

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Metabolomická analýza lidské plazmy pomocí bioinertního UHPLC systému
spojeného s hmotnostní spektrometrií

Diplomová práce

2023

Bc. Langová Alena

Prohlašuji:

Práci s názvem metabolická analýza lidské plazmy pomocí bioinertního UHPLC systému spojeného s hmotnostní spektrometrií jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích 1.5.2023

Bc. Langová Alena

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu prof. Ing. Michalu Holčapkovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Ondřeji Peterkovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady v průběhu diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celé vědecké skupině pana prof. Holčapka za veškeré připomínky a pomoc při řešení nejrůznějších vědeckých otázek a v neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé mé rodině a příteli za neutuchající podporu při celé době studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřená na vývoj a optimalizaci metody ultravysokoučinné kapalinové chromatografie hydrofilních interakcí s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HILIC-UHPLC/MS) a jejím využitím pro identifikaci metabolitů v lidské plazmě. Teoretická část je rozdělena na čtyři části. První část se zabývá obecnými informacemi o metabolitech a jejich funkcích v lidském organismu. Druhá část je zaměřena na hmotnostní spektrometrii a bližší vysvětlení instrumentace používané v metabolomice. V třetí části jsou shrnuty všeobecné informace o kapalinové chromatografii se zaměřením na HILIC separaci. Poslední teoretická část je zaměřena na metabolomickou analýzu. V experimentální části jsou shrnuty výsledné postupy a použité parametry při analýze lidské plazmy a v závěrečné diskuzi jsou poté zhodnoceny a diskutovány výsledky této diplomové práce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Metabolit; metabolomická analýza; hydrofilní interakční kapalinová chromatografie; hmotnostní spektrometrie

TITLE

Metabolomic analysis of human plasma by bio-inert UHPLC system coupled with mass spectrometry

ANNOTATION

This thesis is focused on the development and optimization of the hydrophilic interaction ultrahigh-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (HILIC-UHPLC/MS) and its use for the identification of metabolites in human plasma. The theoretical part is divided into four parts. The first part deals with general information about metabolites and their function in the human organism. The second part is focused on mass spectrometry and a closer explanation of the instrumentation used in metabolomics. The third part summarizes general information about liquid chromatography with a focus on HILIC separation. The last theoretical part is focused on the overall metabolomic analysis. In the experimental part, the resulting procedures and the parameters used in the analysis of human plasma are summarized, and in the final discussion, results of this diploma thesis are then evaluated and discussed.

KEYWORDS

Metabolite; metabolomics analysis; hydrophilic interaction liquid chromatography; mass spectrometry

OBSAH

| | |
|--|----|
| ÚVOD..... | 12 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST..... | 13 |
| 1.1 Metabolity..... | 13 |
| 1.1.1 Rozdělení metabolitů..... | 13 |
| 1.2 Hmotnostní spektrometrie..... | 14 |
| 1.2.1 Ionizační techniky..... | 15 |
| 1.2.2 Hmotnostní analyzátory..... | 17 |
| 1.2.3 Detektory v hmotnostní spektrometrii..... | 18 |
| 1.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie..... | 18 |
| 1.2.5 Iontová mobilita..... | 19 |
| 1.3 Kapalinová chromatografie..... | 20 |
| 1.3.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie..... | 20 |
| 1.3.2 Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi..... | 23 |
| 1.3.3 Superkritická fluidní chromatografie..... | 23 |
| 1.3.4 Bioinertní systém..... | 25 |
| 1.4 Metabolomická analýza..... | 26 |
| 1.4.1 Přístupy v metabolické analýze..... | 28 |
| 1.4.2 Příprava vzorků lidské plazmy..... | 30 |
| 1.4.3 Metabolomické databáze..... | 34 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 36 |
| 2.1 Seznam použitých chemikálií a standardů..... | 36 |
| 2.2 Přístroje a technika..... | 36 |
| 2.3 Příprava standardů..... | 37 |
| 2.4 Příprava vzorku plazmy..... | 37 |
| 2.5 UHPLC podmínky..... | 37 |
| 2.6 MS podmínky..... | 38 |
| 2.7 Zpracování naměřených dat..... | 38 |
| 3 VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 39 |
| 3.1 Optimalizace LC..... | 39 |
| 3.2 Optimalizace MS..... | 42 |
| 3.3 Optimalizace rozpouštěcího kroku..... | 49 |
| 3.4 Optimalizace extrakce..... | 52 |

| | |
|---|----|
| 3.5 Identifikace metabolitů v lidské plazmě | 54 |
| ZÁVĚR | 57 |
| CITACE | 58 |
| PŘÍLOHY | 67 |

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Přehled vybraných ionizačních technik | 16 |
| Tabulka 2: Přehled dostupných stacionárních fází pro HILIC separace..... | 21 |
| Tabulka 3: Srovnání vlastností nadkritické tekutiny s kapalinou a plynem..... | 24 |
| Tabulka 4: Výhody a nevýhody LC, GC, CE s MS | 27 |
| Tabulka 5: Souhrnná tabulka extrakce kapalina-kapalina..... | 34 |
| Tabulka 6: Výběr několika databází využívaných v metabolomice | 35 |
| Tabulka 7: Parametry MS | 38 |
| Tabulka 8: Výchozí hodnoty z aplikačního listu firmy Waters | 39 |
| Tabulka 9: Identifikace metabolitů v lidské plazmě | 55 |
| | |
| Obrázek 1: Schéma hmotnostního spektrometru | 15 |
| Obrázek 2: Schéma ionizace elektrosprejem | 17 |
| Obrázek 3: Schéma MS/MS spektrometru..... | 19 |
| Obrázek 4: Schématické znázornění vybraných přístupů kapalinové chromatografie | 22 |
| Obrázek 5: Fázová diagram oxidu uhličitého | 24 |
| Obrázek 6: Omická kaskáda..... | 26 |
| Obrázek 7: Obecné schéma různých pracovních postupů při metabolomických analýzách...29 | |
| Obrázek 8: Odhad použitelnosti extrakčních technik v praxi. | 31 |
| Obrázek 9: Vliv gradientové eluce na separaci izomerů..... | 40 |
| Obrázek 10: Separace STD karnitinů | 47 |
| Obrázek 11: Separace purinových a pyrimidinových nukleových bází | 48 |
| Obrázek 12: Separace vybraných aminokyselin detekovaných v negativním iontovém módu | 48 |
| Obrázek 13: Separace guanosin-fosfátů | 49 |
| Obrázek 14: Vennův diagram identifikace metabolitů | 56 |

SEZNAM GRAFŮ

| | |
|---|----|
| Graf 1: Porovnání mravenčanu a octanu amonného v mobilní fázi B pro vybrané STD na základě poskytnuté odezvy z MS..... | 41 |
| Graf 2: Optimalizace množství kyseliny octové v % u vybraných standardů..... | 42 |
| Graf 3: Optimalizace teploty zdroje na STD | 43 |
| Graf 4: Optimalizace teploty sušícího plynu MS na STD | 43 |
| Graf 5: Optimalizace průtoku plynu ve zdroji na STD..... | 44 |
| Graf 6: Optimalizace průtoku sušícího plynu na STD..... | 45 |
| Graf 7: Optimalizace napětí vstupní elektrody na STD..... | 46 |
| Graf 8: Optimalizace zdrojového offsetu na STD | 46 |
| Graf 9: Optimalizace rozpouštěcího kroku pro precipitaci..... | 50 |
| Graf 10: Optimalizace rozpouštění pro Folch extrakci..... | 51 |
| Graf 11: Porovnání extrakcí dle Folcha s STD..... | 52 |
| Graf 12: Výsledné porovnání různých typů extrakce provedených na vzorcích plazmy | 54 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| ACN | Acetonitril |
| APCI | Chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | Fotoionizace za atmosférického tlaku |
| BEH | Stacionární fáze s ethylenovým můstkem |
| CE | Kapilární elektroforéza |
| CI | Chemická ionizace |
| CE/MS | Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií |
| CID | Kolizně indukovaná disociace |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| DTIMS | Iontová mobilitní spektrometrie v driftové trubici |
| EI | Elektronová ionizace |
| ESI | Ionizace elektrosprejem |
| EtOH | Ethanol |
| FAIMS | Iontová mobilitní spektrometrie s vysokonapěťovou asymetrickou vlnou |
| FT | Fourierova transformace |
| FT-ICR | Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací |
| GC | Plynová chromatografie |
| GC/MS | Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií |
| HMDB | Databáze lidského metabolomu (Human Metabolom Database) |
| HILIC | Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie |
| IC | Iontová chromatografie |
| IM | Iontová mobilita |

| | |
|-------|--|
| IMS | Spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií |
| IS | Interní standard |
| LC | Kapalinová chromatografie |
| LC/MS | Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí |
| MALDI | Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace |
| MS | Hmotnostní spektrometrie |
| MS/MS | Tandemová hmotnostní spektrometrie |
| MTBE | Methyl- <i>terc</i> -butylether |
| MeOH | Methanol |
| MP35N | Slitina niklu a kobaltu |
| NMR | Nukleární magnetická rezonance |
| PEEK | Polyetheretherketon |
| QqQ | Trojité kvadrupól |
| QTOF | Spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu |
| QTRAP | Spojení kvadrupólu a iontové pasti |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| RP-LC | Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi |
| SFC | Superkritická fluidní chromatografie |
| SPE | Extrakce pevnou fází |
| SRM | Selektivní sledování vybraných reakcí |
| STD | Standard |
| TWIMS | Iontová mobilitní spektrometrie s putující vlnou |
| UHPLC | Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| ZIC | Zwitteriontové stacionární fáze |

ÚVOD

Metabolomická analýza je rychle se rozvíjející vědní obor zabývající se studiem metabolitů a metabolických drah v lidském těle. Metabolity jsou malé molekuly do 1500 Da, vznikající enzymatickou přeměnou v organismu. Samotné metabolity dělíme na primární a sekundární, kde každá skupina plní odlišné funkce. Primární metabolity plní nejrůznější fyziologické funkce a tělo si je dokáže syntetizovat samo oproti sekundárním, které se spíše nachází v bakteriích či houbách a plní zejména farmakologické funkce. Metabolomická analýza, zkráceně metabolomika, patří do skupiny tzv. *omik*, jejichž cílem je popsat a vysvětlit celkový chod organismu od DNA až po jednotlivé aminokyseliny. Metabolomika jako taková obsahuje další podskupiny, jako například aminokyseliny, sacharidy, lipidy ale i nukleotidy.

Velice oblíbenou a v drtivé většině případů používanou technikou pro metabolomiku je spojení hmotnostní spektrometrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Toto spojení poskytuje značné výhody, jelikož dokáže separovat a identifikovat látky na základě m/z v jedné analýze. Poněvadž jsou metabolity látky nejrůznějších polarit, proto se používá zejména ionizace elektrosprejem (ESI). Hybridní analyzátor kombinující kvadrupól a analyzátoru doby letu (QTOF) pro necílenou a trojitý kvadrupól pro cílenou analýzu jsou nejčastěji používané hmotnostní analyzátory v metabolomice.

Metabolomická analýza je v posledních 10 letech velmi aktuální a diskutované téma, a proto není divu, že počet publikací a nových informací rapidně vzrůstá. I přes velký zájem o tento obor stále neexistuje univerzální postup pro metabolomickou analýzu, jelikož jsou metabolické cesty a samotné metabolity velmi komplexní. Důležité je mít na paměti, že nejdůležitějším krokem je příprava samotného vzorku. Jelikož cílem této práce je zkoumat pouze metabolity, nikoliv lipidy, je nutné najít takové optimální podmínky, aby přítomnost lipidů nerušila stanovení metabolitů, které poskytují oproti lipidům mnohonásobně menší odezvu. Cílem diplomové práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro stanovení metabolitů v lidské plazmě a zoptimalizovat jednotlivé kroky od složení mobilní fáze až po samotnou extrakci vzorku. Metoda byla optimalizována pomocí velkého množství standardů, které následně byly použity i pro potvrzení identifikace v lidské plazmě. Ostatní metabolity byly identifikovány na základě přesně určeného m/z .

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Metabolity

Metabolity jsou velice rozmanitou skupinou látek a lze je definovat jako malé molekuly (<1500 Da) vznikající enzymaticky katalyzovanou reakcí, tzv. látkovou přeměnou v organismu. Celkový soubor veškerých enzymatických dějů všeobecně označujeme jako metabolismus. Spolu s tímto pojmem přímo souvisí i pojem metabolom. Jedná se o celý soubor metabolických entit individuální pro každého jedince [1]. Metabolom je pozoruhodně složitý a citlivý systém zahrnující téměř 250 tisíc anotovaných metabolitů uvedených v databázi lidského metabolomu (HMDB 5.0) [2], která zahrnuje doposud známé malé metabolity přítomné v biologických tekutinách, buňkách nebo tkáních [3]. Metabolom je koncovým bodem nejrůznějších biologických procesů. Jsou v něm uloženy otisky genetických, epigenetických a environmentálních faktorů, tím pádem může být poskytnuto spojení mezi genotypem a fenotypem každého organismu. Na rozdíl od proteinů a genů, jejichž funkce podléhá post-translačním modifikacím, jsou metabolity zdrojem informací o čistě aktuálním fyziologickém stavu organismu [1], avšak v důsledku právě již zmiňovaných faktorů se může individuálně lišit. Mezi genetické faktory patří zejména dědičné choroby či jejich predispozice k nim, u environmentálních faktorů je to potom stres, strava, léky a celkově životní styl [1; 3].

1.1.1 Rozdělení metabolitů

Metabolity lze rozdělit do dvou základních skupin, a to na primární a sekundární. Primární metabolity jsou organické látky syntetizované samotným organismem. Jsou pro organismus nepostradatelné, jelikož plní základní fyziologické děje. Jedná se o buněčné dělení, růst, vývoj, dýchání a mimo jiné i rozmnožování. Při silném nedostatku těchto metabolitů v buňce může nastat i její smrt. Mezi primární metabolity řadíme celé skupiny sloučenin. Příkladem mohou být aminokyseliny, cukry, lipidy, nukleotidy, vitamíny a samozřejmě i jejich deriváty. Tyto sloučeniny pak můžeme rozdělit na základě některých metabolických drah na citrátový cyklus, glykolýzu, močovinový cyklus a pentózofosfátovou dráhu [4].

