyty separovány na základě jejich rozdílné pohyblivosti, což přidá další dimenzi při separaci [15]. Využit se toho může např. k separaci leucinu a isoleucinu [16].

1.2.1.2 Poruchy metabolismu aminokyselin

Vrozené poruchy metabolismu (IEM, z angl. inborn errors of metabolism) je skupina dědičných metabolický poruch, které jsou způsobeny mutacemi specifických genů, což má za následek zhoršení produkce proteinů a enzymů a narušení tak řady metabolických drah. IEM byly rozděleny do různých kategorií. Jedna z nich, která je charakterizovaná poruchami AMK, se nazývá aminoacidopatie. Aminoacidopatie lze detekovat genetickými testy na úrovni mutace v odpovídajících genech nebo sledováním změn v hladinách AMK metodami HPLC-MS/MS. Mezi aminoacidopatie, které jsou potenciálně léčitelné, pokud jsou diagnostikovány v brzké fázi života, je řazeno 13 poruch. Jejich přehled je uveden v Tabulka 1. U těchto poruch se objevují různé příznaky, jako jsou hyperaktivita, mentální postižení, zpoždění vývoje, zvracení a záchvaty. Pro snížení úmrtnosti a minimalizaci morbidity se provádí včasná diagnostika IEM prostřednictvím novorozeneckého screeningu [12, 17].

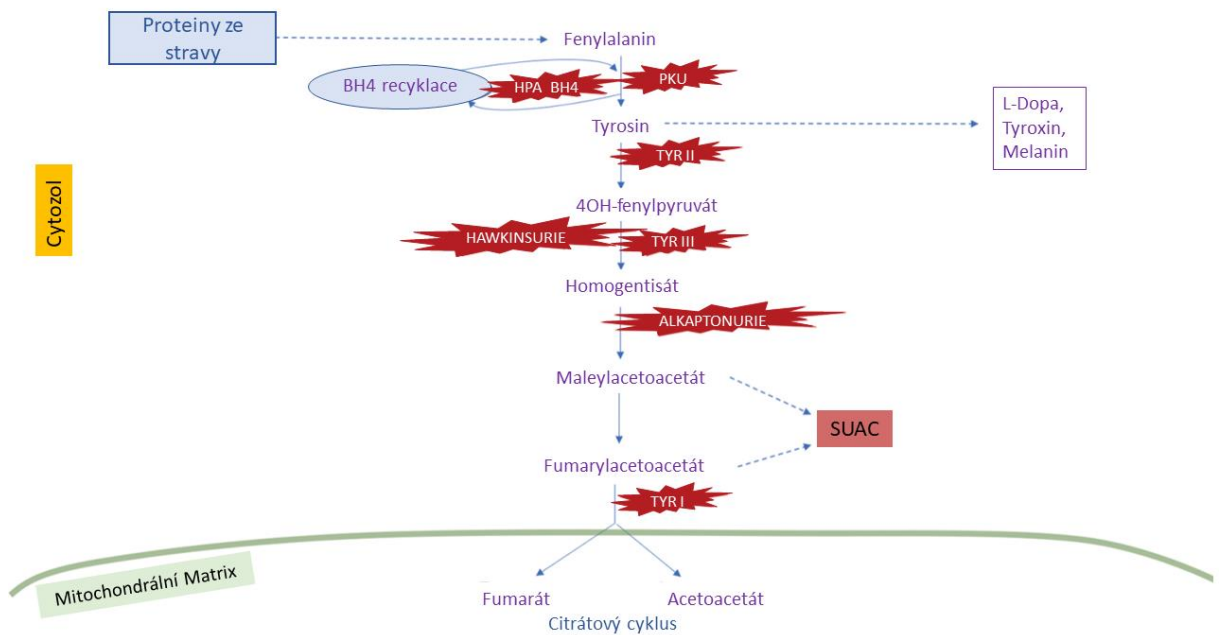
Tabulka 1 Přehled 13 potenciálně léčitelných aminoacidopatií

Aminoacidopatie	OMIM	Světová prevalence
Fenylketonurie	261600	1:10000-25000
Nemoc javorového sirupu	248600	1:185000
Homocystinurie	236250	1:150000
Tyrosinémie typu II	276600	1:250000
Citrulinémie typu I	215700	1:200000
Citrulinémie typu II	605814	1:230000
Argininémie	207800	1:3500000
Deficit karbamoylfosfátsynthetasy I	237300	1:800000
Argininjantarová acidurie	207900	1:70000
Deficit <i>N</i> -acetylglutamátsynthasy	237310	Neznámá, velmi vzácně
HHH syndrom	238970	Více než 100 jedinců
Deficit ornithintranskarbamylasy	311250	1:77000
Deficit pyruvátkarboxylasy	312170	Neznámá, velmi vzácně

OMIM, Databáze genů a genetických onemocnění (z angl. Online Mendelian Inheritance in Man); HHH, hyperornithinémie-hyperamonémie-homocitrulinurie [18].

Fenylketonurie

Fenylalanin je esenciální AMK a tyrosin semiesenciální. U lidí je tyrosin syntetizován z fenylalaninu za účasti enzymu fenylalaninhydroxylasy, který katalyzuje zavedení hydroxylové skupiny na aromatické jádro fenylalaninu. Tyrosin pak může být dále katabolizován v několika krocích za vzniku acetoacetátu a fumarátu jako konečných produktů. Stručný popis metabolismu fenylalaninu a tyrosinu je znázorněn na Obrázku 3 [19].



Obrázek 3 Přehled metabolismu fenylalaninu a tyrosinu. Deficience enzymů je znázorněna červenými hvězdami. Zelená čára představuje mitochondriální membránu. SUAC, sukcinylaceton; BH4 tetrahydrobiopterin; HPA, hyperfenylalaninémie; PKU, fenylketonurie; TYR, tyrosinémie (upraveno dle [19]).

Poruchou genu kódující enzym fenylalaninhydroxylasu vzniká nejčastější autozomálně recesivní porucha metabolismu zvaná fenylketonurie (PKU). Ve většině případů je PKU způsobena právě poruchou genu, nicméně několik málo procent případů je způsobeno nedostatečností syntézy nebo recyklace biopterinového kofaktoru. U neléčených jedinců se v důsledku zvýšených hladin fenylalaninu ve tkáních rozvinou neurologická onemocnění, včetně opožděného vývoje, záchvatů, mentálního postižení a psychiatrických poruch. Vyskytnout se můžou také ekzémy a zesvětlené vlasy a kůže. Incidence PKU se liší v závislosti na populaci, kdy nejvyšší incidence je v turecké populaci 1:2600 a populaci severní Evropy 1:10000 [19].

Klasická PKU je definována jako zvýšená hladina fenylalaninu v plazmě nad 1200 $\mu\text{mol/l}$, nicméně i mnohem nižší koncentrace fenylalaninu jsou spojovány s neoptimálními kognitivními a neurologickými potížemi. Současné směrnice pro léčbu doporučují udržovat hladiny fenylalaninu v plazmě v rozmezí 120-360 $\mu\text{mol/l}$. Základem léčby je řízení koncentrace fenylalaninu v krvi celoživotní dietou s omezením bílkovin a suplementací AMK. Účinek léčby je sledován pravidelnou analýzou fenylalaninu a tyrosinu. U PKU se tyrosin stává neesenciální AMK a je ho nutné podávat jako nezbytný doplněk stravy. Udržování a s tím i spojené monitorování hladin tyrosinu je důležité, jelikož tyrosin slouží jako prekurzor pro syntézu katecholaminů, hormonů štítné žlázy a melaninu [20, 21]. Novějším způsobem léčby je například injekční podání enzymu fenylalaninamoniumlyasy, která může normalizovat hladiny fenylalaninu v krvi. Experimentální léčba pak zahrnuje genovou terapii nebo transplantaci hepatocytů [19].

Tyrosinémie typu I a II

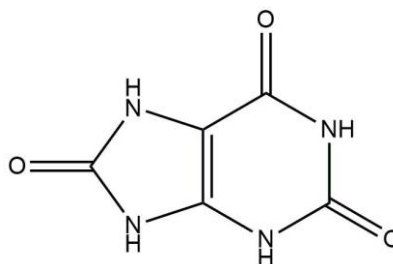
Tyrosinémie (TYR) typu I je způsobena nedostatkem enzymu fumarylacetoacetáthydrolysy, která katalyzuje poslední krok odbourávání tyrosinu. Defekt enzymu znemožňuje enzymatické odbourávání fumarylacetoacetátu, který je tím pádem dekarboxylován na sukcinylaceton. Akumulace sukcinylacetonu má toxický účinek na hepatocyty a buňky proximálních ledvinových tubulů a způsobuje inhibici syntézy hemu a glukoneogeneze. Klinický průběh je život ohrožující a obvykle charakterizován akutním jaterním selháním nebo chronickou dysfunkcí jater. Léčba probíhá dietou se sníženým množstvím fenylalaninu a tyrosinu v potravě. Léčbou je zlepšena funkce jater, nicméně ve většině případů ale nezabraňuje rozvoji hepatocelulárního karcinomu, či cirhózy jater již v dětství [22].

Tyrosinémie typu II, také známa jako Richner-Hanhartův syndrom, je autozomálně recesivní porucha metabolismu, při které je narušena funkce enzymu tyrosinaminotransferasy. Výsledkem je hromadění tyrosinu v krvi, moči a cerebrospinální tekutině. U neléčené TYR typu II jsou hladiny tyrosinu v plazmě vyšší než 1200 $\mu\text{mol/l}$. Klinickým projevem je usazování krystalů tyrosinu v epiteliálních buňkách rohovky, což vede k fotofobii a nadměrnému slzení. Dále se vyvíjejí kožní abnormality ve formě puchýřů a hyperkeratotických papul, hlavně v tlakových oblastech, jako jsou dlaně a chodidla. Projevují se také neurologické potíže a mentální postižení. K symptomatické léčbě se využívá dietní omezení s nízkým obsahem

tyrosinu a fenylalaninu v potravě a doporučuje se udržení hladin tyrosinu v plazmě v rozmezí 200-500 $\mu\text{mol/l}$ při zachování adekvátních hladin fenylalaninu [19, 23].

1.2.2 Kyselina močová

Kyselina močová (KM) neboli 2,6,8-trioxopurin (Obrázek 4) je heterocyklická sloučenina, která je konečným produktem odbourávání purinů u lidí. Jedná se o slabou kyselinu vyskytující se v extracelulární tekutině jako monosodná sůl. KM vzniká oxidací oxopurinů za účasti xanthinoxidasy.



Obrázek 4 Strukturální vzorec kyseliny močové

U většiny savců je KM, reakcí katalyzovanou urikasou, oxidována na alantoin (ALA). Výjimkou jsou lidé a vyšší primáti, u nichž je *nonsense* mutacemi blokována exprese genu pro urikasu. Zajímavostí je, že u vyšších primátů mutace urikasy paralelizuje se ztrátou schopnosti syntetizovat kyselinu askorbovou. Je možné, že u vyšších primátů tak KM svými antioxidačními vlastnostmi částečně nahrazuje kyselinu askorbovou. KM je u člověka hlavním antioxidantem plazmy a považuje se za významný faktor prodloužení délky života a snižování rizika vzniku rakoviny spojené s věkem [24]. Řada *in vitro* studií prokázala jednoznačnou antioxidační schopnost KM. Tato sloučenina chrání membrány erytrocytů před lipoperoxidací a zabraňuje tvorbě oxo-hemových oxidantů, které vznikají reakcí hemoglobinu s peroxidy. Je také schopna velmi účinně zhasět singletový kyslík nebo vychytávat hydroxylové radikály. Dále bylo zjištěno, že KM je reaktivními sloučeninami kyslíku (ROS) oxidována na ALA [25].

Hladina KM v krvi se odvíjí od její biosyntézy, vylučování ledvinami a příjmu purinů v potravě. Referenční hodnoty KM v plazmě se pohybují v rozmezí 200-400 $\mu\text{mol/l}$ [26]. Chronická hyperurikémie je spojena s řadou nemocí, jakou jsou dna, hypertenze, onemocnění ledvin a kardiovaskulárního systému [27, 28].

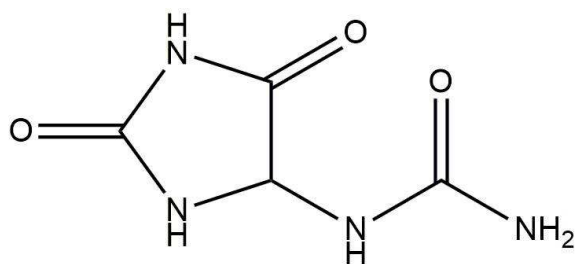
1.2.2.1 Stanovení kyseliny močové

Pro stanovení hladiny KM v séru se v biochemických laboratořích používá metoda s urikasou. Přednost se dává séru před plazmou, jelikož běžně používaná antikoagulancia (EDTA, citrát, oxalát) inhibují urikasu. Při tomto stanovením je KM oxidována za katalýzy urikasou na ALA, měří se buď pokles absorbance KM při 293 nm, nebo se vzniklý peroxid vodíku využívá k oxidační kopulaci mezi 4-aminoantipyrinem a derivátem fenolu za katalýzy peroxidasou. Při této reakci interferují látky s redukčními vlastnostmi, jako jsou glukosa, bilirubin a kyselina askorbová, které jsou peroxidem oxidovány. Interference bilirubinu se řeší přidavkem hexakvanoželeznatanu, který slouží jako intermediátor pro přenos elektronů v oxidační kopulaci, namísto 4-aminoantipyrinu oxiduje derivát fenolu. Vzniklý meziproduct je méně náchylný k redukci bilirubinem. Interference kyseliny askorbové může být potlačena přidavkem askorbát oxidasy. Ta katalyzuje její oxidaci na kyselinu dehydroaskorbovou. Správnějšími a citlivějšími metodami pro stanovení KM jsou kapalinová, případně plynová chromatografie [29].

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a isotopovým zředěním byla zvolena Národním institutem pro standardy a technologie (NIST) jako definitivní metoda pro stanovení KM [30]. Nicméně, v poslední době se upřednostňuje kapalinová chromatografie. Je to díky její vysoké účinnosti separace, dobré selektivitě, vysoké citlivosti detekce, širokému lineárnímu rozsahu a automatizaci. Navíc není nutná derivatizace KM. Detekce KM není omezena pouze na vzorky séra a moči, kde se vyskytuje ve vyšších koncentracích, ale může být detekována i ve vzorcích slin, buněk či nehtů. Separace se provádí převážně na kolonách s reverzní stacionární fází. K detekci jsou využívány různé typy detektorů, zahrnující elektrochemický detektor, UV detektor [31, 32] nebo hmotnostní spektrometr (MS) [33–36].

1.2.3 Alantoin

Alantoin (Obrázek 5), také glyoxyldiureid nebo 5-ureidohydantoin, je produktem oxidace KM a u většiny savců konečným produktem metabolismu purinů. V lidském těle může vznikat neenzymatickou oxidací KM působením ROS. To je důvod, proč je ALA považován za ukazatele oxidačního stresu. Má i terapeutické účinky, stimuluje růst zdravé tkáně, proto se hojně využívá v kosmetických produktech pro regeneraci pokožky a ke zklidnění kožního podráždění [37].



Obrázek 5 Strukturní vzorec alantoinu

1.2.3.1 Stanovení alantoinu

Analýza ALA je poměrně obtížná, a to hlavně kvůli jeho nízkým koncentracím v biologických vzorcích, nepřítomnosti chromoforu v molekule a jeho vysoké polaritě. Hladiny ALA mohou být stanoveny HPLC s UV detekcí po převedení ALA na kyselinu glyoxylovou a následné derivatizaci s dinitrofenylhydrazinem [38]. Další možností je metoda GC-MS. Při tomto stanovení je nutná derivatizace, při které je ALA v bezvodém prostředí derivatizován směsí *N*-methyl-*N*-*terc*-butyldimethylsilyltrifluoroacetamidu (MTBSTFA) a pyridinu, za vzniku methylsilylderivátu. Nicméně velmi časově náročná derivatizace ALA je hlavním limitujícím faktorem pro použití této metody [39].

Alternativou může být HPLC-MS. U této metody je snadná příprava vzorku bez nutnosti derivatizace. Separace se může provádět na kolonách s reverzní fází (C18, alkyl) [40–42], ale vzhledem k vysoké polaritě ALA je vhodnější použít hydrofilní interakční chromatografii. I přesto je stanovení ALA stále náročné a v klinických laboratořích se běžně neprovádí [43, 44].

1.3 Technika suché kapky krve

Metabolom jakéhokoliv daného biologického systému obsahuje rozmanitou škálu nízkomolekulárních metabolitů, jejichž zjištěné množství může být ovlivněno načasováním a metodou odběru vzorku, nebo také skladováním a manipulací. V metabolomickém výzkumu je nutné zohlednit preanalytické procesy a biobankování. Špatné zacházení se vzorky před jejich analýzou může mít negativní účinky na robustnost a reprodukovatelnost získaných dat [45].

Jednou z možných technik odběru vzorku pro metabolomické studie je metoda suché kapky krve (DBS, z angl. dried blood spot). Ta se stala populární v roce 1963, kdy ji Robert Guthrie použil pro odběr vzorku při novorozeneckém screeningu fenylketonurie. Technika DBS spočívá v nanášení několika kapek kapilární krve, získaných píchnutím do prstu nebo paty, na filtrační papír ve formátu karty. Vzorky se nechají jednoduše uschnout bez jakékoliv další úpravy a jsou podrobeny analýze. V současné době se DBS technika využívá při stanovení hladin léků, kontaminantů z životního prostředí, metabolitů, bílkovin, protilátek, DNA a RNA v různých biologických vzorcích. Je standardní technikou odběru vzorku plné krve při novorozeneckém screeningu různých metabolických onemocnění na celém světě [46, 47].

Z chemického hlediska jsou analyty adsorbovány na pevnou matici na bázi celulosy. Adsorpce a pevná povaha DBS činí analyty obvykle méně reaktivní než v kapalně krvi. Dobrá stabilita analytů po dobu až několika měsíců je právě jedna z mnoha výhod DBS techniky (Tabulka 2). Navíc vysušená matrice vzorků inaktivuje většinu patogenů, čímž se snižuje biologické riziko spojené s transportem vzorku. Nicméně některé patogeny, jako je virus hepatitidy typu B, virus dengue nebo streptokoky skupiny A, zůstávají v zaschlé krvi aktivní i po dobu několika dní [48, 49].

Tabulka 2 Souhrnná tabulka výhod a nevýhod použití techniky suché kapky krve

Výhody	Nevýhody
neinvasivní odběr	netradiční matrice vzorku
malý objem vzorku	malý objem vzorku
jednoduchý odběr, transport a uskladnění	chromatografické efekty
snížení rizika infekce	vliv hematokritu
zvýšení stability analytů	rozdílná stabilita analytů
nízké náklady	různá účinnost extrakce analytů
kompatibilní s většinou bioanalytických metod	citlivost na podmínky prostředí
dobrá přesnost a reprodukovatelnost	

Největší výhodou je méně invazivní způsob odběru vzorku, který je přijatelný zejména u novorozenců a malých dětí. Malý vpich do prstu speciální jehlou je téměř bezbolestný a bez speciálního proškolení jej můžou pacienti (v případě dětí jejich rodiče) provádět sami. Na druhou stranu je objem odebrané krve poměrně nízký (obvykle několik desítek mikrolitrů), zatímco standardním odběrem krve do zkumavek získáváme objemy v jednotkách mililitrů. DBS vzorky jsou proto obzvláště vhodné v případech, kdy je množství odebrané krve omezené. Takovým případem může být např. preklinický vývoj léčiv, kdy se sleduje farmakokinetika léčiv na myších. Kromě jednoduchého odběru a stability analytů je také snadnější transport a skladování karet s DBS. Vzorky mohou být poslány do laboratoře poštou bez nutnosti jejich zamrazení. Vyšší vlhkost a teplota v poštovních schránkách mohou způsobit znehodnocení vzorku [47].

1.3.1 Odběr vzorků technikou suché kapky

U lidí lze kapilární krev odebírat na různých místech těla, nejčastěji se však jedná o patu a konečky prstů. Před odběrem se místo vpichu očistí 70% alkoholem a kůže se napíchne speciální sterilní jehlou. První kapka krve se odsaje gázou, protože může obsahovat intersticiální tekutinu, další kapky jsou pak aplikovány na odběrovou kartu do předem určených kruhů. Takto získané DBS vzorky se nechají zaschnout v horizontální poloze při laboratorní teplotě po dobu 2-3 hodin. Při sušení by nemělo dojít ke kontaktu s jinými povrchy a vystavení vzorku přímému slunečnímu záření. DBS vzorky mohou být také získány pipetováním plné krve obsahující antikoagulant na odběrovou kartu. Pipetuje se předem definovaný objem s pipetou umístěnou tak, aniž by se dotýkala karty. Tento postup se využívá hlavně při přípravě standardů pro sestavení kalibrační křivky a vzorků pro určení kontroly kvality dané metody [50].

1.3.1.1 Typy odběrových karet

V současné době je na trhu několik komerčně dostupných odběrových karet pro techniku DBS. Můžeme je rozdělit do dvou kategorií podle toho, z čeho byly vyrobeny, karty na bázi celulosy (chemicky ošetřené i neošetřené) a necelulosové karty. Pro novorozenecký screening jsou komerčně dostupné tři typy celulosových karet s různou kvalitou. Jedná se o odběrové karty Whatman 903, PerkinElmer 226 a Munktell TFN. Nicméně pouze první dvě zmíněné jsou

schválené americkou agenturou pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Odběrové karty mohou být impregnovány různými činidly (Tabulka 3) pro potřeby lýzy buněk, inaktivace patogenů, denaturace enzymů a dalších proteinů. Tyto karty jsou navrženy převážně pro analýzu nukleových kyselin tak, aby usnadnily jejich izolaci a zvýšily stabilitu analytů ve vzorku [51].

Pro odběr krve je možné využít i materiály, které nejsou vyrobeny z celulosy. Ovšem pouze firma Agilent Technologies vyvinula odběrovou kartu pro techniku DBS, která je podobná té z celulosy a je vhodná pro bioanalytické aplikace. Další materiály nejsou speciálně navrženy pro odběr DBS a využívají se jen okrajově. Jedná se například o odběrové karty ze skleněných mikrovláken nebo polyuretanové membrány [51].

Tabulka 3 Příklady komerčně dostupných karet pro odběr vzorku technikou suché kapky

Značka	Vlastnosti
Whatman 903	celuloseový papír žádná impregnace stabilizátory
Whatman FTA DMPK-A	celuloseový papír impregnovaný: SDS, tris(hydroxymethyl)aminomethan stabilizace DNA při malých objemech krve lýza buněk a denaturace proteinů
Whatman FTA DMPK-B	celuloseový papír impregnovaný chaotropními látkami: guanidiniumthiokyanát lýza buněk a denaturace proteinů
Whatman FTA DMPK-C	celuloseový papír žádná impregnace stabilizátory, vhodný pro analýzu proteinů
PerkinElmer	celuloseový papír žádná impregnace stabilizátory

DMPK, z angl. drug metabolism and pharmacokinetics; FTA, z angl. Flinders Technology Associates; SDS, dodecylsulfát sodný [52]

1.3.2 Technika suché kapky krve a kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza biomarkerů v DBS vzorcích se opírá o předpoklad, že jednotlivé výseky použité pro analýzu poskytují volumetrické měření srovnatelné s kapalným vzorkem krve. Na kvantitativní výsledek analýzy výseku ze vzorku odebraného technikou DBS, který byl vytvořen nevolumentrickým aplikováním vzorku krve, má však vliv několik faktorů. Mezi tyto faktory, ovlivňující přesnost a správnost, patří objem krve aplikované na odběrovou kartu, hodnota hematokritu (HCT), distribuce analytu ve skvrně, stabilita analytu, způsob přidání vnitřního standardu a účinnost extrakce [53].

1.3.2.1 Homogenita

Objem krve aplikované na odběrovou kartu ovlivňuje nejen velikost vytvořené skvrny, ale také analytické výsledky. Typický vzorek DBS obsahuje přibližně 50 μl krve s průměrem skvrny 12 mm. Vlivem chromatografických efektů jsou erytrocyty koncentrovány na okraji skvrny, což může vést ke ztrátě homogenity vzorku. Tato ztráta homogenity vede ke zvýšené koncentraci analytů ve výsecích odebraných z okraje skvrny ve srovnání s výseky ze středu skvrny. Např. koncentrace fenylalaninu, která se stanovuje při screeningu PKU, se může lišit až o 300 $\mu\text{mol/l}$ v závislosti na poloze výseku z karty a objemu aplikované krve na kartu [54]. Vzhledem k možným rozdílům ve výsledcích, je nutné během vývoje a validace metody posoudit, zda objem krve a následná poloha výseku ovlivňuje koncentraci analytu [54–57].

Homogenita vzorku závisí také na typu odběrové karty. Při použití radioaktivně značených látek byly zjištěny vyšší koncentrace analytů v periférii skvrny u všech komerčně dostupných karet, kromě FTA DMPK-B, u kterých jsou analyty koncentrovány ve vyšší míře uprostřed [58]. Při distribuci analytu ve skvrně může také dojít k interakci mezi chromatografickými efekty a hodnotou HCT. Holub a kol. prokázali aditivní anebo synergické interakce mezi hodnotou HCT a chromatografickými účinky pro AMK a acylkarnitiny [59].

1.3.2.2 Hematokrit

Hodnota HCT je považována za významný faktor, který ovlivňuje vlastnosti vzorku odebraného technikou DBS. Jeho hodnota udává podíl erytrocytů v celkovém objemu krve a liší se nejen mezi jednotlivci, ale také během různých chorobných stavů jedince. U mužů je typická hodnota HCT $46 \pm 6 \%$ a u žen $41 \pm 5 \%$. U novorozenců se může pohybovat v rozmezí

28-67 %, přičemž průměrná hodnota je 55 %. Kromě toho kapilární krev mívá zpravidla vyšší hodnotu HCT než krev žilní [50, 60].

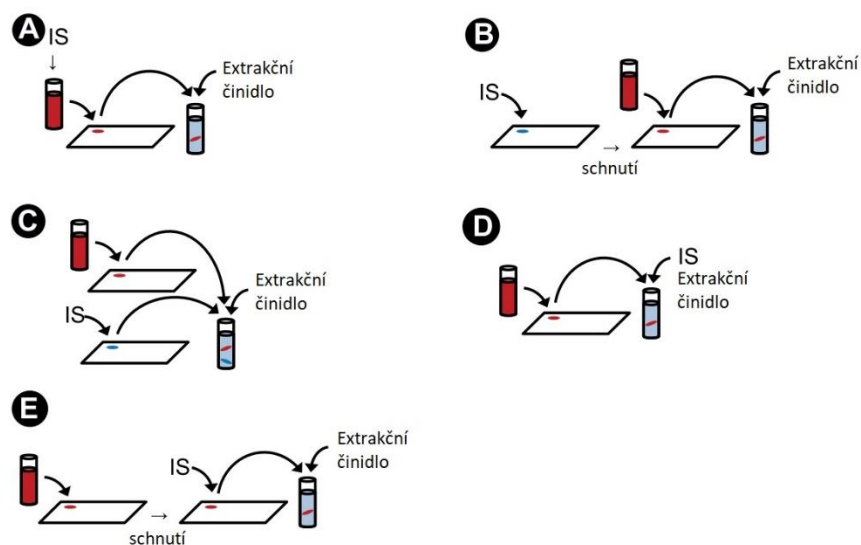
Hodnota HCT úzce souvisí s vlastnostmi krve, a tím pádem může ovlivnit její chování během nanášení na filtrační papír. Při vyšších hodnotách HCT se krev stává viskóznější, což způsobí nižší adsorpci a menší šíření krve na filtračním papíru ve srovnání s krví s nízkou hodnotou HCT. Vliv HCT na velikost a vzhled DBS lze pozorovat i vizuálně. Krevní skvrny s nízkou hodnotou HCT jsou symetričtější s hladkými hranami, na rozdíl od těch s vyššími hodnotami HCT, které jsou menší, tmavší a mají nerovný okraj [61]. Z analytického hlediska mohou být odchylky měření ovlivněné hodnotou HCT rozděleny na odchylky způsobené různou plochou krevní skvrny, různou výtěžností a účinky matrice. Nejlépe zdokumentovány jsou odchylky způsobené rozdílnou plochou krevních skvrn, které vznikají v důsledku rozdílného šíření krve s různou hodnotou HCT. Zkreslení výtěžnosti je způsobeno přidáním vnitřního standardu (IS) až během extrakčního kroku. Kromě toho lze vzorek odebraný technikou DBS s odlišnou hodnotou HCT považovat za odlišnou matici, což může vést ke vzniku odchylek měření při použití HPLC-MS [62].

Pro kvantifikaci hodnoty HCT z DBS bylo navrženo několik postupů. Většina se opírá o měření endogenní látky, z jejíž koncentrace lze predikovat hodnotu HCT. Vhodným kandidátem by mohla být hladina draselných kationtů, hemoglobinu nebo mRNA. Nicméně stanovení hladiny těchto látek není dostatečně přesné, aby mohlo být použito v praxi [63]. Účinkům HCT se dá vyhnout při analýze celého vzorku DBS. Aby byl tento přístup efektivní, je nutné kontrolovat množství aplikované krve, aby bylo možné definovat její objem. V současné době jsou komerčně dostupná nová vzorkovací zařízení, která odebírají a aplikují fixní objem plné krve na filtrační papír [64–67]. Alternativou jsou zařízení, která jsou schopná oddělit krevní buňky od plazmy a následně vytvořit suchou kapku plazmy [68, 69]. Další možností, jak minimalizovat účinek HCT, je příprava kalibrátorů z krve s hodnotami HCT odpovídající očekávanému mediánu sledované populace [63].

1.3.2.3 Vnitřní standard

V případě kapalného vzorku plazmy nebo plné krve je malý objem IS přidán přímo ke vzorku, čímž se korigují účinky matrice a případné ztráty analytu při přípravě vzorku. Vzhledem k pevné povaze vzorku DBS není tento způsob přidání IS možný. V běžné praxi se IS přidává

do extrakčního činidla (Obrázek 6D), přestože tento postup nedokáže korigovat ztráty analytu během přípravy vzorku [58].



Obrázek 6 Pět možných technik přidání vnitřního standardu ke vzorku suché kapky krve [58]

Ideálním postupem je přidání IS k plné krvi a až následné nakapání takto upraveného vzorku na kartičku. Tento způsob je nicméně v praxi nepoužitelný a využívá se pouze jako referenční postup při hodnocení nové techniky přidavku IS. Další možností je nakapání IS na kartičku a po zaschnutí nanesení vzorku plné krve, nebo je IS a vzorek nakapán na kartu každý zvlášť a jsou extrahovány společně. Problém nastává, pokud je IS připraven v organickém rozpouštědle. Díky nižší viskozitě se může organické rozpouštědlo rozprostřít do větší plochy než krev. Poslední alternativou je nakapání IS na již zaschlou skvrnu vzorku. Pokud je použit roztok IS v methanolu, dochází k jeho šíření do menších, méně homogenních a nepravidelných ploch. V případě vodného roztoku IS může dojít k redisoluci a redistribuci analytu ve vzorku [58, 70]. Možným řešením může být aplikace IS sprejem. Touto technikou dojde k více homogenní distribuci IS a navíc k vyloučení potenciálních chromatografických efektů [71].

1.3.2.4 Extrakce analytů

Extrakce analytů z pevné fáze do kapalné představuje nejdůležitější krok zpracování vzorků odebraných technikou DBS. Pro extrakci je při kvantitativní analýze vyražen jeden nebo více

terčků z odběrové karty. Průměr terčků se může lišit od 1,5 do 8 mm a jejich počet je závislý na citlivosti použité analytické metody [53]. Extrakce se obvykle provádí přidáním určitého množství extrakčního rozpouštědla k vyraženým terčům. Extrakční rozpouštědlo musí být dostatečně silné, aby přerušilo vazbu mezi analytem a proteiny v matici nebo vazbu mezi analytem a papírem odběrové karty. Jeho volba je závislá na fyzikálních a chemických vlastnostech analytu. Obvykle se používají různé směsi organických rozpouštědel s vodou (methanol, ethanol, acetonitril), vodné pufrů (fosfátový pufr), mravenčan amonný, samostatná organická rozpouštědla (n-hexan) nebo komerčně dostupné soupravy [46, 50]. Účinnost extrakce se vyjadřuje jako poměr výsledků získaných z krevní skvrny a výsledků získaných z vodného standardu. Evropská léková agentura (EMA, z angl. European Medicines Agency) uvádí, že „...výtěžnost analytu nemusí být 100 %, ale poměr výtěžnosti analytu a vnitřního standardu by měl být konzistentní, přesný a reprodukovatelný. Výtěžnost experimentů by měla být provedena porovnáním analytických výsledků extrahovaných vzorků ve třech koncentracích (nízká, střední a vysoká) s neextrahovanými standardy, které reprezentují 100% výtěžnost“ [72]. Pro dosažení reprodukovatelných výsledků je během vývoje metody nutná optimalizace extrakce, tzn. volba vhodného extrakčního činidla a jeho pH, teplota, potřeba třepání či sonikace a doba extrakce [53].