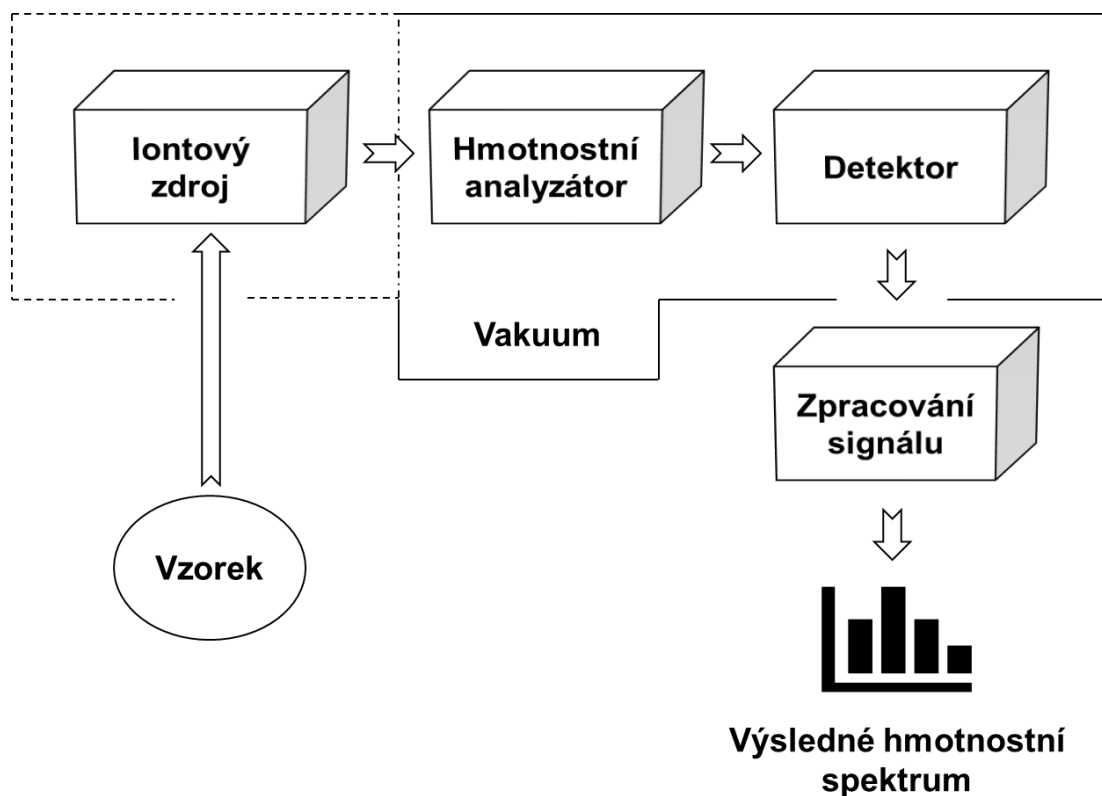
Oproti tomu sekundární metabolity, běžně označované jako přírodní produkty, jsou produkovány v každém jednotlivém živém organismu na Zemi. Jedná se o látky, které se nutně nepodílejí na primárních metabolických procesech, ale plní nejčastěji farmakologické a jiné biologické funkce. Do této skupiny metabolitů patří především rostliny, houby, bakterie a mikroorganismy. S objevem penicilinu, jakožto prvním masově vyráběným

antibiotikem, se sekundární metabolity začali více aplikovat v klasické medicíně, avšak daleko větší využití mají v medicíně alternativní. Jak už bylo řečeno, jmenovitě sem můžeme zařadit například další druhy léčiv, pigmentů, pesticidů nebo také barviva. Velmi důležitou vlastností sekundárních metabolitů je jejich biologická aktivita, která může hrát klíčovou roli při objevování nových léků. Celá skupina sekundárních metabolitů je chemicky i strukturně různorodá. Ač je diverzita této skupiny veliká, můžeme je rozdělit na základě strukturní podobnosti, respektive dle biosyntetických drah, na metabolity acetátové dráhy (mastné kyseliny a polyketidy), mevalonátové dráhy (steroidy, terpenoidy), shikimatové dráhy (fenylpropaniody a aromatické aminokyseliny) a alkaloidy (sloučeniny obsahující dusík). Nevýhodou některých sekundárních metabolitů je jejich toxicita týkající se škodlivého účinku na organismus. Nicméně toxický účinek metabolitů, lze využít při léčbě některých onemocnění jako je třeba rakovina, kde se k samotné léčbě využívají cytotoxické sloučeniny [5].

1.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je destruktivní analytická technika, kde dochází k převodu molekul na ionty, které se následně dělí dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Výsledkem je hmotnostní spektrum, na kterém jsou zaznamenány intenzity jednotlivých iontů. MS umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu a mezi její výhody patří vysoká citlivost, selektivita a univerzálnost použití. Mezi nevýhody potom řadíme pořizovací a provozní náklady, avšak i přes tyto nevýhody patří MS mezi nejvíce používanou techniku v oblasti medicíny, farmacie, forezních věd nebo také v enviromentálních analýzách [6; 7].

Přístroj, na kterém probíhají jednotlivá měření, nazýváme hmotnostní spektrometr. Jedná se o je iontově optické zařízení, které se skládá ze tří základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru (**obr. 1**). Součástí jsou samozřejmě i další neméně důležité části jako vakuový systém, iontová optika nebo samotný počítačový software pro sběr dat [7].



Obrázek 1: Schéma hmotnostního spektrometru

1.2.1 Ionizační techniky

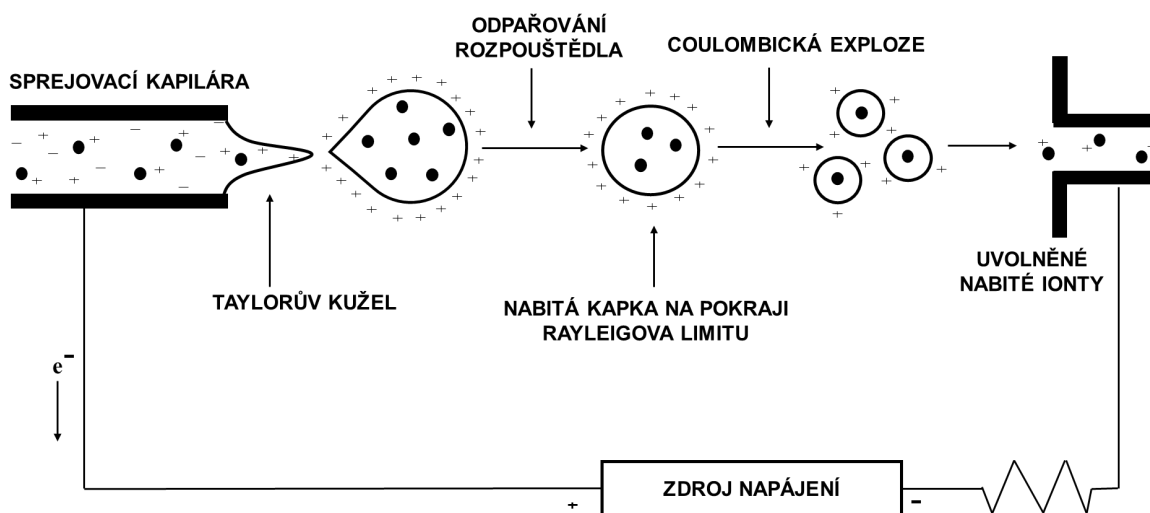
Ionizační techniky můžeme dělit na tvrdé a měkké podle toho jakou ionty získaly vnitřní energii během ionizace. Samotná ionizace pak může probíhat buď za sníženého nebo za atmosférického tlaku. Tvrdé ionizační techniky, jako je elektronová ionizace, získávají nadbytek vnitřní energie, to se následně projeví fragmentací molekulového iontu a vzniku tzv. fragmentových iontů. Oproti tomu měkké ionizační techniky, jako jsou například ionizace elektrosprejem nebo chemická ionizace, získávají mnohem méně vnitřní energie, a proto lze v jejich spektrech pozorovat spíše protonované či deprotonované molekuly s minimem fragmentových iontů. Níže je uvedený stručný přehled jednotlivých ionizačních technik (**tabulka 1**) [6; 7] a následně samostatně blíže popsána ionizace elektrosprejem, jakožto ionizační technika nejpoužívanější při metabolomických analýzách [8-11].

Tabulka 1: Přehled vybraných ionizačních technik

| Ionizační technika | Zkratka | Ionizace | Tlak |
|--|----------------|-----------------|--------------------------|
| <i>Elektronová ionizace</i> | EI | tvrdá | snížený |
| <i>Chemická ionizace</i> | CI | měkká | snížený |
| <i>Ionizace elektrosprejem</i> | ESI | měkká | atmosférický |
| <i>Chemická ionizace za atmosférického tlaku</i> | APCI | měkká | atmosférický |
| <i>Fotoionizace za atmosférického tlaku</i> | APPI | měkká | atmosférický |
| <i>Ionizace laserem za účasti matrice</i> | MALDI | měkká | snížený/ atmosférický |

1.2.1.1 Ionizace elektrosprejem

Jak už bylo výše řečeno, ESI je nejvyužívanějším typem ionizace pro metabolomickou analýzu. Jedná se o velmi šetrnou techniku umožňující tvorbu $[M+H]^+$, $[M+H]^-$, aduktových iontů, ale i vícenásobně nabitých iontů. ESI je velice vhodnou metodou pro středně polární až iontové látky o různé molární hmotnosti. Mezi tyto molekuly řadíme například peptidy, proteiny, sacharidy, ale i polymery. Princip ESI spočívá ve třech hlavních, po sobě navazujících krocích (**obr. 2**). V prvním kroku dochází ke zmlžení analytu na malé elektricky nabitě kapičky. V druhém kroku dochází k odpařování rozpouštědla, čím se zvyšuje hustota náboje na povrchu kapky, než dosáhne Rayleighova limitu. Po jeho překročení se nabitá kapka rozpadá na ještě menší s rozdělením původního náboje. Celý tento proces se nazývá Coulombická exploze, který se několikrát opakuje, než dojde k uvolnění samotného iontu. Třetím a posledním krokem je transport vzniklých iontů do hmotnostního analyzátoru za přítomnosti sušícího plynu, nejčastěji dusíku [9; 12].



Obrázek 2: Schéma ionizace elektrosprejem [7; 12].

1.2.2 Hmotnostní analyzátoři

Druhou a nedílnou částí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor, který umožňuje rozdělení vzniklých iontů v plynné fázi podle m/z . Oproti iontovému zdroji pracuje hmotnostní analyzátor pouze za vysokého vakua. Dle typu analyzátoru se tlak v systému může pohybovat v rozmezí mezi 10^{-3} až 10^{-11} Pa. Dělení iontů dle m/z pak probíhá na základě 5 různých fyzikálně-chemických principů:

- Dle zakřivení dráhy letu iontu v elektrickém nebo magnetickém poli (magnetický sektorový analyzátor)
- Dle různé doby rychlosti letu (analyzátor doby letu)
- Dle různé stability oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól, iontová past)
- Dle různé frekvence harmonických oscilací v elektrickém poli (orbitální past, tzv. Orbitrap)
- Dle různé rotace při cykloidálním pohybu iontů v elektrickém a magnetickém poli (iontová cyklotronová rezonance)

Hmotnostní analyzátor je charakterizován několika základními parametry. Mezi ně patří rozlišovací schopnost, jinak řečeno rozlišení, rychlost, hmotnostní a dynamický rozsah a v neposlední řadě i správné určení hmoty (vyjádřena v jednotkách *parts per million*). Podle rozlišovací schopnosti dělíme analyzátoři do dvou skupin, s vysokým a s nízkým rozlišením [7]. Samotný výběr analyzátoru zásadně ovlivňuje kvalitu hmotnostních spekter,

ale i pořizovací cenu hmotnostního spektrometru. Mezi vysokorozlišovací analyzátory řadíme Orbitrap, ICR pracující s Fourierovou transformací (FT) [13], dále pak analyzátor doby letu (TOF) a sektorový magnetický analyzátor s dvojitou fokusací iontů. Rozlišení těchto analyzátorů se pohybuje od desítek tisíc až k přibližně 20 milionům [14]. Oproti tomu analyzátory s nízkým rozlišením, jako je kvadrupól nebo iontová past, mají rozlišení pouze v jednotkách tisíc [7].

1.2.3 Detektory v hmotnostní spektrometrii

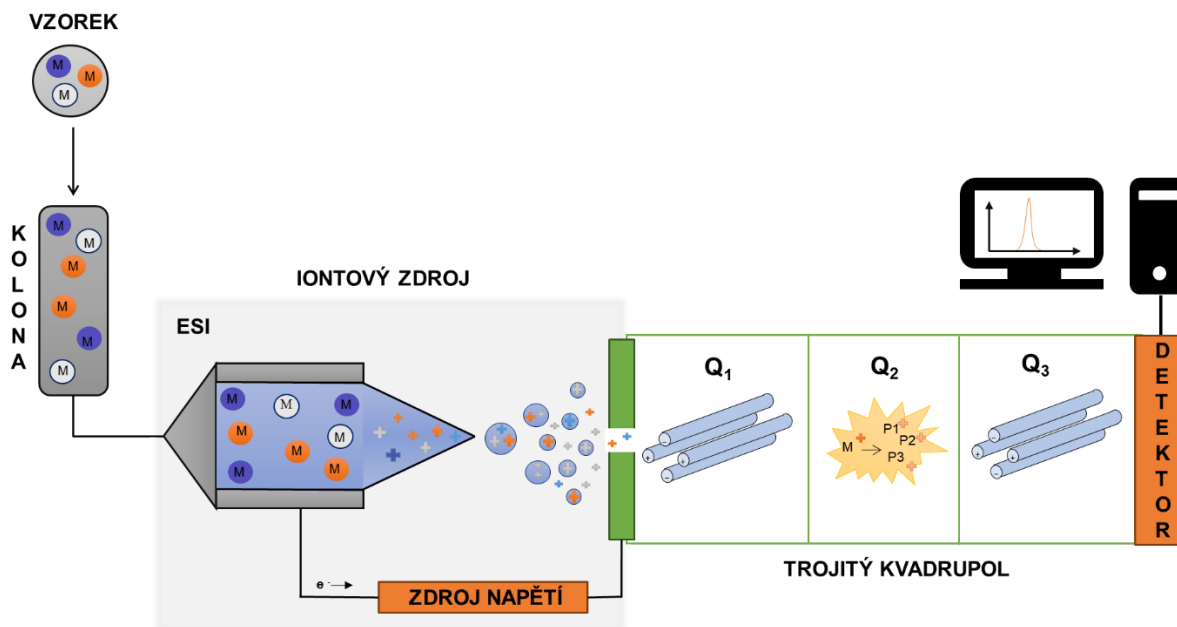
Jako poslední část hmotnostního spektrometru je hmotnostní detektor, který po rozdělení iontů v analyzátoru generuje jejich příslušný signál, resp. převádí proud nabitých částic na proud elektrický. Veškeré informace putují do počítače, kde jsou následně interpretovány. Většina systémů pracuje na tomto principu, avšak výjimkou jsou dva analyzátory, Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance. Detekce zde probíhá přímo v analyzátoru a signál je zpracováván pomocí Fourierovi transformace. Ostatní analyzátory využívají různé typy MS detektorů. Mezi nejběžnější detektory řadíme elektronový násobič, scintilační fotonásobič nebo také Faradayovu klec [15].

1.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

MS/MS analýza spadá do skupiny hmotnostních technik označovaných jako tandemová hmotnostní spektrometrie. Principem MS/MS analýz je štěpení vybraných prekurzorových iontů na ionty produktové, tzv. fragmenty. Vybraný prekurzorový iont se v analyzátoru nebo kolizní cele podrobí excitaci s kolizním plynem, nejčastěji plynem inertním, čímž dochází k jeho rozpadu a na příslušné fragmenty. Výsledkem je MS/MS spektrum sloužící pro následnou identifikaci látek (**obr. 3**). Možností fragmentace je hned několik. Mezi nejčastější řadíme kolizně indukovanou disociaci (CID), dále pak fragmentaci v důsledku fotodisociace nebo fragmentaci v důsledku záchytu elektronu. Posledním a typem fragmentace je nadměrná excitace při ionizaci jako tomu může být například u MALDI. CID potom můžeme ještě rozdělit na nízkoenergetickou disociaci, kdy se energie srážek pohybuje v rozsahu 1-100 eV a vysokoenergetickou disociaci, kde se energie srážek pohybuje v keV a dochází zde k rozsáhlejší fragmentacím [16].

Zásadním rozdílem MS/MS analýz je volba hmotnostního analyzátoru. U tohoto typu měření se využívají hybridní hmotnostní analyzátory. Jedná se o spojení několika jednoduchých analyzátorů, kde nejčastěji používanými jsou QTOF (spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu), QqQ (trojitý kvadrupól), QTRAP (spojení kvadrupólu a lineární iontové pasti). Jejich výhoda oproti jednoduchým analyzátorům spočívá v případě QqQ a QTRAPu ve větší

citlivosti a v případě QTOFu ve větším rozlišení, ale zejména v možnosti měření MS/MS spektra [17].



Obrázek 3: Schéma MS/MS spektrometru [18]

1.2.5 Iontová mobilita

Iontová mobilita (IM) je elektroforetická technika umožňující rychlou separaci iontů v plynné fázi. K separaci iontů dochází na základě jejich velikosti, tvaru, náboje a hmotnosti v závislosti na různé pohyblivosti v slabých nebo silných elektrických polích [19-20]. V posledních desetiletích se iontová mobilita ve spojení s MS ukázala jako velice dobrou metodou pro zlepšení analýzy malých molekul. Tato technika dokáže poskytnou strukturní i hmotnostní informace během milisekund [20]. Spojení IMS existuje v několika provedeních: mobilitní spektrometrie s driftovou trubicí (DTIMS), iontová mobilitní spektrometrie s putující vlnou (TWIMS) a iontové mobility spektrometrie v asymetrické poli (FAIMS) popř. diferenciální mobilitní spektrometrie (DMS) [19]. IMS se také velmi často spojuje s kapalinovou chromatografií, kdy u tohoto spojení může docházet ke zlepšení separace izobarických látek, k redukci šumu/pozadí nebo ke zlepšení selektivity separací matricových efektů od cílových analytů [20-21].

IMS lze spojit se všemi druhy ionizace, jako je ESI, APCI nebo MALDI. Jako hmotnostní analyzátor se nejčastěji používá TOF, méně často potom Orbitrap [22] nebo kvadrupól [20; 23]. Díky velké variabilitě spojení analyzátoru s iontovým zdrojem, můžeme IMS využít k analýze nejrozličnějších látek a nabízí nám velice širokou škálu použití jak v metabolomice, tak i v jiných vědních disciplínách. Použití IM v metabolomice má své výhody ale i omezení. Výhodou IMS je multidimenzionální molekulární analýza pro necílenou a semi-cílenou analýzu. Zlepšuje citlivost rozlišení, tím pádem může být daleko přesnější při identifikaci metabolitů, což má za následek snížení falešně pozitivních identifikací. Tím, že IMS je poměrně nová technika, tak omezení spočívají v nutnosti vylepšení zejména softwarových systémů nebo v rozšiřování IM databází [20].

1.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je separační technika využívající se pro separaci látek nepolární až iontové povahy. K separaci směsi dochází na základě rozdílné afinity mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Stacionární fází může být tuhá látka nebo kapalina, která je vázána na pevném nosiči, zatímco mobilní fáze je výhradně tvořena kapalinou. Stacionární fáze je umístěná v chromatografických kolonách, kterými protéká mobilní fáze, hnaná v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie vysokotlakým čerpadlem. Na fázovém rozhraní mezi stacionární a mobilní fází dochází k neustále se opakující dynamické sorpci a desorpci stanovovaných látek. Tento proces je pro každou látku charakterizovaný pomocí distribuční konstanty, která udává poměr rovnovážné koncentrace látky strávené v stacionární fází k rovnovážné koncentraci látky strávené ve fází mobilní. Aby došlo k separaci směsi, je nutné, aby se distribuční konstanty vzájemně dostatečně lišily [24].

V metabolomice se nejčastěji používanou separací stala chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) následovaná kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi (RP-LC) [9]. Právě tyto dva typy kapalinové chromatografie nám mohou v kombinaci s hmotnostní spektrometrií poskytnout velice dobrý přehled o celém lidském metabolomu, jelikož lze v jedné analýze detekovat až několik set, popřípadě tisíc metabolitů [25].

1.3.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, častěji označovaná zkratkou HILIC, je separační technika, jenž umožňuje rozdělení malých polárních molekul na hydrofilních stacionární fází. Jako polární stacionární fáze se nejčastěji používá silikagel nebo jeho modifikace, viz **tabulka 2** [24; 26-29].

Tabulka 2: Přehled dostupných stacionárních fází pro HILIC separace [24]

| <i>NEUTRÁLNÍ</i> | <i>NABITÉ</i> | <i>ZWITTERIONTY</i> |
|-------------------|---------------|------------------------------|
| diol | silikagel | sulfobetain |
| kyano | aminopropyl | fosfocholin |
| polyvinylalkohol | imidazol | vícemodální stacionární fáze |
| amid | triazol | |
| aspartamid | močovina | |
| polyethylenimin | | |
| pentahydroxyl | | |
| polyethylenglykol | | |
| cyklodextrin | | |

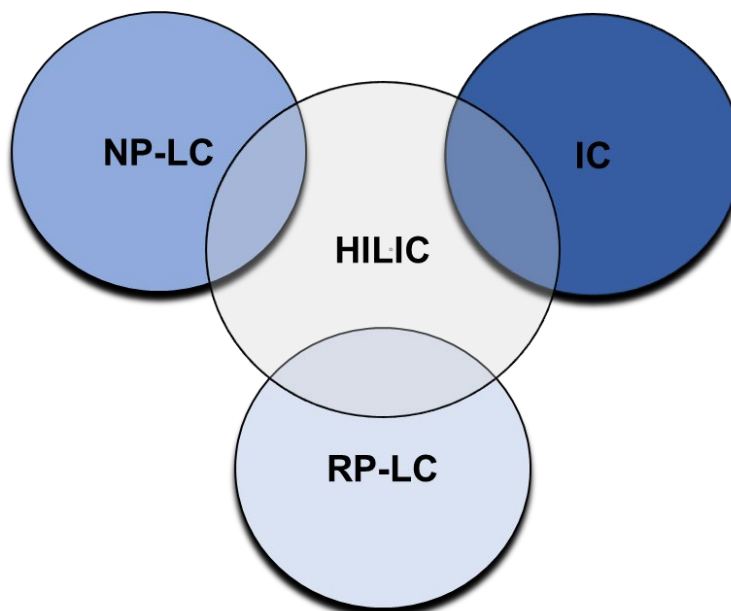
Mobilní fázi tvoří s vodou mísitelná aprotická polární organická rozpouštědla, kde vodná složka tvoří minimálně 2-3%, kvůli zachování optimálních podmínek pro HILIC separace. Buszewský a kol. zpracovali seznam mobilních fází se zvyšující eluční silou vhodnou pro použití HILIC separací [27].

aceton < isopropanol ~ propanol < acetonitril < ethanol < dioxan < methanol < voda

Velmi často se u HILIC separací setkáváme s gradientovou elucí. Typickými gradienty používanými pro HILIC separace jsou organická rozpouštědla v zastoupení od 50 do 95 %. Spolu s využitím gradientu je pro HILIC typické přidávání solí (pufrů) do mobilní fáze, které mají za úkol ovlivnit elektrostatické interakce mezi stacionární fází a nabitými analyty. Nejčastěji používané pufrů jsou amonné soli acetátu či mravenčanu v rozsahu pH 3-8, ale mohou se využívat i jiné méně obvyklé pufrů jako je například fluorid amonný [29]. Dále pak mohou být využívány roztoky kyselin či bází, popř. samotná voda, dle toho, co dovoluje povaha analytů v kombinaci se zvolenými podmínkami [24; 26; 28]. Samotná retence látek v HILIC modu je pak dána hydrofilitou látky, tedy čím je analyt hydrofilnější, tím více je v koloně zadržován. Kromě toho jsou do separace zapojené i jiné adsorpční mechanismy, které jsou poměrně složité a zahrnují interakce dipól-dipól, vodíkové vazby, hydrofilní rozdělování či elektrostatické interakce. Jednotlivé interakce potom závisí na povaze a složení stacionární a mobilní fáze [26; 28].

Z historických důvodů se může HILIC separace přirovnávat k separaci s normálními fázemi. Dochází k tomu zejména proto, že využívá stejně polárních stacionárních fází jako je právě již zmiňovaný silikagel, avšak samotný princip separace je odlišný. HILIC nám také umožňuje analýzu elektricky nabitých látek stejně jako to může být v iontové

chromatografii (IC) [27]. Tím, že HILIC separace je takovým hybridem všech typů kapalinové chromatografie, lze ho schematicky znázornit **obr. 4**.



Obrázek 4: Schématické znázornění vybraných přístupů kapalinové chromatografie [27]

Za velkou výhodou HILIC separace můžeme považovat vysokou citlivost stanovení, vysokou separační kapacitu píků a zároveň vysokou retenční sílu silně polárních látek rozpustných ve vodě. Další podstatnou výhodou je nižší viskozita mobilní fáze, a to 2-3x oproti RP-LC, což vede k nižšímu zpětnému tlaku, a tedy k možnosti použití vyšších průtoků, delších kolon a menších velikostí částic [28]. Tím, že HILIC využívá téžavější polární mobilní fáze, usnadňuje tak odpařování vzorku a při ESI ionizaci to může vést až k několikanásobnému zvýšení citlivosti. Spolu s RP-LC lze HILIC využívat k 2D-LC ortogonálním separacím v online nebo off-line režimu. Oproti tomu má HILIC i své nevýhody. V závislosti na daných experimentálních podmínkách může docházet k rozmývání píků, retenční časy separace jsou obtížné předvídatelné kvůli složitým retenčním mechanismům, zejména pak plná ekvilibrace kolony trvá až 4x déle oproti RP-LC [24; 27-28].

Spojení HILIC separace s MS je v metabolomických analýzách velice časté, kvůli již zmiňované separaci polárnějších látek, což umožňuje značné pokrytí celého metabolomu [29]. Ze všech komerčně dostupných stacionárních fází používaných pro metabolomiku se často využívají neutrální UPLC BEH-amid a zwitteriontové (ZIC) stacionární fáze [30]. Například BEH-amid byl použit pro stanovení 24 volných aminokyselin

v buněčných kulturách [31], tzn. že by tento typ kolony mohl velice efektivně pokrýt klíčové třídy metabolitů jako jsou aminokyseliny, nukleotidy a kyseliny v lidské plazmě [32]. Oproti tomu Arase a kol. [33] uvádí fosforylcholinový typ ZIC-HILIC jako nejvhodnější kolonu pro separaci nukleotidů. Dalším kritickým faktorem kromě správného výběru kolon v metabolomice je samotná volba pH mobilní fáze, jelikož ovlivňuje náboj metabolitů a jejich retenční chování [30]. V metabolomice se pak v drtivé většině případů setkáváme s acetonitrem jako mobilní fází, zejména při spojení s ESI ionizací [24].

1.3.2 Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi je nejuniverzálnější a velmi často používanou metodou zejména proto, že je použitelná pro látky nejrůznějších polarit i různých acidobazických vlastností. Jedná se o systém, kdy mobilní fáze je polárnějšího charakteru než fáze stacionární. Nepolární stacionární fázi RP-LC tvoří většinou dlouhé uhlíkaté řetězce ukotvené na povrch pevného nosiče, kterým je nejčastěji silikagel, modifikovaný silikagel nebo různé oxidy kovů (např. hliníku, zirkonu, titanu). Mobilní fázi potom tvoří vodná a organická fáze, kde organickou je nejčastěji polární rozpouštědlo mísitelné s vodou, např. methanol, acetonitril nebo méně používaný tetrahydrofuran. Eluční síla těchto rozpouštědel roste s klesající polaritou rozpouštědla. Samotnou retenci látek na koloně ovlivňuje hned několik faktorů. Jedním z nich je délka alkyly stacionární fáze nebo vliv funkčních skupin, kdy retence roste s přibývajícím počtem uhlíků v řetězci, popřípadě s přibývajícím počtem aromatických jader. Oproti tomu přítomnost silně polárních a iontových skupin (amino-, hydroxy-, karboxy-) retenci látek snižuje. Příkladem mohou být cukry, které ve své struktuře obsahují více polárních skupin a samotná uhlovodíková část je malá, zde převažuje větší afinita k vodě jako mobilní fázi a retence je tím výrazně snížena. To stejné platí například i pro disociované funkční skupiny (sulfokyseliny), a proto je v takovýchto případech vhodnější pro separaci kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí [24].

1.3.3 Superkritická fluidní chromatografie

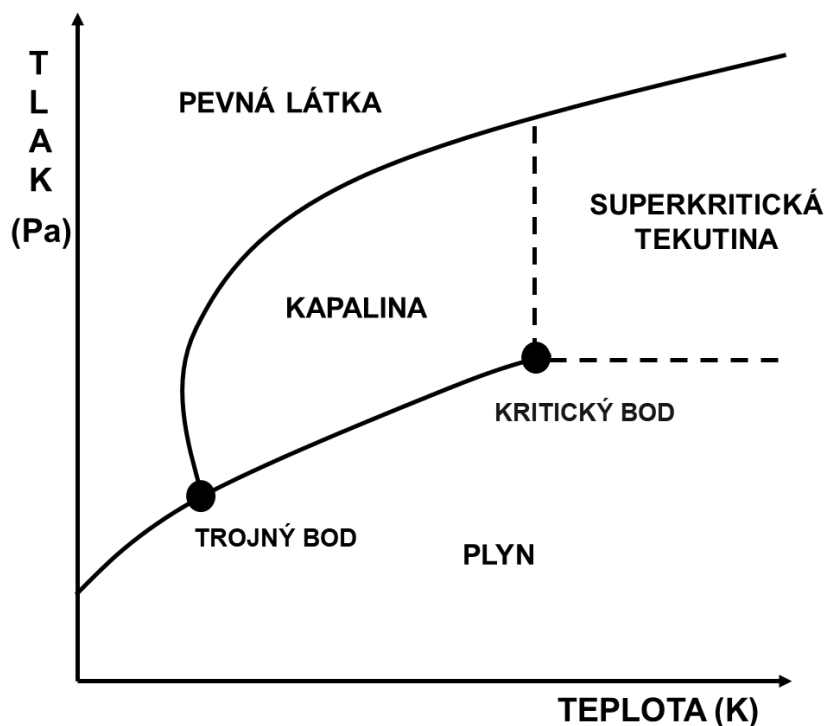
Superkritická fluidní chromatografie (SFC) byla poprvé použita již v roce 1962 Klesperem a kol. [34], ale větší pozornost získala až začátkem 90. let. S rostoucím technologickým pokrokem v oblasti chromatografie vzrostl i zájem o SFC zejména v oblasti lipidomické analýzy. SFC oproti ostatním chromatografickým technikám využívá binární mobilní fázi složenou ze stlačeného plynu v superkritickém stavu s přídavkem organického modifikátoru (methanol, ethanol, acetonitril) [24; 35-37]. Majoritní složkou mobilní fáze v současnosti je stlačený oxid uhličitý v rozmezí tlaků 100-400 násobku tlaku atmosférického

a teplotě 31,3 °C, čímž se vyskytuje v superkritickém stavu. Jako stacionární fáze v SFC analýzách se v drtivé většině používá (modifikovaný) oxid křemičitý [24; 35].

Superkritické tekutiny jsou látky, které se nachází při teplotě vyšší, než je kritická teplota T_c a kritický tlak P_c (**obr. 5**) [24; 37] a vykazují odlišné vlastnosti (**tabulka 3**), které je činí velice atraktivními v separačních analýzách. Samotné vlastnosti těchto tekutin jsou na rozmezí kapalina-plyn, kdy hustotou jsou blízko kapalině, ale viskozitou a difúzním koeficientem blízko plynům [36]. Tyto vlastnosti vedou k lepší selektivitě, kratší době analýzy a k nízkým zpětným tlakům umožňujícím používat vysoké průtoky [35; 37]

Tabulka 3: Srovnání vlastností nadkritické tekutiny s kapalinou a plynem [24]

| | KAPALINA | NADKRITICKÁ TEKUTINA | PLYN |
|--|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Viskozita [cP] | 0,2-3 | $(1-3) \times 10^{-2}$ | $(1-3) \times 10^{-2}$ |
| Hustota [g/cm ³] | 0,6-1,6 | 0,2-1,1 | $(0,6-2) \times 10^{-3}$ |
| Difúzní koeficient [m ² /s] | $(0,2-2) \times 10^{-9}$ | $0,7 \times 10^{-7}$ | $(1-4) \times 10^{-5}$ |



Obrázek 5: Fázový diagram oxidu uhličitého [24]

Co se týká použití SFC v metabolomických aplikacích, tak představuje velice zajímavou techniku, která umožňuje ortogonální separační selektivitu, nízkou tlakovou ztrátu a celkově

velice dobrou citlivost analýzy. Díky použití aditiv lze říct, že došlo ke zlepšení v oblasti simultánní analýzy metabolitů, které vykazují široký rozsah polarit. V porovnání s LC vyžaduje SFC přítomnost pomocné kapaliny tzv. „*make-up*“, která zlepšuje ionizaci, a tedy celkově i odezvu signálu. Avšak i navzdory velkému pokroku se SFC používá zatím používá zejména při lipidomických a chirálních analýzách [36].