Novou alternativou je on-line extrakce, jejíž principem je neustálé přivádění rozpouštědla na suchou krevní skvrnu fluidní soustavou s jeho následnou analýzou. Toho lze dosáhnout dvěma způsoby, v závislosti na tom, zda extrakční proces zahrnuje jednostrannou extrakci nebo extrakci průtokovou [58]. V prvním případě se využívá desorpční elektrosprejová ionizace (DESI) [73] nebo maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) [74]. V případě průtokové extrakce protéká rozpouštědlo skrz krevní skvrny a extrahované analyty unáší rovnou do hmotnostního spektrometru. Před MS analýzou je navíc možné provést HPLC separaci analytů na koloně [58].

1.3.2.5 Kalibrace a vzorky pro kontrolu kvality

Obecně by se měla k přípravě kalibračních standardů a vzorků pro kontrolu kvality (QC) použít čerstvá plná krev. Je třeba se vyhnout hemolyzované krvi a hodnota HCT by měla být v rozmezí testované populace, aby se minimalizovala potenciální chyba. Pro analýzu nových látek (např. nových kandidátů na léčiva) není obtížné najít neinterferující matici pro přípravu kalibračních standardů a vzorků QC. Nicméně problém nastává v případě biomarkerů s nízkou molekulovou

hmotností, které jsou běžně přítomny v těle a jejich hladina je mezi jednotlivci různá a mění se v čase. Možným řešením tohoto problému je příprava umělé „plné krve“, kdy jsou smíchány promyté krevní buňky s uměle vytvořeným sérem nebo plazmou. Vzhledem k tomu, že zásobní roztoky standardů nejsou připraveny v krvi, měl by být jejich přídavek k plné krvi při přípravě vzorků QC a kalibrátorů co nejvíce minimalizován (maximálně 5 % konečného objemu) [50, 75].

1.4 Analytické metody v metabolomice

1.4.1 Kapalinová chromatografie

Díky širokému spektru metabolitů s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a jejich rozdílným hladinám v různých biologických matricích, je v metabolomice využívána celá řada analytických technik. Nejvíce využívanou je kapalinová chromatografie, neboť je schopná separace, identifikace a kvantifikace směsí analytů rozpustných v kapalině. Výjimečnou ji dělá její široký rozsah použití, dostatečná přesnost a komerční dostupnost široké škály kolon, spotřebního materiálu a potřebného vybavení.

Vznik chromatografie sahá na počátek 20. století a je připisován Michailu Cvětovi, kterému se podařilo separovat extrakty z rostlin. O několik let později vznikla klasická sloupcová chromatografie, která byla následně rozvinuta na další typy chromatografie, jako je tenkovrstvá chromatografie, iontově výměnná chromatografie a gelová permeační chromatografie [76]. První HPLC systém (kolona obsahující částice s malým průměrem a přístroj schopný zvládnout vysoký tlak) byl zaveden v 60. letech 20. století pod vedením Csaby Horvátha a Josefa Hubera [77].

Princip chromatografie je založen na interakci směsi analytů mezi mobilní a stacionární fází, kde separační mechanismus (adsorpce a rozdělení) je závislý na fyzikálně-chemických vlastnostech analytů a zmíněných fází [76]. V metabolomické analýze se využívají různé chromatografické módy, které jsou více popsány v následujících kapitolách.

1.4.1.1 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) je nejvíce používaným separačním módem. RP-HPLC využívá hydrofobní stacionární fázi a směs vody a organických

rozpouštědel (acetonitril, methanol, ethanol atd.) s aditivy (pufry, kyseliny nebo zásady) jako mobilní fázi. Mobilní fáze má polární charakter, zatímco stacionární fáze je nepolární. Retence je založena na hydrofobní interakci mezi analyty a stacionární fází a vzrůstá se snižující se polaritou analytů a klesá s nižším obsahem vody v mobilní fázi [76].

Nepoužívanější hydrofobní stacionární fází je C18, případně C8, která je vázaná na silikagelu. Volba délky uhlovodíkového řetězce pak závisí na hydrofobicitě stanovovaných analytů. Jako alternativu lze využít fluorované fáze. Těmito fázemi může být buď fluorovaná alkylová fáze, nebo perfluorovaná fenylová (PFP) fáze, která je v praxi využívána více. Většina PFP fází má krátký alkylový řetězec, obvykle propyl, kterým je perfluorovaný fenyl vázán k silikagelu. Tyto fáze jsou chemicky nestabilní, což může vést k tzv. „krvácení“ kolon při LC-MS analýzách. Řešením může být delší alkylový řetězec, tím ale stacionární fáze ztrácí typické vlastnosti PFP fáze a stává se více podobnou fází C18 [78]. PFP fáze kromě disperzních interakcí, typických pro tradiční alkylové fáze, vykazují také silné dipólové interakce, π - π interakce a iontově výměnné interakce. Díky duální charakteristice normální a reverzní fáze jsou PFP fáze vhodné pro analýzu polárních analytů ve farmaceutických a biologických vzorcích, jako jsou nukleotidy, steroidy, vitamíny a alkaloidy [79].

1.4.1.2 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

U HILIC se využívá polární stacionární fáze a vodně-organická mobilní fáze, která musí obsahovat alespoň 2-3 % vody. Retenční chování je opačné, než je tomu u reverzní fáze. Voda má větší eluční sílu, to znamená, že polárnější analyty jsou více zadržovány na koloně, zatímco méně polární nebo nepolární látky jsou eluovány v blízkosti mrtvého objemu. Mezi výhody použití HILIC módu patří zvýšení citlivosti ve spojení s hmotnostním detektorem, možnost vyšších průtoků mobilní fáze díky její nižší viskozitě a zlepšení tvaru píků u zásaditých látek [76].

Princip separace není stále zcela objasněn, ale usuzuje se, že se vytvoří vodná vrstva na povrchu polární stacionární fáze, po které následuje aprotická vrstva. Separace se dosáhne v závislosti na polaritě nebo rozpustnosti analytů, přičemž polární analyty jsou lépe rozpustné ve vodné vrstvě než ve vrstvě aprotické. Předpokládá se, že retence je založena na rozdělovacích a adsorpčních mechanizmech. Polární analyty migrují do vrstvy bohaté na vodu v blízkosti povrchu stacionární fáze, čímž je usnadněna jejich interakce s vázaným selektorem na stacionární fází [80]. Pro analýzy v HILIC módu je k dispozici několik typů

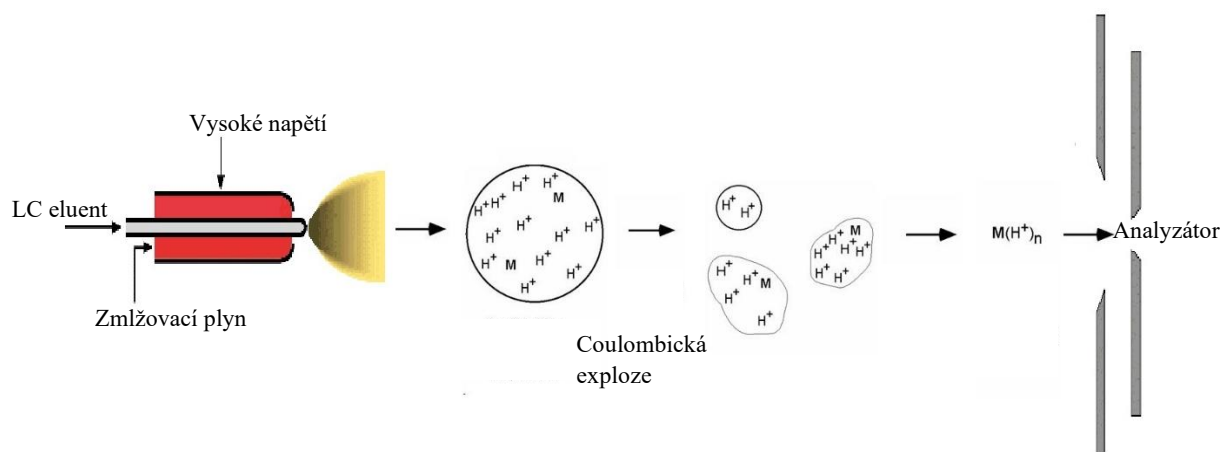
kolon. Nejčastěji používaným materiálem pro plnění kolon jsou sférické částice z oxidu křemičitého. Pro lepší retenční a separační selektivitu mohou být částice modifikovány navázáním různých funkčních skupin. Mezi ně patří zejména amino-, amido- a zwitteriontová skupina, diol nebo cyklodextrin. Alternativou jsou hybridní kolony, které jsou plněny částicemi ze silikagelu s hybridními ethylenovými můstky (BEH, z angl., bridge ethylene hybrid). BEH částice jsou odolné i za extrémních podmínek. Odolávají vysoké teplotě a tlaku a jsou stabilní v rozmezí pH 1-12 [81].

Jako mobilní fáze se využívá směs vody a organického rozpouštědla (obvykle 60-95 %). Volba organického rozpouštědla má vliv na retenci stanovovaných látek a jeho eluční síla roste se zvyšující se polaritou a schopností účastnit se proton-donorových a proton-akceptorových interakcí v pořadí voda > methanol > ethanol > 2-propanol > acetonitril (ACN). Retenci látek lze také ovlivnit hodnotou pH, proto se do mobilní fáze přidávají pufrы, které navíc zlepšují ionizaci analytů v případě detekce hmotností spektrometrií. Obvykle se používá mravenčan nebo octan amonný [81].

1.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií je nejpobulárnějším přístupem pro metabolomickou analýzu. V hmotnostní spektrometrii jsou neutrální molekuly převáděny na ionty (ionizace). Následně jsou ionty separovány hmotnostními analyzátory podle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z) a jejich intenzita je zaznamenána detektorem [82].

Nejpobulárnější a nejvíce používanou ionizační technikou MS je elektrosprejová ionizace (ESI). Tato technika patří mezi měkké ionizační techniky a je vhodná pro středně polární a polární látky. Ionty v ESI jsou přeneseny z roztoku do plynné fáze použitím elektrického potenciálu. Mobilní fáze (a v ní rozpuštěné analyty) je přiváděna do iontového zdroje kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (1-5 kV). Na výstupu kapiláry jsou při průtoku zmlžovacího plynu generovány nabitě kapičky. Ty se působením vyšší teploty ve zdroji a proudem sušícího plynu kontinuálně zmenšují odpařováním rozpouštědla, což vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje a zmenšení poloměru kapek. Nakonec intenzita elektrického pole v nabitě kapce dosáhne kritického bodu, ve kterém je kineticky a energeticky možné, aby byly ionty na povrchu kapek převedeny do plynné fáze. Ionty v plynné fázi jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru (Obrázek 7) [83].

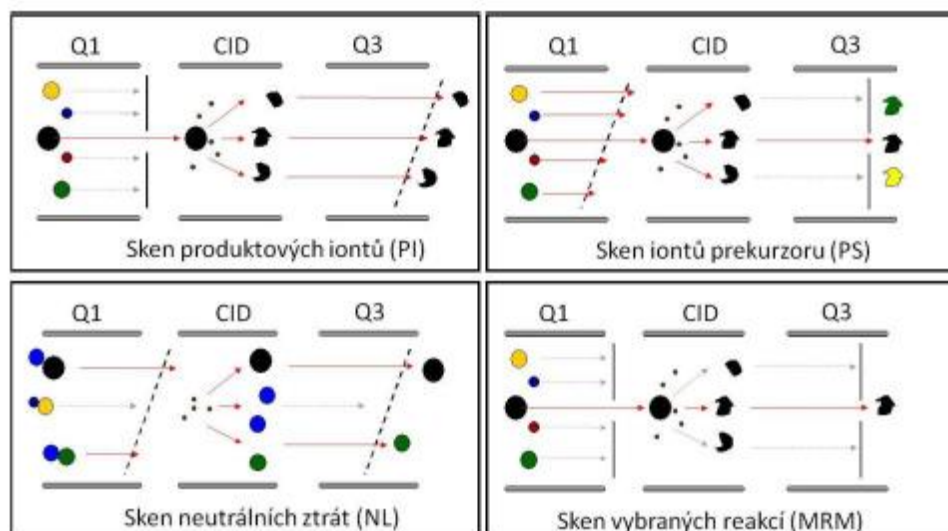


Obrázek 7 Princip ionizace elektrosprejem [83]

ESI jsou v pozitivním módu produkovány protonované ionty $[M+H]^+$, v negativním módu deprotonované ionty $[M-H]^-$ nebo se mohou vytvářet adukty $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ a $[M+CH_3COO]^-$. Vznik aduktů je ovlivněn hlavně povahou a typem analytu a koncentrací použitých aditiv v mobilní fázi [84]. Dalšími ionizačními technikami jsou chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), které jsou spíše vhodné pro méně polární mobilní fáze a analyty [82].

Pro přesnou a vysoce citlivou kvantitativní analýzu je nejvýhodnější provádět vícenásobné MS experimenty (MS/MS), což se označuje jako tandemová hmotnostní spektrometrie. Využívá se k tomu trojitý kvadrupól (QqQ) nebo iontová past. QqQ je hmotnostní analyzátor složený ze dvou analytických kvadrupólů (Q1 a Q3), mezi nimiž je umístěn třetí kvadrupól (Q2), který slouží jako kolizní cela pro fragmentaci iontů. U některých hybridních variant trojitého kvadrupólu, může Q3 fungovat jako lineární iontová past, což se nazývá QTRAP [82]. QqQ je možné používat díky selektivní separaci iontů také bez kapalinové chromatografie a pracovat v uspořádání přímého nástřiku vzorku (FIA-MS/MS). V tomto případě je vzorek přiváděn přímo do iontového zdroje a selekce analytů probíhá na analytických kvadrupólech. Tohoto uspořádání se využívá převážně pro rychlé screeningové analýzy. V klinické praxi se využívá pro stanovení hladiny AMK a acylkarnitinů z DBS vzorků při novorozeneckém screeningu [85].

Trojité kvadrupól může pracovat v několika módech. Podle typu zvoleného módu je možné použít analytické kvadrupóly v režimu skenu nebo selektivního filtru a tyto režimy různě kombinovat (Obrázek 8).



Obrázek 8 Módy používané ve spojení s trojitým kvadrupólem (CID, kolizí indukovaná disociace)[86]

Nejčastěji používaným módem je monitorování vybraných reakcí (MRM). Při tomto módu jsou kvadrupóly Q1 a Q3 použity jako selektivní filtry pro izolaci prekursoru a specifického fragmentu. Častým postupem je i kombinace několika skenovacích módů během jedné analýzy [87]. Díky vysoké citlivosti, selektivitě, robustnosti a propustnosti poskytují QqQ analyzátory pracující v režimu MRM vynikající přístup pro cílené metabolické profilování umožňující simultánní analýzu stovek metabolitů, které jsou zapojeny do hlavních metabolických drah [88].

2 Cíl práce

Hlavním cílem této dizertační práce bylo:

1. Zavést a validovat metodu pro simultánní stanovení kyseliny močové a alantoinu v lidské krvi získané technikou suché kapky.
2. Zavést a validovat metodu pro stanovení aminokyselin v lidské krvi získané technikou suché kapky bez předchozí derivatizace.
3. Zavést a validovat metodu pro stanovení fenylalaninu a tyrosinu v lidské krvi získané technikou suché kapky.

Dále aplikovat vyvinuté metody pro analýzu vzorků odebraných od dobrovolných dárců a zhodnotit použití techniky suché kapky krve jako alternativy k odběru plné krve pro metabolomické či klinické studie.

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Vzorky

Do studie bylo zapojeno celkem 100 dobrovolných dárců (49 mužů a 51 žen, ve věkovém rozmezí 21-85 let s průměrným věkem 50 let). Před zahájením samotného odběru krve byl každý z dárců poučen o průběhu studie a podepsal informovaný souhlas (viz Příloha 1). Samotná studie byla schválena etickou komisí Nemocnice Pardubice. Z důvodu reprezentativnosti vzorku populace, nemuseli dárce pro zařazení do studie splňovat žádné konkrétní podmínky, byl znám pouze věk a pohlaví dárce.

Vzorky krve byly odebírány z kubitální žíly do zkumavek obsahující EDTA kvalifikovaným zdravotnickým personálem. Odebrané vzorky krve byly bezprostředně po odběru pipetovány (50 μ l) automatickou pipetou na odběrové karty (Whatman[®] 903 protein saver cards) tak, aby se špička nedotýkala filtračního papíru a krev byla nanášena formou kapky. Pro analýzu fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích DBS bylo na odběrovou kartu pipetováno přesně 20 μ l krve. Vzorky krve byly následně ponechány zaschnout při laboratorní teplotě v horizontální poloze po dobu 3 hodin, poté byly odběrové karty umístěny do hermeticky uzavíratelného polypropylenového sáčku a uskladněny při -80 °C, po dobu maximálně 3 měsíců.

Vzorky krve pro optimalizaci metod byly získány od 2 dobrovolných dárců, jejichž hodnota HCT se pohybovala v rozmezí námi studované populace (0,34-0,46 pro ženy a 0,40-0,52 pro muže). Venózní krev byla kvalifikovaným zdravotníkem odebrána do zkumavek obsahující EDTA a následně pipetována na odběrové karty (50 μ l). Hodnota HCT byla ověřena ihned po odběru krve mikrohematokritovou metodou.

3.1.2 Chemikálie

- Acetonitril, hyper-grade pro HPLC-MS; Mr 41,05; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Alantoin; Mr 158,12; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- DL-Alantoin-5-¹³C,1-¹⁵N; Mr 160,10; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Aminokyseliny (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
 - L-Alanin (Ala); Mr 89,09

- L-Arginin (Arg); Mr 174,20
- L-Asparagin (Asn); Mr 132,12
- L-Asparagová kyselina (Asp); Mr 133,11
- L-2-Aminomáselná kyselina (2-AM); Mr 103,12
- L-Citrulin (Cit); Mr 175,20
- L-Fenylalanin (Phe); Mr 165,191
- L-Fenylalanin-D5 (Phe-D5); Mr 170,22
- L-Glutamin (Gln); Mr 146,14
- L-Glutamová kyselina (Glu); Mr 147,13
- L-Glycin (Gly); Mr 75,07
- L-Histidin (His); Mr 155,15
- L-Isoleucin (Ile); Mr 131,17
- L-Leucin (Leu); Mr 131,17
- L-Lysin (Lys); Mr 146,19
- L-Methionin (Met); Mr 149,21
- L-Prolin (Pro); Mr 115,13
- L-Serin (Ser); Mr 105,09
- L-Taurin (Tau); Mr 125,15
- L-Threonin (Thr); Mr 119,12
- L-Tyrosin (Tyr); Mr 181,19
- L-Tryptofan (Trp); Mr 204,23
- L-Valin (Val); Mr 117,151
- Deionizovaná voda; Mr 18,00; ($G = 0,055 \mu\text{S}$)
- Hydroxid sodný; Mr 40,00; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Chlorid sodný; Mr 58,44; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina chlorovodíková; Mr 36,45; ($\rho = 1,18 \text{ g/cm}^3$, $w = 0,366$; Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina močová; Mr 168,11; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina močová-1,3- $^{15}\text{N}_2$; Mr 170,10; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS; Mr 46,03; ($w = 0,98-1,00$; Merck, Darmstadt, Německo)
- Methanol hyper-grade pro HPLC-MS; Mr 32,04; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Mravenčan amonný pro LC-MS; Mr 63,06; (Merck, Darmstadt, Německo)

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Adventurer™ Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Analytická kolona Discovery® HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm), opatřena ochrannou kolonou Discovery® HS F5 (4 × 2,1 mm; 3 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Analytická kolona Ascentis® Express OH5 (150 × 2,1 mm; 2,7 μm), opatřena ochrannou kolonou Ascentis® Express OH5 (4 × 2,1 mm; 2,7 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Analytická kolona LiChroCart, Purospher Star RP-18e (125 × 4 mm; 5 μm), opatřena ochrannou kolonou LiChroCart Purospher Star RP-18e (4 × 4 mm; 5 μm) (Merck, KGaA, Darmstadt, Německo)
- Automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- Centrifuga EPP-5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Děrovačka, pinzeta, sterilní jehla
- Filtrační papír pro odběr krve, odběrová karta Whatman 903 (Whatman, GmbH, Dassel, Německo)
- Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Hlubokomrazicí box MDF-U 3086S (Sanyo Electric, Ósaka, Japonsko)
- Hmotnostní spektrometr LCMS-8045 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Kádinky, odměrné válce, odměrné baňky
- Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
 - Řídicí systém CBM-20A
 - Odplyňovač mobilní fáze DGU-20A
 - Termostat kolon CTO-20AC
 - Vysokotlaká analytická čerpadla LC-20AD
 - Autosampler SIL-20AC
 - Software LCsolution
- Lyofilizátor SCANAVAC CoolSafe™ (Labogene APS, Allerød, Dánsko)

- Magnetické míchadlo Heidolph MR 3001K (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Šwabach, Německo)
- Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, porozita 0,20 μm (Sulpeco, Bellefonte, PA, USA)
- Odběrové zkumavky s K_3EDTA , 2 a 9 ml, Vacuette (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)
- pH-metr inoLab, level 2 (WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, Weilheim, Německo)
- Polypropylenové (PP) mikrozkušavky s víčkem typu Eppendorf 1,5 ml (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Předvážky AdventurerTM Pro AV212C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Rotační olejová vývěva CLASSIC VRO-4 (LAVAT, a.s., Radim u Kolína, ČR)
- Skleněné vialky se šroubovacím víčkem (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Skleněné inserty ND8, 100 μl (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Ultrazvuková čistička ECOSON (ECOSON, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)
- Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo).

3.1.4 Pracovní roztoky

Příprava deionizované vody

Deionizovaná voda ($G = 0,055 \mu\text{S}$) byla připravena zařízením na úpravu vody Smart2pure a před použitím byla přefiltrována přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm .

Stanovení aminokyselin

Zásobní roztoky aminokyselin

Zásobní roztoky příslušných AMK byly připraveny rozpuštěním navážek (Tabulka 4) v 25 ml deionizované vody. Roztoky byly pipetovány po 1 ml alikvotech a uchovávány při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabulka 4 Navážky aminokyselin pro přípravu zásobních roztoků

AMK	Navážka [g]	Koncentrace [μmol/l]	AMK	Navážka [g]	Koncentrace [μmol/l]
Ala	0,0237	10640,9	Met	0,0382	10240,6
Arg	0,0514	9759,8	Phe	0,0413	99957,6
Asn	0,0340	10293,7	Pro	0,0307	10666,2
Asp	0,0317	9526,7	Ser	0,0289	11000,1
Cit	0,0433	9886,4	Thr	0,0292	9805,2
Gln	0,0385	10537,1	Trp	0,0501	9812,5
Glu	0,0380	10331,0	Tyr	0,0044	2428,4
Gly	0,0190	10123,9	Val	0,0288	9833,5
His	0,0380	9797,0	2-AM	0,0242	9387,1
Ile	0,0321	9788,1	Lys	0,0449	9833,0
Leu	0,0342	10428,4			

Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu fenylalanin-D5 (9987 μmol/l)

Navážka 0,0170 g deuterovaného fenylalaninu (Phe-D5) byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvotech a uchováván při -80 °C.

Příprava mobilní fáze A (ACN – 10 mmol/l mravenčan amonný, 90:10, v/v); pH 4,5 ± 0,1

Navážka 0,63 g mravenčanu amonného byla rozpuštěna v 100 ml deionizované vody. Po rozpuštění bylo přidáno 900 ml ACN a pH mobilní fáze bylo upraveno koncentrovanou kyselinou mravenčí na hodnotu 4,5. Před použitím byla mobilní fáze přefiltrována přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μm a odvzdušněná v ultrazvukové lázni.

Příprava mobilní fáze B (voda – 10 mmol/l mravenčan amonný, 90:10, v/v); pH 4,5 ± 0,1

Navážka 0,63 g mravenčanu amonného byla rozpuštěna v 100 ml deionizované vody. Po rozpuštění bylo přidáno 900 ml deionizované vody a pH mobilní fáze bylo upraveno koncentrovanou kyselinou mravenčí na hodnotu 4,5. Před použitím byla mobilní fáze přefiltrována přes nylonový filtr o porozitě 0,2 µm a odvzdušněná v ultrazvukové lázni.

Příprava mobilní fáze C – stanovení fenylalaninu a tyrosinu

Mobilní fáze byla připravena smícháním methanolu s deionizovanou vodou v poměru 1:1 (v/v) s přidavkem kyseliny mravenčí 0,1 % (v/v). Mobilní fáze byla před použitím přefiltrována a odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Příprava elučního činidla (75% ACN)

Pro přípravu 10 ml elučního činidla obsahující vnitřní standard (Phe-D5) o koncentraci asi 10 µmol/l bylo smícháno 7,5 ml ACN a 2,5 ml deionizované vody a přidáno 10 µl zásobního roztoku vnitřního standardu (9987 µmol/l). Roztok byl připravován denně čerstvý.

Stanovení alantoinu a kyseliny močové

Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 0,9 g chloridu sodného v 100 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při 4 °C maximálně po dobu 1 týdne.

Příprava roztoku hydroxidu sodného (1 mol/l)

Navážka 1 g hydroxidu sodného byla rozpuštěna v 25 ml deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

Zásobní roztok kyseliny močové I (4996,7 µmol/l)

Navážka 0,0210 g KM byla rozpuštěna v 550 µl 1 mol/l hydroxidu sodného a objem byl doplněn do 25 ml deionizovanou vodou. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvotech a uchováván při -80 °C.

Zásobní roztok kyseliny močové II (7614,06 µmol/l)

Navážka 0,0316 g KM byla rozpuštěna v 750 µl 1 mol/l hydroxidu sodného a objem byl doplněn do 25 ml fyziologickým roztokem. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvotech a uchováván při -80 °C.

Zásobní roztok alantoinu I (1037,19 $\mu\text{mol/l}$)

Navážka 0,0041 g ALA byla rozpuštěna v 25 ml deionizované vody. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvotech a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok alantoinu II (3035,7 $\mu\text{mol/l}$)

Navážka 0,0048 g ALA byla rozpuštěna v 10 ml fyziologického roztoku. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvotech a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok vnitřního standardu kyseliny močové (58,79 $\mu\text{mol/l}$)

Navážka 0,0050 g izotopově značené KM ($\text{KM-1,3-}^{15}\text{N}_2$) byla kvantitativně rozpuštěna v 500 ml deionizované vody. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvotech a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok vnitřního standardu alantoinu (624,64 $\mu\text{mol/l}$)

Navážka 0,0100 g izotopově značeného ALA ($\text{DL-alantoin-5-}^{13}\text{C,1-}^{15}\text{N}$) byla kvantitativně rozpuštěna v 100 ml deionizované vody. Roztok byl pipetován po 1 ml alikvotech a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pracovní roztok vnitřního standardu alantoinu (asi 100 $\mu\text{mol/l}$)

Pracovní roztok izotopově značeného ALA byl připraven denně čerstvý ředěním zásobního roztoku deionizovanou vodou.

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním ACN s deionizovanou vodou v poměru 1:9 (v/v) s přidávkem kyseliny mravenčí 0,1 % (v/v). Mobilní fáze byla před použitím přefiltrována a odvzdušněna v ultrazvukové lázni.

Roztok elučňního činidla (85% ACN)

Pro přípravu 13 ml elučňního činidla bylo smícháno 11,05 ml ACN, 1300 μl izotopově značené KM (58 $\mu\text{mol/l}$), 130 μl pracovního roztoku izotopově značeného ALA (100 $\mu\text{mol/l}$) a 520 μl deionizované vody. Roztok byl připravován denně čerstvý.

3.2 Pracovní postup stanovení kyseliny močové a alantoinu

3.2.1 Příprava standardů

Pro přípravu standardů kalibrační řady a vzorků pro optimalizaci metody byly použity zásobní roztoky standardů připravených ve fyziologickém roztoku, které byly smíchány s nesrážlivou venózní krví v poměru 9:1 (v/v). Byly připraveny standardy dvou na sobě nezávislých sedmibodových kalibrací (S1-S7), jedny pro KM a druhé pro ALA. Nulový standard S0 byl připraven smícháním fyziologického roztoku s nesrážlivou krví. Padesát μl takto připravených standardů v plné krvi bylo pipetováno na odběrovou kartu Whatman #903 a ponechány zaschnout za stejných podmínek jako v případě reálných vzorků.

Pro přípravu vzorků pro testování vlivu hodnoty HCT na koncentraci analytů, byla plná venózní krev odstředěna (10 min, $1700 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Erytrocyty a krevní plazma byly smíchány v různých poměrech tak, aby měly vzorky krve různou hodnotu HCT (od 30 % do 60 %). Například vzorek krve s hodnotou HCT 30 % byl připraven smícháním 30 μl erytrocytů a 70 μl krevní plazmy.

3.2.2 Zpracování vzorků

Ze vzorku DBS byl vyražen terčík o průměru 6 mm, který byl vložen do 1,5 ml PP zkumavky. K terčíku bylo přidáno 150 μl roztoku IS v 85% ACN (KM-1,3- $^{15}\text{N}_2$ o koncentraci 5,8 $\mu\text{mol/l}$ a ALA-5- ^{13}C ,1- ^{15}N o koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$) a zkumavka byla vložena na 30 minut do ultrazvukové lázně. Po extrakci byl obsah zkumavky odstředěn (5 min, $4430 \times g$, laboratorní teplota) a supernatant byl pipetován do insertu skleněné vialky.

Při analýze plné krve bylo do PP zkumavky pipetováno 10 μl plné krve a 150 μl roztoku IS v 85% ACN. Po precipitaci proteinů byl obsah zkumavky odstředěn (5 min, $4430 \times g$, laboratorní teplota) a supernatant byl pipetován do insertu skleněné vialky.

3.2.3 Test lýzy erytrocytů

K 30 μl jednotlivých zásobních roztoků I a II ALA a KM bylo pipetováno 370 μl plné krve. Obsah vzorku byl promíchán na vortexu, poté ponechán stát 5 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně odstředěn (10 min, $1500 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Takto připravené vzorky byly vizuálně posouzeny, zda došlo k lýze erytrocytů.

3.2.4 Chromatografická analýza

Hladiny KM a ALA byly stanoveny metodou HPLC s hmotnostní detekcí. Separace byla isokratická, chromatografické podmínky a podmínky hmotnostní spektrometrie byly následující:

- Kolona Discovery® HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm)
- Mobilní fáze Směs ACN a deionizované vody (10:90, v/v) s 0,1% kyselinou mravenčí
- Průtok mobilní fáze 0,2 ml/min
- Dávkovaný objem 5 μl
- Teplota kolony 40 °C
- Doba analýzy 3 min
- Detektor ESI – QqQ
 - Loop time 0,2 s
 - Parametry iontového zdroje:
 - Kapilární napětí -3 kV
 - Průtok zahřívacího plynu 10 l/min
 - Průtok sušícího plynu 10 l/min
 - Průtok zmlžovacího plynu 2 l/min
 - Teplota v iontovém zdroji 300 °C
 - Teplota rozhraní 250 °C
 - Teplota vyhřívacího bloku 400 °C
 - Detekční mód negativní MRM

Kvalitativní stanovení: porovnání retenčních časů a přechodů MRM se známými standardy.

Kvantitativní stanovení: metoda kalibrační křivky (plocha píku analytu/plocha píku IS).

3.3 Pracovní postup stanovení aminokyselin

3.3.1 Příprava standardů

Pro přípravu směsného standardu AMK byly zásobní roztoky jednotlivých AMK (Tabulka 4) naředěny deionizovanou vodou. Jeden mililitr standardu s nejvyšší koncentrací AMK (S5) byl lyofilizován. Při přípravě standardů kalibrační křivky byl lyofilizovaný standard S5

rekonstituován 1 ml plné krve. Další standardy kalibrační křivky (S1-S4) byly připraveny ředěním standardu S5 plnou krví, nulovým standardem S0 byla samotná plná krev. Vzorky pro optimalizaci metody byly připraveny rovněž ředěním standardu S5 plnou krví. Padesát μ l takto připravených standardů v plné krvi bylo pipetováno na odběrovou kartu Whatman #903 a ponechány zaschnout za stejných podmínek jako v případě reálných vzorků.

Vzorky DBS pro testování vlivu hodnoty HCT na hladiny jednotlivých AMK byly připraveny smícháním erytrocytů a krevní plazmy v různých poměrech, aby vzorky DBS měly různou hodnotu HCT (od 30 % do 60 %). Vliv hodnoty HCT na hladiny AMK byl testován na čtyřech úrovních koncentrace (plná krev bez přídavku a plná krev s přídavkem standardů AMK na třech hladinách koncentrace). Vzorky s přídavkem byly připraveny rozpuštěním lyofilizovaných standardů v připravené krvi s danou hodnotou HCT.

3.3.2 Zpracování vzorků

Ze vzorku DBS byl vyražen terčík o průměru 6 mm, který byl vložen do 1,5ml PP zkumavky. K terčíku bylo přidáno 150 μ l roztoku IS v 75% ACN (Phe-D5 o koncentraci 10 μ mol/l) a zkumavka byla vložena na 30 minut do ultrazvukové lázně. Po extrakci byl obsah zkumavky odstředěn (5 min, 4430 \times g, laboratorní teplota) a supernatant byl pipetován do insertu skleněné vialky.

Při analýze plné krve bylo do PP zkumavky pipetováno 10 μ l plné krve, ke které bylo přidáno 150 μ l roztoku IS v 85% ACN. Po precipitaci proteinů byl obsah zkumavky odstředěn (5 min, 4430 \times g, laboratorní teplota) a supernatant byl pipetován do insertu skleněné vialky.