1.3.4 Bioinertní systém

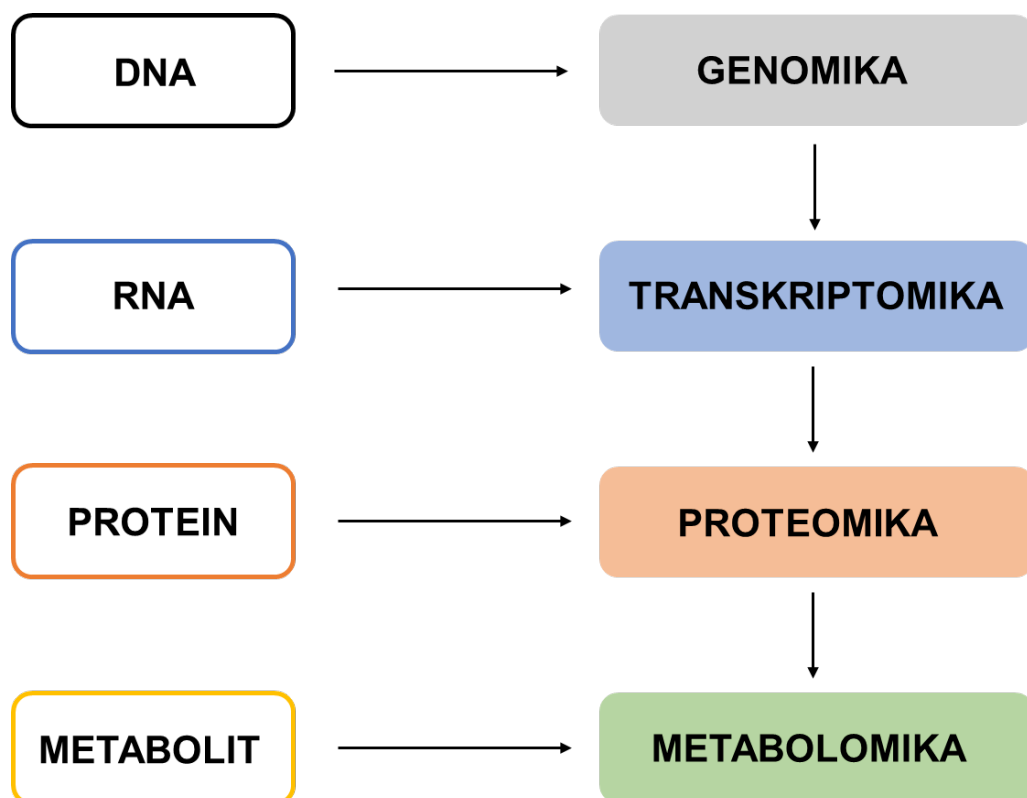
S rostoucím pokrokem rostou i nároky na instrumentální techniku, a proto se výrobci chromatografických přístrojů v posledních několika letech zaměřili na vývoj bioinertních a biokompatibilních systémů. Obecně se termín „bioinertní“ vztahuje k povrchu, který brání adsorpci, zatímco termín „biokompatibilní“ se používá k definování korozivzdorného materiálu. Tyto systémy jsou navrženy tak, aby oproti klasickým nerezovým systémům minimalizovali nespecifické adsorpční ztráty v důsledku interakcí povrchu kovu s analytem [38]. Adsorpční interakce negativně ovlivňují chromatografickou separaci tím, že mění tvar píku (asymetrie, chvostování) a v nejhorším případě může dojít až k úplné ztrátě signálu. Výhoda bioinertních systémů spočívá v tom, že povrch systému je z materiálu, který snižuje/zamezuje nežádoucím interakcím, což vede k vyšší selektivitě, citlivosti a lepšímu tvaru píku, zejména pro analyty s problematickými funkčními skupinami jako je fosfátová nebo sulfátová [38-39].

1.3.4.1 Bioinertní kolony

Inovace spočívá nejen v bioinertních systémech, ale zejména v oblasti chromatografických kolon. Nejčastěji se jako bioinertní materiály používají polyetheretherketon (PEEK), MP35N (slitina nikl-kobalt) a titan, které odolávají i vysokým tlakům [39]. Kromě toho společnost Waters nedávno uvedla na trh nový bioinertní systém UHPLC, kde bioinertní materiál tvoří tzv. *hybridní povrch*. Tento povrch je založen na siloxanovém polymeru s ethylenovým můstkem o složení $[O_{1.5}-SiCH_2-CH_2-SiO_{1.5}]_n$, který byl vyvinut zejména pro RP a HILIC chromatografii [38]. Tento hybridní povrch nezhoršuje tvar píků látkám obsahující fosfátové a karboxylové skupiny jako tomu je u klasických materiálů (nerezová ocel). Nerezová ocel je náchylná ke korozi, zvláště když je vystavena kyselým nebo halogenovaným rozpouštědlům obsaženým v mobilní fázi. Zkorodované povrchy mohou být zvláště náchylné k interakci s určitými analyty. Nerezová ocel může také uvolňovat ionty železa do mobilní fáze a tyto ionty se mohou vázat na stacionární fázi a interagovat s analyty citlivými na kovy a celkově tak zhoršovat separaci [39].

1.4 Metabolomická analýza

Metabolomická analýza, většinou označována jako metabolomika, je vědní obor zabývající se komplexní a systematickou identifikací či kvantifikací metabolitů produkovaných organismem. Poskytuje informace o metabolismu za konkrétního fyziologického nebo vývojového stádia a je velice důležitá pro pochopení nejrůznějších biologických procesů [36; 40]. K objasnění těchto procesů se v dnešní době používá systémová biologie, tzv. systemomika, která se zabývá strukturou a dynamikou jednotlivých úrovní biologické organizace. Systémový přístup zahrnuje několik klíčových „omických“ věd: genomiku, transkriptomiku, proteomiku a metabolomiku, jejichž cílem je určit genom (DNA), transkriptom (RNA), proteom (proteiny) a metabolom (metabolity). Ve výše vyjmenovaných „omikách“ existuje mnoho vzájemných interakcí, které se buď doplňují nebo na sebe navazují (**obr. 6**). Metabolomika zahrnuje některé další podskupiny, jmenovitě metabolity lipidů, aminokyselin, cukrů a nukleotidů [9; 41].



Obrázek 6: Omická kaskáda [1]

I když označení metabolomika poprvé použil v roce 1998 britský vědec Steve Oliver, který se ve své vědecké práci zabýval studiem metabolismu kvasinek v živém organismu [42], ke zvýšenému zájmu o tuhle problematiku došlo teprve v posledních letech. Souvisí to zejména s vývojem přístrojových technik, kdy se pro metabolomickou analýzu v drtivé většině využívají dvě spektrální metody, a to nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie ve spojení s různými separačními technikami. Obě techniky mají své silné i slabé stránky, avšak MS je ve srovnání s NMR citlivější, specifitější a cenově dostupnější [43]. Jak už bylo řečeno, dle potřeby MS spojujeme s nejrůznějšími separačními technikami, nejčastěji pak s kapalinovou chromatografií (LC/MS), plynovou chromatografií (GC/MS) či elektroforézou (CE/MS). V následující tabulce (**tabulka 4**) jsou popsány výhody a nevýhody jednotlivých separačních spojení [36; 40].

Tabulka 4: Výhody a nevýhody LC, GC, CE s MS [40]

| Separací technika | Výhody | Nevýhody |
|-------------------|---|--|
| LC/MS | <ul style="list-style-type: none"> • vhodné pro látky s nízkou těkavostí • vysoká citlivost, široký rozsah • možnost dvousložkové MF • univerzálnost použití • možnost separace i identifikace v jedné analýze | <ul style="list-style-type: none"> • paměťové efekty, zanesení zdroje • velká spotřeba rozpouštědel |
| GC/MS | <ul style="list-style-type: none"> • vhodné pro těkavé a termostabilní látky • vysoká citlivost • snadná obsluha • použití spektrálních knihoven EI | <ul style="list-style-type: none"> • může dojít k rozkladu analytu • nelze provést stopovou analýzu • diskriminace velkých Mr |
| CE/MS | <ul style="list-style-type: none"> • malé dávkování • rychlá separace • není potřebná předúprava vzorku • separace biopolymerů a iontových sloučenin | <ul style="list-style-type: none"> • nízká reprodukovatelnost • špatná citlivost |

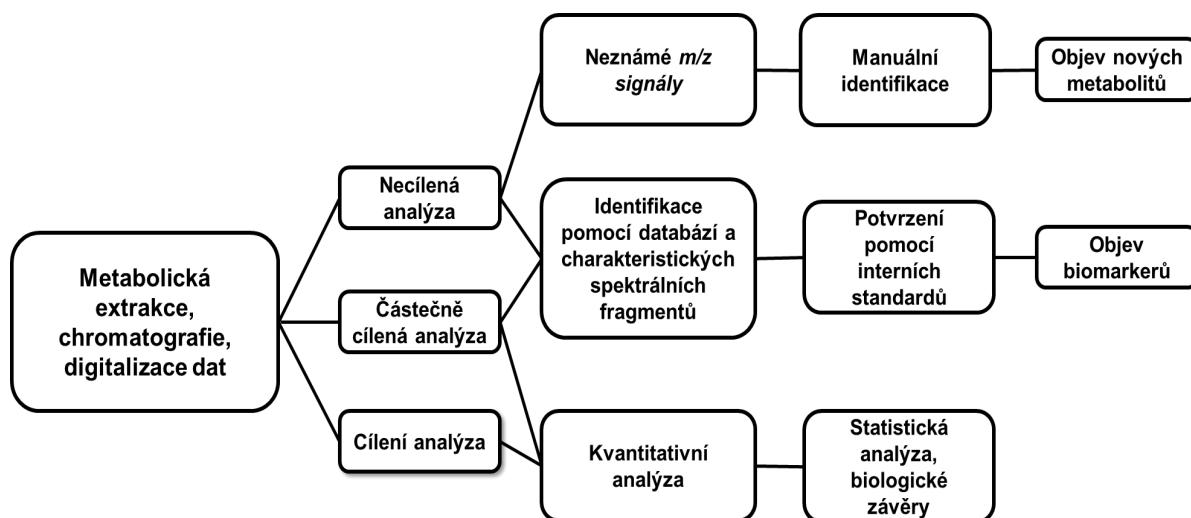
Tím, že metabolom obsahuje velké množství nejrůznějších struktur s velkým rozdílem fyzikálně-chemických vlastností, lze si jeho komplexní analýzu lépe představit při použití ortogonálních technik nebo při kombinaci různých chromatografických režimů. Na základě rozdílných vlastností se pak musí volit optimální experimentální podmínky, které se mohou mezi jednotlivými metabolity do značné míry lišit v závislosti na jejich polaritě [36].

Častokrát se ve starší literatuře můžeme ještě setkat s pojmem metabonomika. Hlavní rozdíl mezi pojmy metabolomika a metabonomika je v jejich výkladu. Dle striktních definic je cílem metabolomiky holistická kvalitativní a kvantitativní analýza všech metabolitů v daném biologickém systému, kdežto cílem metabonomiky je porovnání hladin metabolitů v systému na reakci daného podmětu. V novější literatuře se však rozdíl mezi těmito pojmy vytrácí [44].

1.4.1 Přístupy v metabolické analýze

Metabolomickou analýzu můžeme rozdělit dle přístupu k dané analýze na cílenou a necílenou (**obr. 7**) Cílený metabolomický přístup je multiplexní a spočívá v identifikaci a kvantifikaci předem vybrané skupiny metabolitů s velice podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [45]. Může se jednat o metabolity účastnící se stejné biochemické dráhy jako je například Krebsův cyklus, glykolýza či β -oxidace [41]. Cílený přístup se využívá zejména ve farmakokinetice metabolismu léčiv a celkové klinické analýze. V té hraje významnou roli hlavně při identifikaci metabolických biomarkerů nejrůznějších nemocí. Výhodou cílené analýzy je absolutní kvantifikace, dále pak nízký limit detekce, což souvisí s dobrou citlivostí a oproti necílené analýze výrazně jednodušším zpracováním a interpretací dat [1; 46-48].

Druhým komplexnějším přístupem metabolomické analýzy je necílená analýza. Tu můžeme odborněji označit jako metabolomické profilování u kterého není předem definovaná skupina metabolitů a jeho cílem je identifikovat a kvantifikovat co nejvíce metabolitů v daném vzorku [41; 45]. Výhodou tohoto přístupu je vyšší rozlišovací schopnost, identifikace nových metabolitů a látek s nimi souvisejících. Oproti tomu nevýhodou je falešná pozitivita, identifikace metabolických m/z signálů („*features*“), relativní kvantifikace a v neposlední řadě složitá interpretace výsledků [1; 19 46-47].



Obrázek 7: Obecné schéma různých pracovních postupů při metabolických analýzách [45]

1.4.1.1 Postupy v metabolické analýze

Pod pojmem ideální postup si lze představit jednotlivé kroky, jak by se správně mělo postupovat, při vývoji vlastní analytické metody v metabolomice. Na počátku je důležité provést vývoj nové analytické metody. Samotný vývoj metody probíhá většinou na standardech (STD), na kterých se nejdříve optimalizují vhodné podmínky a parametry pro analýzu (např. složení mobilní fáze, gradient, teplota kolony, parametry ionizace). V druhém kroku se provádí necílená analýza (tzv. kvalitativní analýza) a po identifikaci co nejvíce látek následuje validace metody, která nám umožní ověřit, že vyvinutou metodu lze použít pro kvantitativní analýzu. Mezi parametry validace patří například správnost, přesnost, selektivita, robustnost, lineární rozsah, mez detekce a mez kvantifikace. Posledním krokem je provedení kvantitativní cílené analýzy, která je pro metabolomiku podstatná, z hlediska pochopení biologických procesů [49]. Kvantifikaci lze provést dvěma způsoby, relativní či absolutní. Při relativní kvantifikaci, která se využívá ve velkém měřítku zejména při necílených analýzách, dochází ke kvantifikaci látek na základě normalizace signálu. Většinou se využívá přístup semi-kvantity, neboť pro každý identifikovaný metabolit neexistuje příslušný interní standard, proto se jeden interní standard využívá pro více strukturně podobných látek v blízkém retenčním čase. Oproti tomu absolutní kvantifikace využívá pro každou jednu látku daný IS a tím pádem lze s jistotou určit její přesnou koncentraci [50].

Interní standard je analogická sloučenina či homolog o známé koncentraci, který nesmí být přítomen ve vzorku a musí vykazovat podobné vlastnosti jako sledovaný analyt. Ideálním případem pro metabolomiku by bylo použití IS pro každý metabolit, avšak chemická diverzita

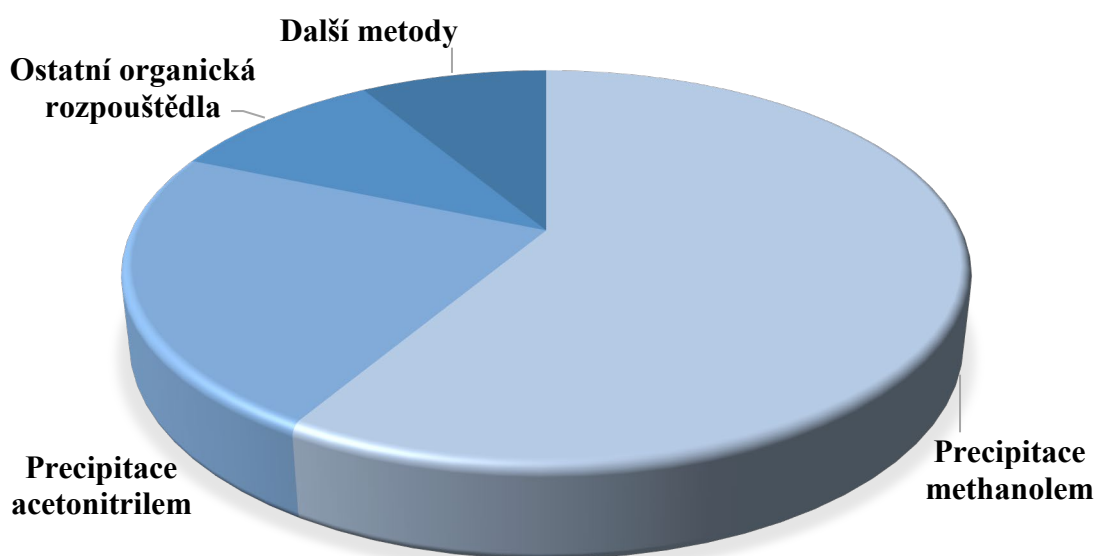
metabolitů je tak velká, že pro rozsáhlé metabolické profilování není reálná [51]. IS se mohou vyskytovat v nejrůznějších podobách, avšak nejlepší variantou je izotopicky značený IS, např. ^{13}C , ^2H či ^{14}N . Při použití deuteria je důležité mít na paměti, že k označení jsou použitelné pouze ty pozice, na kterých nedochází k vodík-deuteriové výměně. Výhodou použití izotopicky značených IS je velice podobné nebo stejné chromatografické chování (retenční čas) a identická ionizace. Jedinou nevýhodou IS je jejich cena a dostupnost. V metabolomice se obecně při práci s biologickým vzorkem nedoporučuje používat analogy založené na methylyaci/demethylyaci (± 14 Da) nebo hydroxylaci/dehydroxylaci (± 16 Da) analytu, protože stejné hmotnostní posuny jsou také obvyklé v přirozeném metabolismu látek a analyt by mohl být tedy metabolicky přeměněn na látku s molární hmotností lišící se o právě 14 nebo 16 Da [52].