3.3.3 Chromatografická analýza

Stanovení AMK metodou HPLC s hmotnostní detekcí probíhalo v módu HILIC. Eluce byla gradientová, chromatografické podmínky a podmínky hmotnostní spektrometrie byly následující:

- Kolona Ascentis[®] Express OH5 (150 \times 2,1 mm; 2,7 μ m)
- Mobilní fáze A voda – 10 mmol/l mravenčan amonný (90:10, v/v); pH 4,5 \pm 0,1
- Mobilní fáze B ACN – 10 mmol/l mravenčan amonný (90:10, v/v); pH 4,5 \pm 0,1
- Průtok mobilní fáze 0,25 ml/min

- Dávkovaný objem 2 μ l
- Teplota kolony 40 °C
- Časový program

0,00 min	95 % B
8,00 min	47 % B
8,50 min	47 % B
8,51 min	95 % B
15,00 min	95 % B
15,01 min	STOP
- Detektor ESI – QqQ
 - Loop time 0,2 s
 - Parametry iontového zdroje:
 - Kapilární napětí 5 kV
 - Průtok zahřívacího plynu 10 l/min
 - Průtok sušícího plynu 10 l/min
 - Průtok zmlžovacího plynu 2 l/min
 - Teplota v iontovém zdroji 300 °C
 - Teplota rozhraní 250 °C
 - Teplota vyhřívacího bloku 400 °C
 - Detekční mód pozitivní MRM

Kvalitativní stanovení: porovnání retenčních časů a přechodů MRM se známými standardy.

Kvantitativní stanovení: metoda kalibrační křivky (plocha píku analytu/plocha píku IS).

3.4 Pracovní postup stanovení fenylalaninu a tyrosinu

3.4.1 Příprava standardů

Pro přípravu směsného standardu fenylalaninu a tyrosinu byly jejich zásobní roztoky (Tabulka 4) naředěny deionizovanou vodou. Jeden mililitr standardu s nejvyšší koncentrací AMK byl lyofilizován. Při přípravě standardů kalibrační křivky byl lyofilizovaný standard S6 rekonstituován 1 ml plné krve. Další standardy kalibrační křivky (S1-S5) byly připraveny ředěním standardu S6 plnou krví. Nulovým standardem byla samotná plná krev. Vzorky pro optimalizaci metody byly připraveny rovněž ředěním standardu S6 plnou krví. Padesát μ l takto připravených standardů v plné krvi bylo pipetováno na odběrovou kartu Whatman #903.

Pro analýzu celých skvrn vzorků DBS bylo na odběrovou kartu pipetováno přesně 20 μl standardu. Takto připravené standardy byly ponechány zaschnout za stejných podmínek jako v případě reálných vzorků.

Vzorky pro testování vlivu hodnoty HCT na hladiny fenylalaninu a tyrosinu byly připraveny smícháním erytrocytů a krevní plazmy v různých poměrech tak, aby vzorky DBS měly různou hodnotu HCT (od 20 % do 60 %). Vliv hodnoty HCT na hladiny fenylalaninu a tyrosinu byl testován na třech úrovních koncentrace (plná krev a plná krev s přidavkem standardu fenylalaninu a tyrosinu). Vzorky s přidavkem byly připraveny rozpuštěním lyofilizovaných standardů v připravené krvi s danou hodnotou HCT.

3.4.2 Zpracování vzorků

Ze vzorku DBS byl vyražen terčík o průměru 6 mm (v případě skvrny s 20 μl krve byla vyražena celá skvrna), který byl vložen do 1,5ml PP zkumavky. K terčíku bylo přidáno 400 μl (v případě celé skvrny 500 μl) roztoku IS ve 100% methanolu (Phe-D5 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$) a zkumavka byla třepána 20 min na třepáče. Po extrakci byl obsah zkumavky odstředěn (5 min, 4430 \times g, laboratorní teplota) a supernatant byl pipetován do insertu skleněné vialky.

Při analýze plné krve bylo do PP zkumavky pipetováno 20 μl krve, ke které bylo přidáno 500 μl roztoku IS v 100% methanolu. Po precipitaci proteinů byl obsah zkumavky odstředěn (5 min, 4430 \times g, laboratorní teplota) a supernatant byl pipetován do insertu skleněné vialky.

3.4.3 Chromatografická analýza

Hladiny fenylalaninu a tyrosinu byly stanoveny metodou HPLC s hmotnostní detekcí. Separace byla isokratická, chromatografické podmínky a podmínky hmotnostní spektrometrie byly následující:

- Kolona LiChroCart, Purospher Star RP-18e (125 \times 4 mm; 5 μm)
- Mobilní fáze Směs methanolu s deionizovanou vodou (1:1, v/v) s 0,1% kyselinou mravenčí
- Průtok mobilní fáze 0,75 ml/min
- Dávkovaný objem 1 μl
- Teplota kolony 40 $^{\circ}\text{C}$

- Doba analýzy 2,5 min
- Detektor ESI – QqQ
 - Loop time 0,2 s
 - Parametry iontového zdroje:
 - Kapilární napětí 4 kV
 - Průtok zahřívacího plynu 10 l/min
 - Průtok sušícího plynu 10 l/min
 - Průtok zmlžovacího plynu 2 l/min
 - Teplota v iontovém zdroji 300 °C
 - Teplota rozhraní 250 °C
 - Teplota vyhřívacího bloku 400 °C
 - Detekční mód pozitivní MRM

Kvalitativní stanovení: porovnání retenčních časů a přechodů MRM se známými standardy.

Kvantitativní stanovení: metoda kalibrační křivky (plocha píku analytu/plocha píku IS).

3.5 Validace a analytické parametry metod

Validace metody byla provedena podle pokynů pro validaci bioanalytických metod publikovaných Evropskou lékovou agenturou (EMA). U jednotlivých metod byla testována linearita, dolní mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), přesnost, výtěžnost, selektivita, účinek matrice, vliv objemu krve a hodnoty HCT na hladinu analytů a stabilita analytů ve vzorcích DBS.

3.6 Statistická analýza dat

Pro vyhodnocení chromatografických záznamů byl použit software LCSolution. Pro zpracování a statistické vyhodnocení získaných dat byly použity programy Statistika 14 a Microsoft Excel.

4 Výsledky a diskuze

V současné době roste zájem o technologie, které jsou schopné profilovat biologické systémy. Jednou z těchto technologií je metabolomika, která se zabývá analýzou relativně malých molekul v biologických systémech. Hlavním cílem metabolomiky je porozumění metabolických drah s následným využitím pro predikci vzniku onemocnění, a analýza biomarkerů, které lze použít k diagnostice onemocnění nebo monitorování léčby. K posouzení zdravotního stavu jedince se běžně využívají screeningová vyšetření metabolismu. Díky tomuto vyšetření mohou být v raném stádiu zachyceny různorodé metabolické poruchy a sledovány případné účinky nasazené léčby. U převážné většiny jsou k tomu účelu vyšetřovány klasické vzorky (plazma nebo plná krev) [89–91]. Jako alternativní technika odběru vzorku krve se využívá technika suché kapky krve, která se v řadě zemí využívá k diagnostice vrozených poruch metabolismu AMK, mastných kyselin a hormonů u novorozenců. Dále by tato screeningová vyšetření mohla být rozšířena o stanovení hladin KM a ALA, které by mohlo sloužit pro monitorování dětí s respirační tísní [92] nebo k hodnocení stavu oxidačního stresu u předčasně narozených novorozenců pro včasnou identifikaci závažného intraventrikulárního krvácení [93]. Stanovení hladin KM a ALA by mohlo být také využito pro klinické studie s velkou kohortou pacientů, například u pacientů s chronickou dnou [43], Behcetovou chorobou [94] a chronickým selháním srdce [95]. Toto široké využití je hlavně díky řadě výhod oproti klasickému odběru vzorku, jako je rychlý, jednoduchý a víceméně bezbolestný odběr krve, odběr krve si prakticky může pacient provést sám. Navíc jsou analyty ve vzorcích DBS stabilnější, což umožňuje transport odběrových karet do centrální laboratoře poštou.

Pro odběr vzorků krve technikou suché kapky je na trhu dostupná celá řada různých typů odběrových karet. Všechny jsou vyrobeny ze 100% celulosy, ale liší se velikostí pórů, která ovlivňuje nasákavost krve do struktury papíru [50]. Některé odběrové karty mohou být navíc impregnovány různými činidly pro zvýšení stability analytů, denaturaci proteinů, či lýzu buněk. Ze studií vyplývá, že různé typy odběrových karet mohou způsobit rozdíly ve výtěžnosti extrakce a chromatografických účincích a poskytnout tak rozdílné hladiny sledovaných analytů [58]. V naší studii se pro zachování reprodukovatelnosti výsledků pracovalo po celou dobu pouze s jedním typem odběrové karty, a to Whatman® 903. Námi sledované analyty nevyžadovaly impregnaci papíru činidly pro zvýšení jejich stability, tudíž jsme pracovali s neošetřenými odběrovými kartami.

4.1 Příprava vzorků

Dodržování správného postupu pro přípravu vzorků DBS může mít zásadní vliv na výsledek celé analýzy. Jedním z faktorů je množství krve nanášené na odběrovou kartu. Minimální objem krve by se měl pohybovat okolo 30 μl . Menší objem krve aplikovaný na odběrovou kartu nezaručí dostatečné nasáknutí papíru v celém objemu vyseknutého terčíku (v našem případě s průměrem 6 mm), což může vést k falešným výsledkům. Objem aplikované krve na odběrové karty, a s tím spojené chromatografické účinky, mohou mít vliv na koncentraci stanovovaných analytů. Tato problematika bude pospána dále. S množstvím aplikované krve souvisí také možnost vyseknutí vícero terčíků k analýze ze středu nebo okraje skvrny. Řada autorů [59, 96, 97] pozorovala vyšší koncentraci stanovovaných analytů na okraji vzorku DBS v porovnání se středem skvrny. Nicméně v našem případě jsme se touto problematikou nezabývali, jelikož u námi používaných terčíků s průměrem 6 mm a 50 μl nanášené krve není možné vyrazit vícero terčíků z jedné skvrny. Pro zachování reprodukovatelnosti výsledků byl terčík vždy vyražen ze středu skvrny.

Správnost výsledků je také ovlivněna způsobem přípravy standardů kalibrační křivky. Pro přípravu standardů kalibračních křivek používaných pro kvantifikaci analytů ze vzorků DBS existuje celá řada postupů. Jednou z možností je příprava zásobních roztoků ve vodě s jejím následným odpařením v atmosféře dusíku a rozpuštěním odparku v plné krvi. Tato možnost je díky pomalému odpařování vody časově náročná, a navíc může docházet ke ztrátám analytu při špatně nastaveném proudu dusíku. Další možností je přidavek standardu k plné krvi, pokud možno s co nejmenší změnou matrice vzorku. Doporučený maximální přidavek je jeden díl roztoku standardu k devíti dílům plné krve. Posledním způsobem přípravy standardu je lyofilizace roztoku standardu a následné rozpuštění v plné krvi. Tento způsob je vhodný pro standard obsahující komplexní směs analytů s různými koncentracemi.

V případě přípravy standardu pro stanovení hladiny KM a ALA ve vzorcích DBS byla použita metoda standardního přídávku. Bylo testováno, zda zásobní roztoky standardů musejí být připraveny ve fyziologickém roztoku nebo postačí deionizovaná voda. Zároveň byl sledován vliv hydroxidu sodného, přítomného v zásobním roztoku KM, na lýzu erytrocytů. Vzhledem k tomu, že je KM při pH asi 7 málo rozpustná (asi 500 $\mu\text{mol/l}$), bylo nutné pro přípravu zásobního roztoku KM o vysoké koncentraci použít pro zvýšení hodnoty pH právě hydroxid sodný, jelikož s rostoucí hodnotou pH se zvyšuje rozpustnost KM. Pro námi požadovanou koncentrací zásobního roztoku KM (viz kapitola 3.1.4) bylo nutné rozpustit

navážku KM v 1 mol/l hydroxidu sodném. Test lýzy erytrocytů byl proveden tak, že k plné krvi byl přidán zásobní roztok KM připravený v deionizované vodě, fyziologickém roztoku a fyziologickém roztoku s přídavkem hydroxidu sodného. Hemolýza (červené zabarvení plazmy) byla posuzována vizuálně po sedimentaci erytrocytů. Hemolýza byla pozorována v případě použití deionizované vody. Zásobní roztok KM je tedy nutné připravit ve fyziologickém roztoku, vysoká hodnota pH není problém. Při přípravě standardů pro stanovení AMK ve vzorcích DBS byl použit postup lyofilizace. Díky rozdílné rozpustnosti AMK ve vodě, referenčnímu rozmezí AMK v lidské krvi a poměrně velkého počtu stanovovaných AMK nebylo možné připravit směsný standard AMK s takovou koncentrací, aby mohla být použita metoda standardního přídavku. Zkoušeli jsme také postup odpaření vody ze směsného standardu, ale díky zdlouhavému odpařování vody byla nakonec zvolena lyofilizace.

Možným zdrojem chyb při stanovení analytů ve vzorcích DBS by mohl být přenos analytů mezi jednotlivými vzorky při vysekávání terčků ze vzorku DBS. Přenos analytů byl testován analýzou tří po sobě vyseknutých čistých terčků (stejná odběrová karta bez nanesené krve) po analýze terčku vyseknutého ze vzorku DBS obsahující vysokou koncentraci sledovaných analytů. Experiment prokázal, že k přenosu analytů mezi vzorky DBS nedochází.

Kromě výše zmíněných faktorů má významný vliv na hladinu stanovovaných analytů i hodnota HCT [50, 63]. Vzorky krve s vysokou hodnotou HCT mají vyšší viskozitu, což přímo ovlivňuje distribuci séra a erytrocytů skrze odběrovou kartu a vede k horšímu nasáknutí krve do filtračního papíru [53]. Hodnota HCT se může mezi jednotlivci výrazně lišit. Snížená hodnota HCT bývá přítomna u pacientů s anémií, ale také u některých infekčních stavů či po podání infuze. Jednou z možností korekce je využití metody predikce hodnoty HCT ze vzorku DBS, což je ovšem náročné jak z ekonomického hlediska, tak i časově. Další možností je analýza celého vzorku DBS. To je ovšem z hlediska odběru vzorků krve nereálné, jelikož není možné u všech pacientů zabezpečit stejný objem krve aplikovaný na odběrovou kartu. Hlavní variantou, jak minimalizovat účinek hodnoty HCT, je příprava standardů z krve s hodnotou HCT odpovídající očekávanému mediánu sledované populace [63]. Účinek hodnoty HCT na koncentraci stanovovaných analytů musí být tedy zohledněn při vývoji a validaci metody a je popsán pro jednotlivé analyty v následujících kapitolách.

Výsledky mohou být také ovlivněny způsobem, jakým je přidán vnitřní standard ke vzorkům. U kapalné plné krve se IS obvykle přidává v malém objemu přímo ke vzorku.

Vzhledem k tomu, že vzorky DBS jsou pevné povahy a hlavním principem techniky suché kapky je nanášení kapilární krve získané píchnutím do prstu, je běžnou praxí přidat IS do extrakčního činidla. Velkou nevýhodou je, že tento postup není schopný kompenzovat odchylky související s extrakcí analytů ze vzorků DBS (extrakce pevná látka-kapalina). Z toho důvodu je nutné, aby standardy a vzorky pro kontrolu kvality byly připraveny přidáním analytů do krve a zpracovány stejným postupem jako reálné vzorky. V praxi existuje pět způsobů, jak přidat IS ke vzorku. Ideální strategií je přidání IS přímo do vzorku krve před jejím samotným nanesením na odběrovou kartu. Nicméně, v případě techniky suché kapky je tento postup v praxi nepoužitelný a využívá se jen v průběhu optimalizace metody pro sledování účinnosti extrakce. IS lze také aplikovat na odběrovou kartu před nanesením krve nebo na již odebraný vzorek DBS. V prvním případě je nutné vzít v úvahu, že roztok IS se bude šířit skrz papír jinak než krev, díky rozdílné viskozitě. Navíc je nutné zohlednit jeho stabilitu a s tím spojené uchování odběrové karty. V případě nanášení IS na již odebraný vzorek DBS může naopak docházet k opětovnému rozpuštění a redistribuci krevních složek a analytů, pokud je IS rozpuštěn ve vodě. Posledním postupem je aplikace IS a krve jako dvě oddělené skvrny v rámci jedné odběrové karty a následně z nich vyražené terčíky zpracovat společně. Zde je ovšem problémem rozdílná účinnost extrakce, která je ovlivňována celou řadou faktorů.

4.2 Stanovení kyseliny močové a alantoinu v krvi získané technikou suché kapky

Stanovení KM se v klinických biochemických laboratořích rutinně provádí urikasovou metodou. Avšak při této metodě může výsledky ovlivňovat řada interferujících látek, proto je vhodnější použít pro stanovení KM kapalinovou chromatografií [29]. Naproti tomu stanovení hladin ALA je i v současnosti náročné a v klinické praxi se běžně neprovádí. Navíc, v současné době není žádná jiná publikovaná práce, která by se věnovala simultánnímu stanovení KM a ALA jak v klasicky odebraných vzorcích krve, tak ve vzorcích krve získaných technikou suché kapky. Jedním z cílů této práce bylo vyvinout rychlou a dostatečně citlivou metodu pro stanovení KM a ALA ve vzorcích krve, které byly získané technikou suché kapky, aby mohla být v budoucnu využita v klinických biochemických laboratořích nebo při metabolomických studiích.

4.2.1 Optimalizace metody LC-MS/MS

Pro simultánní detekci KM a ALA byl použit MS detektor vybavený iontovým zdrojem ESI a analyzátozem QqQ. Pro přesnou a citlivou kvantitativní analýzu je vhodné provádět vícenásobné experimenty MS, kdy v našem případě byl zvolen mód monitorování vybraných reakcí, MRM. Pro získání co nejlepší odezvy detektoru byla optimalizována řada jeho parametrů. Nejdříve bylo provedeno skenování (v pozitivním i negativním módu) standardů, při němž byla pro oba analyty zjištěna větší intenzita odezvy a nižší poměr S/N v negativním módu. Dále byla pro každý analyt (ALA, KM a značené IS) provedena softwarem řízená optimalizace přechodů MRM, hodnoty napětí fragmentace a usměrňovacího napětí na kvadrupólech. Získané hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 5.

Tabulka 5 Optimalizované přechody MRM pro kyselinu močovou a alantoin

Analyt	Prekurzor [m/z]	Produkt [m/z]	CE [V]
Alantoin	157,0	114,0	15
		97,1	16
Alantoin* (IS)	159,2	116,0	14
		99,0	14
KM	166,9	123,9	17
		96,1	18
KM* (IS)	168,9	125,1	18
		97,1	20

CE, kolizní energie; *izotopicky značený standard

Při měření reálných vzorků krve byla zjištěna interference matrice u ALA, respektive jeho MRM přechodu m/z 157,2 > 97,15 a značeného standardu 159,2 > 99,0. Tento problém byl pozorován i jinými autory [44]. Z toho důvodu byl při měření reálných vzorků krve použit pouze jeden přechod MRM jak pro ALA, tak i pro izotopově značený ALA. V případě KM byla interference matrice pouze v případě značené KM, ale vzhledem k tomu, že interference byla mimo její retenční okno, mohly být u ní ponechány všechny optimalizované přechody. Jako další parametr byl testován průtok sušících plynů v iontovém zdroji. Největší intenzita odezvy analytů byla dosažena při průtoku 10 l/min. V případě snížení průtoku plynů na 9, 8

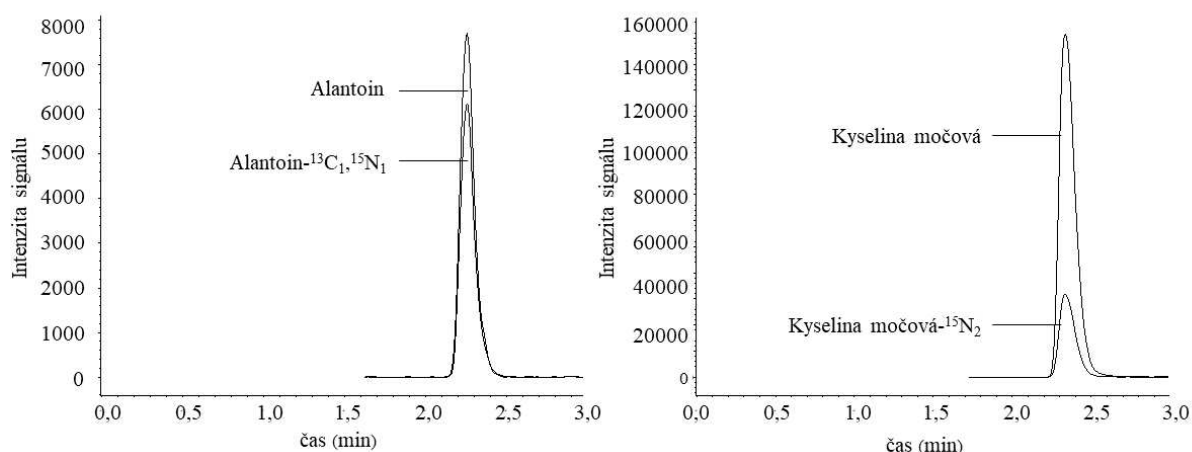
a 7 l/min byla intenzita odezvy analytů stejná nebo došlo k jejímu poklesu. Pro získání nejlepšího tvaru píku s maximální intenzitou odezvy byl také testován "loop time", přičemž nejlepší odezvy bylo dosaženo při jeho hodnotě 0,2 s.

V případě použití MS jako detektoru je vhodné v rámci validace metody určit účinky matrice neboli jaký vliv má matrice na ionizaci sledovaných analytů v iontovém zdroji. Účinky matrice pro ALA a KM byly testovány u šesti vzorků DBS získaných od různých dárců. Vzhledem k přirozenému výskytu analytů ve vzorcích DBS byly účinky matrice stanoveny porovnáním plochy píku izotopicky značeného standardu KM a ALA přidaného po extrakci s plochou píku v čistém rozpouštědle. Pro výpočet byla použita následující rovnice: (plocha píku s přídatkem po extrakci/plocha píku v čistém rozpouštědle) * 100. Účinky matrice se pro KM pohybovaly v rozmezí od 80 do 118 % a pro ALA od 58 do 64 %. Pro ALA byl u všech měřených vzorků pozorován vyšší účinek matrice, kdy došlo ke snížení absolutního signálu až na 58 % signálu v čistém rozpouštědle. Na druhou stranu při stanovení KM se účinky matrice mezi jednotlivými vzorky DBS náhodně měnily. Účinky matrice jsou v bioanalýze běžným jevem a lze je často vyřešit naředím vzorku. Nicméně toto řešení není v našem případě možné z důvodu nízké koncentrace ALA ve vzorcích DBS. Problém však může vyřešit použití izotopicky značeného standardu, jelikož se očekává, že poměr analyt/vnitřní standard zůstane nezměněn [98].

Pro separaci KM se nejčastěji používá kolona s vázanou reverzní fází C18. Nicméně díky vysoké polaritě ALA jsme byli nuceni přistoupit k jiné alternativě. Pro separaci KM a ALA byly testovány dvě analytické kolony: Discovery[®] HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm) a Ascentis[®] Express OH5 (150 × 2,1 mm; 2,7 μm). Nejdříve byla testována analytická kolona Ascentis Express OH5, na které oba analyty vykazovaly typické chování HILIC. Pro získání nejlepší retence obou analytů, tvaru píků a intenzity odezvy MS byly testovány účinky iontové síly mobilní fáze. Jako mobilní fáze byla použita směs vody a ACN s přídatkem mravenčanu amonného o koncentraci 5 mmol/l a hodnotou pH 4. Nicméně přítomnost mravenčanu amonného v mobilní fázi měla za následek výrazné snížení signálu MS u obou analytů, což navíc s nízkou koncentrací ALA ve vzorcích DBS, a tím i nižší odezvou detektoru, vedlo k odstoupení od použití pufované mobilní fáze. Další testovanou kolonou byla Discovery HS-F5 s PFP vázanou stacionární fází, která byla zvolena jako alternativa k typické vázané reverzní fázi C18. Jako mobilní fáze byla testována směs ACN s vodou a přídatkem kyseliny mravenčí o výsledné koncentraci 0,1%, 0,2%, 0,5% a 1% (v/v), která byla přidána pro podporu ionizace analytů v iontovém zdroji. Námi provedené testy však ukázaly, že změna koncentrace kyseliny

mravenčí nemá žádný vliv na změnu intenzity signálu v případě obou analytů, a proto jsme zvolili koncentraci 0,1 % (v/v).

Pro analýzu biologických vzorků je ve většině případů žádoucí mít dostatečnou chromatografickou separaci analytů, i když se používá detekce MS/MS. Pro separaci KM a ALA byla testována řada gradientových a isokratických elucí s mobilní fází ACN-voda v různých poměrech. Nejlepších výsledků jsme dosáhli s mobilní fází ACN-voda 10/90 (v/v) s 0,1% kyselinou mravenčí. Za těchto podmínek nedošlo k úplné separaci KM a ALA. I tak jsme upřednostnili isokratickou eluci před gradientovou, a to z časových důvodů. Jakákoli možná rizika ovlivnění odezvy našich analytů jejich koelucí nebo koelucí matrice byla snížena použitím izotopicky značených IS. Celková doba analýzy byla 3 minuty, tedy kratší než u dříve publikovaných metod pro stanovení ALA [44, 99, 100]. Souhrn optimalizovaných podmínek, při kterých byly měřeny vzorky DBS, je uveden v kapitole 3.2.4. Chromatografický záznam stanovení KM a ALA ve vzorku DBS, získaný při optimalizovaných podmínkách HPLC-MS/MS, je uveden na Obrázek 9.



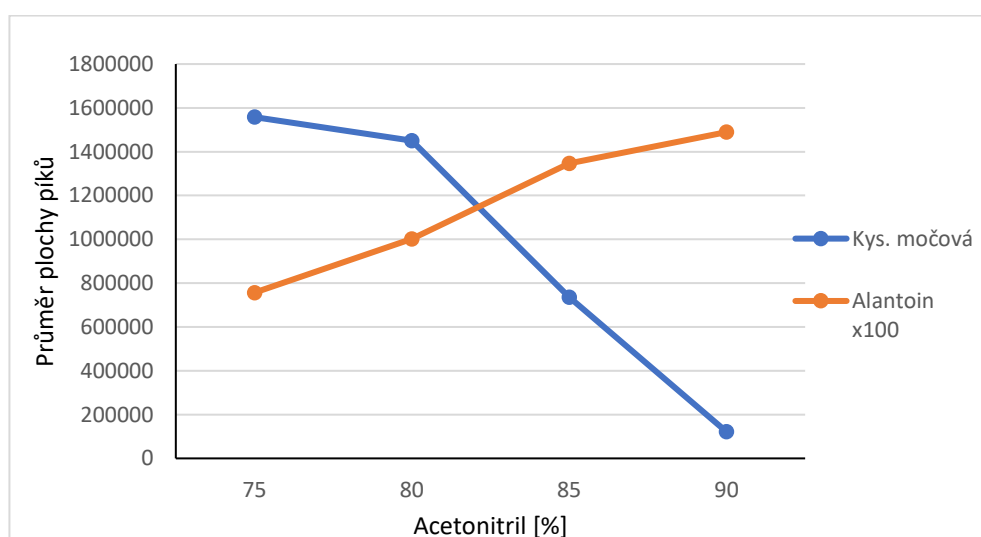
Obrázek 9 Chromatografický záznam stanovení alantoinu a kyseliny močové metodou HPLC-MS/MS. (Reálný vzorek DBS, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.2.4)

4.2.2 Validace metody stanovení kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích suché kapky krve

Extrakce kyseliny močové a alantoinu ze vzorku suché kapky krve

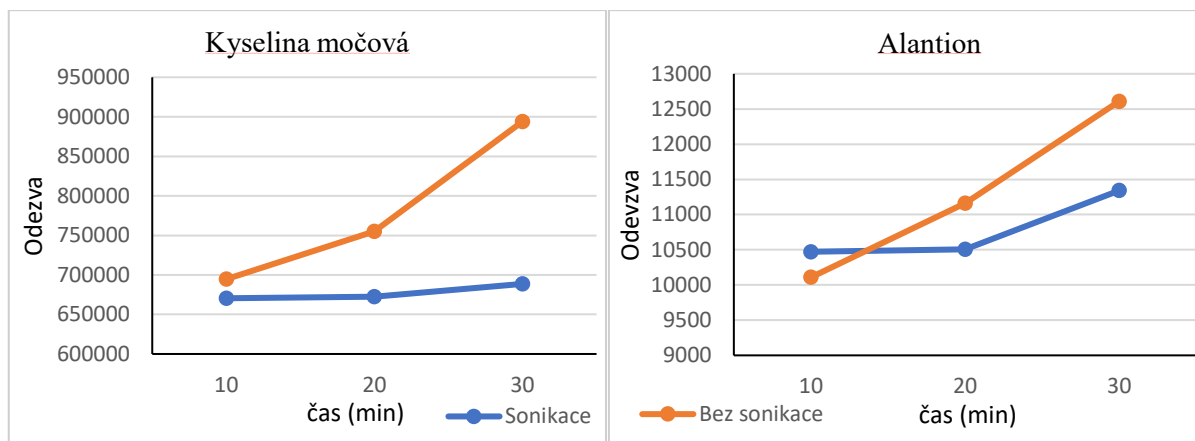
K získání co nejčistšího efluentu pro analýzu HPLC-MS je vhodné, aby byly proteiny vysráženy přímo na filtračním papíře a nebyly do efluentu uvolněny, proto byla v duplikátu

testována elučňi činidla s vysokým obsahem ACN ve vodě (70%, 75%, 80%, 85%, a 90%). Zvolené složení elučňi činidla navíc umožňovalo nástřik vzorku do systému HPLC-MS/MS bez dalších úprav, tj. odpařování a následné rozpuštění odparku v mobilní fázi. Experimenty ukázaly, že minimální koncentrace ACN, potřebná k úplné precipitaci proteinů, je 75 %. V případě 70% ACN došlo k zabarvení efluentu hemoglobinem a nedošlo tedy k úplné precipitaci proteinů. Při volbě extrakčního činidla musel být zvolen kompromis, jelikož se ukázalo, že účinnost extrakce KM ze vzorku DBS klesá se zvyšující se koncentrací ACN a je nejnižší při 90% ACN. Oproti tomu byl u ALA pozorován opačný trend, tedy při použití 90% ACN byla účinnost extrakce ALA dvakrát vyšší než při použití 75% ACN (Graf 1). Při volbě extrakčního činidla byl brán větší ohled na ALA, neboť v porovnání s KM je ve vzorcích DBS v nízkých koncentracích. Proto byl jako elučňi činidlo zvolen 85% ACN.



Graf 1 Závislost plochy píkú na síle elučňi činidla

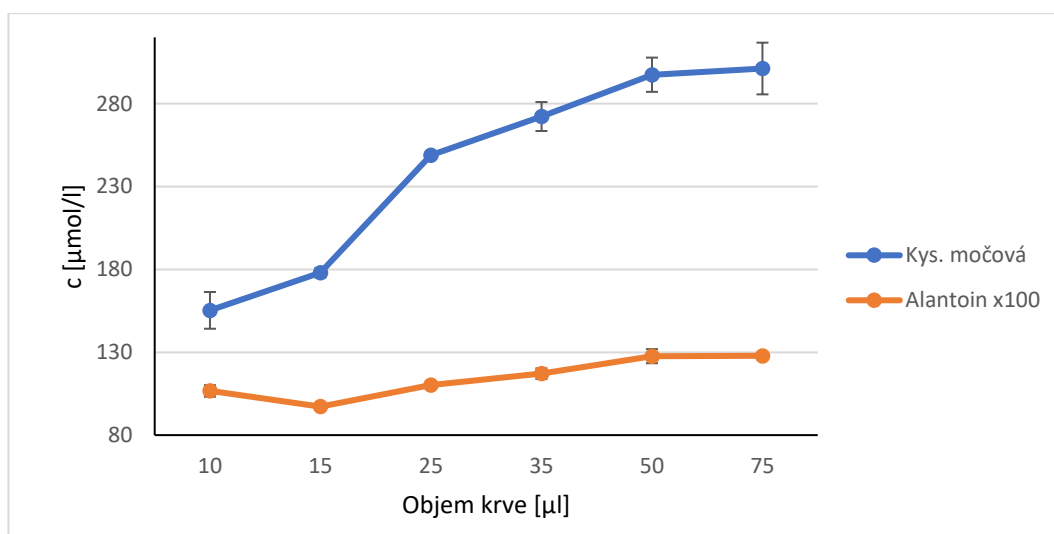
Extrakci analytů ze vzorku DBS může ovlivňovat řada faktorů, Wagner a kol [58] uvádějí, že výtěžnost extrakce klesá s hodnotou HCT. Ke zlepšení účinnosti extrakce se proto v mnoha případech využívá extrakce za stálého míchání vzorku nebo je vzorek umístěn do ultrazvukové lázně. V našem případě jsme pro podpoření eluce využili sonikaci. Testována byla eluce 85% ACN s 10, 20 a 30minutovou sonikací a bez sonikace za laboratorní teploty v duplikátu. V případě obou analytů bylo dosaženo nejvyšší účinnosti extrakce po 30minutové sonikaci (viz Graf 2).