1.4.2 Příprava vzorků lidské plazmy

Příprava vzorku je zásadní pro získání vysoce kvalitních, reprodukovatelných a spolehlivých výsledků jakéhokoli analytického měření. Jejím hlavním cílem je izolovat nebo zakoncertovat cílový analyt z komplexní matrice tak, aby byl vzorek kompatibilní s požadovanou technikou [53]. S rostoucím zájmem o metabolomiku a zlepšením používané instrumentace se v současné době zlepšuje přístup k přípravě vzorku [44].

Příprava vzorku lidské plazmy zahrnuje několik fází, ale oproti proteomice či transkriptomice je výrazně jednodušší. V počáteční fázi je vzorek vhodným způsobem odebrán, z krve je následně izolována plazma, která je zmrazena na -80°C . Tato teplota je zvolená zejména proto, aby došlo k zastavení veškerých metabolických a enzymatických procesů (ideální je uchování v tekutém dusíku, což je finančně náročné). Poté je vzorek transportován do příslušné vědecké laboratoře na suchém ledu (-20°C) a skladován opět při -80°C až do jeho analýzy. Pokud se jedná o necílenou analýzu, je nutné připravit reprezentativní vzorek z biologických materiálů, tedy v ideálním případě smíchání alikvótu ze všech vzorků, v případě velkého množství z vybraného počtu vzorků. Následuje extrakce, kdy výsledkem je izolace a obohacení požadovaných složek z matrice vzorku. Existuje velké množství extrakčních technik jako je například extrakce kapalina-kapalina, extrakce pevnou fází a precipitace proteinů, kde se využívá nejrůznějších extrakčních rozpouštědel, v různém poměru, v závislosti na zvolené extrakční metodě (**obr. 8**). Po provedené extrakci je vzorek homogenizován, centrifugován, odpařen a následně rozpuštěn v požadovaném objemu většinou organického rozpouštědla [54].

Tím, že příprava vzorku může ovlivňovat analyzovaný obsah metabolitů i biologickou interpretaci dat, je extrémně důležitá její preciznost. Vyžaduje se, aby byla metoda co nejjednodušší, rychlá a reprodukovatelná. Navzdory tomu při špatně provedené extrakci vznikají při měřeních chyby, které pramení z neúplné extrakce metabolitů, transformace metabolitů v důsledku enzymatických reakcí a také chemické degradaci metabolitů během samotné přípravy [53].



Obrázek 8: Odhad použitelnosti extrakčních technik v praxi [55]. Největší % zastoupení má precipitace methanolem, následně acetonitrilem. Extrakci kapalina-kapalina a méně používaná rozpouštědla řadíme do skupiny ostatní organické rozpouštědla. Do skupiny dalších technik potom řadíme extrakci pevnou fází.

1.4.2.1 Precipitace proteinů

Jednou z nejběžněji používaných metod přípravy vzorku v metabolomice je precipitace proteinů organickým rozpouštědlem [19]. Jelikož celkový obsah bílkovin v krevní plazmě nebo krevním séru se pohybuje okolo 6-8 g/dl, je nutné bílkoviny ze vzorku odstranit [44]. Bohužel neexistuje žádná precipitační metoda k odstranění veškerého proteinu, a proto je obsah proteinu v konečném extraktu odhadován na 2-10 % [25; 44]. Přítomnost těchto zbytků spolu s přítomností solí, může mít za následek zanesení LC kolony a výrazně tak může zkrátit její životnost [25]. Nejčastějšími používanými rozpouštědly jsou methanol, ethanol nebo acetonitril. Některé vědecké studie se zabývaly různými poměry extrakční činidla

ku vzorku tak, aby došlo k lepšímu odstranění proteinu, jelikož správný poměr je důležitým faktorem při vývoji a hodnocení metody. Například Polson a kol. [56] doporučuje minimální poměr plazmy a rozpouštědla 1-2,5:1 (v/v) a tvrdí, že dalším navyšováním poměru nedosáhneme dalšího zlepšení. Bruce a kol. [57] použili poměr 1:4 (v/v), zatímco Pereira a kol. doporučují 1:2 (v/v) [58]. I z těchto málo příkladů lze říct, že v literatuře neexistuje shoda ohledně nejlepšího poměru plazmy a rozpouštědla a je tak na optimalizaci jaký poměr bude k dané analýze nejvíce vyhovovat [25]. Samotná analýza probíhá za studena, aby se minimalizovala enzymatická přeměna metabolitů a aby se zároveň vysrážely proteiny. Elizabeth J. Want a kol. [59] ve své práci využívaly k odhadu koncentrace zbylých proteinů Bradfordův test. Jedná se o velice jednoduchý, rychlý a také levný test, který je založen na posunu absorbance stanovených proteinů z 465 na 595 nm pomocí barviva *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Toto barvivo se může vyskytovat ve dvou formách, podle toho, zda je na něj protein navázán či nikoli. Pokud na něj protein navázán není, samotné barvivo má v roztoku hnědočervené zbarvení, ale pokud je v roztoku přítomen protein, zbarví se do modra [60]. Díky tomuto testu bylo zjištěno, že účinnost odstranění proteinu čistým methanolem byla nejvyšší až 98 %, následoval pak ethanol 96 % a acetonitril 94 % [44; 59]. Vedle čistých rozpouštědel se méně často k precipitaci používají jejich směsi. Jedná se o směsi methanol/acetonitril 1:1 (v/v) nebo voda/acetonitril 1:1 (v/v) s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (pH=3) či voda/acetonitril 1:1 (v/v) s přídavkem 10 mM octanu amonného (pH=6) [61].

1.4.2.2 Extrakce kapalina-kapalina

Jedná se o dělicí postup, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné kapaliny a analyt se rozděluje mezi tyto fáze na základě rozpustnosti, respektive rozdílu rozdělovacích koeficientů. Výsledkem extrakce je vznik dvou vrstev, organické, která se využívá pro lipidomickou analýzu, a vodné využívající se pro metabolomiku. Cílem této extrakce je selektivně oddělit analyt od ostatních složek nebo oddělit nežádoucí látky od vzorku. Volba extrakčního činidla ovlivňuje selektivitu a účinnost, proto se volí takové látky, které mají vhodnou polaritu, těkavost a nízkou rozpustnost ve vodě. Běžně dostupnými a tradičními rozpouštědly potom jsou benzen nebo heptan. Extrakci kapalina-kapalina můžeme rozdělit dle způsobu provedení na jednokrokovou, vícekrokovou a kontinuální extrakci [62].

Nejčastěji používané extrakce kapalina-kapalina pro metabolomiku jsou Matyashova [63], Folchova [64] a Bligh-Dyerova metoda [17]. Každá z těchto metod má specifické poměry rozpouštědel, které musí být dodrženy pro dosažení optimální extrakční účinnosti (**tabulka 5**).

1.4.2.2.1 Folchova metoda

Jednou z nejstarších extrakčních technik, z roku 1957, je metoda dle Folche. Tato metoda patří mezi nejrozšířenější metody v metabolomické oblasti, zejména pak lipidomické analýze, a proto je většinou označována jako zlatý standard mezi extrakcemi kapalina-kapalina [65].

K samotné extrakci plazmy se využívají rozpouštědla chloroform, methanol v poměru 2:1 (v/v), respektive 8:4:3 (v/v/v) chloroform/methanol/voda. Celkový postup extrakce je založen na několika krocích. Nejdříve se přímo do vzorku v příslušném poměru přidávají ledově vychlazená organická rozpouštědla, kdy je následně suspenze míchána a poté je inkubována na ledu asi 30 minut. Následně se pak přidá voda, která způsobí oddělení organické a vodné fáze. V závěru je pak suspenze odstředěna pomocí chlazené centrifugy při 4 °C. Po oddělení vrstev, horní vodné a spodní organické, se metabolity znovu extrahují a v dalším kroku se odpaří pod dusíkem. Jakmile je vzorek odpařen, je nutné jej rozpustit v příslušném organickém rozpouštědle. Organické rozpouštědlo se volí tak, aby bylo kompatibilní s mobilní fází a taky aby se v něm veškerý vzorek rozpustil. Následně je vzorek připraven k analýze [64; 66].

1.4.2.2.2 Extrakce podle Bligh-Dyera

Dalším typem extrakce je Bligh–Dryerova metoda známá již od roku 1959. Tento typ extrakce je velice podobný jako extrakce dle Folche s tím rozdílem, že poměr jednotlivých rozpouštědel i poměrem extrakční směsi a vzorku. V tomto případě je poměr rozpouštědel chloroformu a methanolu 1:2 (v/v). Jedná se také o dvoustupňovou extrakci, kdy po separaci jsou metabolity v horní vodné fázi [17].

1.4.2.2.3 Extrakce podle Matyashe

Tato moderní extrakční metoda, jinak známá pod názvem MTBE [63], se v posledních letech stala velice oblíbenou alternativou pro extrakci dle Folche. Svou oblibu si získala zejména proto, že ke svým extrakcím využívá jiné organické rozpouštědlo a to methyl-*terc*-butylether, který oproti chloroformu není karcinogenní. Další výhodou použití je relativně široký rozsah analýzy pro polární metabolity, který je například u Folche o něco menší. Pro Matyashovu metodu se používají rozpouštědla MTBE/MeOH/H₂O v poměru 10:3:2,5 (v/v/v). Oproti ostatním metodám je hustota nepochlární fáze MTBE ve srovnání s MeOH/ H₂O nižší, a proto se vodná fáze nachází v opačném uspořádání oproti ostatním [65].

Tabulka 5: Souhrnná tabulka extrakce kapalina-kapalina

| Typ extrakce kapalina-kapalina | Rozpouštědlo a poměr |
|--------------------------------|---|
| Folchova metoda | CHCl ₃ : MeOH/H ₂ O (8:4/3) |
| Extrakce podle Bligh–Dyer | CHCl ₃ : MeOH/CHCl ₃ : H ₂ O (1:2/1:1) |
| Extrakce podle Matyashe | MTBE: MeOH/H ₂ O (10:3/2,5) |

1.4.2.3 Extrakce pevnou fází

Extrakce pevnou fází (SPE) je typem extrakce, která je podobná extrakci kapalina-kapalina až na fakt, že jednou z fází je pevná látka (sorbent). Principem je selektivní zadržování látek na pevné fázi, která je umístěna v krátké kolonce (patronce) ve formě sloupce nebo membrány. SPE se v metabolomice využívá zejména v cílené bioanalýze. Příkladem může být zvýšení koncentrace cílového analytu při detekci stopových sloučenin nebo odstranění složitějších matic či interferujících látek. Hlavní nevýhodou SPE je, že sorbent zvyšuje selektivitu postupu přípravy, což může vést ke snížení rozsahu metabolitů, proto se tento typ extrakce nevyužívá při necílené analýze [44; 67].

Velkou výhodou SPE je možnost automatizace, a to buď v off-line nebo on-line režimu. V současnosti se pro automatizaci využívá 96 jamkové filtrační destičky, které několikanásobně urychlují extrakci. Příkladem může být publikace Zimmera a kol., který tvrdí, že jedna 96 jamková destička s 96 vzorky je analyzována po dobu 5,25 hodin, což odpovídá 3,3 minut na jednu extrakci a v porovnání s extrakcí kapalina-kapalina, u které celková doba extrakce činí asi 16 hodin, je podstatně kratší [68]. Automatizace výrazně snižuje možný výskyt chyb vzniklých lidskou činností, což může znatelně ulehčit analýzu velkého množství vzorků [67]. Navzdory svým výhodám a možnosti automatizace se systémy SPE-LC-MS zřídka využívají pro rutinní metabolomické aplikace [55].

1.4.3 Metabolomické databáze

Metabolomika, jakožto rychle se rozvíjející vědní obor, zvyšuje požadavky jak na instrumentální techniku, tak i na interpretaci dat. Bez identity metabolitů nelze získaná data z biologických vzorků určit a následně spojovat s proteomickými a genomickými informacemi v systémové biologii či medicíně. Nároky vzrostly zejména v oblasti bioinformatiky a chemoinformatiky, a proto s narůstajícím množstvím informací vznikají nové metabolomické databáze [69].

V současné době je metabolomika podporována řadou volně dostupných databází, které poskytují nejrůznější informace například o chemických strukturách, fyzikálně-chemických a farmakologických vlastnostech nebo také biologických funkcích metabolitů [70]. Metabolomické databáze (**tabulka 6**) můžeme rozdělit na základě informací, které nám poskytují. První skupinou databází jsou referenční spektrální databáze, mezi které řadíme třeba Metlin či MassBank. Další skupinou databází jsou databáze profilů metabolitů specifických pro sloučeninu a druh kam patří třeba LipidMaps, MyCompoundID [69] nebo asi nejrozšířenější a nejpoužívanější databáze HMDB (Human Metabolom Database). Existují samozřejmě i databáze, které mapují jednotlivé metabolické dráhy organismu, mezi tuhle skupinu řadíme třeba KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) nebo ROCHE [40; 70].

Tabulka 6: Výběr několika databází využívaných v metabolomice [70]

| Databáze | Obsah | Odkaz |
|---|---|-------|
| REFERENČNÍ SPEKTRÁLNÍ DATABÁZE | | |
| Metlin | LC/MS, LC/MS/MS, FT-MS spektra, chemické struktury, retenční čas, vazba na KEGG, chemický vzorec | [71] |
| MassBank | GC, ESI a FAB-MS, MS/MS spektra, chemická struktura a název, separační metoda, experimentální podmínky | [72] |
| DATABÁZE PROFILŮ METABOLITŮ SPECIFICKÝCH PRO SLOUČENINU A DRUH | | |
| HMDB | Metabolity nalezené v lidském těle, NMR, GC-MS a MS/MS data, fyzikální, klinické a fyzikálně chemické vlastnosti, chemická struktura, koncentrační data, informace o dráze, experimentální metody | [2] |
| Lipid Maps | Lipidy, chemická struktura a vzorec, fyzikální vlastnosti, odkazy na další databáze lipidů a cest, experimentální data a protokoly | [73] |
| DATABÁZE METABOLICKÝCH DRAH | | |
| KEGG | Metabolické a regulační dráhy, interakce protein-protein, geny zcela a částečně sekvenovaného genomu, léky, glykany, malé molekuly, reakce, funkční hierarchie | [74] |

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Seznam použitých chemikálií a standardů

- Acetonitril – LC-MS Ultra Chromasolv™, ≥ 99,9 %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Ultračistá voda – LC-MS Ultra Chromasolv™, Honeywell (Seelze, Německo)
- Deionizovaná voda – Milli-Q Reference Water Purification System (Molsheim, Francie)
- Mravenčan amonný ≥ 99,9 %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Octan amonný ≥ 99,9 %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Kyselina mravenčí ≥ 99,9 %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Kyselina octová ≥ 99,9 %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Methanol – LC-MS čistota, ≥ 99,9 %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Chloroform – LC-MS čistota, Merck (Darmstadt, Německo)
- Standardy (viz. Příloha A)

2.2 Přístroje a technika

- Analytická váha ABT 120-5DM – Kern & Sohn GmbH (Balingen, Německo)
- Hmotnostní spektrometer XEVO G2-XS – QTOF – Waters (Milford, MA, USA)
- Bioinertní UHPLC – Acquity Premier Systém – Waters
- Ultrazvuk FB Fisherbrand 15061H – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Mechanické pipety s nastavitelným objemem – Sartorius (Goettingen, Německo)
- Automatická multipipeta M4 – Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Odstředivka Hettich EBA 20 – Hettich (Tuttlingen, Německo)
- Koncentrátor NDK200-2 – MIULAB (Hangzhou, Čína)
- Laminární box MSC-Advantage II. triedy – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.3 Příprava standardů

Zásobní roztoky jednotlivých standardů metabolitů byly připraveny v příslušných koncentracích (**příloha A**) navážením přibližně 1 mg STD a rozpuštěním v požadovaném objemu směsi rozpouštědel (koncentrace 1mg/ml). Příslušné STD byly rozpuštěny rozpouštědly v závislosti na jejich polaritě: methanol/acetonitril (1:1, v/v), acetonitril/voda (2:1, v/v) a chloroform/methanol (1:1, v/v). Následně byly pipetovány vypočítané objemy standardů pro vytvoření celkového STD mixu a celý STD mix byl doplněn směsí rozpouštědel acetonitril/voda (1:1, v/v) na požadovaný objem 4 ml. Celý postup byl opakován i pro jednotlivé STD lipidů (**příloha A**).

2.4 Příprava vzorku plazmy

Jako nejvhodnější extrakce vzorku lidské plazmy pro následnou metabolickou analýzu byla vybrána dvojnásobná extrakce dle Folche. Do 4ml skleněné vialky bylo pipetováno 50 μ l plazmy, 2 ml chloroformu a 1 ml methanolu. Takto připravená směs byla na 15 minut homogenizována v ultrazvukové lázni při teplotě 40 °C. Následně bylo do směsi pipetováno 600 μ l vody a celá směs byla znovu homogenizována při stejných podmínkách dalších 15 minut. Po homogenizaci byla směs centrifugována 6 minut při 6000 otáčkách/min, a nakonec bylo pomocí automatické pipety odebráno do 2ml skleněné vialky 750 μ l horní vodné fáze. Do zbylého extraktu bylo znovu pipetováno dalších 600 μ l vody a celý postup byl zopakován. Následně byla odebrána nová horní vodná vrstva (750 μ l) a zkombinována s prvním odebraným množstvím. Celá vodní vrstva byla odpařena do sucha pod proudem dusíku a rozpuštěna v 250 μ l směsi rozpouštědel voda/acetonitril (1:1, v/v). Takto připravený vzorek byl míchán po dobu 30 sekund, a ještě vložen do ultrazvuku na 5 min k úplnému rozpuštění veškerých metabolitů.

2.5 UHPLC podmínky

Celá analýza byla měřena na bioinertním kapalinovém chromatografu Acquity Premier System s kolonou Acquity Premier BEH Amide (150×2,1 mm; 1,7 μ m). Samotná kolona byla vyhřívána na 45 °C a průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Mobilní fázi A tvořil acetonitril s přídavkem 0,005% kyseliny octové a mobilní fázi B tvořila voda a octanový pufr. Pufr byl složen z 0,005% kyseliny octové a 15 mM octanu amonného. Pro metabolickou analýzu byla zvolena gradientová eluce: 0 min – 95% A; 10,5 min – 87% A; 12min – 60% A; 15min– 60% A; 15,1min – 95% A; 20min – 95% A. Celkový čas metody byl 20 minut včetně 5 minutové ekvilibrace kolony. Dávkovaný objem byl 1 μ l a po každé analýze byla dávkovací jehla promyta 20 % methanolem. Teplota autosampleru byla nastavena na 6 °C.

2.6 MS podmínky

Všechna měření byly prováděné na hmotnostním spektrometru XEVO G2-XS, kdy byl zvolen kontinuální mód se skenovací rychlostí 0,5s pro MS analýzy. Jako LockMass (referenční hodnota) byl zvolen Leucin Enkefalin. Hodnota m/z pro pozitivní ionizaci byla 556,2771 a pro negativní 554,2615. Pro samotné měření byly zvoleny níže uvedené parametry uvedené v **tabulce 7**:

Tabulka 7: Parametry MS

| | |
|--|------------|
| Napětí na kapiláře při pozitivní ionizaci | 3 kV |
| Napětí na kapiláře při negativní ionizaci | 1,5 kV |
| m/z rozsah | 50-1200 Da |
| Napětí na vstupní kapiláře | 20V |
| Zdrojový offset | 60V |
| Teplota zdroje | 120 °C |
| Teplota sušícího plynu | 600 °C |
| Průtok plynu ve zdroji | 50 l/h |
| Průtok sušícího plynu | 900 l/h |

2.7 Zpracování naměřených dat

Data jednotlivých měření byly získána pomocí programu MassLynx. Po získání surových dat z naměřených analýz byl nejdříve redukován šum pomocí nástroje Waters Compression and Archival tools, což vedlo jak ke snížení velikosti souboru, tak i ke snížení pravděpodobnosti špatné identifikace. Následně byla provedena korekce m/z pomocí referenční hodnoty s využitím nástroje Accurate Mass Measure v MassLynx, což mělo za následek vyšší přesnost hmoty a převod záznamu na čárové spektrum. Dále byly vytvořeny vhodné metody v programu QuantLynx, a to zvláště pro veškeré série měření s odlišnými podmínkami v pozitivním i negativním módu polarity. Veškerá integrace píku byla provedena také v programu QuantLynx, ze kterého byla získána výška a plocha píku. Výsledné integrace byly manuálně zkontrolovány, aby nedošlo k chybné interpretaci dat a výsledný soubor byl exportován do příslušného Excel souboru, kde byly výsledky následně vyhodnoceny. V závěru byla veškerá identifikace metabolitů v lidské plazmě interpretována ručně.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální části diplomové práce byla provedena celá optimalizace UHPLC a MS systému. Spolu s tím byla provedena optimalizace rozpouštěcího kroku a také výběr nejvhodnějšího typu extrakce pro metabolity v lidské plazmě. V samotném závěru byla provedena necílená analýza vedoucí k identifikaci metabolitů v lidské plazmě.

3.1 Optimalizace LC

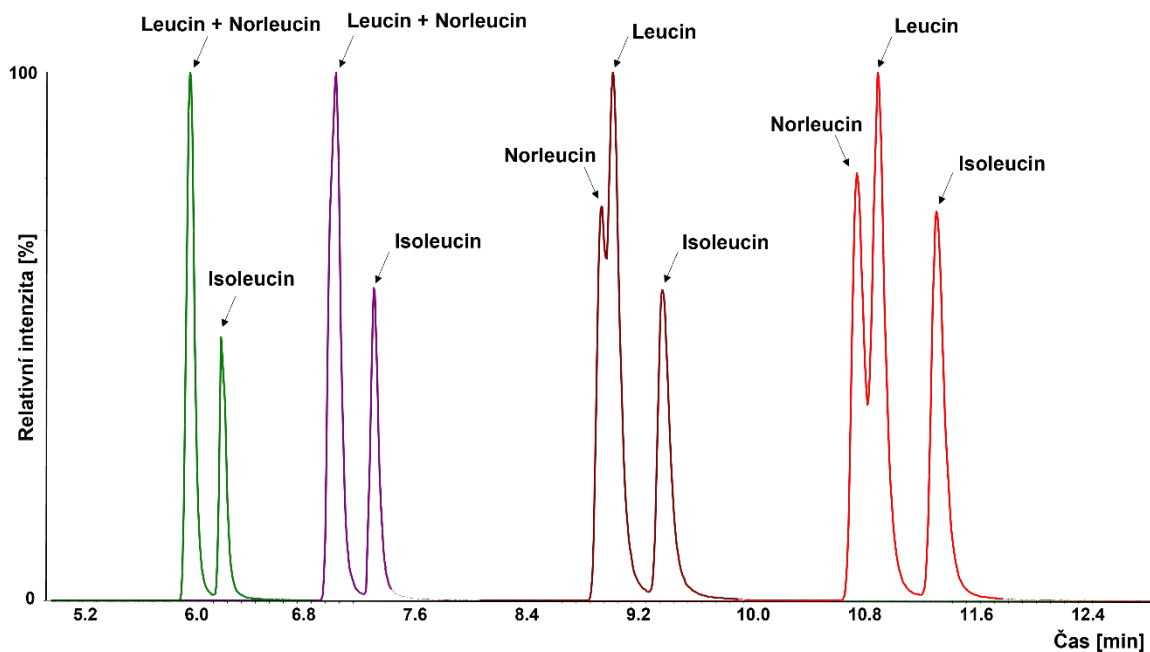
Prvním krokem při samotné optimalizaci metody byla optimalizace LC. Po celou dobu byla optimalizace prováděna na koloně Acquity Premier BEH Amide (150×2,1 mm; 1,7 μm) s HILIC separací. Nejdříve byly zkoušeny podmínky z aplikačního listu Waters k zjištění vhodnosti a reprodukovatelnosti metody na naší přístrojové technice (**tabulka 8**) [75].

Tabulka 8: Výchozí hodnoty z aplikačního listu firmy Waters

| | |
|-----------------------|--|
| Mobilní fáze A | Acetonitril + 0,1 % kyselina mravenčí |
| Mobilní fáze B | Voda + 0,1 % kyselina mravenčí |
| Průtok | 0,4 ml/min |
| Teplota kolony | 45 °C |
| Nástřik | 1 μl |
| Gradient | 0 min – 99% A; 7 min – 30% A; 7,1 min – 99% A; 10min – 99% A |

Bylo zjištěno, že tato metoda je zcela nevhodná pro UHPLC/HRMS, jelikož se jedná o nedokonalou separaci s nedostatečným rozlišením látek vhodnou spíše pro trojitý kvadrupól a SRM přechody (selektivní sledování vybraných reakcí). Co se týče samotných parametrů, tak i počáteční množství mobilní fáze B bylo nedostačující, zejména kvůli samotnému charakteru HILIC kolony. Vzhledem k těmto nedostatkům byla reprodukována jiná publikace, a to Karlíkové a kol. [76]. Zde byl použit jejich výchozí gradient s vyšším počátečním a koncovým množstvím mobilní fáze B než u metody Waters. Tento krok se ukázal jako správný, avšak samotná délka měření nestačila na eluci veškerých standardů z kolony. To mělo za následek úpravu gradientu. Byla zkoušena gradientová eluce s různým sklonem gradientů, a to pomocí zvyšující se procenta vodné mobilní fáze, konkrétně 10, 15, 20, 30 a 40 % vody. Z výsledků vyplývá, že při složení 15 % vody v MF lze nejlépe rozseparovat izomery leucinu (**obr.9**), avšak celá analýza pro eluci všech metabolitů byla moc dlouhá.

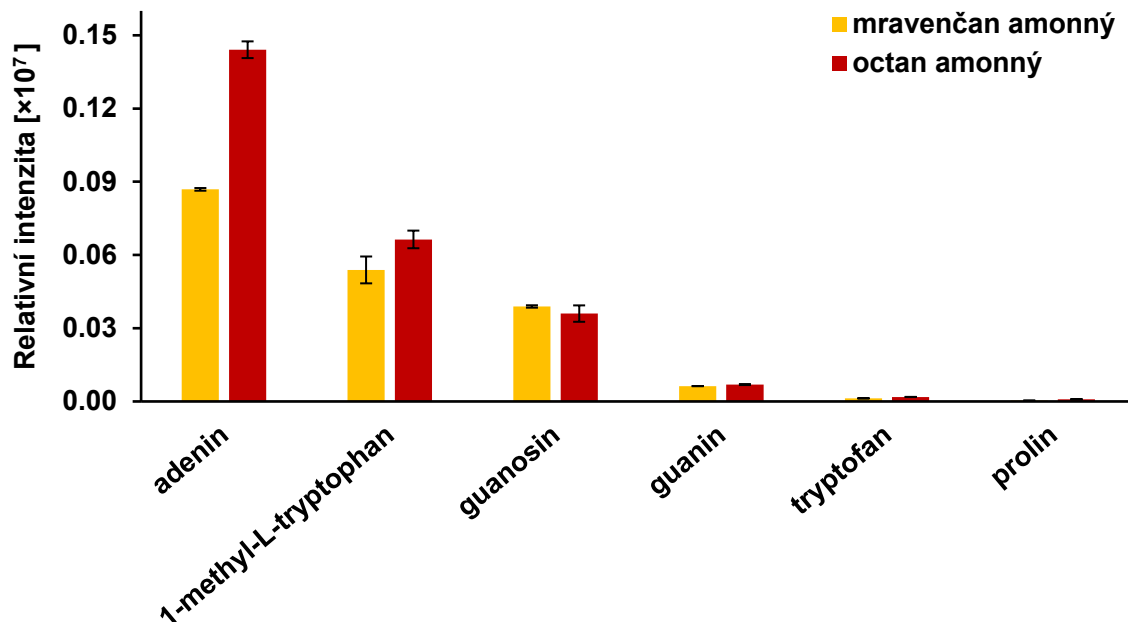
Na základě proměřených gradientů bylo zjištěno, že při 40 % vody lze spolehlivě vyeluovat veškeré metabolity z kolony, a proto byl následně stávající gradient upraven na finální dvoustupňový gradient (viz 2.6 UHPLC podmínky), kdy je nejprve zvolena nižší eluční síla pro separaci izomerů a následně je eluční síla zvýšena pro eluci zbývajících látek tak, aby celá analýza trvala nejdéle 20 minut.



Obrázek 9: Vliv gradientové eluce na separaci izomerů. Zelená: 40% vody, fialová: 30% vody, hnědá: 20% vody, červená: 15% vody

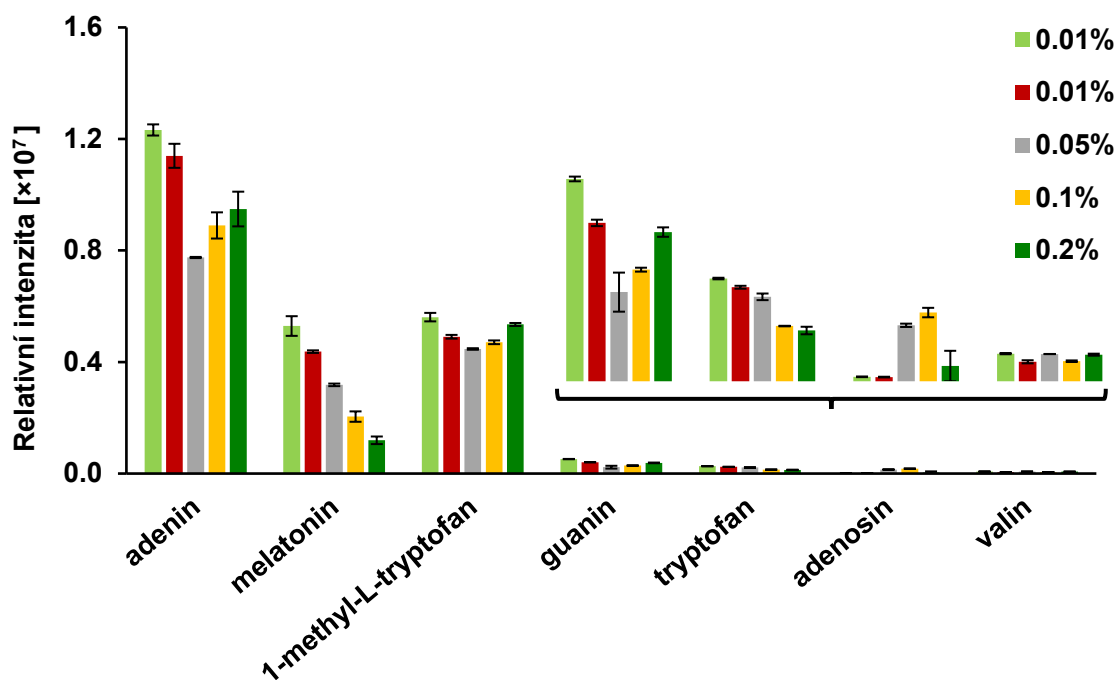
Následovala optimalizace mobilní fáze, kde byl pro začátek zvolen acetonitril jako MF A a čistá voda jako MF B. Bylo zjištěno, že použití čistých rozpouštědel je pro separaci metabolitů zcela nevhodné, a proto bylo nutné přidat do MF aditiva. Jako aditivum byl zvolen mravenčan amonný, stejně jako tomu bylo v aplikačním listu, a byly proměřeny koncentrace 5, 10, 15 a 20 mM. Jako nejlepší koncentrace byl zvolen 15 mM mravenčan amonný, jelikož pro tuto koncentraci měli jednotlivé metabolity nejvyšší odezvu. Následně byly porovnány dva odlišné typy aditiv vhodné pro LC-MS, a to mravenčan a octan amonný (**graf 1**). Ze vzájemného porovnání byly hodnoty pro octan amonný znatelně vyšší a separace látek byla totožná. Optimalizace byla provedena na všech směsích standardů, pro znázornění výsledků byly vybrány pouze vybrané standardy, které přibližně reprezentují metabolity (aminokyseliny, nukleosid, purinová a pyrimidinová báze). Ostatní standardy

poskytovali přibližně stejné výsledky (platí pro všechny body optimalizace). Hodnoty v grafech jsou uváděny jako průměr 3 nezávislých experimentů a odchylka je stanovena jako \pm směrodatná odchylka (platí pro všechny body optimalizace).