Graf 2 Vliv doby sonikace na účinnost extrakce kyseliny močové a alantoinu ze vzorku DBS

Vliv objemu krve a hodnoty hematokritu na koncentraci kyseliny močové a alantoinu

Vzorek DBS zpravidla obsahuje přibližně 50 μl krve s průměrem skvrny kolem 12 mm. V některých studiích bylo zjištěno, že objem krve aplikovaný na odběrovou kartu může mít vliv na koncentraci analytů ve vzorku DBS [55]. Vliv objemu krve na koncentraci KM a ALA ve vzorcích DBS byl testován tak, že na odběrovou kartu byly aplikovány různé objemy krve (10, 15, 25, 35, 50 a 75 μl). V případě obou analytů byla zjištěna stejná závislost, kdy se zvyšujícím se objemem aplikované krve na odběrovou kartu se zvyšovala koncentrace analytů (Graf 3). Vzorky DBS s aplikovaným objemem krve 50 a 70 μl poskytovaly výsledky bez významných rozdílů, proto pro zajištění správnosti výsledků by měly vzorky DBS i kalibrátory obsahovat stejný objem aplikované krve na odběrovou kartu (50-75 μl) a terčíky by měly být ze vzorku DBS vyseknuty na stejném místě jako v případě kalibrátorů, tedy nejlépe ze středu.



Graf 3 Závislost koncentrace kyseliny močové a alantoinu na objemu krve aplikované na odběrovou kartu

Hodnota HCT je považována za jeden z hlavních faktorů, které ovlivňují vlastnosti vzorků DBS (extrakci analytů, homogenitu vzorků a dobu sušení), jelikož ovlivňuje viskozitu krve. Vliv hodnoty HCT na koncentraci KM a ALA byl zkoumán na čtyřech úrovních hodnoty HCT (30 %, 40 %, 50 % a 60 %) bez přídavku standardů a s přídavkem standardů na třech úrovních koncentrace (2,5; 25; 50 $\mu\text{mol/l}$ pro ALA a 50; 250; 500 $\mu\text{mol/l}$ pro KM). Zjistili jsme, že hodnota HCT v rozmezí 30-60 % má jen malý vliv na koncentraci obou analytů (Tabulka 6). Hladina KM vykazovala ve studovaném rozmezí rozdíl menší než $\pm 10\%$ a ALA menší než $\pm 10,5\%$ od hladiny naměřené ve vzorku DBS s hodnotou HCT 40 %. Vzhledem k tomu, že se jedná o pilotní studii, nebylo možné námi získané výsledky ověřit s literárními daty. Nicméně z našich výsledků vyplývá, že vliv hodnoty HCT na viskozitu krve a distribuci analytů ve vzorcích DBS je pro kvantifikaci sledovaných látek irelevantní.

Tabulka 6 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací kyseliny močové a alantoinu naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaheno ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %)

	Alantoin (%)				Kyselina močová (%)			
	c0	c1	c2	c3	c0	c1	c2	c3
HCT 30	110,5	107,7	101,6	92,4	106,9	101,9	105,1	98,7
HCT 40	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HCT 50	101,2	104,4	110,1	105,3	97,9	101,7	104,5	91,0
HCT 60	108,6	105,6	108,2	109,3	98,0	90,9	96,4	92,0

c0, koncentrace kyseliny močové a alantoinu ve vzorku suché kapky krve bez přídavku standardů; c1-c3, koncentrace kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích suché kapky krve s přídavkem standardů (0; 2,5; 25; 50 $\mu\text{mol/l}$ pro alantoin; 0; 50; 250; 500 $\mu\text{mol/l}$ pro kyselinu močovou); HCT, hematokrit.

Stabilita kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích DBS

Stabilita KM a ALA ve vzorcích DBS byla testována na vzorcích, které byly skladovány při laboratorní teplotě a při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorek DBS pro test stability byl získán od jednoho dárce a měřen v triplicátu. Koncentrace obou analytů se při skladování vzorku DBS při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pohybovala na stejných hodnotách. Dokonce i u vzorků DBS skladovaných při laboratorní

teplotě nedošlo k výraznému poklesu či nárůstu koncentrace po dobu 7 dní (ALA: $5,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$; KM: $205,2 \pm 3,2 \mu\text{mol/l}$), vzorky DBS pro stanovení koncentrace KM a ALA bude tak možné zasílat do laboratoře poštou. Pro delší uchovávání je nutné vzorky DBS skladovat při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bez přístupu vzduchu v uzavíratelných sáčcích, protože po 30 dnech skladování při laboratorní teplotě došlo k mírnému nárůstu koncentrace ALA a mírnému poklesu koncentrace KM (Tabulka 7). To může být způsobeno oxidací KM vzdušným kyslíkem.

Tabulka 7 Stabilita alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve skladovaných při laboratorní teplotě

	Průměrná koncentrace (\pm SD) ($\mu\text{mol/l}$)				
	Den 0	Den 2	Den 5	Den 7	Den 30
Kyselina močová	210,3 (13,9)	205,6 (12,8)	201,8 (15,7)	203,1 (12,5)	199,8 (9,7)
Alantoin	5,5 (0,3)	5,3 (0,1)	5,7 (0,2)	5,9 (0,4)	8,8 (0,4)

SD, směrodatná odchylka

Analytické parametry metody stanovení kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích suché kapky krve

Souhrn analytických parametrů je uveden v Příloze 2. Pro získání co nejspolehlivějších výsledků byly standardy kalibrační řady připraveny v plné krvi. Kalibrační křivka byla lineární v celém testovaném rozsahu: $0,5\text{-}50 \mu\text{mol/l}$ pro ALA ($R^2 = 0,9993$) a $10,0\text{-}750,0 \mu\text{mol/l}$ pro KM ($R^2 = 0,9949$). Linearita byla potvrzena zpětně vypočítanými koncentracemi standardů kalibrační křivky. Správnost a přesnost zpětně odečtené koncentrace standardů kalibrační křivky byla do 10 % od nominální koncentrace. Přesnost metody byla testována na 3 hladinách koncentrace. Variační koeficienty pro přesnost v sérii i mezi sériemi byly pro oba analyty pod 5 %. Výťažnost extrakce byla hodnocena porovnáním plochy píku ALA a KM získané proměřením vzorků DBS s plochou píku ALA a KM získané proměřením vzorků tekuté krve o stejném objemu. Průměrná výtěžnost extrakce pro KM byla 103 % ($\pm 4,7$ %) a pro ALA 118 % ($\pm 6,9$ %).

4.2.3 Stanovení koncentrace kyseliny močové a alantoinu v krvi získané technikou suché kapky u dobrovolných dárců

Nově vyvinutá metoda HPLC-MS/MS byla použita pro simultánní stanovení koncentrace KM a ALA ve 100 vzorcích DBS a 100 identických vzorcích tekuté krve získaných od dobrovolných dárců. Vzorky byly zpracovány a analyzovány podle protokolu popsáno v kapitole 3.2. Koncentrace KM a ALA v krvi dobrovolných dárců jsou uvedeny v Tabulka 8 jako medián a interkvartilové rozpětí (IQR). Medián koncentrace ALA ve vzorcích DBS byl u mužů 6,1 $\mu\text{mol/l}$ (IQR = 1,3) a u žen 5,2 $\mu\text{mol/l}$ (IQR = 1,4). Vzhledem k tomu, že v současné době nejsou k dispozici žádné jiné literární zdroje uvádějící hladiny ALA v krvi získané technikou suché kapky, porovnávali jsme naše výsledky s hodnotami naměřenými jinými autory v plazmě. Námi naměřené koncentrace jsou mírně vyšší než jinými autory publikované koncentrace v plazmě [25, 99, 100]. Vyšší koncentraci v krvi si vysvětlujeme tím, že se ALA přirozeně vyskytuje v plazmě i erytrocytech. V případě KM byl medián koncentrace ve vzorcích DBS u mužů 245,2 $\mu\text{mol/l}$ (IQR = 92,90) a u žen 227,5 $\mu\text{mol/l}$ (IQR = 88,4). Námi naměřené koncentrace se pohybují ve fyziologickém rozmezí a jsou podobné jako dříve publikované jinými autory [25, 36].

Tabulka 8 Medián koncentrace alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích plné krve a suché kapky krve

	Kyselina močová		Alantoin	
	Medián (IQR)		Medián (IQR)	
	DBS ($\mu\text{mol/l}$)	Krev ($\mu\text{mol/l}$)	DBS ($\mu\text{mol/l}$)	Krev ($\mu\text{mol/l}$)
Všichni (n = 100)	239,3 (75,7)	220,1 (90,8)	5,6 (1,3)	3,6 (0,9)
Muži (n = 49)	245,2 (92,9)	225,8 (106,0)	6,1 (1,3)	3,9 (1,0)
Ženy (n = 51)	227,5 (88,4)	213,0 (83,8)	5,2 (1,4)	3,3 (0,8)

DBS, suchá kapka krve; IQR, interkvartilové rozpětí

Pro ověření správnosti výsledků koncentrace naměřené ve vzorcích DBS, byla koncentrace ALA a KM naměřená ve vzorcích DBS porovnána s koncentrací naměřenou v kapalně krvi. Z grafů je pro oba analyty patrná lineární závislost mezi koncentracemi naměřenými ve vzorcích DBS a kapalně krvi (Příloha 3). Regresní rovnice pro ALA je $y = 0,5555x + 0,5268$ ($R = 0,9276$) a pro KM $y = 1,1248x - 42,3962$ ($R = 0,9300$). Ověření

lineárního vztahu mezi naměřenými koncentracemi bylo provedeno korelační analýzou s využitím Spearmanova korelačního koeficientu se statistickou hladinou významnosti $\alpha < 0,05$. Statisticky významná korelace mezi koncentracemi ve vzorcích DBS a koncentracemi ve vzorcích tekuté krve byla zjištěna jak v případě ALA ($R = 0,9016$), tak v případě KM ($R = 0,9093$).

V klinické praxi se stanovení ALA běžně neprovádí, naproti tomu stanovení KM urikasovou metodou patří mezi rutinní testy. Nicméně velkou nevýhodou urikasové metody je invazivní odběr velkého množství vzorku kvalifikovaným personálem, dále problém interference s endogenními sloučeninami a inhibice urikasy běžně používanými antikoagulancii. Z námi prezentovaných výsledků vyplývá, že techniku DBS lze použít jako alternativní odběr vzorku krve pro stanovení KM a ALA metodou HPLC-MS. Velkou výhodou prezentované metody je jednoduchý odběr vzorku krve a simultánní stanovení KM a ALA bez zdoluhavé přípravy vzorku pro analýzu. Díky tomu má metoda potenciál být implementována do klinické praxe nebo rozsáhlých metabolických studií.

4.3 Stanovení aminokyselin v krvi získané technikou suché kapky

Pro stanovení AMK existují dva běžně využívané přístupy. Buď jsou AMK analyzovány v jejich přirozené formě, nebo se provádí analýza jejich derivátů. Nejčastěji se pro analýzu AMK v biologických vzorcích využívají chromatografické techniky ve spojení s různými typy detektorů, jako je například UV, fluorescenční, elektrochemický nebo MS detektor. Velkou oblibu v posledních letech získal právě hmotnostní detektor, který umožňuje detekci bez předcházející derivatizace, čímž výrazně snižuje dobu přípravy vzorku pro analýzu. Jeho velkou nevýhodou je však vysoká pořizovací cena a náklady spojené s provozem. Metoda MS se rutinně využívá pro stanovení AMK při novorozeneckém screeningu, avšak stále s využitím derivatizace před analýzou. Cílem této práce bylo vyvinout metodu HPLC-MS pro stanovení AMK v krvi získané technikou suché kapky bez derivatizace a usnadnit a zrychlit tak přípravu vzorku před vlastní analýzou.

4.3.1 Optimalizace metody LC-MS/MS

Stejně jako v případě stanovení KM a ALA ve vzorcích DBS byl pro stanovení AMK použit MS detektor s iontovým zdrojem ESI a analyzátozem QqQ. Pro kvantitativní analýzu byl zvolen

mód monitorování vybraných reakcí MRM. V rámci optimalizace byla nejdříve provedena metoda skenování standardů (v pozitivním i negativním módu), při které byla pro všechny sledované AMK zjištěna vyšší intenzita signálu a nižší poměr S/N v pozitivním než negativním módu. Následně byla provedena softwarem řízená optimalizace MRM přechodů, hodnot napětí pro fragmentaci a hodnot usměrňovacího napětí na kvadrupólech. Optimalizací byly získány tři produktové ionty, kdy byly vybírány přechody s nejvyšší intenzitou odezvy. Pro ověření selektivity byl proměřen reálný vzorek DBS. U řady AMK byla zjištěna interference matrice pro některé přechody MRM a byly tedy z metody vyřazeny. Přehled použitých optimalizovaných přechodů MRM pro jednotlivé AMK je uveden v Tabulka 9.

Tabulka 9 Optimalizované přechody MRM pro stanovované aminokyseliny

	Prekurzor (m/z)	Kolizní energie (V)	Produkty (m/z)		Prekurzor (m/z)	Kolizní energie (V)	Produkty (m/z)	
Ala	90	22	44		Lys	147	17	84 130
2-AM	104	11	58	41	Met	150	16	56 104
Arg	175	12	70	60	Phe	166	11	72 103
Asn	133	15	74	87	Pro	116	15	70 43
Cit	176	23	70	159	Ser	106	11	60 42
Glu	148	15	84	56	Thr	120	12	74 56
Gln	147	16	84	130	Trp	205	8	188 146
Gly	76	13	30		Tyr	182	13	136 91
His	156	14	110	83	Val	118	12	72 55
Ile	132	86	86	69	Asp	134	18	88 74
Leu	132	11	86	44	Phe-D5	171	13	125 106

Pro dosažení co nejvyšší intenzity odezvy analytů byl testován průtok sušících plynů v iontovém zdroji. Největší intenzity odezvy bylo dosaženo při průtoku 10 l/min. V případě snížení průtoku plynů na 9, 8 a 7 l/min docházelo k přímo úměrnému snížení intenzity odezvy všech sledovaných AMK. K získání nejlepšího tvaru píku s maximální intenzitou odezvy byl také sledován počet bodů na pík neboli „loop time“. Nejlepší odezvy bylo dosaženo při hodnotě

0,2 s. S rostoucí hodnotou „loop time“ docházelo k poklesu intenzity odezvy všech sledovaných AMK.

Na vzorcích krve získaných technikou suché kapky od 6 různých dárců byly testovány účinky matrice. Vzhledem k tomu, že se AMK přirozeně vyskytují ve vzorcích DBS, byly účinky matrice určeny porovnáním ploch píků AMK přidáných po extrakci s plochami píků v čistém rozpouštědle. Pro výpočet byla použita následující rovnice: [(plocha píku s přidavkem po extrakci – plocha píku bez přidavku) / plocha píku v čistém rozpouštědle] * 100. Účinky matrice pro jednotlivé AMK byly poměrně konstantní, kdy došlo ke snížení absolutního signálu oproti signálu v čistém rozpouštědle u všech sledovaných AMK kromě tryptofanu (Tabulka 10). V našem případě byl pro korekci účinků matrice použit izotopicky značený IS (Phe-D5). Správnější přístup by byl ovšem použit značený IS pro každou sledovanou AMK, nebo alespoň pro skupinu AMK se stejnými vlastnostmi, což bohužel nebylo možné vzhledem k velkým pořizovacím nákladům daných IS.

Tabulka 10 Účinky matrice pro sledované aminokyseliny

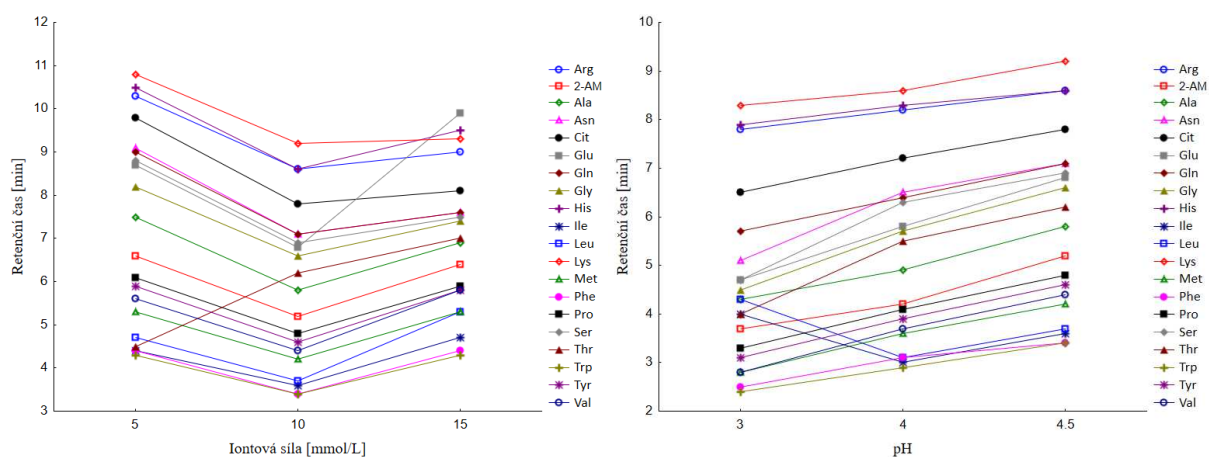
Aminokyselina	ME (%)	Aminokyselina	ME (%)
Ala	84-96	Leu	69-83
2-AM	73-83	Lys	54-85
Arg	67-89	Met	57-70
Asn	73-88	Phe	97-101
Cit	58-72	Pro	84-96
Glu	57-65	Ser	69-77
Gln	76-86	Thr	77-84
Gly	82-91	Trp	121-131
His	70-79	Tyr	87-95
Ile	77-99	Val	88-102

ME, účinky matrice

Stanovení AMK ve vzorcích DBS se rutinně provádí při novorozeneckém screeningu. Hmotnostní detekci nepředchází chromatografická separace, proto není možné stanovit

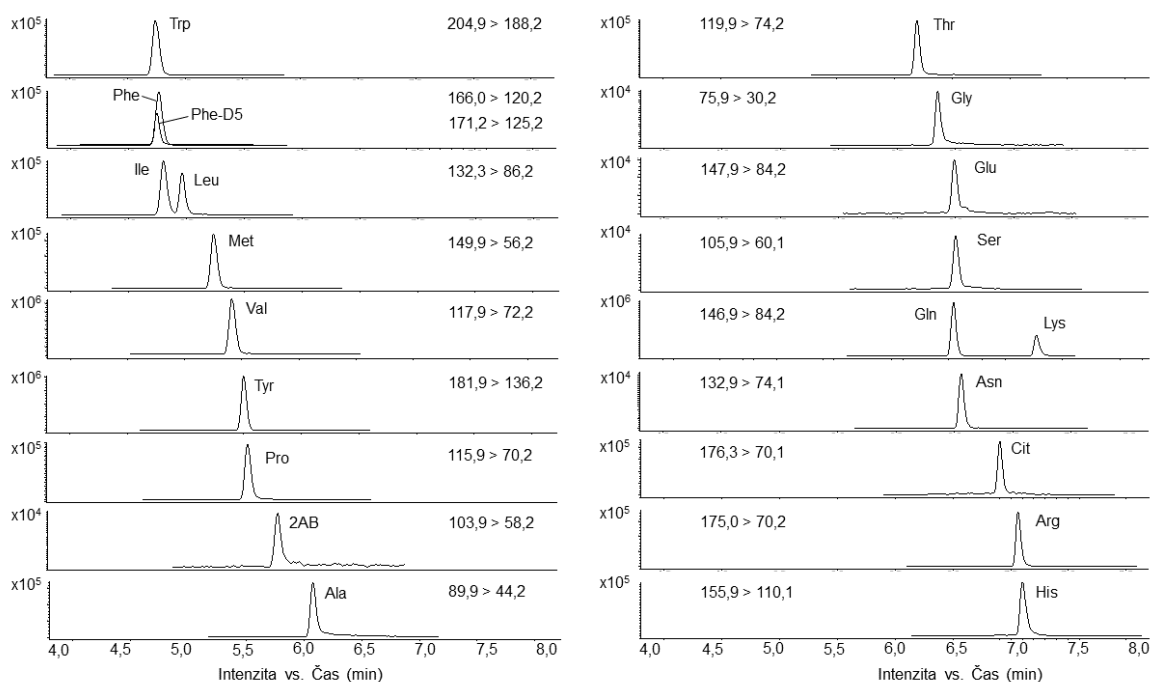
izomery AMK. Navíc jsou AMK před samotnou analýzou převedeny na příslušné butylestery, čímž se prodlužuje příprava vzorku [12]. AMK jsou vysoce polární analyty, což má za následek špatnou retenci na reverzní stacionární fázi C18 a je tak nutná jejich derivatizace vedoucí ke snížení polariry. V našem případě jsme zvolili alternativní kolonu Discovery® HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm) s PFP vázanou fází, která umožňuje separaci nederivatizovaných AMK v reverzním módu [101]. Jako mobilní fáze byla testována směs ACN a vody s přídavkem kyseliny mravenčí o výsledné koncentraci 0,1%, 0,2% a 0,5% (v/v), která byla přidávána pro zlepšení ionizace AMK v iontovém zdroji. Z námi provedených experimentů se ukázalo, že změna koncentrace kyseliny mravenčí nemá vliv na změnu intenzity odezvy. Testována byla také řada různých gradientových elucí, aby bylo dosaženo co nejlepší separace AMK, především izomerů leucinu a isoleucinu a AMK poskytující stejné produktové ionty po fragmentaci MS. I přes veškerou snahu se nám na této koloně nepodařilo dosáhnout optimální separace, a to díky špatné retenci AMK. Navíc docházelo k velkým změnám retenčních časů všech AMK a byli jsme nuceni přistoupit k pufované mobilní fázi.

Pro zlepšení separace a retence AMK byla testována kolona Ascentis® Express OH5 (150 × 2,1 mm; 2,7 μm) s povrchově porézními částicemi, která umožňovala separaci v uspořádání HILIC. Pro získání nejlepší retence AMK, tvaru píků a odezvy detektoru byly testovány účinky iontové síly mobilní fáze. Jako mobilní fáze byla použita voda a ACN s přídavkem mravenčanu amonného v koncentraci 5, 10 a 15 mmol/l, pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 3, 4 a 4,5. Přítomnost mravenčanu amonného v mobilní fázi vedla k výraznému poklesu signálu MS u všech sledovaných AMK. Změny v iontové síle mobilní fáze a hodnotě pH měly poměrně významný vliv na retenční časy všech AMK (Graf 4). Nejkratší doby analýzy při stejné gradientové eluci bylo dosaženo s mobilní fází obsahující mravenčan amonný o koncentraci 10 mmol/l. V případě změny hodnoty pH byl pozorován trend, kdy s rostoucí hodnotou pH se zvyšovala také doba retence AMK na koloně. Naproti tomu intenzita píků se úměrně snižovala s klesající hodnotou pH mobilní fáze.



Graf 4 Závislost retenčních časů aminokyselin na iontové síle a pH mobilní fáze

Jako finální mobilní fáze A byla zvolena směs vody a 10 mmol/l mravenčanu amonného (90:10, v/v), mobilní fáze B byla směs ACN a 10 mmol/l mravenčanu amonného (90:10, v/v). Výsledná hodnota pH obou mobilních fází byla 4,5. Pro co nejlepší separaci AMK byla testována řada gradientových elucí při různé rychlosti průtoku mobilní fáze. Gradientová eluce, která poskytla nejlepší separaci AMK a byla použita pro měření reálných vzorků DBS je uvedena v kapitole 3.3.3. Celkem bylo detegováno 21 AMK, kvantifikováno pouze 20 AMK. Problém jsme měli s kyselinou asparagovou, která při použití mravenčanu amonného v mobilní fázi vykazovala velký pokles intenzity signálu. Jelikož jsou hladiny kyseliny asparagové v krvi v jednotkách $\mu\text{mol/l}$, nebyli jsme ji schopni v reálných vzorcích DBS kvantifikovat. Chromatografický záznam AMK stanovených metodou HPLC-ESI-MS/MS je uveden na Obrázku 10.



Obrázek 10 Chromatografický záznam stanovení aminokyselin metodou HPLC-MS/MS (Reálný vzorek DBS, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.3.3).

4.3.2 Validace metody stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

Extrakce aminokyselin ze vzorku suché kapky krve

Eluce analytů ze vzorku DBS je jeden z nejvíce kritických kroků při přípravě vzorku pro analýzu. Optimální extrakční podmínky závisí na fyzikálně chemických vlastnostech analytu. Nejčastěji se extrakce provádí směsí vody a organického rozpouštědla, především methanolu a ACN, v různých poměrech [58]. Někteří autoři uvádí, že přidání malého množství vody k vzorku DBS před přidáním extrakčního činidla (organického rozpouštědla) zlepšuje účinnost extrakce. Domnívají se, že voda oslabuje interakce mezi hydroxylovými skupinami celulosy a polárních analytů [102]. Nicméně v tomto případě dochází také k uvolňování proteinů, navíc je filtrační papír náchylný k disagregaci a uvolňování vláken do roztoku, což může způsobit ucpání součástí HPLC systému. Tento problém lze však řešit odstředěním a filtrací efluentu. Pro extrakci AMK ze vzorků DBS se nejčastěji využívá methanol s malým obsahem vody. Tento postup by ale v našem případě vyžadoval před nástřikem vzorku do HPLC-MS systému odpaření rozpouštědla a následné rozpuštění odparku v mobilní fázi. Proto byla testována řada elučnicích činidel s vysokým obsahem ACN ve vodě (75%, 80%, 85% a 90%). Zvolené složení elučnicích činidla umožňovalo nástřik vzorku přímo do HPLC-MS systému i přesto, že složení

nebylo identické jako složení mobilní fáze. Pro eluci AMK ze vzorků DBS byla také testována mobilní fáze se stejným složením, jako je na počátku analýzy. Nicméně v tomto případě nedošlo k úplné precipitaci proteinů. Téměř u všech AMK byl sledován trend, kdy s klesajícím obsahem ACN docházelo ke zvýšení eluce AMK a nejvyšší výtěžnosti extrakce pro všechny AMK bylo dosaženo se 75% ACN ve vodě (Příloha 4).

V určitých případech je pouhé ponoření vyseknutého terčíku vzorku DBS do elučního činidla dostačující, aby došlo k účinné extrakci AMK. Častěji se však provádí třepání nebo sonikace, čímž je dodána dodatečná energie potřebná k uvolnění analytu navázaného k celulóze. Tím se zvýší účinnost extrakce [103]. Testovali jsme eluci AMK se 75% ACN po dobu 10, 20 a 30 minut s použitím sonikace a bez sonikace při laboratorní teplotě. Téměř u všech AMK bylo při sonikaci po dobu 30 minut dosaženo nejvyšší účinnosti extrakce (Příloha 5).

Vliv objemu krve a hodnoty hematokritu na koncentraci aminokyselin

Byl testován vliv objemu aplikované krve na odběrovou kartu (15, 20, 30, 40, 50 a 75 μ l) na koncentraci sledovaných AMK, v duplikátu. U všech AMK, s výjimkou argininu, byla zjištěna stejná závislost, kdy se zvyšujícím se objemem aplikované krve se zvyšovala koncentrace AMK (Příloha 6). Vzorky DBS s aplikovaným objemem 70 μ l krve poskytovaly o asi 8 až 42 % vyšší průměrné koncentrace AMK v porovnání se vzorky DBS s aplikovaným objemem krve 10 μ l. Podobné výsledky uvádějí také další autoři [20, 53, 54, 58]. Moat a kol. (2020) navíc pozorovali velké rozdíly v koncentracích AMK u terčíků vyražených ze středu a okraje vzorků DBS se stejně velkým aplikovaným objemem krve [55]. Pro zajištění správnosti výsledků je tedy nutné, aby vzorky DBS pro kontrolu kvality a standardy obsahovaly, pokud možno, stejné množství krve jako reálné vzorky. V našem případě byl zvolen objem 50 μ l, který odpovídá zcela vyplněnému vyznačenému kruhu krví na odběrové kartě.

Hodnota HCT je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují koncentraci analytů ve vzorcích DBS. Vliv hodnoty HCT na koncentraci AMK byl testován na čtyřech vzorcích DBS s hodnotou HCT (30 %, 40 %, 50 % a 60 %) bez a s přidavkem standardu AMK. Testy ukázaly, že hodnota HCT má poměrně výrazný vliv na koncentraci všech sledovaných AMK. U všech AMK, kromě argininu, byl pozorován rostoucí trend, kdy se zvyšující se hodnotou HCT rostla také koncentrace AMK (viz Příloha 7). U některých AMK byly koncentrace vyšší

až o 30 % ve vzorcích s hodnotou HCT 60 % oproti vzorkům s hodnotou HCT 30 %. Velmi podobných výsledků dosáhli také Holub a kol. (2006), kteří pozorovali zvýšení koncentrace leucinu, methioninu, fenylalaninu a tyrosinu o 21 %, 20 %, 27 % a 8 % ve vzorcích s hodnotou HCT 60 % v porovnání s hodnotou 30 % [59, 96]. Tomuto problému se lze vyhnout analýzou celého vzorku DBS. Nicméně, aby byl tento přístup účinný, musí mít množství krve aplikované na papír přesně definovaný objem. K tomu jsou v současné době dostupná nová vzorkovací zařízení, která odebírají a aplikují fixní objem krve na odběrové filtrační papíry [20, 62, 63, 104]. Toto zařízení je však dražší než tradičně používané odběrové karty a zvyšuje tak náklady na analýzu. V případě použití klasických odběrových karet s filtračním papírem je nutné zajistit, aby připravené standardy měly přibližně stejnou hodnotu HCT jako reálné vzorky.

Stabilita aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

Vzorky DBS se obecně vyznačují vyšší stabilitou analytů, což je jedna z hlavních výhod techniky DBS, která umožňuje jejich snazší transport do laboratoří. Nicméně, během přepravy mohou být vzorky vystaveny extrémním podmínkám (zvýšená teplota nebo vlhkost vzduchu). Z předchozích studií vyplývá, že tyto extrémní podmínky přímo ovlivňují krátkodobou stabilitu AMK a dalších metabolitů ve vzorcích DBS. Problém může také působit sluneční záření. Ukázalo se, že například methionin degraduje po 4 hodinách o 25 % po vystavení slunečnímu záření [105]. Golbahar a kol. zjistili, že při skladování vzorků DBS při 45 °C a 70% vlhkosti je methionin nestabilní po třech dnech a koncentrace fenylalaninu a tyrosinu se snížily o 28 % a 49 % za 24 hodin [106]. Avšak při dlouhodobém skladování vzorků DBS v suchém prostředí při pokojové teplotě, klesají koncentrace fenylalaninu a tyrosinu rychlostí 5,7 % a 1,7 % za rok [107]. Výše uvedené výsledky tedy naznačují, že skladování vzorků DBS při -20 °C a při -80 °C bez nadměrné vlhkosti může zvýšit stabilitu analytů a prodloužit ji z několika dnů na roky.

Stabilita AMK ve vzorcích DBS byla testována na vzorcích, které byly skladovány při laboratorní teplotě a při -20 °C v uzavíratelných sáčkách se silikagelem. Vzorek DBS byl získán od jednoho dárce a změřen. Koncentrace všech sledovaných AMK se při skladování vzorku DBS při -20 °C pohybovala na stejných hodnotách i po 30 dnech. U vzorků skladovaných při laboratorní teplotě došlo jen k velmi malému poklesu koncentrace. Pro delší uchování je tedy vhodné vzorky skladovat při -20 °C nebo -80 °C bez nadměrné vlhkosti.

Analytické parametry metody stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

Souhrn analytických parametrů je uveden v Příloha 8. Pro získání spolehlivých výsledků byly standardy kalibrační řady připraveny v plné krvi. Pro všechny sledované AMK byly kalibrační křivky lineární v celém testovaném rozsahu koncentrací. Linearita byla potvrzena zpětně odečtenými koncentracemi standardů kalibrační řady. Správnost a přesnost odečtených koncentrací jednotlivých standardů kalibrační řady byla v rámci 10 % od nominální koncentrace. Přesnost metody byla testována na 2 hladinách koncentrace AMK. Variační koeficienty pro přesnost v sérii byly pod 5 % a mezi sériemi pod 10 %. Výtěžnost extrakce byla hodnocena porovnáním plochy píku AMK získané proměřením vzorků DBS s plochou píku AMK získané proměřením vzorků tekuté krve o stejném objemu. Průměrná výtěžnost pro jednotlivé AMK se pohybovala v rozmezí 94-105 %.

4.3.3 Stanovení koncentrace aminokyselin v krvi získané technikou suché kapky u dobrovolných dárců

Nově vyvinutá metoda HPLC-MS/MS byla využita pro stanovení koncentrace AMK ve 100 vzorcích DBS a 100 identických vzorcích kapalně krve získaných od dobrovolných dárců. Vzorky byly zpracovány a analyzovány podle protokolu popsáno v kapitole 3.3. Koncentrace jednotlivých AMK v krvi dobrovolných dárců jsou uvedeny v Tabulce 11 jako medián a interkvartilové rozpětí (IQR). Z referenčních hodnot získaných z literatury je zřejmé, že převážná většina AMK má podobnou koncentraci v plné krvi jako v plazmě. Významnější rozdíl je u kyseliny glutamové, jejíž koncentrace v plazmě je 34-70 $\mu\text{mol/l}$, přičemž koncentrace v plné krvi se pohybuje v rozmezí 102-172 $\mu\text{mol/l}$, podobné výsledky ukázaly i naše experimenty. V případě dalších AMK se námi naměřené koncentrace pohybují v podobném rozmezí referenčních hodnot jako je udáváno v odborné literatuře [108–111].