Graf 1: Porovnání mravenčanu a octanu amonného v mobilní fázi B pro vybrané STD na základě odezvy z MS

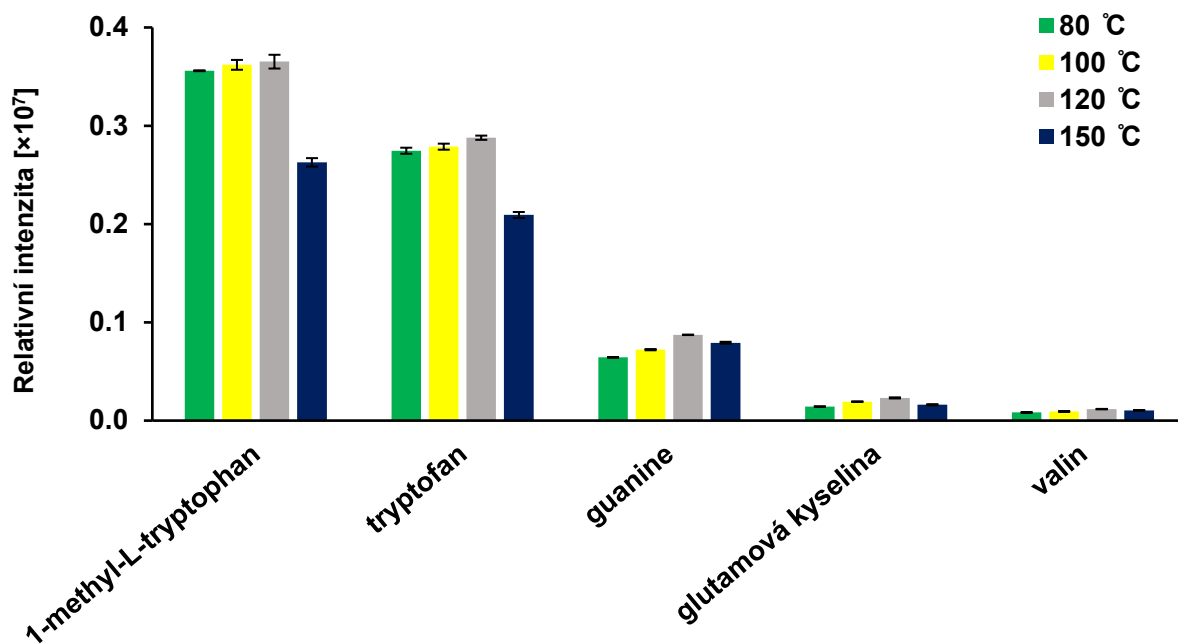
Další postup při optimalizaci mobilní fáze spočíval v nalezení nejlepší koncentrace kyseliny octové, aby ve výsledku s octanem amonným vytvořila pufr. Byly zvoleny mobilní fáze s přidavkem 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 a 0,2% kyseliny octové. Jak je patrné z **grafu 2**, jako nejlepší se ukázal 0,005% přidavek kyseliny octové. Jakou další alternativou se ukázal 0,01% přidavek, avšak dalším přidáváním kyseliny octové se odezva vybraných metabolitů pouze zhoršuje. Výjimkou je adenosin, kdy nejlepší odezva je poskytována při 0,1% kyseliny octové, avšak s ohledem na většinu metabolitů bylo zvoleno jako ideální složení 0,005% kyseliny octové.



Graf 2: Optimalizace množství kyseliny octové v % u vybraných standardů

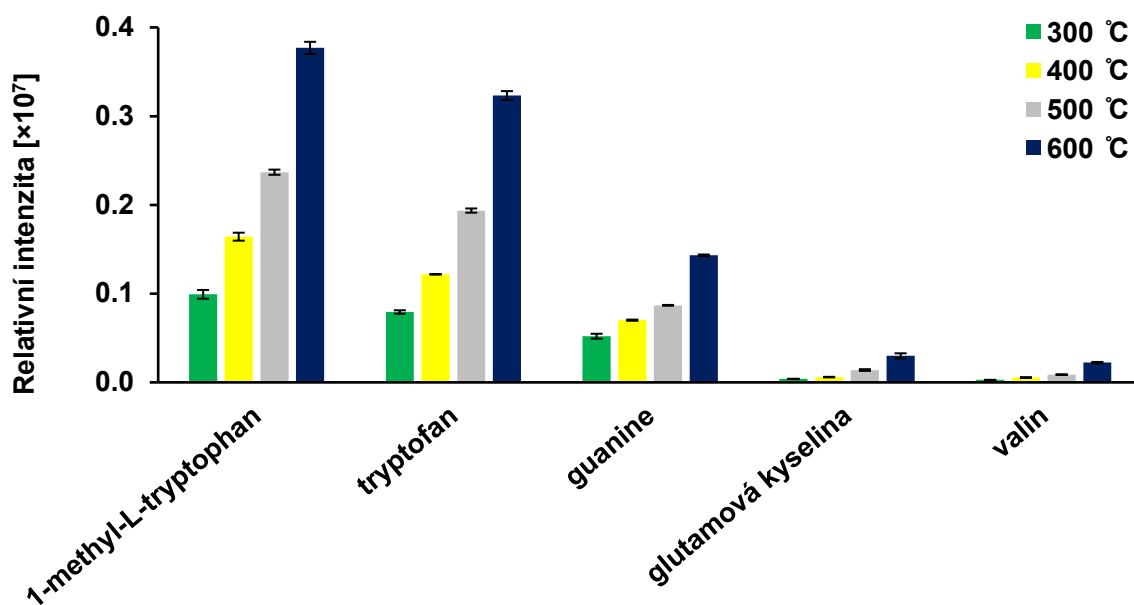
3.2 Optimalizace MS

Při vývoji nové metabolické metody bylo nutné zoptimalizovat i všechny parametry MS. První parametr, který byl optimalizován byla teplota zdroje. Pro optimalizaci byly zvoleny teploty 80, 100, 120 a 150 °C. Celá optimalizace MS byla prováděna na všech standardech v negativním módu polarita, ale do vyhodnocovacích grafů bylo vybráno pouze 5 reprezentantů a to 1-methyl-L-tryptofan, tryptofan, guanin, glutamová kyselina a valin. Z výsledného grafu 3 je patrné, že pro všechny zvolené standardy je jednoznačně nevhodnější teplota zdroje 120 °C. Jednou z dalších diskutovaných možností by mohla být teplota 100 °C, avšak pro většinu standardů je odezva nižší než při teplotě 120 °C. U teploty zdroje je patrné, že při zvyšování teploty nedochází přímo úměrně ke zvyšování odezvy, a proto je teplota 150 °C nevhodná.



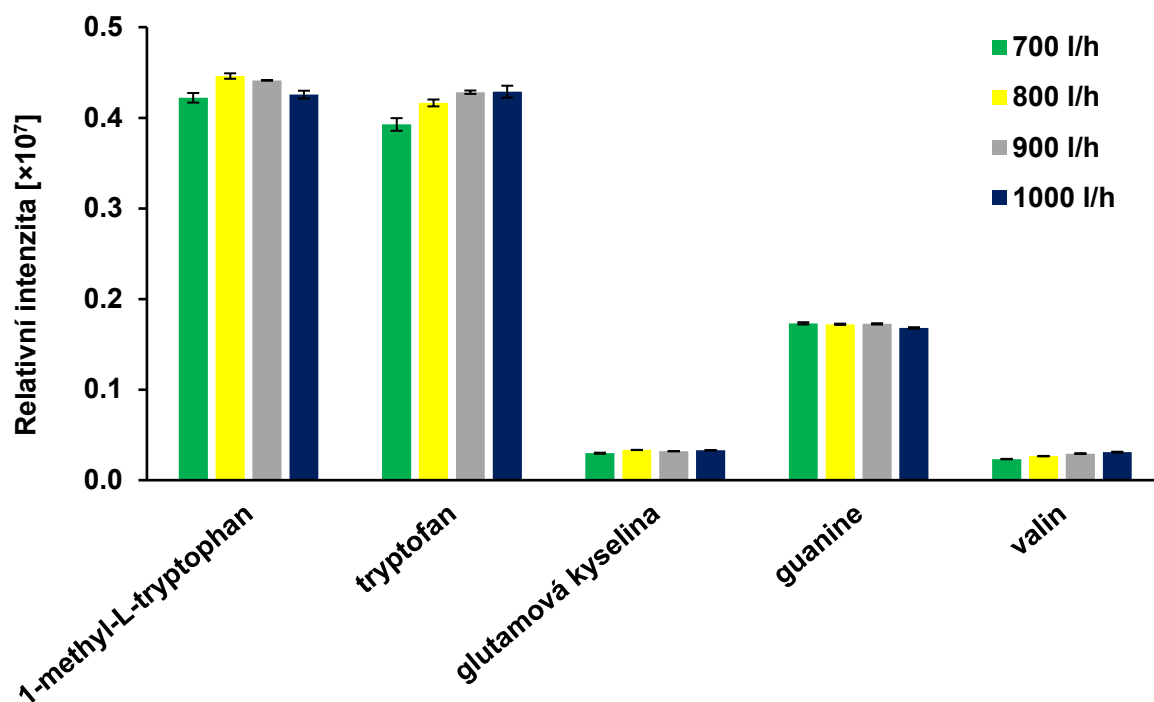
Graf 3: Optimalizace teploty zdroje na STD

Po optimalizaci zdroje následovala optimalizace teploty sušícího plynu. Byly zvoleny teploty 300, 400, 500 a 600 °C. Z těchto zvolených teplot se jako nejlepší ukázala ta nejvyšší, a to teplota 600 °C. Z výsledného **grafu 4** lze konstatovat, že se zvyšující se teplotou sušícího plynu ve zdroji roste i odezva standardů. Vyšší teplota nebyla zkoušena kvůli limitu přístroje.



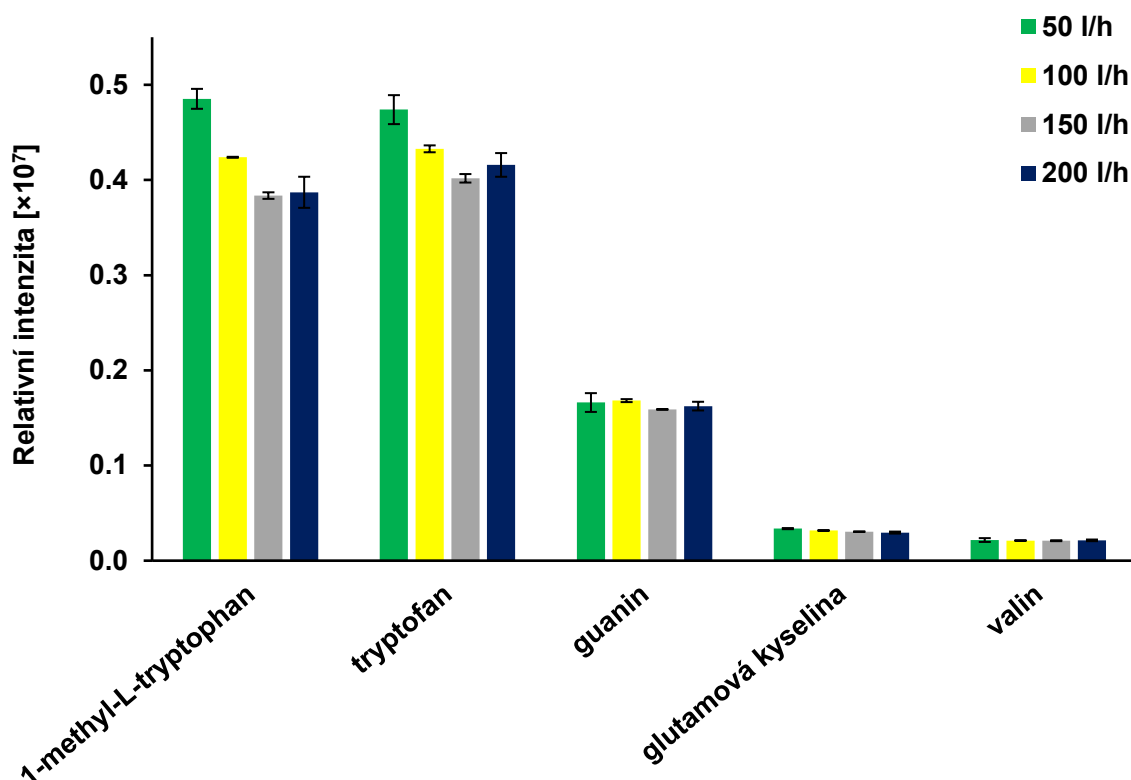
Graf 4: Optimalizace teploty sušícího plynu MS na STD

Třetím optimalizovaným parametrem byl průtok plynu ve zdroji. Pro optimalizaci byly zvoleny hodnoty průtoku 700, 800, 900, 1000 l/h (**graf 5**). Naměřené hodnoty pro 800, 900 a 1000 l/h byly téměř stejné, avšak po srovnání odezvy všech standardů byl zvolen kompromis, a to průtok 900 l/h.



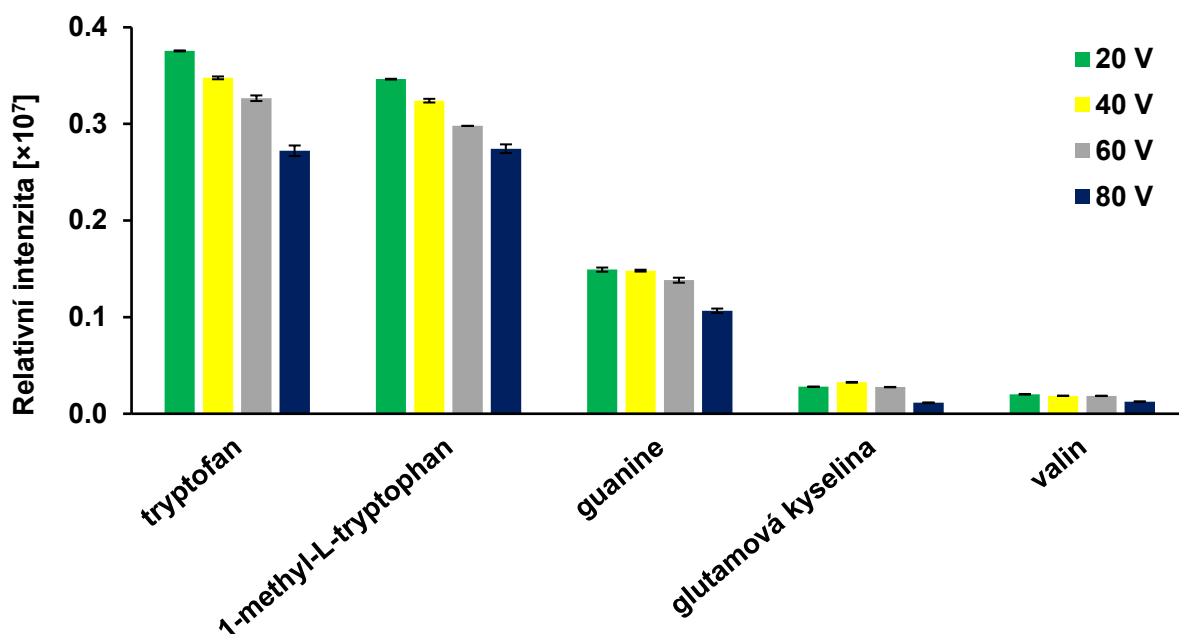
Graf 5: Optimalizace průtoku plynu ve zdroji na STD

Čtvrtým optimalizovaným MS parametrem je průtok sušícího plynu. Hodnoty byly vybrány na základě možností MS, a to 50, 100, 150 a 200 l/h. Jako nejlepší hodnota pro průtok sušícího plynu se jednoznačně ukázal průtok 50 l/h. Co se týká ostatních hodnot průtoku, tak jsou se zvyšujícím průtokem buď srovnatelné nebo horší (**graf 6**).