Tabulka 11 Medián koncentrace aminokyselin ve vzorcích plné krve a suché kapky krve

AMK	Koncentrace v DBS (IQR) ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace v plné krvi (IQR) ($\mu\text{mol/l}$)
Ala	362,6 (134,6)	382,9 (300,0)
2-AM	19,0 (8,1)	21,2 (10,9)
Arg	76,1 (11,9)	81,6 (8,8)

AMK	Koncentrace v DBS (IQR) (μmol/l)	Koncentrace v plné krvi (IQR) (μmol/l)
Asn	66,9 (22,0)	64,3 (36,2)
Cit	32,8 (8,7)	30,4 (11,2)
Glu	125,8 (37,9)	86,5 (25,2)
Gln	455,1 (105,6)	489,2 (279,8)
Gly	282,5 (59,9)	281,8 (68,8)
His	78,1 (22,3)	71,9 (63,6)
Ile	88,5 (18,4)	93,2 (27,8)
Leu	110,2 (29,5)	112,9 (27,1)
Lys	148,6 (40,5)	141,4 (43,3)
Met	26,5 (9,0)	23,6 (23,5)
Phe	68,0 (14,0)	66,5 (15,6)
Pro	163,2 (65,7)	195,3 (168,3)
Ser	111,8 (26,7)	118,0 (27,3)
Thr	101,3 (37,9)	115,4 (80,5)
Trp	38,4 (7,6)	39,1 (16,4)
Tyr	80,7 (20,5)	75,3 (20,0)
Val	194,9 (48,2)	221,9 (122,9)

AMK, aminokyselina; DBS, suchá kapka krve; IQR, interkvartilové rozpětí

Pro ověření správnosti výsledků koncentrace naměřené ve vzorcích DBS, byla koncentrace AMK naměřená v kapalně krvi porovnána s koncentrací naměřenou ve vzorcích DBS. Z grafů (Příloha 9) je patrná statisticky významná (hladina významnosti $\alpha < 0,05$) lineární závislost pro všechny sledované AMK. Korelační analýzou s využitím Spearmanova korelačního koeficientu bylo provedeno ověření lineárního vztahu mezi naměřenými koncentracemi. Analýzou byla potvrzena dobrá korelace, kdy se korelační koeficienty pohybovaly nad 0,73 u všech sledovaných AMK kromě argininu, ten jako jediný vykazoval

horší korelaci s hodnotou korelačního koeficientu 0,6811. Přehled korelačních koeficientů je uveden v Tabulce 12.

Tabulka 12 Přehled korelačních koeficientů závislosti koncentrace aminokyselin ve vzorcích DBS na jejich koncentraci v kapalně krvi.

AMK	Regresní rovnice	Korelační koeficient	Spearmanův korelační koeficient
Trp	$y = 1,4683x - 15,7897$	0,8622	0,7304
Phe	$y = 0,9267x + 5,7299$	0,9085	0,8270
Ile	$y = 1,0474x + 0,5499$	0,9263	0,8779
Leu	$y = 0,9305x + 10,545$	0,9574	0,9165
Met	$y = 2,0286x - 25,1409$	0,9109	0,8353
Val	$y = 1,4789x - 58,5798$	0,8389	0,7683
Tyr	$y = 0,8854x + 5,0707$	0,9255	0,8785
Pro	$y = 1,5837x - 43,4844$	0,8958	0,8908
2-AM	$y = 1,1163x - 0,4766$	0,8801	0,8309
Ala	$y = 1,5999x - 163,1246$	0,8961	0,8943
Thr	$y = 1,6341x - 48,8639$	0,9127	0,8947
Gly	$y = 0,9286x + 15,9173$	0,8638	0,8277
Arg	$y = 0,8228x + 17,5632$	0,8444	0,6811
Glu	$y = 0,5438x + 16,4382$	0,8536	0,8176
Ser	$y = 0,9902x + 9,4328$	0,8926	0,8557
Gln	$y = 1,9467x - 381,7732$	0,8903	0,8426
Asn	$y = 1,5229x - 37,4201$	0,9260	0,9076
Cit	$y = 0,8718x + 1,4713$	0,8694	0,7814
His	$y = 2,4401x - 112,8474$	0,9068	0,8951
Lys	$y = 0,9927x - 2,3106$	0,8406	0,7476

AMK, aminokyselina

Výše prezentované výsledky ukazují, že námi vyvinutá metoda pro stanovení 20 AMK ve vzorcích DBS bez derivatizace poskytuje spolehlivé výsledky. Pro analýzu AMK se odběr vzorků krve technikou suché kapky jeví jako vhodná alternativa ke klasickému odběru krve. AMK ve vzorcích DBS jsou vysoce stabilní, čímž je usnadněn transport a následné skladování vzorků. Navíc vynechání kroku derivatizace výrazně snížilo čas potřebný pro přípravu vzorku a celkově zjednodušilo postup zpracování vzorků k analýze. Možná rizika ovlivnění výsledků různou hodnotou HCT, či různým objemem aplikované krve na odběrovou kartu se dají eliminovat například využitím nových odběrových zařízení, která jsou čím dál více dostupná. Z toho vyplývá, že prezentovaná metoda má potenciální využití při metabolických či klinických studiích s velkou kohortou pacientů.

4.4 Stanovení fenylalaninu a tyrosinu

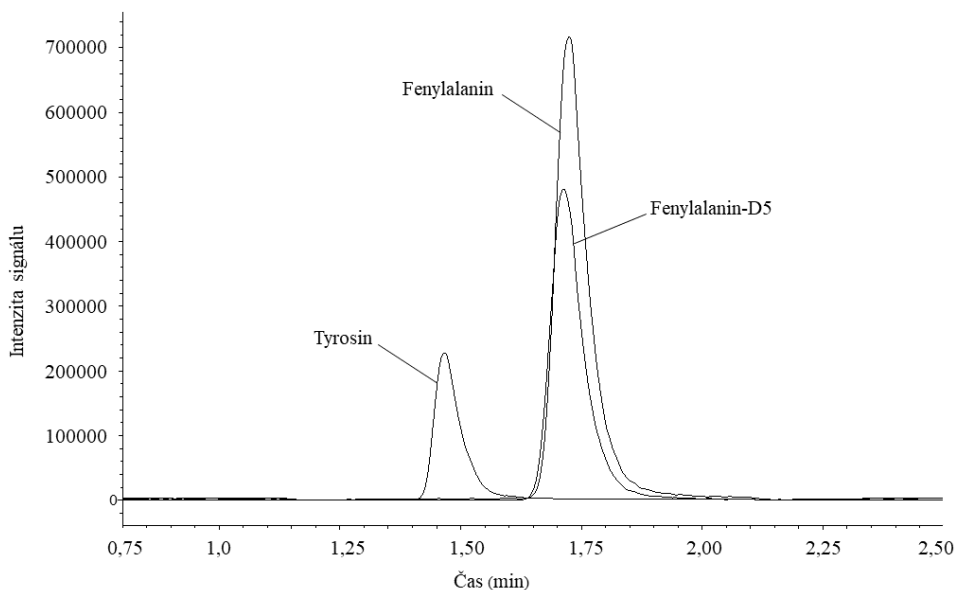
PKU je jedna z nejčastějších dědičných metabolických poruch, která je způsobená mutacemi v genu kódující fenylalaninhydroxylasu. Tyto mutace vedou ke snížené až žádné aktivitě tohoto enzymu. Výsledkem jsou pak zvýšené hladiny fenylalaninu a snížené hladiny tyrosinu v krvi a dalších tkáních. Neléčený stav je charakterizován mentální retardací, opožděnou řečí, záchvaty a abnormalitou chování [111]. PKU se rutinně vyšetřuje v rámci novorozeneckého screeningu, nicméně pro potvrzení diagnózy jsou vzorky opětovně testovány více specifickými a selektivními technikami. Navíc u pacientů s diagnostikovanou PKU a TYR je fenylalanin a tyrosin monitorován v rámci kontroly stavu nemoci. K tomu se využívají enzymatické metody [112], plynová chromatografie [113], nebo v současné době nejvíce oblíbená technika HPLC-MS [114–116]. Jedním z cílů této práce bylo zavést rychlou, selektivní a robustní HPLC-MS/MS metodu pro simultánní stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích DBS, která by sloužila jako rychlejší alternativa k výše prezentované metodě a mohla být využita například pro monitorování stavu pacientů s PKU, případně TYR.

4.4.1 Optimalizace metody LC-MS/MS

Pro detekci fenylalaninu a tyrosinu byl použit MS detektor s iontovým zdrojem ESI a analyzátozem QqQ. Pro kvantitativní analýzu byl zvolen mód MRM. Optimalizace parametrů pro detekci těchto dvou vybraných AMK je popsána v předchozí kapitole (kapitola 4.3.1.). Účinky matrice byly testovány na vzorcích krve získaných technikou suché kapky od 6 různých

dárců. Vzhledem k tomu, že se AMK přirozeně vyskytují ve vzorcích DBS, byly účinky matrice určeny porovnáním ploch píků AMK přidaných po extrakci s plochami píků v čistém rozpouštědle. Pro výpočet byla použita následující rovnice: $[(\text{plocha píku s přidavkem po extrakci} - \text{plocha píku bez přidavku}) / \text{plocha píku v čistém rozpouštědle}] * 100$. U obou sledovaných AMK byly pozorovány poměrně nízké účinky matrice, kdy došlo pouze k malému zvýšení nebo snížení absolutního signálu oproti jejich signálu v čistém rozpouštědle. Účinky matrice se pohybovaly do $\pm 5\%$ u fenylalaninu a do $\pm 9\%$ u tyrosinu (viz Příloha 12). Pro jejich korekci byl použit izotopicky značený standard Phe-D5 a do budoucna je v plánu pro lepší správnost výsledků implementovat i izotopicky značený standard Tyr-D4.

HPLC separaci fenylalaninu a tyrosinu v přirozené formě je možné, díky jejich nižší polaritě, provádět na kolonách s vázanou reverzní fází C18. Primární volbou pro naši studii byla analytická kolona LiChroCart, Purospher Star RP-18e (125 × 4 mm; 5 μm), která díky své kratší délce umožňuje rychlejší čas analýz, navíc máme s touto kolonou dobré zkušenosti z předchozích studií [111, 117]. Jako mobilní fáze byla testována směs ACN a deionizované vody v různých poměrech. Nicméně s využitím ACN nebylo dosaženo potřebné intenzity píků ani požadovaná retence analytů, proto byla zvolena jako mobilní fáze směs methanolu a vody, u které došlo k trojnásobnému zvýšení intenzity odezvy u obou AMK. Pro lepší ionizaci byla přidána kyselina mravenčí. Provedenými experimenty bylo zjištěno, že změna koncentrace kyseliny mravenčí v mobilní fázi nemá vliv na intenzitu odezvy sledovaných AMK, a byla tedy přidána ve výsledné koncentraci 0,1% (v/v). Pro dosažení co nejlepší separace v nejkratším čase byla testována řada isokratických a gradientových elucí. Nejlepších výsledků bylo dosaženo isokratickou elucí s 50% methanolem ve vodě. Celková doba analýzy byla 2,5 min, tedy kratší než u dříve publikovaných metod pro simultánní stanovení těchto dvou AMK [111, 116, 118]. Souhrn optimalizovaných podmínek, při kterých byly měřeny vzorky DBS, je uveden v kapitole 3.4.3. Chromatografický záznam stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorku DBS, získaný při optimalizovaných podmínkách HPLC-MS/MS je uveden na Obrázku 11.



Obrázek 11 Chromatografický záznam stanovení fenylalaninu a tyrosinu metodou HPLC-MS/MS (Reálný vzorek suché kapky krve, chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.3).

4.4.2 Validace metody stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve

Extrakce fenylalaninu a tyrosinu ze vzorku suché kapky krve

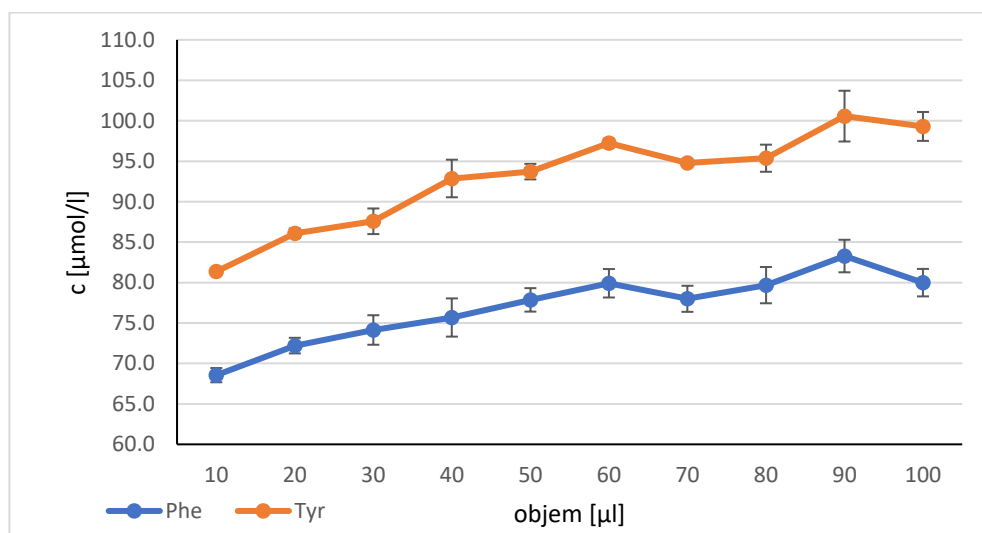
Pro extrakci fenylalaninu a tyrosinu ze vzorků DBS se nejčastěji používá methanol s malým obsahem vody, proto byla testována eluční činidla s vysokým obsahem methanolu ve vodě (85%, 90%, 95% a 100%) s přidavkem a bez přidavku kyseliny mravenčí. Kand'ár a kol. (2009) dosáhli vyšší účinnosti extrakce právě okyselením elučního činidla kyselinou chlorovodíkovou [117]. V našem případě jsme zvolili okyselení kyselinou mravenčí, což umožňovalo nástřik vzorku přímo do systému HPLC-MS/MS bez dalších úprav. Experimenty ukázaly, že přítomnost kyseliny mravenčí v elučním činidle má pouze malý vliv na účinnost extrakce a ve většině případů byla účinnost extrakce vyšší u činidel, ve kterých nebyla obsažena. Nejvyšší výtěžnosti extrakce bylo dosaženo pro obě sledované AMK se 100% methanolem (Příloha 10).

Pro zlepšení účinnosti extrakce se ve většině případech využívá extrakce za stálého míchání vzorku nebo je vzorek umístěn do ultrazvukové lázně. V našem případě jsme pro podpoření eluce testovali sonikaci a třepání. Testována byla eluce 100% methanolem s 5, 10, 20 a 30minutovou sonikací, třepáním a pouhým stáním zkumavky za laboratorní teploty.

V případě obou AMK bylo dosaženo nejvyšší účinnosti extrakce po 20minutovém třepání vzorku (Příloha 11).

Vliv objemu krve a hodnoty hematokritu na koncentraci fenylalaninu a tyrosinu

Vliv objemu krve na koncentraci fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích DBS byl testován tak, že na odběrovou kartu byly aplikovány různé objemy krve (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μl). V případě obou AMK byla zjištěna stejná závislost, stejně jako u metody popsané v předchozí kapitole a to, že se zvyšujícím se objemem aplikované krve na odběrovou kartu se zvyšovala i koncentrace fenylalaninu a tyrosinu (Graf 5). Pro zajištění správnosti výsledků je tedy nutné, aby reálné vzorky DBS obsahovaly stejné množství krve jako standardy a vzorky pro kontrolu kvality. V našem případě byl zvolen objem 50 μl .



Graf 5 Závislost koncentrace fenylalaninu a tyrosinu na objemu krve aplikovaném na odběrovou kartu

Vliv hodnoty HCT na koncentraci fenylalaninu a tyrosinu byl zkoumán na pěti úrovních hodnoty HCT (20 %, 30 %, 40 %, 50 % a 60 %) bez přídavku standardů a s jejich přídavkem na dvou hladinách koncentrace. Experimenty jsme zjistili, že hodnota HCT v rozmezí 20-60 % má poměrně výrazný vliv na koncentraci jak fenylalaninu, tak i tyrosinu (Tabulka 13). Hladina fenylalaninu vykazovala ve studovaném rozmezí rozdíl téměř až ± 15 % a tyrosin až ± 10 % od hladiny naměřené ve vzorku DBS s hodnotou HCT 40 %. Navíc byl pozorován trend, kdy se zvyšující se hodnotou HCT rostla také koncentrace obou AMK. Rostoucí trend byl pozorován i jinými autory v dříve publikovaných pracích a může být způsoben změnami objemu plazmy nebo sníženou distribucí krve skrze papír u vzorků s vysokou hodnotou HCT [96].

Tabulka 13 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací fenylalaninu a tyrosinu naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaženo ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %)

	Fenylalanin (%)			Tyrosin (%)		
	c0	c1	c2	c0	c1	c2
HCT 20	90,8	85,3	90,5	94,4	100,1	98,1
HCT 30	98,3	98,1	97,6	95,8	97,8	100,4
HCT 40	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HCT 50	104,1	100,4	108,4	102,1	104,0	107,7
HCT 60	104,5	107,3	110,0	108,7	107,1	109,3

c0, koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorku suché kapky krve bez přídavku standardů; c1-c2, koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve s přídavkem standardů; HCT, hematokrit.

Analytické parametry metody stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve

Souhrn analytických parametrů je uveden v Příloze 12. Pro získání spolehlivých výsledků byly standardy kalibrační řady připraveny v plně nesrážlivé krvi. Linearita byla testována v rozsahu 20–2000 $\mu\text{mol/l}$, kdy pro obě AMK byla linearita dosažena pouze do koncentrace 1200 $\mu\text{mol/l}$. Linearita byla potvrzena zpětně odečtenými koncentracemi standardů kalibrační řady. Správnost a přesnost odečtených koncentrací jednotlivých standardů kalibrační řady byla v rámci 10 % od nominální koncentrace. Přesnost metody byla testována na 3 hladinách koncentrace AMK. Variační koeficienty pro přesnost v sérii i mezi sériemi byly pod 5 % pro oba analyty. Výtěžnost extrakce byla hodnocena porovnáním plochy píku daných AMK získané proměřením vzorků DBS s plochou píku AMK získané proměřením vzorků kapalně krve o stejném objemu. Průměrná výtěžnost pro fenylalanin se pohybovala v rozmezí 97,1 % ($\pm 2,0$ %) a pro tyrosin 96,7 % ($\pm 1,9$ %). Stabilita fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích DBS je popsána v předchozí kapitole 4.3.2.

4.4.3 Stanovení koncentrace fenylalaninu a tyrosinu v krvi získané technikou suché kapky u dobrovolných dárců

Vyvinutá metoda HPLC-MS/MS byla použita pro simultánní stanovení tyrosinu a fenylalaninu ve 100 vzorcích tekuté krve a 100 identických vzorcích DBS získaných od dobrovolných dárců. V případě vzorků DBS byly hladiny fenylalaninu a tyrosinu stanoveny v celé skvrně s objemem krve 20 μ l a v terčíku vyseknutého ze vzorku DBS. Vzorky byly zpracovány a analyzovány podle protokolu popsaného v kapitole 3.4. Koncentrace fenylalaninu a tyrosinu v krvi dobrovolných dárců jsou uvedeny v Tabulce 14 jako medián a interkvartilové rozpětí. Volumetrická analýza celé skvrny vzorku DBS s fixním objemem krve byla testována jako alternativa, která by mohla být schopna eliminovat například vliv HCT a být tak implementována v metabolomických či klinických studiích, čímž by se usnadnil transport vzorků venózní krve do laboratoře. Překvapivě byly zjištěny nižší koncentrace fenylalaninu i tyrosinu ve vzorcích celé skvrny DBS oproti vzorkům kapalné krve se stejným objemem, který byl použit pro analýzu. Naproti tomu výsek ze vzorků DBS vykazuje téměř shodný medián koncentrací jako kapalné vzorky krve.

Tabulka 14 Medián koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích plné krve a suché kapky krve

	Fenylalanin	Tyrosin
	Medián (IQR) (μmol/l)	Medián (IQR) (μmol/l)
DBS výsek	65,1 (9,4)	87,4 (17,6)
DBS celá skvrna	57,5 (11,3)	79,9 (18,6)
Kapalná krev	65,6 (14,1)	88,5 (17,5)

DBS, suchá kapka krve; IQR, interkvartilové rozpětí

Pro ověření správnosti výsledků koncentrace naměřené ve vzorcích DBS, byla koncentrace fenylalaninu a tyrosinu naměřená v kapalné krvi porovnána s koncentrací naměřenou ve vzorcích DBS. Z grafů je patrná statisticky významná lineární závislost (statistická hladina významnosti $\alpha < 0,05$) koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích DBS na jejich koncentraci v kapalné krvi (Příloha 13 a Příloha 14). Ověření lineárního vztahu bylo provedeno korelační analýzou s využitím Spearmanova korelačního koeficientu. Regresní rovnice a korelační koeficienty jsou uvedeny v Tabulce 15. Statisticky významná korelace mezi

koncentracemi ve vzorcích DBS a koncentracemi ve vzorcích kapalné krve byla zjištěna pro fenylalanin i tyrosin. Korelační analýza navíc ukázala, že je lepší korelace koncentrace naměřené ve vzorcích kapalné krve na koncentraci ve výsecích vzorků DBS než v případě závislosti koncentrace naměřené v celých skvrnách vzorků DBS na koncentraci ve vzorcích kapalné krve.

Tabulka 15 Přehled korelačních koeficientů závislosti koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve na jejich koncentraci v kapalné krvi.

AMK	Závislost	Regresní rovnice	Korelační koeficient	Spearmanův korelační koeficient
Fenylalanin	DBS výsek vs kapalná krev	$y = 1,0376x - 1,5476$	0,9235	0,8947
	DBS celá vs kapalná krev	$y = 1,0229x + 7,1515$	0,9223	0,8894
	DBS výsek vs DBS celá	$y = 0,9309x - 2,9933$	0,9190	0,8928
Tyrosin	DBS výsek vs kapalná krev	$y = 0,9833x + 2,9390$	0,9314	0,9069
	DBS celá vs kapalná krev	$y = 0,8309x + 22,6503$	0,9191	0,8749
	DBS výsek vs DBS celá	$y = 1,0501x - 11,9679$	0,8992	0,8624

AMK, aminokyselina; DBS, suchá kapka krve

Výsledky koncentrací fenylalaninu a tyrosinu získané touto metodou (využívající reverzní stacionární fázi) byly porovnány s výsledky získané metodou využívající stacionární fázi HILIC, která je popsána v předchozí kapitole. Porovnání bylo provedeno pro ověření výsledků a také zjištění, zda metoda pro stanovení fenylalaninu a tyrosinu může sloužit jako rychlejší alternativa k metodě se stacionární fází HILIC. Pro zjištění závislosti koncentrace fenylalaninu a tyrosinu změřené metodou využívající stacionární fázi HILIC na koncentraci změřené metodou využívající reverzní fázi, byly získané koncentrace vyneseny do bodových grafů. Z grafů (Příloha 15) je patrná statisticky významná lineární korelace (statistická hladina významnosti $\alpha < 0,05$) mezi koncentracemi fenylalaninu a tyrosinu získanými metodou se stacionární fází HILIC a koncentracemi fenylalaninu a tyrosinu získanými metodou využívající reverzní stacionární fázi, a to jak pro vzorky DBS, tak pro vzorky kapalné krve. Přehled korelačních koeficientů je uveden v Tabulce 16.

Tabulka 16 Přehled korelačních koeficientů závislosti koncentrace změřené metodou využívající stacionární fázi HILIC na koncentraci změřené metodou využívající reverzní stacionární fázi

	Fenylalanin		Tyrosin	
	DBS	Kapalná krev	DBS	Kapalná krev
Korelační koeficient	0,9244	0,9161	0,9452	0,9096
Spearmanův korelační koeficient	0,8644	0,8725	0,9152	0,8738

DBS, suchá kapka krve

Stanovení koncentrace fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích DBS můžeme zařadit mezi rutinní testy, jelikož se plošně provádí v rámci novorozeneckého screeningu. V tomto případě se ovšem jedná pouze o screeningové vyšetření a je vždy nutná confirmace možného onemocnění více selektivní a robustní metodou. Z výše prezentovaných výsledků je patrné, že námi vyvinutá metoda pro simultánní stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích DBS je pro tyto účely vhodná. Může také sloužit jako rychlejší alternativa k metodě stanovující 20 AMK, která je prezentovaná v předchozí kapitole, a být tak využita pro monitorování stavu pacientů s PKU a TYR. Navíc výsledky ukázaly, že analýzou výseků ze vzorků DBS jsou poskytnuty téměř shodné výsledky jako při analýze kapalných vzorků krve, odebraných klasicky z kubitální žíly, což má potenciál implementovat naši metodu a celkově techniku DBS do metabolomických a klinických studií a usnadnit tak odběr a transport vzorků.

5 Závěr

V této dizertační práci byly vyvinuty a validovány tři metody HPLC-MS/MS pro stanovení vybraných 20 aminokyselin, alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích DBS. Pro extrakci analytů ze vzorků DBS byla použita jednokroková extrakce organickým rozpouštědlem s třepáním či sonikací, čímž byla zvýšena účinnost extrakce. Prezentované metody jsou dostatečně citlivé a selektivní pro stanovení koncentrace daných analytů ve vzorcích DBS, které se vyznačují malým objemem krve a dobrou stabilitou analytů. Metody prošly procesem optimalizace dle obecně uznávaných norem a analytické parametry byly ve všech případech uspokojivé. Ukázalo se, že objem krve nanesený na odběrové karty má vliv na koncentraci všech sledovaných analytů. Pro získání správných výsledků by mělo být na odběrovou kartu nanášeno, pokud možno stejné množství krve, a to okolo 50 μ l. Dále bylo zjištěno, že hodnota HCT má poměrně významný vliv na hladiny AMK ve vzorcích DBS. Tento problém se dá eliminovat přípravou standardů v krvi s hodnotou HCT, jaká je očekávána u sledované populace, případně se dají využít nová odběrová zařízení s fixním objemem krve aplikovaným na odběrové karty. Naproti tomu vliv hodnoty HCT na koncentraci KM a ALA byl zanedbatelný. Použitelnost metod byla testována na 100 vzorcích DBS od dobrovolných dárců. Výsledné koncentrace byly pro všechny stanovované analyty ve fyziologickém rozmezí. Navíc, srovnání koncentrací sledovaných analytů ve vzorcích DBS s koncentracemi v identických vzorcích plné kapalné krve ukazuje lineární vztah a statisticky významnou korelaci.

Z množství benefitů techniky DBS a námi prezentovaných výsledků vyplývá, že tato technika se jeví jako vhodná alternativa ke klasickému odběru venózní krve punkcí. Vzorky DBS mají také potenciál být implementovány v metabolomických studiích s velkou kohortou pacientů, či být využity pro screening poruchy metabolismu a monitorování účinků nasazené léčby.

6 Zdroje

- [1] HASIN, Yehudit, Marcus SELDIN a Aldons LUSIS. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* [online]. 2017, **18**(1), 1–15. ISSN 1474760X. Dostupné z: doi:10.1186/s13059-017-1215-1
- [2] SINDELAR, Miriam a Gary J. PATTI. Chemical Discovery in the Era of Metabolomics. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2020, **142**(20), 9097–9105. ISSN 15205126. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.9b13198
- [3] IVANISEVIC, Julijana a Gary SIUZDAK. The Role of Metabolomics in Brain Metabolism Research. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* [online]. 2015, **10**(3), 391–395. ISSN 15571904. Dostupné z: doi:10.1007/s11481-015-9621-1
- [4] CLISH, Clary B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Molecular Case Studies* [online]. 2015, **1**(1), a000588. ISSN 2373-2865. Dostupné z: doi:10.1101/mcs.a000588
- [5] DETTMER, Katja, Pavel A. ARONOV a Bruce D. HAMMOCK. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2007, **26**(1), 51–78. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20108
- [6] RIBBENSTEDT, Anton, Haizea ZIARRUSTA a Jonathan P. BENSKIN. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS ONE* [online]. 2018, **13**(11), 1–18. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0207082
- [7] BHAGAVAN, N.V. a Chung-Eun HA. Amino Acids. In: *Essentials of Medical Biochemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2015, s. 21–29. ISBN 9780124166875. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416687-5.00003-8
- [8] SONG, Yanting, Chang XU, Hiroshi KUROKI, Yiyi LIAO a Makoto TSUNODA. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **147**, 35–49. ISSN 1873264X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.08.050
- [9] KRUMPOCHOVA, P., B. BRUYNEEL, D. MOLENAAR, A. KOUKOU, M. WUHRER, W. M.A. NIESSEN a M. GIERA. Amino acid analysis using chromatography-mass spectrometry: An inter platform comparison study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, **114**, 398–407. ISSN 1873264X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.06.001
- [10] SANTA, Tomofumi. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* [online]. 2011, **25**(1), 1–10. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1548
- [11] ZHU, Yunting, Pan DENG a Dafang ZHONG. Derivatization methods for LC-MS analysis of endogenous compounds. *Bioanalysis* [online]. 2015, **7**(19), 2557–2581. ISSN 17576199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.15.183
- [12] MALSAGOVA, Kristina, Artur KOPYLOV, Alexander STEPANOV, Tatyana BUTKOVA, Alexander IZOTOV a Anna KAYSHEVA. Dried blood spot in laboratory: Directions and prospects. *Diagnostics* [online]. 2020, **10**(4). ISSN 20754418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics10040248

- [13] BECKER, Susen, Linda KORTZ, Christin HELMSCHRODT, Joachim THIERY a Uta CEGLAREK. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2012, **883–884**, 68–75. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.10.018
- [14] XU, Weihua, Congcong ZHONG, Chunpu ZOU, Bing WANG a Ning ZHANG. Analytical methods for amino acid determination in organisms. *Amino Acids* [online]. 2020, **52(8)**, 1071–1088. ISSN 14382199. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-020-02884-7
- [15] VIOLI, Jake P., David P. BISHOP, Matthew P. PADULA, Joel R. STEELE a Kenneth J. RODGERS. Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **131**, 116018. ISSN 18793142. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2020.116018
- [16] BARNETT, David a, Barbara ELLS, Roger GUEVREMONT a Randy W PURVES. Separation of leucine and isoleucine by electrospray ionization-high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 1999, **10(12)**, 1279–1284. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1016/S1044-0305(99)00098-7
- [17] RASHED, Mohamed S. Clinical applications of tandem mass spectrometry: Ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 2001, **758(1)**, 27–48. ISSN 13872273. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(01)00100-1
- [18] WASIM, Muhammad, Fazli Rabbi AWAN, Haq Nawaz KHAN, Abdul TAWAB, Mazhar IQBAL a Hina AYESHA. Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. *Biochemical Genetics* [online]. 2018, **56(1–2)**, 7–21. ISSN 15734927. Dostupné z: doi:10.1007/s10528-017-9825-6
- [19] ALIU, Ermal, Shibani KANUNGO a Georgianne L. ARNOLD. Amino acid disorders. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2018, **6(24)**, 471–471. ISSN 23055839. Dostupné z: doi:10.21037/atm.2018.12.12
- [20] CARLING, Rachel S, Erin C EMMETT a Stuart J MOAT. Clinica Chimica Acta Evaluation of volumetric blood collection devices for the measurement of phenylalanine and tyrosine to monitor patients with phenylketonuria. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2022, **535(August)**, 157–166. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2022.08.005
- [21] MCBRIDE, Kim L, Jill PLUCINICZAK, Timothy RHYAND a Dennis BARTHOLOMEW. Phenylalanine and tyrosine measurements across gestation by tandem mass spectrometer on dried blood spot cards from normal pregnant women. *Genetics in Medicine* [online]. 2019, **21(8)**, 1821–1826. ISSN 1098-3600. Dostupné z: doi:10.1038/s41436-018-0407-8
- [22] LA MARCA, Giancarlo, Sabrina MALVAGIA, Serena MATERAZZI, Maria Luisa DELLA BONA, Sara BOENZI, Diego MARTINELLI a Carlo DIONISI-VICI. LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination on a Dried Blood Spot of Multiple Analytes Relevant for Treatment Monitoring in Patients with Tyrosinemia Type I. *Analytical Chemistry* [online]. 2012, **84(2)**, 1184–1188. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analychem.2c00000

z: doi:10.1021/ac202695h

- [23] RUSSO, Pierre A., Grant A. MITCHELL a Robert M. TANGUAY. Tyrosinemia: A review. *Pediatric and Developmental Pathology* [online]. 2001, **4**(3), 212–221. ISSN 10935266. Dostupné z: doi:10.1007/s100240010146
- [24] AMES, B. N., R. CATHCART, E. SCHWIERS a P. HOCHSTEIN. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1981, **78**(11), 6858–6862. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.78.11.6858
- [25] KAND'ÁR, Roman, Pavla ŽÁKOVÁ a Vladimíra MUŽÁKOVÁ. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2006, **365**(1–2), 249–256. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2005.09.002
- [26] GLANTZOUNIS, G., E. TSIMOYIANNIS, A. KAPPAS a D. GALARIS. Uric Acid and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2005, **11**(32), 4145–4151. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/138161205774913255
- [27] DURANTON, Flore, Gerald COHEN, Rita DE SMET, Mariano RODRIGUEZ, Joachim JANKOWSKI, Raymond VANHOLDER a Angel ARGILES. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 2012, **23**(7), 1258–1270. ISSN 10466673. Dostupné z: doi:10.1681/ASN.2011121175
- [28] GALASSI, Francesco M. a Claudio BORGHI. A brief history of uric acid: From gout to cardiovascular risk factor. *European Journal of Internal Medicine* [online]. 2015, **26**(5), 373. ISSN 18790828. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejim.2015.04.005
- [29] KANDĀR, R, P ŽÁKOVÁ, T MOCO VÁ, J SKALICKÝ a J KOVAŘÍK. Stanovení kyseliny močové v lidském séru pomocí HPLC s UV detekcí – porovnání s enzymatickou metodou. 2010, **18**(3), 167–174.
- [30] ELLERBE, Polly, Alex COHEN, Michael J. WELCH a Edward V. WHITE. Determination of Serum Uric Acid by Isotope Dilution Mass Spectrometry as a New Candidate Definitive Method. *Analytical Chemistry* [online]. 1990, **62**(20), 2173–2177. ISSN 15206882. Dostupné z: doi:10.1021/ac00219a004
- [31] WANG, Qiangwei, Xu WEN a Jinming KONG. Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **50**(4), 359–375. ISSN 15476510. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2019.1637711
- [32] ZUO, Yuegang, Chengjun WANG, Jiping ZHOU, Amita SACHDEVA a Vanessa C. RUELOS. Simultaneous Determination of Creatinine and Uric Acid in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Sciences* [online]. 2008, **24**(12), 1589–1592. ISSN 13482246. Dostupné z: doi:10.2116/analsci.24.1589
- [33] LIU, Xin Ying, Ying LUO, Chun Yu ZHOU, Ai PENG a Jun Yan LIU. A sensitive and accurate method to simultaneously measure uric acid and creatinine in human saliva by using LC-MS/MS. *Bioanalysis* [online]. 2017, **9**(22), 1751–1760. ISSN 17576199. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2017-0189
- [34] LUO, Xi, Ningfang CAI a Zeneng CHENG. Determination of uric acid in plasma by LC-MS/MS and its application to an efficacy evaluation of recombinant urate oxidase. *Analytical Sciences* [online]. 2013, **29**(7), 709–713. ISSN 13482246. Dostupné

z: doi:10.2116/analsci.29.709

- [35] DAI, Xinhua, Xiang FANG, Chunmei ZHANG, Ruifeng XU a Bei XU. Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2007, **857**(2), 287–295. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.07.035
- [36] LI, Qiaozhi, Yanli QIU, Weina HAN, Yaqin ZHENG, Xiaoying WANG, Dandan XIAO, Min MAO a Qian LI. Determination of uric acid in biological samples by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and study on pathogenesis of pulmonary arterial hypertension in pulmonary artery endothelium cells. *RSC Advances* [online]. 2018, **8**(45), 25808–25814. ISSN 20462069. Dostupné z: doi:10.1039/c7ra12702b
- [37] GOELZER, Anne, Fadia BEKKAL BRIKCI, Isabelle MARTIN-VERSTRAETE, Philippe NOIROT, Philippe BESSIÈRES, Stéphane AYMERICH a Vincent FROMION. Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *BMC Systems Biology* [online]. 2008, **2**, 1–18. ISSN 17520509. Dostupné z: doi:10.1186/1752-0509-2-20
- [38] CZAUDERNA, M. a J. KOWALCZYK. Simultaneous measurement of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in blood by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* [online]. 1997, **704**(1–2), 89–98. ISSN 15726495. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(97)00459-3
- [39] GRUBER, Jan, Soon Yew TANG, Andrew M. JENNER, Ian MUDWAY, Anders BLOMBERG, Annelie BEHNDIG, Katherine KASIMAN, Chung Yung J. LEE, Raymond C.S. SEET, Wenxia ZHANG, Christopher CHEN, Frank J. KELLY a Barry HALLIWELL. Allantoin in human plasma, serum, and nasal-lining fluids as a biomarker of oxidative stress: Avoiding artifacts and establishing real in vivo concentrations. *Antioxidants and Redox Signaling* [online]. 2009, **11**(8), 1767–1776. ISSN 15230864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2008.2364
- [40] KANĎÁR, R., X. ŠTRAMOVÁ, P. DRÁBKOVÁ a J. KŘENKOVÁ. A monitoring of allantoin, uric acid, and malondialdehyde levels in plasma and erythrocytes after ten minutes of running activity. *Physiological Research*. 2014, **63**(6), 753–762. ISSN 08628408.
- [41] KIM, Kyung Mee, George N. HENDERSON, Xiaosen OUYANG, Reginald F. FRYE, Yuri Y. SAUTIN, Daniel I. FEIG a Richard J. JOHNSON. A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2009, **877**(22), 2032–2038. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.05.037
- [42] ANDRIES, Asmin, Stéphanie DE RECHTER, Peter JANSSENS, Djalila MEKAHLI a Ann VAN SCHEPDAEL. Simultaneous determination of allantoin and adenosine in human urine using liquid chromatography – UV detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2018, **1096**(August), 201–207. ISSN 1873376X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2018.08.026

- [43] HASIKOVA, Lenka, Marketa PAVLIKOVA, Hana HULEJOVA, Petr KOZLIK, Kveta KALIKOVA, Aparna MAHAJAN, Martin HERRMANN, Blanka STIBURKOVA a Jakub ZAVADA. Serum uric acid increases in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases after 3 months of treatment with TNF inhibitors. *Rheumatology International* [online]. 2019, **39**(10), 1749–1757. ISSN 1437160X. Dostupné z: doi:10.1007/s00296-019-04394-6
- [44] KOZLIK, Petr, Lenka HASIKOVA, Blanka STIBURKOVA, Jakub ZAVADA a Kveta KALIKOVA. Rapid and reliable HILIC-MS/MS method for monitoring allantoin as a biomarker of oxidative stress. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, **589**(November 2019), 113509. ISSN 10960309. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2019.113509
- [45] KIRWAN, Jennifer A., Lorraine BRENNAN, David BROADHURST, Oliver FIEHN, Marta CASCANTE, Warwick B. DUNN, Michael A. SCHMIDT a Vidya VELAGAPUDI. Preanalytical processing and biobanking procedures of biological samples for metabolomics research: A white paper, community perspective (for “Precision medicine and pharmacometabolomics task group”—The metabolomics society initiative). *Clinical Chemistry* [online]. 2018, **64**(8), 1158–1182. ISSN 15308561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2018.287045
- [46] ANDRLOVA, L. a R. KANDAR. The dried blood spot sampling method in the laboratory medicine. *Bratislava Medical Journal* [online]. 2019, **120**(03), 223–234. ISSN 1336-0345. Dostupné z: doi:10.4149/BLL_2019_035
- [47] FREEMAN, Jeffrey D., Lori M. ROSMAN, Jeremy D. RATCLIFF, Paul T. STRICKLAND, David R. GRAHAM a Ellen K. SILBERGELD. State of the science in dried blood spots. *Clinical Chemistry* [online]. 2018, **64**(4), 656–679. ISSN 15308561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2017.275966
- [48] SMIT, Pieter W., Ivo ELLIOTT, Rosanna W. PEELING, David MABEY a Paul N. NEWTON. Review article: An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [online]. 2014, **90**(2), 195–210. ISSN 00029637. Dostupné z: doi:10.4269/ajtmh.13-0463
- [49] SNIJDEWIND, Ingrid J.M., Jeroen J.A. VAN KAMPEN, Pieter L.A. FRAAIJ, Marchina E. VAN DER ENDE, Albert D.M.E. OSTERHAUS a Rob A. GRUTERS. Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Research* [online]. 2012, **93**(3), 309–321. ISSN 01663542. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2011.12.011
- [50] LI, Wenkui a Francis L.S. TSE. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography* [online]. 2010, **24**(1), 49–65. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1367
- [51] MEI, Joanne V., Sherri D. ZOBEL, Elizabeth M. HALL, Víctor R. DE JESÚS, Barbara W. ADAM a W. Harry HANNON. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis* [online]. 2010, **2**(8), 1397–1403. ISSN 17576180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.10.73
- [52] LIM, Mark D. Review article: Dried blood spots for global health diagnostics and surveillance: Opportunities and challenges. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [online]. 2018, **99**(2), 256–265. ISSN 00029637. Dostupné z: doi:10.4269/ajtmh.17-0889

- [53] MOAT, Stuart J., Roanna S. GEORGE a Rachel S. CARLING. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *International Journal of Neonatal Screening* [online]. 2020, **6**(2), 1–17. ISSN 2409515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns6020026
- [54] GEORGE, Roanna S. a Stuart J. MOAT. Effect of dried blood spot quality on newborn screening analyte concentrations and recommendations for minimum acceptance criteria for sample analysis. *Clinical Chemistry* [online]. 2016, **62**(3), 466–475. ISSN 15308561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2015.247668
- [55] MOAT, Stuart J., Catherine DIBDEN, Lesley TETLOW, Caroline GRIFFITH, Jim CHILCOTT, Roanna GEORGE, Laura HAMILTON, Teresa Hy WU, Finlay MACKENZIE a Susan Kate HALL. Effect of blood volume on analytical bias in dried blood spots prepared for newborn screening external quality assurance. *Bioanalysis* [online]. 2020, **12**(2), 99–109. ISSN 17576199. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2019-0201
- [56] PENG, Minzhi, Li LIU a Lijun PENG. Evaluation of factors influencing accuracy in the analysis of succinylacetone in dried blood spots. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2012, **413**(15–16), 1265–1269. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2012.04.006
- [57] LAWSON, A. J., L. BERNSTONE a S. K. HALL. Newborn screening blood spot analysis in the uk: Influence of spot size, punch location and haematocrit. *Journal of Medical Screening* [online]. 2016, **23**(1), 7–16. ISSN 14755793. Dostupné z: doi:10.1177/0969141315593571
- [58] WAGNER, Michel, David TONOLI, Emmanuel VARESIIO a Gérard HOPFGARTNER. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2016, **35**(3), 361–438. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21441
- [59] HOLUB, Margareta, Karin TUSCHL, Rene RATSCHMANN, Kristina Anna STRNADOVÁ, Adolf MÜHL, Georg HEINZE, Wolfgang SPERL a Olaf A. BODAMER. 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* [online]. 2006, **373**(1–2), 27–31. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2006.04.013
- [60] KAYIRAN, S. M., Namik ÖZBEK, M. TURAN a B. GÜRAKAN. Significant differences between capillary and venous complete blood counts in the neonatal period. *Clinical and Laboratory Haematology* [online]. 2003, **25**(1), 9–16. ISSN 01419854. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2257.2003.00484.x
- [61] DENNIFF, Philip a Neil SPOONER. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis* [online]. 2010, **2**(8), 1385–1395. ISSN 17576180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.10.103
- [62] VELGHE, Sofie, Lisa DELAHAYE a Christophe P. STOVE. Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, **163**, 188–196. ISSN 1873264X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.10.010
- [63] DE KESEL, Pieter M.M., Nele SADONES, Sara CAPIAU, Willy E. LAMBERT a Christophe P. STOVE. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: Challenges and solutions. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(16), 2023–2041. ISSN 17576180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.13.156

- [64] NETO, Ricardo, Andrew GOOLEY, Michael C. BREADMORE, Emily F. HILDER a Florian LAPIERRE. Precise, accurate and user-independent blood collection system for dried blood spot sample preparation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, **410**(14), 3315–3323. ISSN 16182650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-0993-y
- [65] LEUTHOLD, Luc Alexis, Olivier HEUDI, Julien DÉGLON, Marc RACCUGLIA, Marc AUGSBURGER, Franck PICARD, Olivier KRETZ a Aurélien THOMAS. New microfluidic-based sampling procedure for overcoming the hematocrit problem associated with dried blood spot analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, **87**(4), 2068–2071. ISSN 15206882. Dostupné z: doi:10.1021/ac503931g
- [66] VELGHE, Sofie a Christophe P. STOVE. Evaluation of the Capitainer-B Microfluidic Device as a New Hematocrit-Independent Alternative for Dried Blood Spot Collection. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, **90**(21), 12893–12899. ISSN 15206882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b03512
- [67] SPOONER, Neil, Philip DENNIFF, Luc MICHIELSEN, Ronald DE VRIES, Qin C. JI, Mark E. ARNOLD, Karen WOODS, Eric J. WOOLF, Yang XU, Valérie BOUTET, Patricia ZANE, Stuart KUSHON a James B. RUDGE. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: Overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis* [online]. 2015, **7**(6), 653–659. ISSN 17576199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.14.310
- [68] STURM, Robert, Jack HENION, Richard ABBOTT a Phil WANG. Novel membrane devices and their potential utility in blood sample collection prior to analysis of dried plasma spots. *Bioanalysis* [online]. 2015, **7**(16), 1987–2002. ISSN 17576199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.15.98
- [69] LI, Yuanyuan, Jack HENION, Richard ABBOTT a Phillip WANG. The use of a membrane filtration device to form dried plasma spots for the quantitative determination of guanfacine in whole blood. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2012, **26**(10), 1208–1212. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.6212
- [70] LI, Yuanyuan, Jack HENION, Richard ABBOTT a Phillip WANG. Semi-automated direct elution of dried blood spots for the quantitative determination of guanfacine in human blood. *Bioanalysis* [online]. 2012, **4**(12), 1445–1456. ISSN 17576180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.12.111
- [71] ABU-RABIE, Paul, Philip DENNIFF, Neil SPOONER, Jan BRYNJOLFFSEN, Paul GALLUZZO a Giles SANDERS. Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(22), 8779–8786. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/ac202321q
- [72] SMITH, Graeme. European medicines agency guideline on bioanalytical method validation: What more is there to say? *Bioanalysis* [online]. 2012, **4**(8), 865–868. ISSN 17576180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.12.44
- [73] SIEBENHAAR, Markus, Kai KÜLLMER, Nuno Miguel DE BARROS FERNANDES, Volker HÜLLEN a Carsten HOPF. 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* [online]. 2015, **407**(23), 7229–7238. ISSN 16182650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8887-8

- [74] KOBRYNSKI, Lisa J., Golriz K. YAZDANPANA, Deborah KOONTZ, Francis K. LEE a Robert F. VOGT. MALDI-TOF-MS assay to detect the hemizygous 22q11.2 deletion in DNA from dried blood spots. *Clinical Chemistry* [online]. 2016, **62**(1), 287–292. ISSN 15308561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2015.247148
- [75] HIGASHI, Tatsuya, Tadashi NISHIO, Syouko UCHIDA, Kazutake SHIMADA, Masaru FUKUSHI a Masako MAEDA. Simultaneous determination of 17 α -hydroxypregnenolone and 17 α -hydroxyprogesterone in dried blood spots from low birth weight infants using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2008, **48**(1), 177–182. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2008.05.010
- [76] LEE, Terry D. *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition* [online]. 2011. ISBN 9780470167540. Dostupné z: doi:10.1007/s13361-010-0021-8
- [77] GUILLARME, Davy a Jean-Luc VEUTHEY. *Theory and Practice of UHPLC and UHPLC-MS* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2017. ISBN 9780128117323. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-811732-3.00001-7
- [78] DITTMANN, Monika M. a Xiaoli WANG. *New Materials for Stationary Phases in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2017. ISBN 9780128117323. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-811732-3.00006-6
- [79] ZHANG, Wei. Fluorocarbon stationary phases for liquid chromatography applications. *Journal of Fluorine Chemistry* [online]. 2008, **129**(10), 910–919. ISSN 00221139. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfluchem.2008.07.001
- [80] TANG, Dao-Quan, Li ZOU, Xiao-Xing YIN a Choon Nam ONG. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2016, **35**(5), 574–600. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21445
- [81] JANDERA, Pavel. *Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 2017. ISBN 9780128117323. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-811732-3.00002-9
- [82] GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. ISBN 978-3-642-10709-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-10711-5
- [83] WATSON, J Throck a O David SPARKMAN. Electrospray Ionization. In: *Introduction to Mass Spectrometry* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007, s. 485–518. ISBN 9780470516898. Dostupné z: doi:10.1002/9780470516898.ch8
- [84] KINTER, Michael. Mass spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 1995, **67**(12), 493–497. ISSN 15206882. Dostupné z: doi:10.1021/ac00108a034
- [85] MILLINGTON, D. S., N. KODO, D. L. NORWOOD a C. R. ROE. Tandem mass spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 1990, **13**(3), 321–324. ISSN 01418955. Dostupné z: doi:10.1007/BF01799385
- [86] LIN, Shih Yi, Wu Huei HSU, Cheng Chieh LIN a Chao Jung CHEN. Mass spectrometry-based proteomics in chest medicine, gerontology, and nephrology: Subgroups omics for personalized medicine. *BioMedicine (Netherlands)* [online]. 2014, **4**(4), 25–36.

- [87] HO, C S, C W K LAM, M H M CHAN, R C K CHEUNG, L K LAW, L C W LIT, K F NG, M W M SUEN a H L TAI. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews* [online]. 2003, **24**(1), 3–12. ISSN 0159-8090. Dostupné z: doi:10.1002/9781118307816.ch34
- [88] TELEKI, Attila a Ralf TAKORS. *Clinical Metabolomics* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-7591-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7592-1
- [89] MIHALIK, Stephanie J., Sara F. MICHALISZYN, Javier DE LAS HERAS, Fida BACHA, So Jung LEE, Donald H. CHACE, Victor R. DEJESUS, Jerry VOCKLEY a Silva A. ARSLANIAN. Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: Evidence for enhanced mitochondrial oxidation. *Diabetes Care* [online]. 2012, **35**(3), 605–611. ISSN 01495992. Dostupné z: doi:10.2337/DC11-1577
- [90] ZHOU, Yong, Ling QIU, Qian XIAO, Yi WANG, Xiangying MENG, Rong XU, Siyang WANG a Risu NA. Obesity and diabetes related plasma amino acid alterations. *Clinical Biochemistry* [online]. 2013, **46**(15), 1447–1452. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.05.045
- [91] WURTZ, Peter, Pasi SOININEN, Antti J. KANGAS, Tapani RÖNNEMAA, Terho LEHTIMÄKI, Mika KÄHÖNEN, Jorma S. VIIKARI, Olli T. RAITAKARI a Mika ALA-KORPELA. Branched-chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in young adults. *Diabetes Care* [online]. 2013, **36**(3), 648–655. ISSN 01495992. Dostupné z: doi:10.2337/dc12-0895
- [92] MOISON, Ralf M.W., Arnout Jan DE BEAUFORT, Adriaan A. HAASNOOT, Tom M.A.R. DUBBELMAN, Diny VAN ZOEREN-GROBBEN a Howard M. BERGER. Uric acid and ascorbic acid redox ratios in plasma and tracheal aspirate of preterm babies with acute and chronic lung disease. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1997, **23**(2), 226–234. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(97)00033-6
- [93] ESIABA, Ijeoma, Danilyn M. ANGELES, Megan S. HOLDEN, John B.C. TAN, Yayesh ASMEROM, Gerald GOLLIN a Danilo S. BOSKOVIC. Urinary Allantoin Is Elevated in Severe Intraventricular Hemorrhage in the Preterm Newborn. *Translational Stroke Research* [online]. 2016, **7**(2), 97–102. ISSN 1868601X. Dostupné z: doi:10.1007/s12975-015-0405-y
- [94] YARDIM-AKAYDIN, S., A. SEPICI, Y. ÖZKAN, B. ŞİMŞEK a V. SEPICI. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology* [online]. 2006, **35**(1), 61–64. ISSN 03009742. Dostupné z: doi:10.1080/03009740510026878
- [95] CAUSSÉ, Elizabeth, Pauline FOURNIER, Jérôme RONCALLI, Robert SALVAYRE a Michel GALINIER. Serum allantoin and aminothiols as biomarkers of chronic heart failure. *Acta Cardiologica* [online]. 2017, **72**(4), 397–403. ISSN 03737934. Dostupné z: doi:10.1080/00015385.2017.1335104
- [96] LAWSON, AJ, L BERNSTONE a SK HALL. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. *Journal of Medical Screening* [online]. 2016, **23**(1), 7–16. ISSN 0969-1413. Dostupné

z: doi:10.1177/0969141315593571

- [97] O'MARA, M, K OLSON, Y YUEH, J DUNN, N SPOONER a B HUDSON-CURTIS. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis*. 2011, **3**(20), 2335–2347.
- [98] THAKARE, Rhishikesh, Yashpal S CHHONKER, Nagsen GAUTAM, Jawaher Abdullah ALAMOUDI a Yazen ALNOUTI. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Quantitative analysis of endogenous compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2016, **128**, 426–437. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2016.06.017
- [99] TURNER, Rufus, Lisa K. STAMP a Anthony J. KETTLE. Detection of allantoin in clinical samples using hydrophilic liquid chromatography with stable isotope dilution negative ion tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2012, **891–892**, 85–89. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2012.02.009
- [100] CHUNG, Wai Yuen a Iris F.F. BENZIE. Plasma allantoin measurement by isocratic liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Method evaluation and application in oxidative stress biomonitoring. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2013, **424**, 237–244. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2013.06.015
- [101] NAKANISHI, Tsuyoshi, Takako HISHIKI, Takayuki MORIKAWA, Mayumi KAJIMURA a Makoto SUEMATSU. Simultaneous analysis of primary metabolites by triple quadrupole LC/MS/MS using pentafluorophenylpropyl column. *Shimadzu Review*. 2013, **SR14_007E**, 1–7.
- [102] REDDY, Todime M., Cristina I. TAMA a Roger N. HAYES. A dried blood spots technique based LC-MS/MS method for the analysis of posaconazole in human whole blood samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2011, **879**(30), 3626–3638. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.10.008
- [103] VU, D. H., R. A. KOSTER, J. W.C. ALFFENAAR, J. R.B.J. BROUWERS a D. R.A. UGES. Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2011, **879**(15–16), 1063–1070. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.017
- [104] RESANO, M., M. A. BELARRA, E. GARCÍA-RUIZ, M. ARAMENDÍA a L. RELLO. Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **99**, 75–87. ISSN 18793142. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2017.12.004
- [105] HAN, Jun, Rehan HIGGINS, Mark D. LIM, Karen LIN, Juncong YANG a Christoph H. BORCHERS. Short-Term Stabilities of 21 Amino Acids in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry* [online]. 2018, **64**(2), 400–402. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2017.278457
- [106] GOLBAHAR, J., DD ALTAYAB a 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* [online]. 2014, **21**(1), 5–9. ISSN 0969-1413. Dostupné z: doi:10.1177/0969141314525367

- [107] STRNADOVÁ, Kristina Anna, Margareta HOLUB, Adolf MÜHL, Georg HEINZE, Rene RATSCHMANN, Hermann MASCHER, Sylvia STÖCKLER-IPSIROGLU, Franz WALDHAUSER, Felix VOTAVA, Jan LEBL a Olaf A. BODAMER. Long-Term Stability of Amino Acids and Acylcarnitines in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry* [online]. 2007, **53**(4), 717–722. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2006.076679
- [108] HAGENFELDT, Lars a Anund ARVIDSSON. The distribution of amino acids between plasma and erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* [online]. 1980, **100**(2), 133–141. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/0009-8981(80)90074-1
- [109] FEKKES, Durk, Astrid VAN DALEN, Margriet EDELMAN a Ans VOSKUILEN. 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 Sciences and Applications* [online]. 1995, **669**(2), 177–186. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(95)00111-U
- [110] LIU, Linsheng, Xurui JIN, Yangfeng WU, Mei YANG, Tao XU, Xianglian LI, Jianhong REN a Lijing L. YAN. A Novel Dried Blood Spot Detection Strategy for Characterizing Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* [online]. 2020, **7**(October), 1–10. ISSN 2297-055X. Dostupné z: doi:10.3389/fcvm.2020.542519
- [111] KAND'ÁR, Roman a Pavla ŽÁKOVÁ. Determination of phenylalanine and tyrosine in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2009, **877**(30), 3926–3929. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.09.045
- [112] KEFFLER, S., R. DENMEADE a A. GREEN. Neonatal screening for phenylketonuria: Evaluation of an automated enzymatic method. *Annals of Clinical Biochemistry* [online]. 1994, **31**(2), 134–139. ISSN 17581001. Dostupné z: doi:10.1177/000456329403100204
- [113] DENG, Chunhui, Yonghui DENG, Bin WANG a Xiuhan YANG. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2002, **780**(2), 407–413. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(02)00632-3
- [114] YAZDANPANA, Mehrdad a Libin YUAN. A highly accurate mass spectrometry method for the quantification of phenylalanine and tyrosine on dried blood spots: Combination of liquid chromatography, phenylalanine / tyrosine-free blood calibrators and multi-point / dynamic calibration. *Clinical Biochemistry* [online]. 2022, **101**(November 2021), 35–41. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2021.12.004
- [115] GOUDA, Amr S a Walaa S NAZIM. Development of a simple method for the analysis of phenylalanine in dried blood spot using tandem mass spectrometry. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* [online]. 2020, **21**(1), 56. ISSN 2090-2441. Dostupné z: doi:10.1186/s43042-020-00100-5
- [116] VAN VLIET, Kimber, Wiggert G. VAN GINKEL, Esther VAN DAM, Pim DE BLAAUW, Martijn KOEHORST, Hermi A KINGMA, Francjan J. VAN SPRONSEN a M. Rebecca HEINER-FOKKEMA. Dried blood spot versus venous blood sampling for

- phenylalanine and tyrosine. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2020, **15**(1), 82. ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/s13023-020-1343-7
- [117] KAND'ÁR, Roman, Pavla ŽÁKOVÁ, Jana JIROŠOVÁ a Michaela SLADKÁ. Determination of branched chain amino acids, methionine, phenylalanine, tyrosine and α -keto acids in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2009, **47**(5), 565–572. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2009.123
- [118] PECCE, Rita, Emanuela SCOLAMIERO, Laura INGENITO, Giancarlo PARENTI a Margherita RUOPPOLO. Optimization of an HPLC method for phenylalanine and tyrosine quantization in dried blood spot. *Clinical Biochemistry* [online]. 2013, **46**(18), 1892–1895. ISSN 0009-9120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.08.022

7 Přílohy

Příloha 1 Informovaný souhlas dárce s účastí ve studii.....	94
Příloha 2 Analytické parametry metody stanovení alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve.	95
Příloha 3 2-D bodové grafy závislosti koncentrace alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích kapalně krve na jejich koncentraci ve vzorcích DBS.	96
Příloha 4 Vliv složení elučního činidla na eluci aminokyselin ze vzorků suché kapky krve.	97
Příloha 5 Vliv sonikace a doby eluce na účinnost extrakce aminokyselin ze vzorků suché kapky krve.	98
Příloha 6 Vliv objemu aplikované krve na odběrovou kartu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve.....	99
Příloha 7 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací aminokyselin naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaženo ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %).	100
Příloha 8 Analytické parametry metody stanovení aminokyselin ve vzorku suché kapky krve.	103
Příloha 9 2-D bodové grafy závislosti koncentrace aminokyselin ve vzorcích kapalně krve na koncentraci aminokyselin ve vzorcích DBS.	105
Příloha 10 Vliv složení elučního činidla na eluci fenylalaninu a tyrosinu ze vzorků suché kapky krve.	110
Příloha 11 Vliv sonikace, třepání a doby eluce na účinnost extrakce fenylalaninu a tyrosinu ze vzorků suché kapky krve.	111
Příloha 12 Analytické parametry metody stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve.....	112
Příloha 13 2-D bodové grafy závislosti koncentrace fenylalaninu ve vzorcích kapalně krve na koncentraci fenylalaninu ve vzorcích DBS.	113
Příloha 14 2-D bodové grafy závislosti koncentrace tyrosinu ve vzorcích kapalně krve na koncentraci tyrosinu ve vzorcích DBS.	114
Příloha 15 2-D bodové grafy závislosti koncentrace fenylalaninu a tyrosinu změřené metodou HILIC na jejich koncentraci změřené metodou na reverzní fázi.	115

Informovaný souhlas

Studie: zavedení metod pro stanovení vybraných metabolitů (aminokyseliny, mastné kyseliny, oxokyseliny, vybrané vitamíny) v krvi získané technikou suché kapky

Číselný kód

jméno a příjmení:

Vážená paní, vážený pane,

zveme Vás k účasti na studii, která se zabývá technikou suché kapky krve (DBS). Cílem projektu je zavést a validovat metody pro stanovení vybraných metabolitů v lidské krvi získané technikou DBS. Požádáme vás o vzorek 2 ml plné krve (odběrová zkumavka Vacuette K3EDTA, 2 ml). Získanou krev nakapeme na speciální odběrovou papírovou kartu (tato technika je známá při novorozeneckém screeningu na vrozené metabolické choroby) a po zaschnutí krve budou tyto karty zaslané do laboratoře Katedry biologických a biochemických věd, Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

Získané vzorky budou použity pouze pro výzkumné účely. Nebudete mít žádné náklady s účastí ve studii.

Informace týkající se vaší osoby bude pouze váš věk a pohlaví, tedy vaše vzorky nebudou označeny Vaším jménem. Vaše vzorky nebudou podstoupeny nikomu dalšímu a po ukončení studie budou odborně zlikvidovány.

Velice si vážíme Vaší účasti ve studii.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd,

Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Studentská 573, 532 10 Pardubice

e-mail: roman.kandar@upce.cz; telefon: 466 037 714

Já, níže podepsaný(á), souhlasím s účastí ve studii.

jméno a příjmení:

datum:

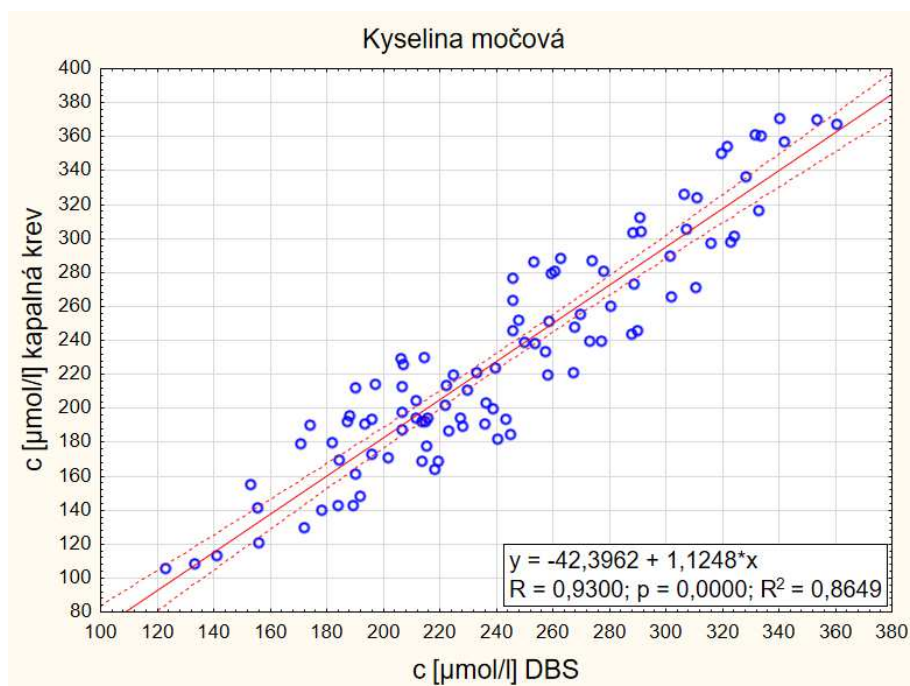
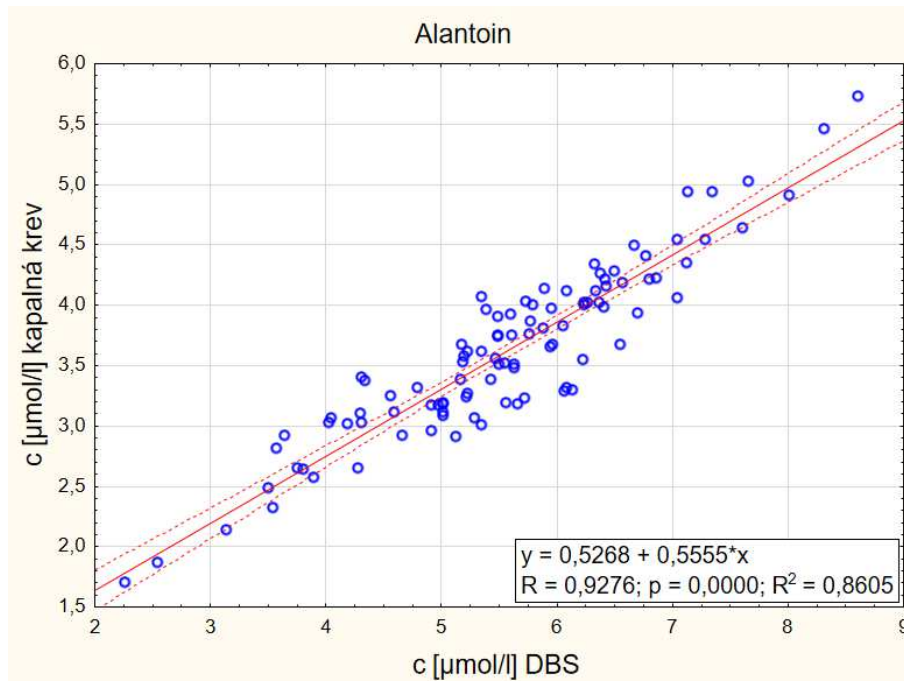
podpis:

Příloha 2 Analytické parametry metody stanovení alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve.

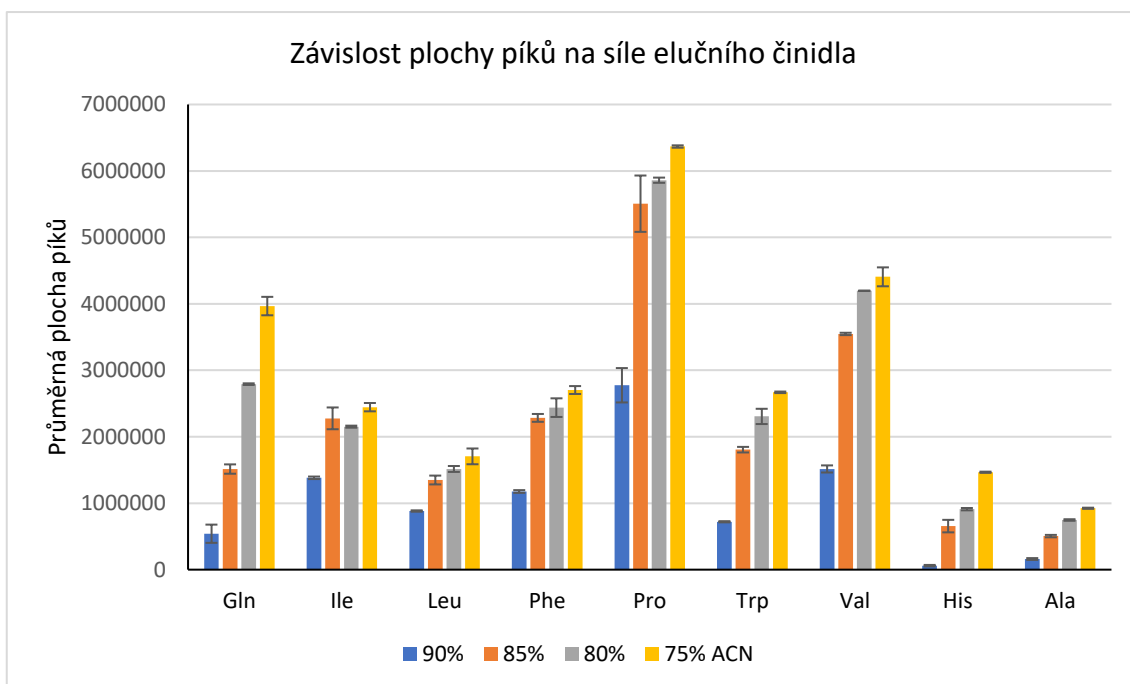
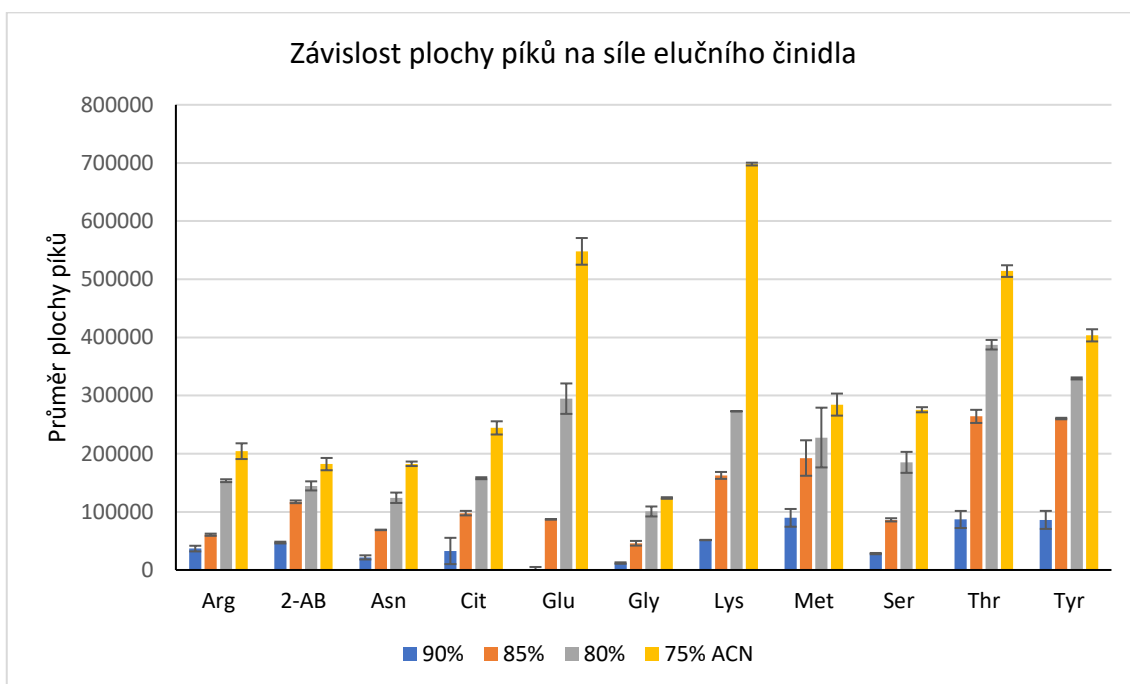
	Alantoin		Kyselina močová	
	Průměr ± SD (μmol/l)	CV (%)	Průměr ± SD (μmol/l)	CV (%)
Přesnost v sérii				
Nízká koncentrace (n=5)	5,6 ± 0,2	2,2	224,7 ± 4,3	1,9
Střední koncentrace (n=5)	21,9 ± 0,4	1,9	355,4 ± 5,8	1,6
Vysoká koncentrace (n=5)	51,6 ± 0,9	1,7	751,3 ± 31,5	4,2
Přesnost mezi sériemi				
Nízká koncentrace (n=5)	5,6 ± 0,1	0,8	228,2 ± 3,9	1,7
Střední koncentrace (n=5)	22,5 ± 0,4	1,9	359,0 ± 7,8	2,2
Vysoká koncentrace (n=5)	54,7 ± 2,2	4,0	776,8 ± 20,4	2,6
Směrnice KK (SD)	0,08761 (0,00291)		0,03853 (0,00116)	
Intercept (SD)	0,01346 (0,0042)		-0,30129 (0,03811)	
R ²	0,9993		0,9949	
Pracovní rozsah KK (μmol/l)	0,5 – 50,0		10,0 – 750,0	
Výtěžnost (%), n = 3 (SD)	118,0 (6,9)		102,9 (4,7)	
LOD (μmol/l)	0,16		3,26	
LOQ (μmol/l)	0,48		9,89	
Účinky matrice (%), n = 6	58-64		82-118	

Průměrné parametry 10 kalibračních křivek pro stanovení alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích suché kapky krve metodou HPLC-MS/MS. Mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byl vypočítán podle rovnic: $LOD = 3,3 \times Sa/b$; $LOQ = 10 \times Sa/b$, kde Sa je směrodatná odchylka interceptu a b je průměrná směrnice kalibračních křivek. KK, kalibrační křivka; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient; R², koeficient determinace.

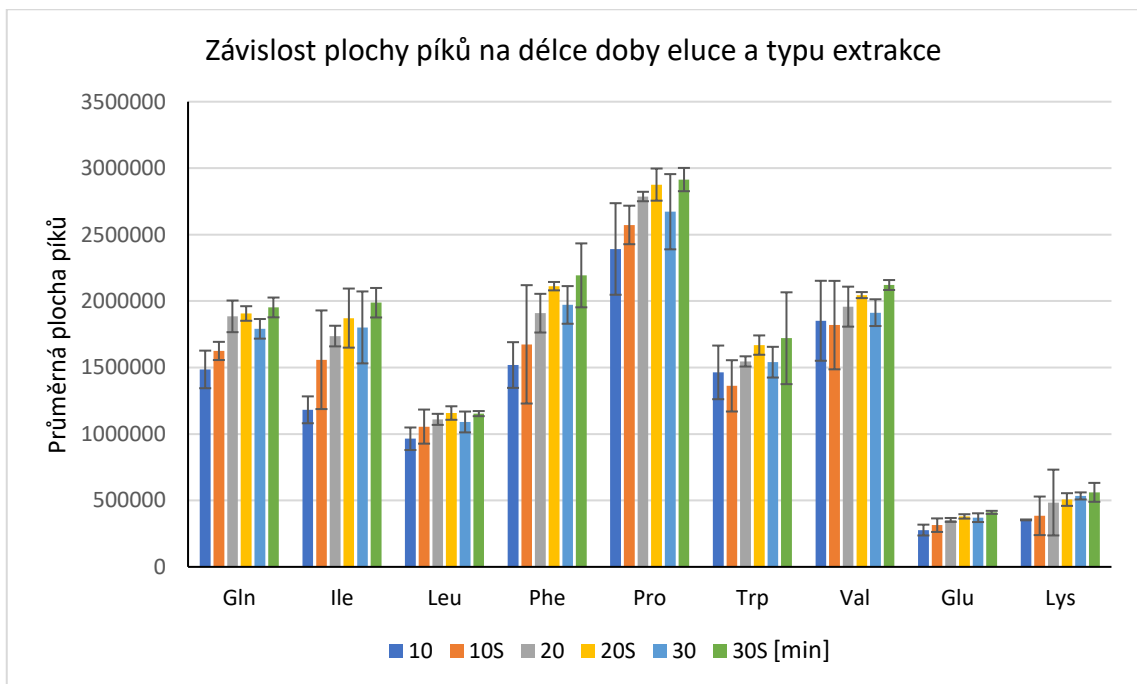
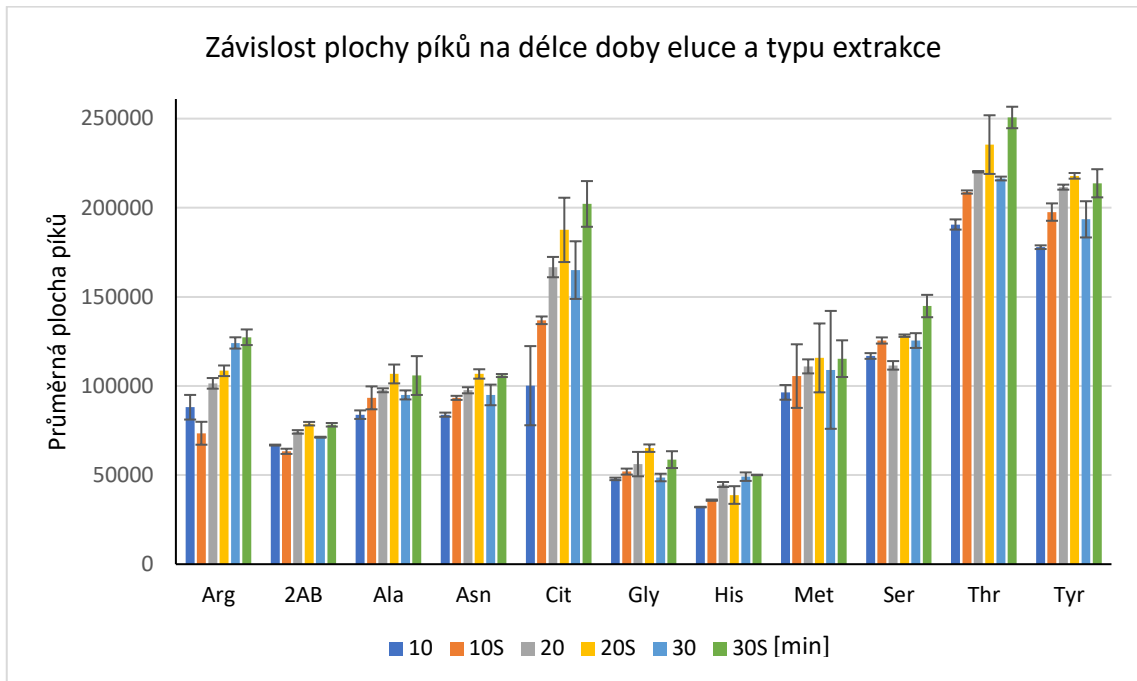
Příloha 3 2-D bodové grafy závislosti koncentrace alantoinu a kyseliny močové ve vzorcích kapalně krve na jejich koncentraci ve vzorcích DBS.



Příloha 4 Vliv složení elučního činidla na eluci aminokyselin ze vzorků suché kapky krve.

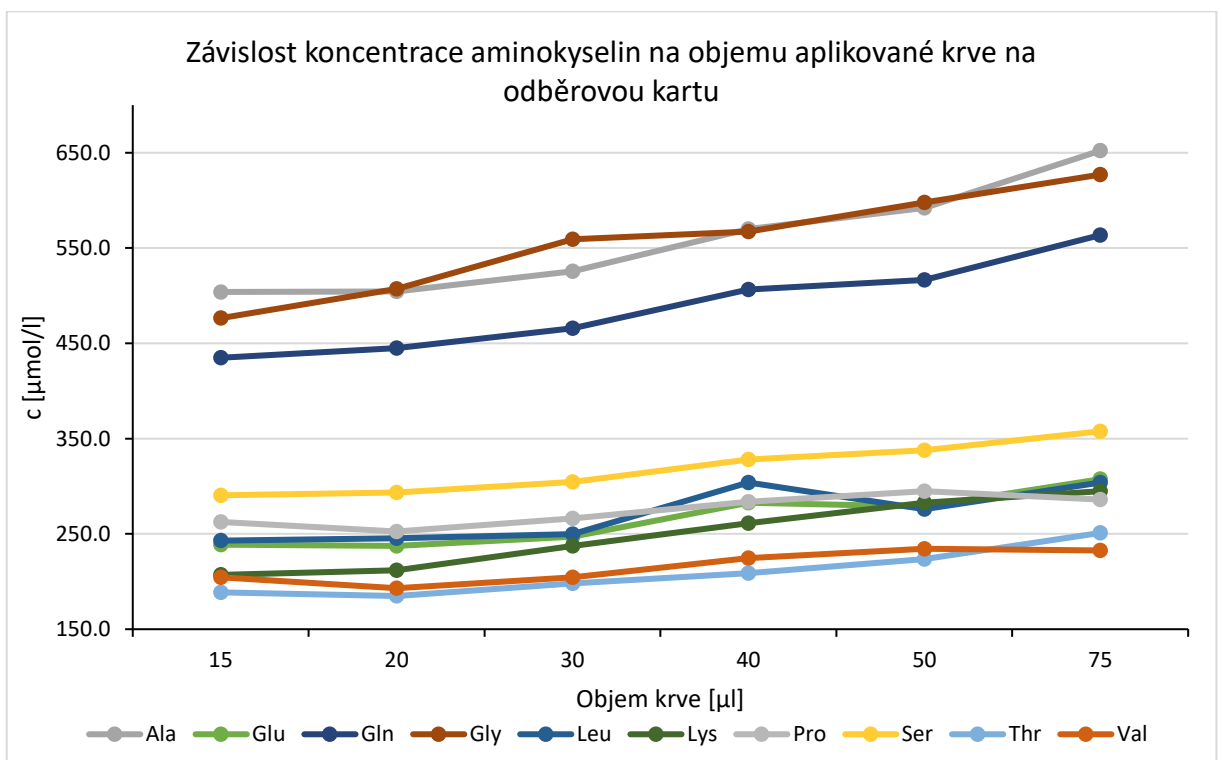
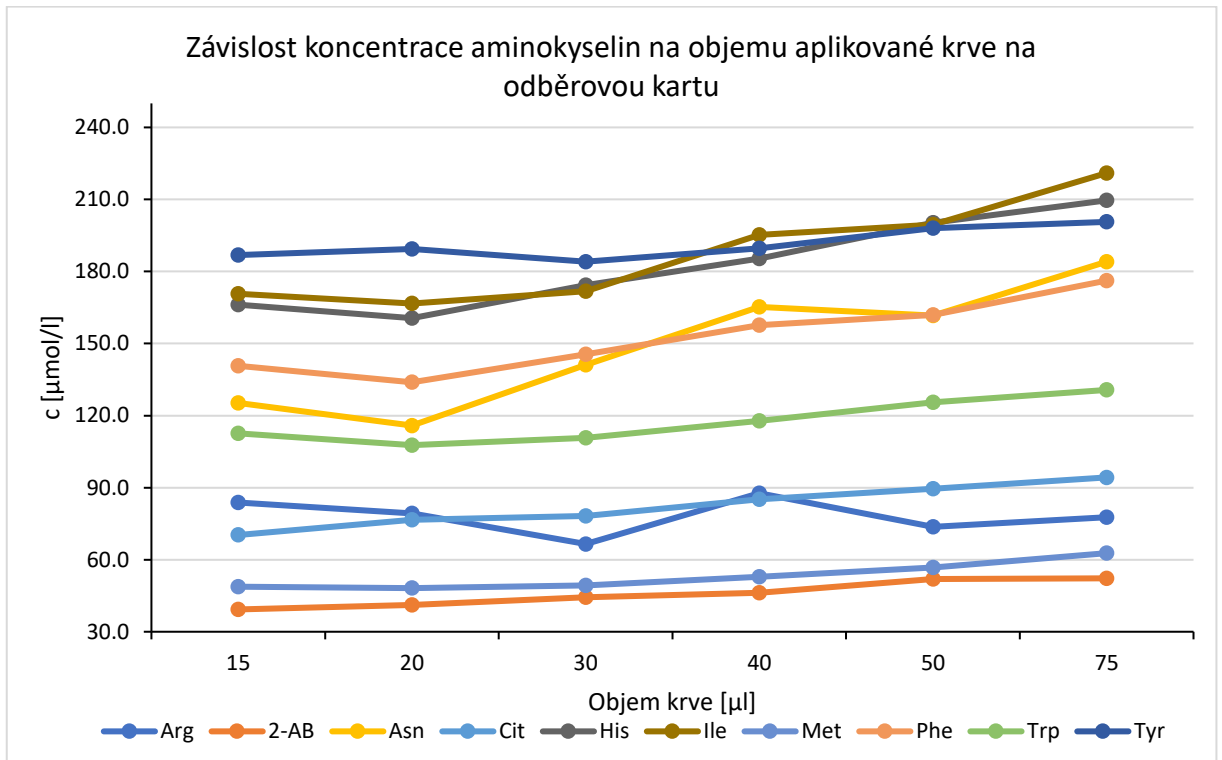


Příloha 5 Vliv sonikace a doby eluce na účinnost extrakce aminokyselin ze vzorků suché kapky krve.



S, sonikace

Příloha 6 Vliv objemu aplikované krve na odběrovou kartu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve.



Příloha 7 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací aminokyselin naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaženo ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %).

	HCT 30	HCT 40	HCT 50	HCT 60	HCT 30	HCT 40	HCT 50	HCT 60
	Trp (%)				Phe (%)			
c0	92,5	100,0	105,0	114,7	104,5	100,0	112,9	120,2
c1	82,6	100,0	106,7	116,8	82,6	100,0	98,8	114,6
c2	105,5	100,0	96,8	116,6	108,8	100,0	102,6	115,8
c3	84,1	100,0	95,5	108,0	85,4	100,0	122,5	113,7
	Ile (%)				Leu (%)			
c0	100,8	100,0	109,6	119,6	93,3	100,0	108,7	113,4
c1	85,5	100,0	100,9	109,9	75,3	100,0	93,7	102,1
c2	105,8	100,0	111,4	114,4	95,7	100,0	103,4	114,6
c3	81,4	100,0	107,2	105,6	82,6	100,0	104,8	106,1
	Met (%)				Val (%)			
c0	96,9	100,0	103,7	106,9	96,3	100,0	107,4	123,9
c1	96,5	100,0	103,1	120,5	78,5	100,0	106,4	115,1
c2	105,9	100,0	109,5	114,6	96,1	100,0	106,1	114,3
c3	90,1	100,0	107,1	112,6	89,1	100,0	103,1	112,1
	Tyr (%)				Pro (%)			
c0	91,3	100,0	103,0	145,2	99,8	100,0	103,1	117,9
c1	83,3	100,0	99,3	115,5	85,7	100,0	102,8	115,8
c2	87,8	100,0	94,6	103,0	103,0	100,0	104,7	113,9
c3	80,5	100,0	110,6	100,0	84,9	100,0	108,3	107,1

HCT, hematokrit (%); c0, koncentrace aminokyselin ve vzorku suché kapky krve bez přídavku standardů; c1-c3, koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve s přídavkem standardů

Příloha 7 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací aminokyselin naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaženo ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %) – pokračování.

	HCT 30	HCT 40	HCT 50	HCT 60	HCT 30	HCT 40	HCT 50	HCT 60
	2-AM (%)				Ala (%)			
c0	101,2	100,0	93,2	115,4	98,5	100,0	105,1	114,8
c1	88,2	100,0	113,3	124,0	83,5	100,0	96,3	112,2
c2	102,0	100,0	95,3	115,4	100,3	100,0	103,8	109,4
c3	91,4	100,0	101,9	100,0	88,8	100,0	105,7	106,1
	Thr (%)				Gly (%)			
c0	102,9	100,0	105,7	124,8	99,6	100,0	97,2	124,8
c1	82,3	100,0	102,3	115,6	91,5	100,0	101,5	116,9
c2	98,3	100,0	108,8	116,6	88,4	100,0	93,6	103,8
c3	87,7	100,0	109,3	112,0	83,2	100,0	105,9	104,9
	Glu (%)				Ser (%)			
c0	88,6	100,0	106,8	122,0	90,2	100,0	104,6	115,2
c1	87,7	100,0	113,5	124,5	80,3	100,0	118,0	120,6
c2	90,2	100,0	100,6	119,3	96,2	100,0	96,7	130,5
c3	93,9	100,0	114,7	130,4	99,6	100,0	113,4	123,8
	Gln (%)				Asn (%)			
c0	108,0	100,0	101,0	108,9	103,9	100,0	107,6	129,9
c1	94,0	100,0	105,6	114,4	95,4	100,0	118,0	134,2
c2	98,7	100,0	96,5	105,0	93,8	100,0	101,4	119,6
c3	93,1	100,0	109,0	118,3	90,7	100,0	111,2	126,4

HCT, hematokrit (%); c0, koncentrace aminokyselin ve vzorku suché kapky krve bez přidavku standardů; c1-c3, koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve s přidavkem standardů

Příloha 7 Střední hodnota rozdílu mezi koncentrací aminokyselin naměřené ve vzorcích suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu (vztaženo ke koncentraci naměřené ve vzorku suché kapky krve s hodnotou hematokritu 40 %) – pokračování.

	HCT 30	HCT 40	HCT 50	HCT 60	HCT 30	HCT 40	HCT 50	HCT 60
	Cit (%)				Arg (%)			
c0	105,4	100,0	96,5	111,1	108,9	100,0	100,0	84,6
c1	96,0	100,0	109,4	119,2	106,3	100,0	109,8	92,5
c2	99,9	100,0	101,2	114,7	108,5	100,0	94,7	90,7
c3	98,0	100,0	109,6	124,0	105,3	100,0	99,5	99,2
	His (%)				Lys (%)			
c0	111,0	100,0	103,4	113,4	112,5	100,0	93,4	94,9
c1	95,2	100,0	104,6	115,8	99,1	100,0	101,9	105,9
c2	100,6	100,0	99,8	111,0	103,8	100,0	91,2	102,7
c3	93,3	100,0	100,9	114,3	106,9	100,0	98,9	114,3

HCT, hematokrit (%); c0, koncentrace aminokyselin ve vzorku suché kapky krve bez přídavku standardů; c1-c3, koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve s přídavkem standardů

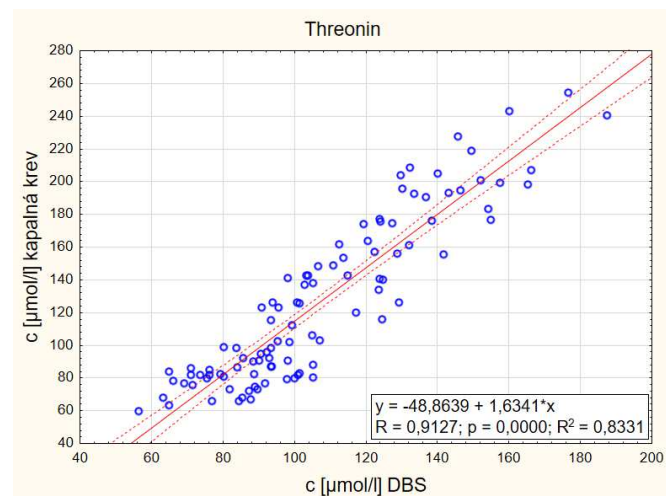
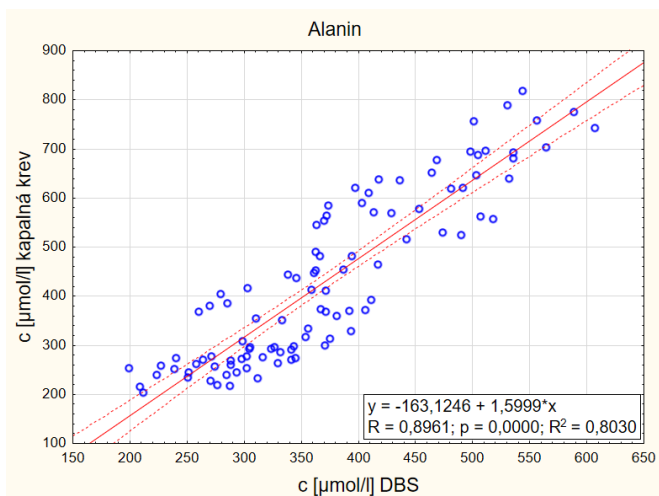
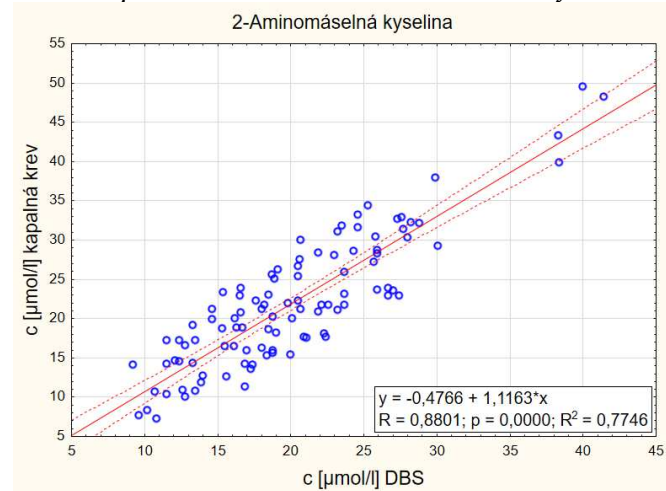
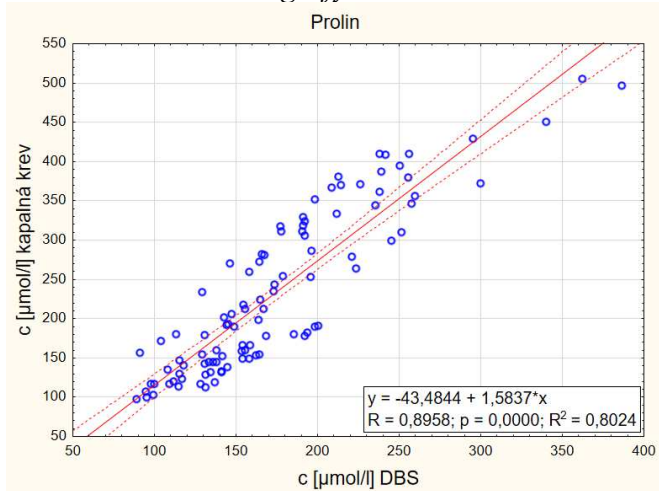
Příloha 8 Analytické parametry metody stanovení aminokyselin ve vzorku suché kapky krve.

	<i>A – c0</i> CV (%)	<i>A – c1</i> CV (%)	<i>B – c0</i> CV (%)	<i>B – c1</i> CV (%)	Výtěžnost (SD) (%)	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)	Pracovní rozsah KK ($\mu\text{mol/l}$)	R ²	Směrnice KK (SD)	Intercept (SD) ($\mu\text{mol/l}$)
Arg	0,5	2,6	7,7	3,1	105,3 (9,2)	0,6	1,9	1,9-273,3	0,994	0,0164 (0,0012)	-0,0055 (0,0031)
2-AM	1,7	9,3	6,2	6,5	102,5 (0,7)	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	98,5 (0,2)	2,5	7,7	7,7-851,3	0,993	0,0033 (0,0002)	-0,0021 (0,0025)
Asn	9,1	3,4	10,6	0,0	98,5 (5,8)	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	94,4 (5,4)	0,3	0,8	0,8-79,1	0,994	0,0108 (0,0005)	0,0020 (0,0009)
Glu	3,3	5,5	5,1	8,7	96,3 (5,2)	0,6	1,8	1,8-186,0	0,998	0,0075 (0,0003)	0,0012 (0,0014)
Gln	5,5	3,1	8,5	7,4	96,1 (3,5)	2,4	7,4	7,4-1369,8	0,997	0,0076 (0,0004)	-0,0126 (0,0056)
Gly	1,2	3,0	4,0	2,7	102,1 (9,6)	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	97,2 (9,7)	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	101,3 (2,0)	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	96,9 (6,0)	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	100,3 (6,8)	1,4	4,4	4,4-295,0	0,993	0,0169 (0,0015)	-0,0171 (0,0074)

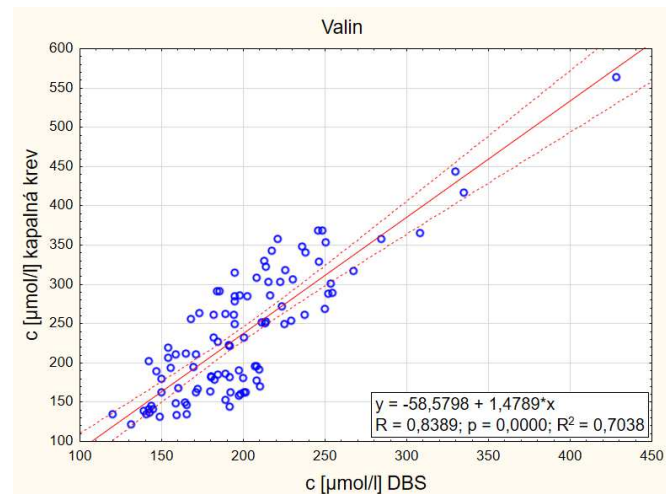
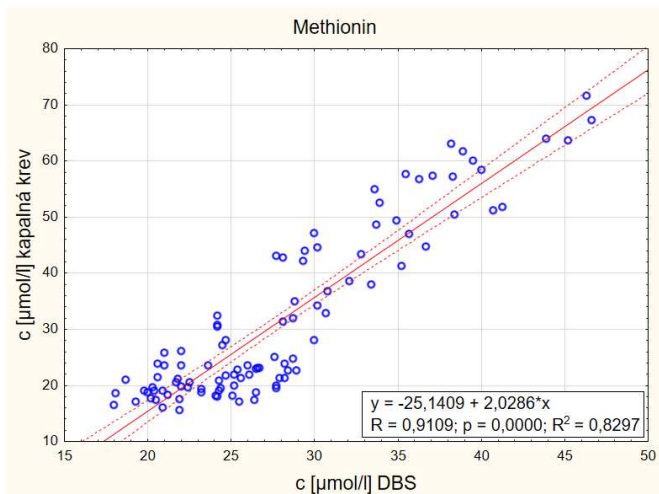
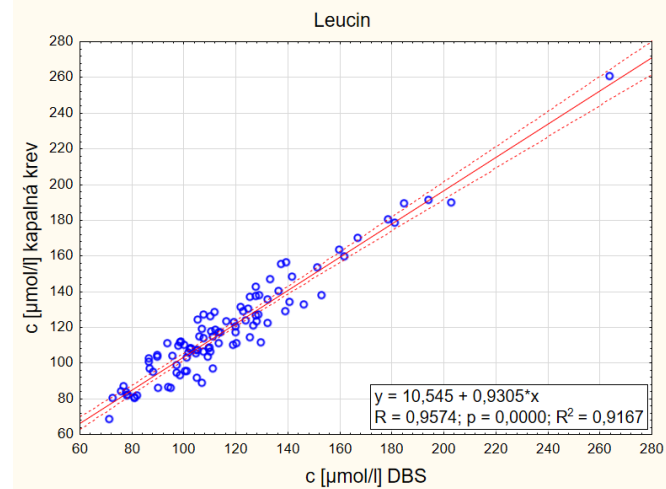
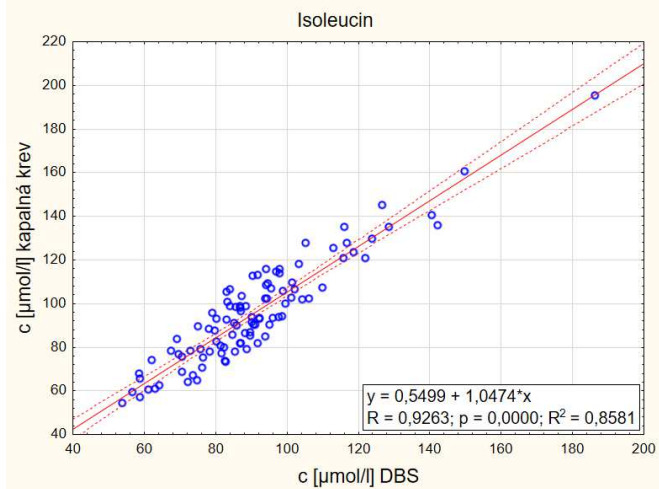
	<i>A</i> – c0 CV (%)	<i>A</i> – c1 CV (%)	<i>B</i> – c0 CV (%)	<i>B</i> – c1 CV (%)	Výtěžnost (SD) (%)	LOD (μmol/l)	LOQ (μmol/l)	Pracovní rozsah KK (μmol/l)	R ²	Směrnice KK (SD)	Intercept (SD) (μmol/l)
Met	4,0	5,7	2,4	7,0	98,2 (2,2)	0,2	0,5	0,5-102,4	0,997	0,0142 (0,0005)	-0,0018 (0,0007)
Phe	1,7	4,8	8,0	0,1	96,9 (1,5)	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	101,8 (7,3)	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	100,2 (2,6)	3,6	11,1	11,1-264,0	0,984	0,0022 (0,0002)	0,0020 (0,0024)
Thr	5,7	3,0	1,5	9,0	101,9 (3,0)	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	95,0 (8,9)	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	94,0 (4,5)	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	96,7 (6,6)	1,9	5,8	5,8-590,0	0,996	0,0208 (0,0007)	-0,0083 (0,0121)

Přesnost v sérii (*A*, n = 10) a přesnost mezi sériemi (*B*, n = 6); c0, nízká koncentrace; c1, vysoká koncentrace. Průměrné parametry 10 kalibračních křivek (KK) pro stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve metodou HPLC-MS/MS. Mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byl vypočítán podle rovnice: $LOD = 3,3 \times Sa/b$; $LOQ = 10 \times Sa/b$, kde *Sa* je směrodatná odchylka interceptu a *b* je průměrná směrnice 10 kalibračních křivek. Intercept představuje hodnotu na ose *x*, kdy hodnota osy *y* je nulová. CV, variační koeficient; SD, směrodatná odchylka; R², koeficient determinace.

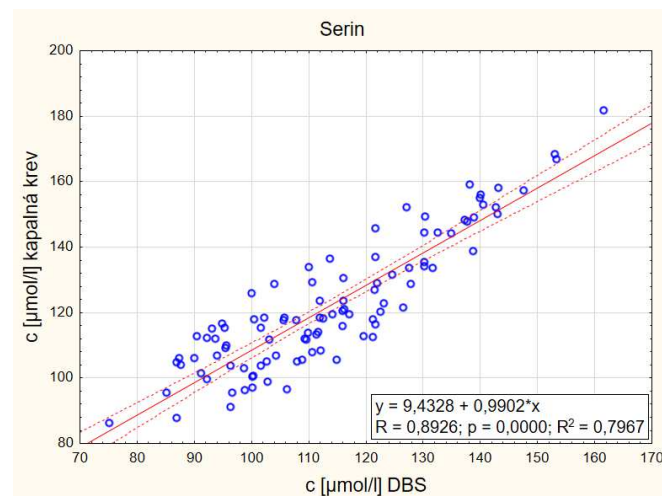
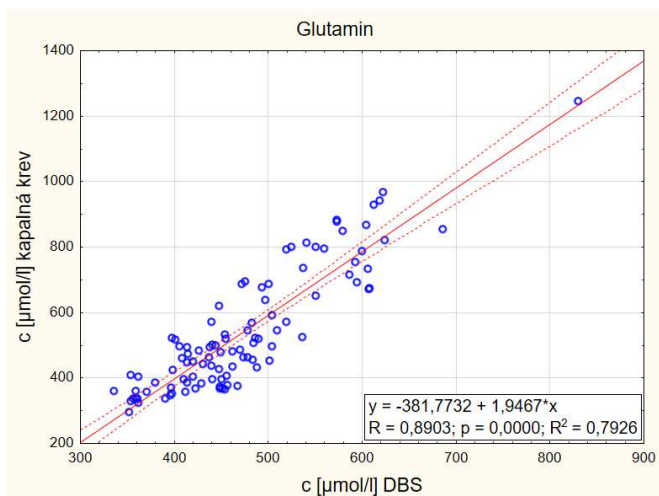
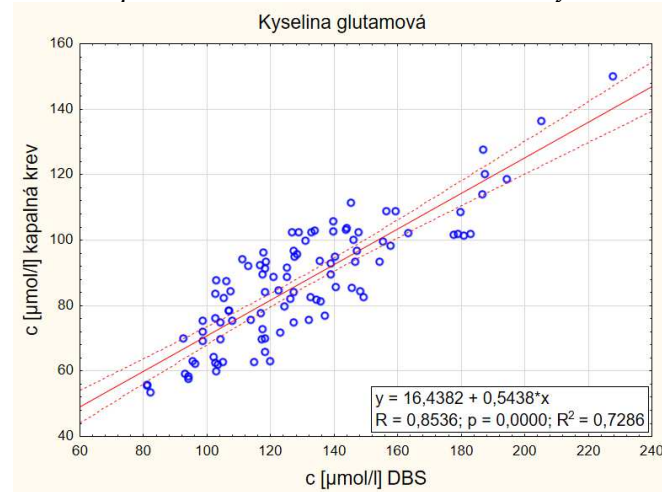
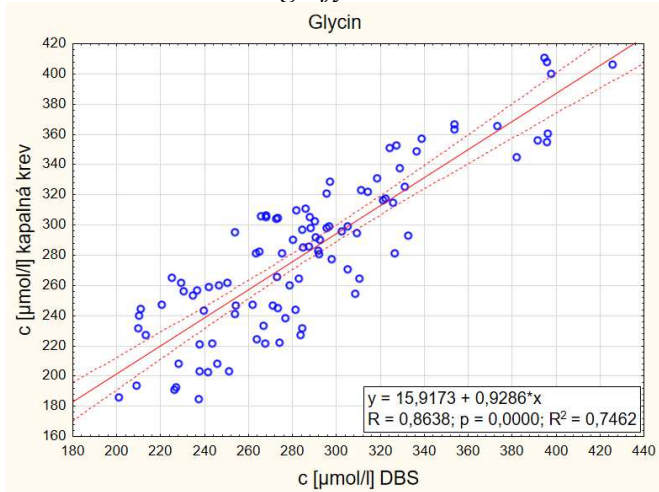
Příloha 9 2-D bodové grafy závislosti koncentrace aminokyselin ve vzorcích kapalné krve na koncentraci aminokyselin ve vzorcích DBS.



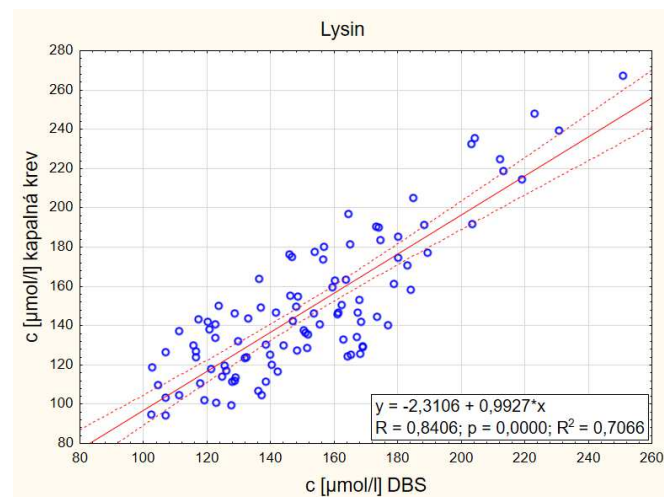
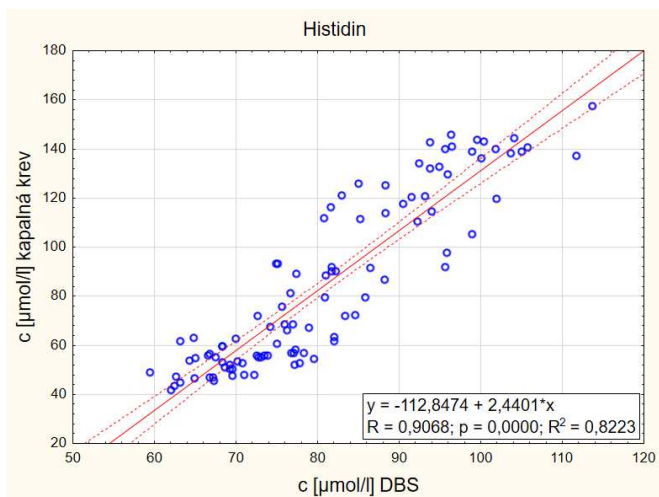
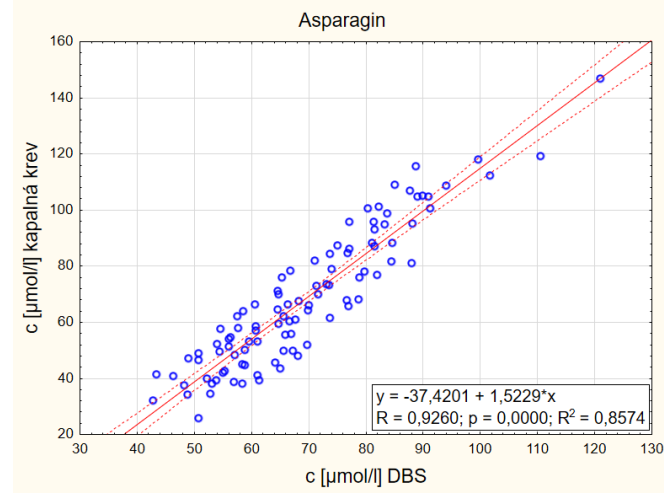
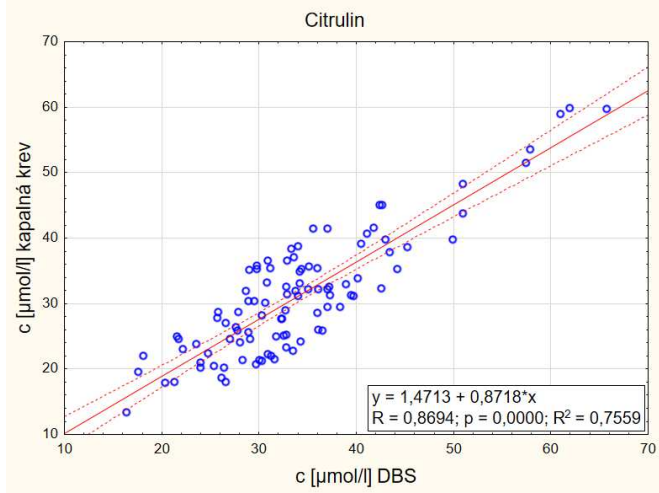
Príloha 9 2-D bodové grafy závislosti koncentrace aminokyselín ve vzorcích kapalnú krve na koncentraci aminokyselín ve vzorcích DBS.



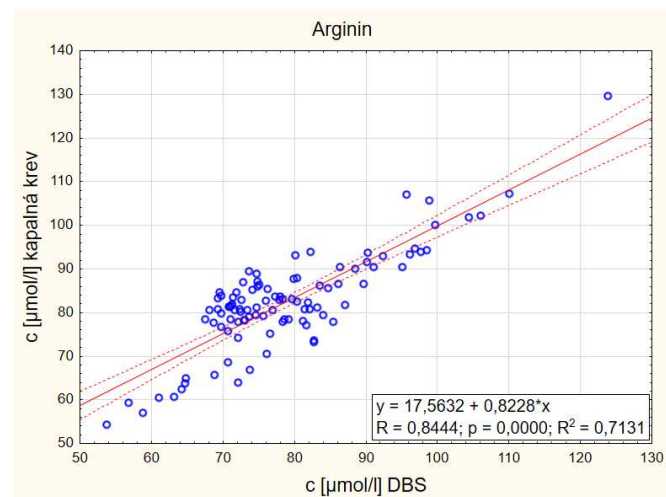
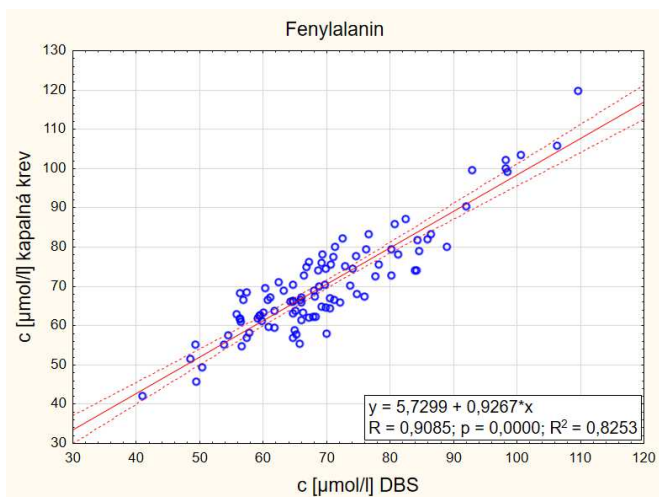
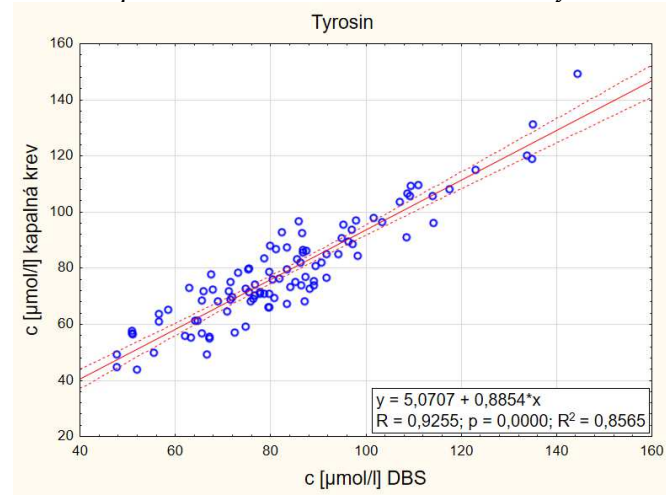
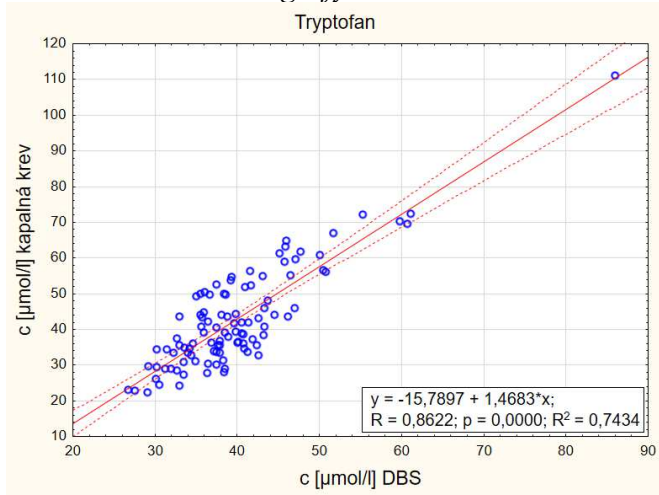
Príloha 9 2-D bodové grafy závislosti koncentrace aminokyselín ve vzorcích kapalnú krve na koncentraci aminokyselín ve vzorcích DBS.



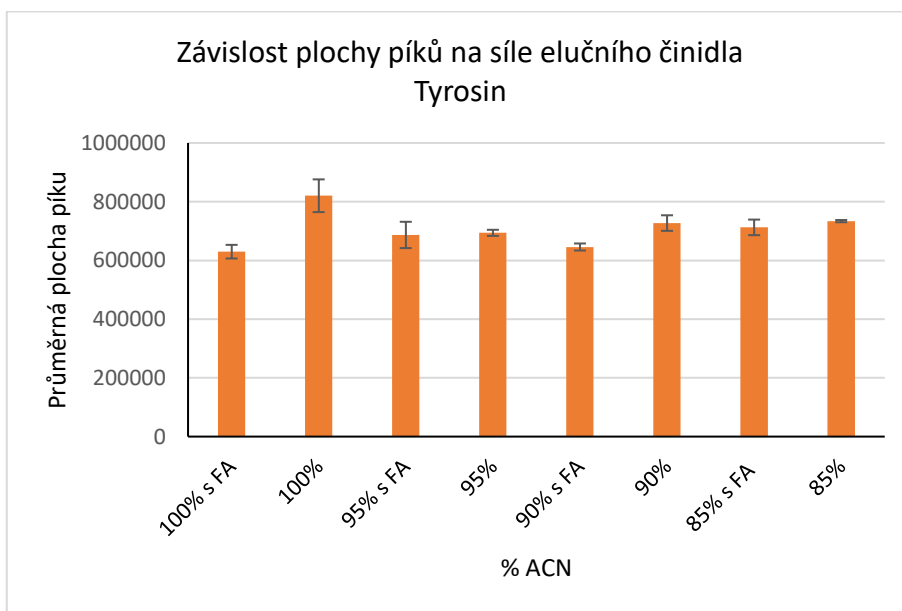
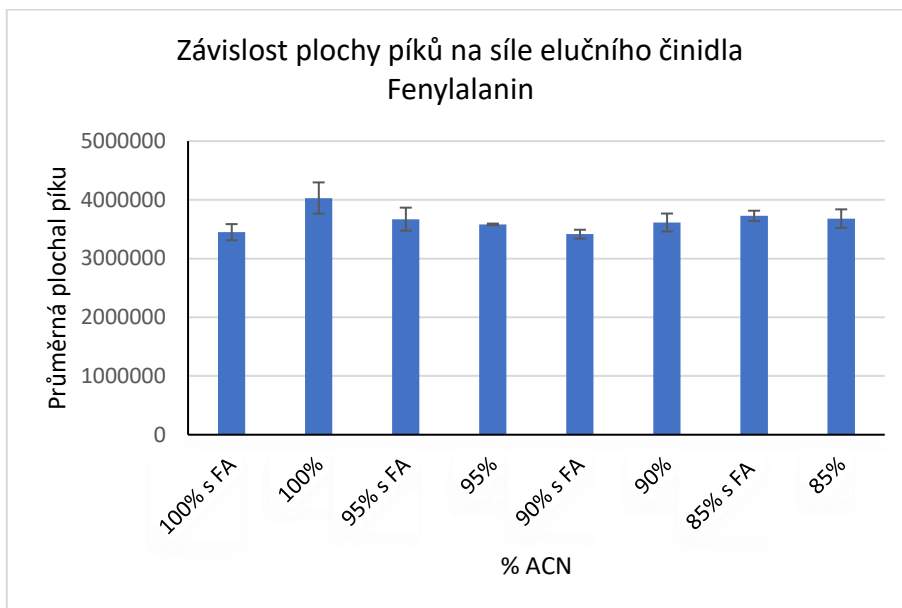
Príloha 9 2-D bodové grafy závislosti koncentrace aminokyselín ve vzorcích kapalnú krve na koncentraci aminokyselín ve vzorcích DBS.



Príloha 9 2-D bodové grafy závislosti koncentrace aminokyselín ve vzorcích kapalnú krve na koncentraci aminokyselín ve vzorcích DBS.

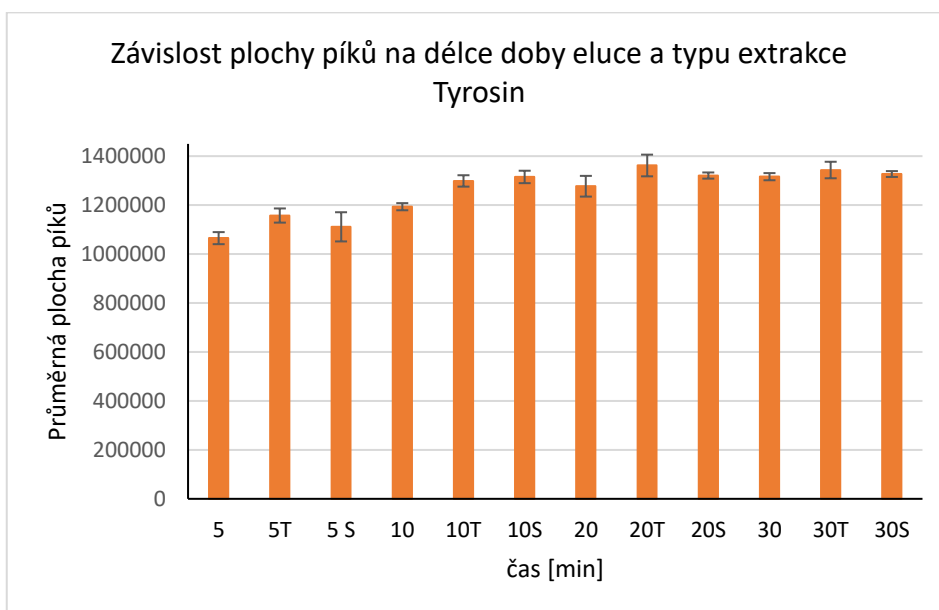
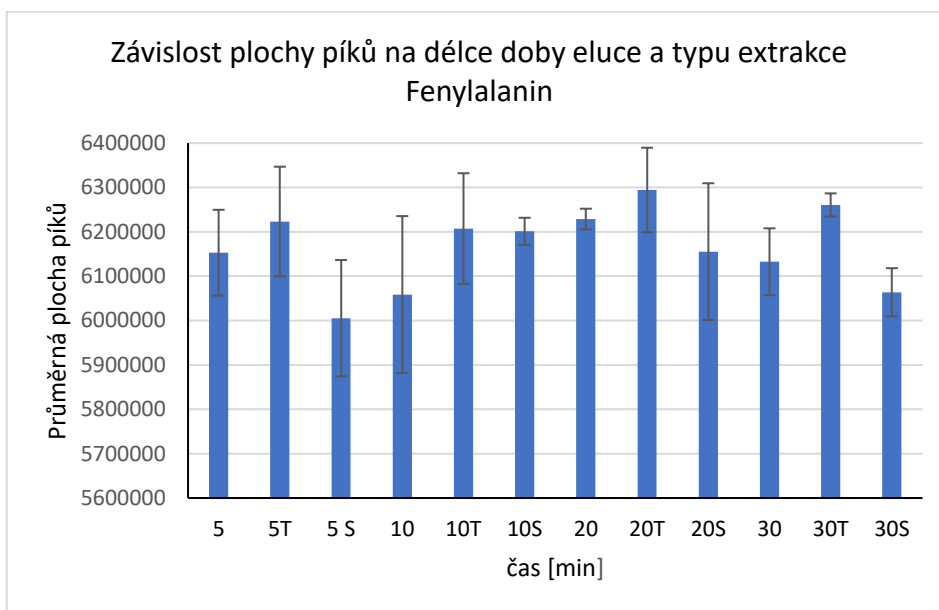


Příloha 10 Vliv složení elučního činidla na eluci fenylalaninu a tyrosinu ze vzorků suché kapky krve.



FA, kyselina mravenčí

Příloha 11 Vliv sonikace, třepání a doby eluce na účinnost extrakce fenylalaninu a tyrosinu ze vzorků suché kapky krve.



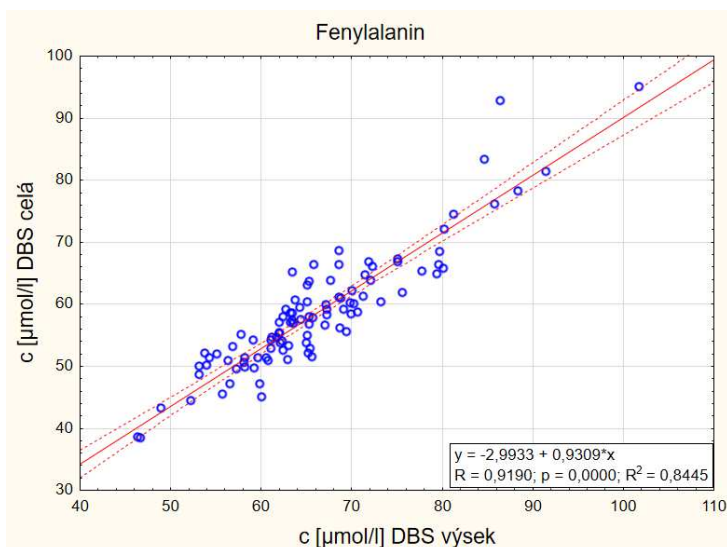
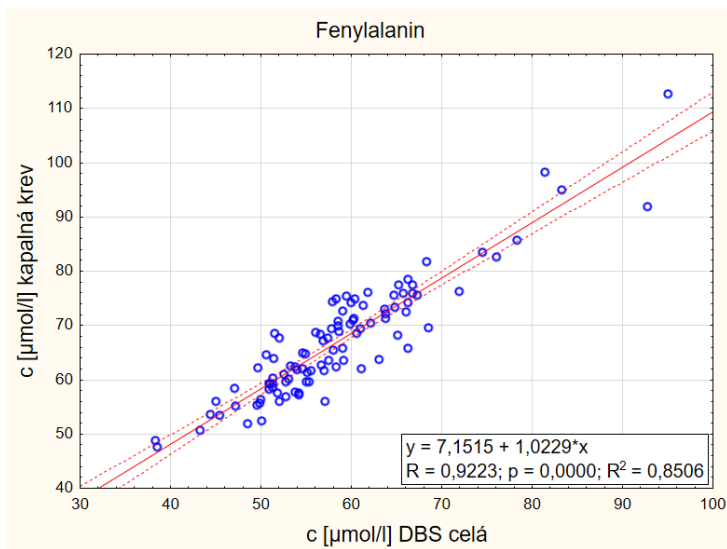
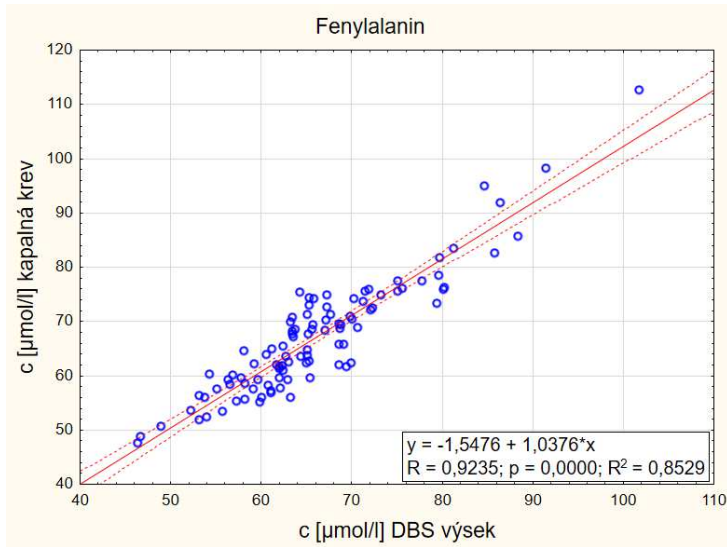
T, třepání; S, sonikace

Příloha 12 Analytické parametry metody stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve.

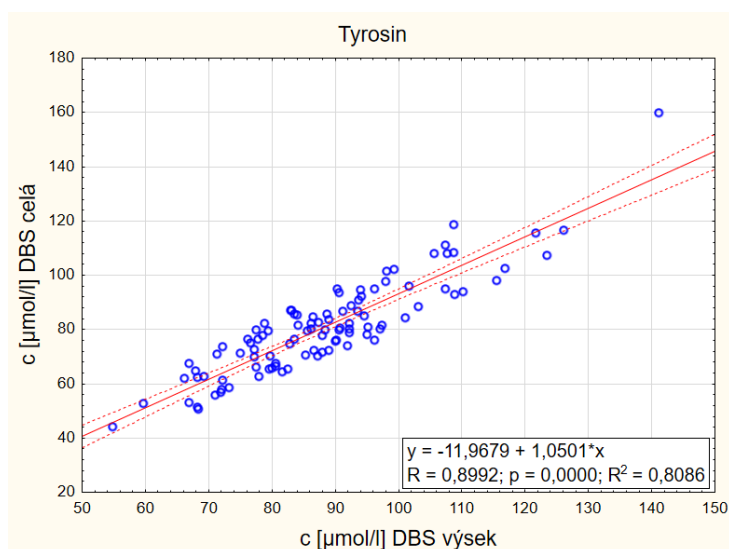
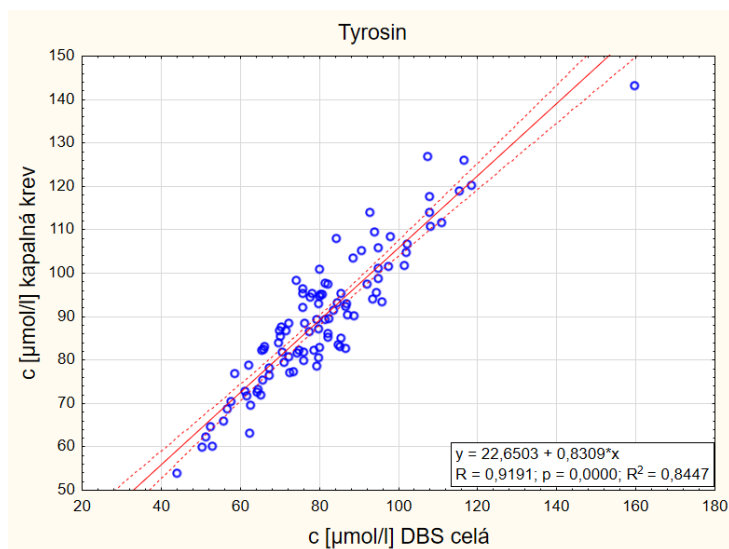
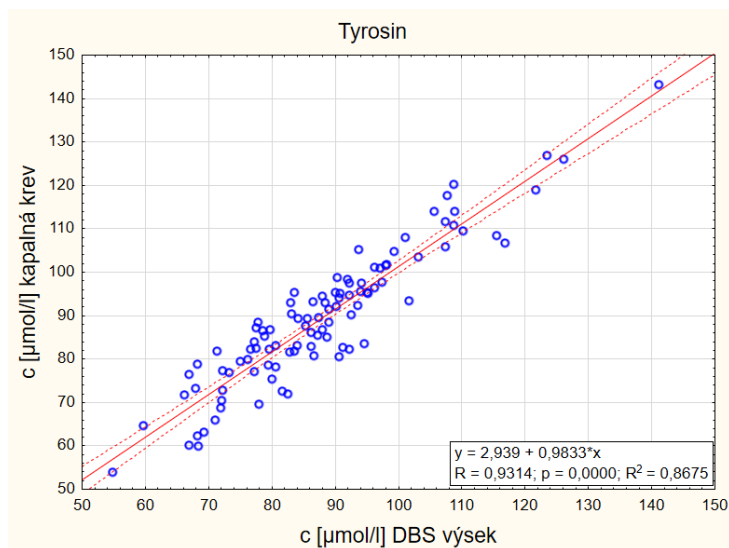
	Fenylalanin		Tyrosin	
	Průměr ± SD (μmol/l)	CV (%)	Průměr ± SD (μmol/l)	CV (%)
Přesnost v sérii				
Nízká koncentrace (n=5)	75,7 ± 2,3	3,0	90,5 ± 1,8	1,9
Střední koncentrace (n=5)	297,8 ± 8,6	2,8	302,5 ± 4,4	1,5
Vysoká koncentrace (n=5)	1005,5 ± 30,9	3,1	990,0 ± 43,4	4,4
Přesnost mezi sériemi				
Nízká koncentrace (n=5)	74,9 ± 1,4	1,9	93,8 ± 4,7	5,0
Střední koncentrace (n=5)	292,3 ± 5,16	1,8	311,3 ± 8,3	2,7
Vysoká koncentrace (n=5)	978,5 ± 47,4	4,9	985,4 ± 46,83	4,8
Směrnice KK (SD)	0,027252 (0,000744)		0,008715 (0,003723)	
Intercept (SD)	-0,195913 (0,001513)		-0,084312 (0,001374)	
R ²	0,9990		0,9987	
Pracovní rozsah KK (μmol/l)	20,0 – 1199,5		20,0 – 1214,2	
Výtěžnost (%), n = 3 (SD)	97,1 (2,0)		96,7 (1,9)	
LOD (μmol/l)	0,18		0,52	
LOQ (μmol/l)	0,56		1,57	
Matricové efekty (%), n = 6	95,2-103,4		91,8-101,0	

Průměrné parametry 10 kalibračních křivek pro stanovení fenylalaninu a tyrosinu ve vzorcích suché kapky krve metodou HPLC-MS/MS. Mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byl vypočítán podle rovnic: $LOD = 3,3 \times Sa/b$; $LOQ = 10 \times Sa/b$, kde Sa je směrodatná odchylka interceptu a b je průměrná směrnice kalibračních křivek. KK, kalibrační křivka; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient; R², koeficient determinace.

Příloha 13 2-D bodové grafy závislosti koncentrace fenylalaninu ve vzorcích kapalně krve na koncentraci fenylalaninu ve vzorcích DBS.



Příloha 14 2-D bodové grafy závislosti koncentrace tyrosinu ve vzorcích kapalně krve na koncentraci tyrosinu ve vzorcích DBS.



Příloha 15 2-D bodové grafy závislosti koncentrace fenylalaninu a tyrosinu změřené metodou se stacionární fází HILIC na jejich koncentraci změřené metodou s reverzní stacionární fází.