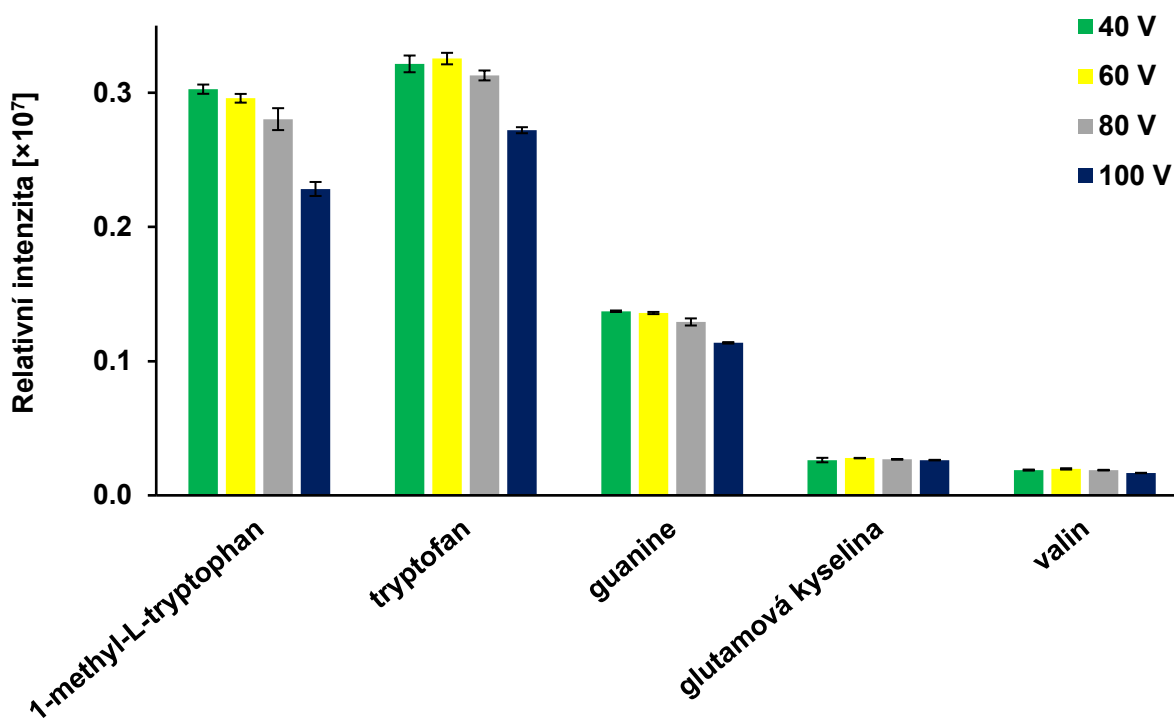
Graf 6: Optimalizace průtoku sušícího plynu na STD

Pátým parametrem, který byl v MS optimalizován bylo napětí na vstupní elektrodě. Jedná se o parametr, který při jeho změně neovlivní analýzu tak výrazně jako například teplota zdroje, ale přesto byl tento parametr také optimalizován. Byly zvoleny hodnoty napětí 20, 40, 60 a 80 V. Jak vyplývá z **grafu 7**, tak se zvyšujícím se napětím na elektrodě klesá odezva většiny látek, tzn. že optimální volbou je to nejnižší napětí a tedy 20 V. Výjimkou je ale kyselina glutamová, kde ideálním napětím na vstupní elektrodě je 40 V, avšak rozdíl není nijak markantní.



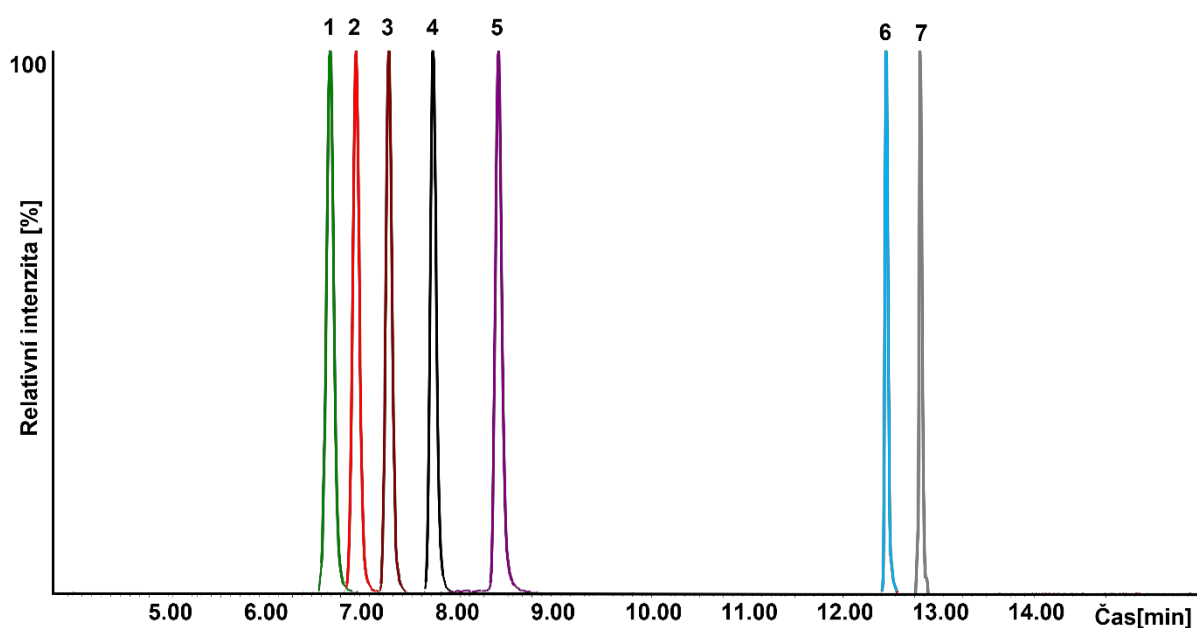
Graf 7: Optimalizace napětí vstupní elektrody na STD

Jako šestý a poslední parametr byl optimalizován zdrojový offset. Byly vybrány reprezentativní hodnoty 40, 60, 80 a 100 V. Velice podobné hodnoty se naměřily pro 40 a 60 V, avšak nakonec byl jako kompromis vybrán zdrojový offset 60 V (graf 8).

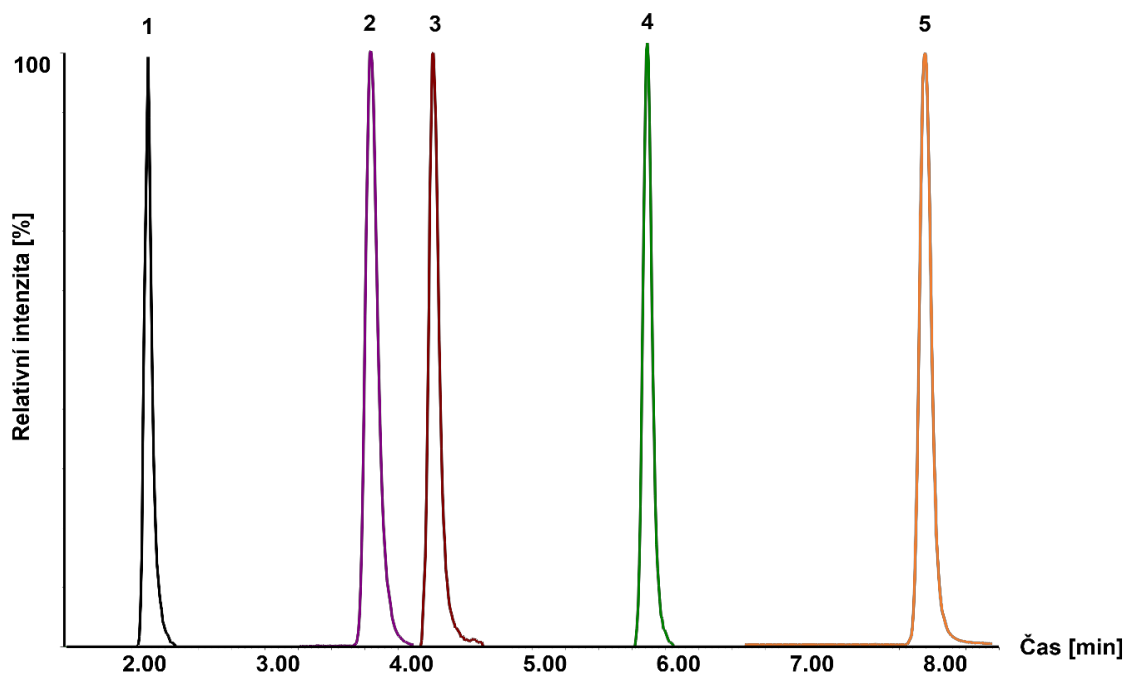


Graf 8: Optimalizace zdrojového offsetu na STD

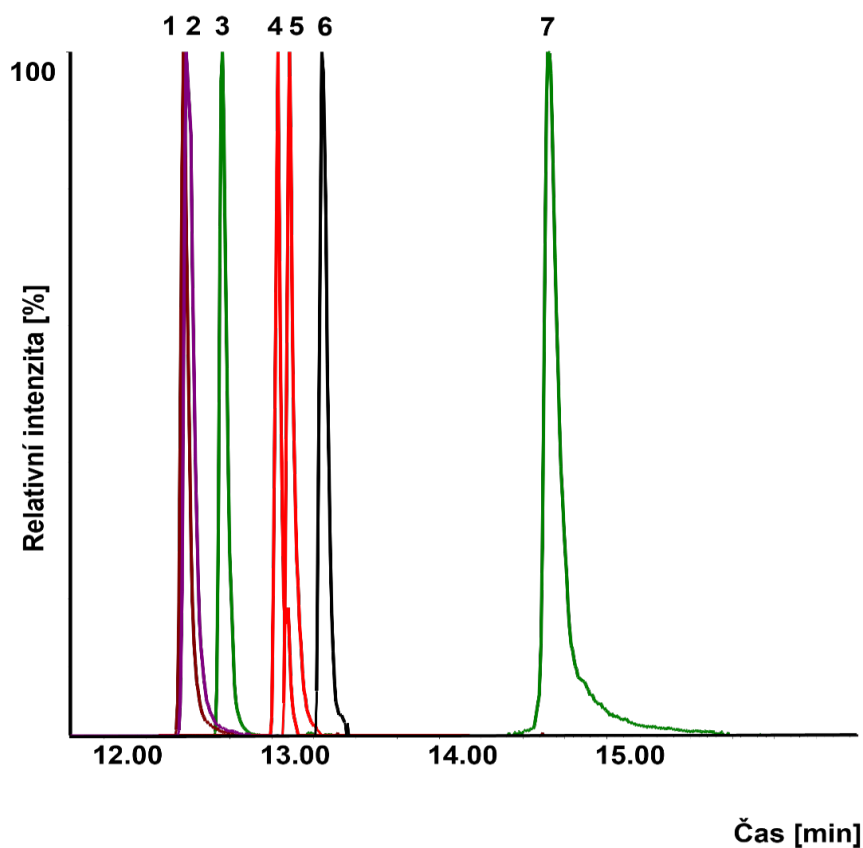
Pomocí optimalizované metody byla proměřena směs všech standardů a výsledkem jsou níže uvedené chromatogramy (**obr. 10-13**), na kterých lze vidět separaci jednotlivých metabolitů. Chromatogramy byly zvoleny dle toho, do jaké třídy jednotlivé metabolity řadíme. Na **obr. 10** je třída karnitinů, kde lze vidět, že se zvyšujícím se počtem uhlíků v mastném acylovém řetězci (látka 1-5) roste retence látky. Karnitin s krátkým acylovým řetězcem (acetylkarnitin) a L-karnitin poté eluují o několik minut později. Na **obr. 11** je ukázána separace jak purinových, tak pyrimidinových nukleových bází. Vybrané aminokyseliny poté můžeme vidět na **obr. 12**. Jedná se o strukturně rozmanitý výběr aminokyselin, který na rozdíl od ostatních lze pozorovat pouze v negativním módu polaroty měření. Na posledním **obr. 13** byli vybráni zástupci guanosin fosfátu, kde lze vidět, že se zvyšujícím počtem fosfátů v řetězci roste i polarita a retence látek. Můžeme také vidět, že s rostoucím množstvím fosfátů sice dochází k většímu rozmývání píku, avšak pomocí bioinertního systému je tvar píku stále vhodný pro identifikaci a případně kvantifikaci.



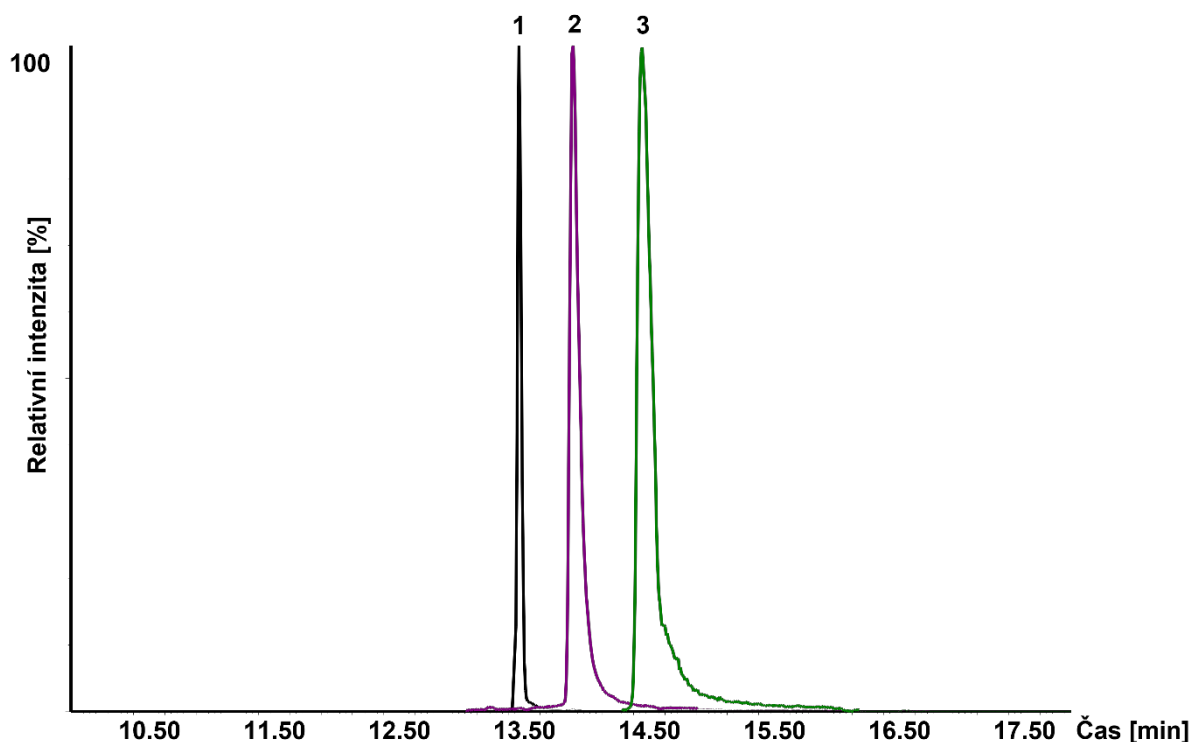
Obrázek 10: Separace STD karnitinů. 1) D,L-palmitoylkarnitin 2) D,L-myristoylkarnitin 3) D,L-lauroylkarnitin 4) D,L- dekanoylkarnitin 5) D,L-oktanoylkarnitin 6) acetyl-L-karnitin 7) L-karnitin



Obrázek 11: Separace purinových a pyrimidinových nukleových bází 1) tymin 2) adenin 3) uracil 4) cytosin 5) guanin



Obrázek 12: Separace vybraných aminokyselin detekovaných v negativním iontovém módu 1) prolin 2) valin 3) tyrosin 4) alanin 5) treonin 6) serin 7) lysin



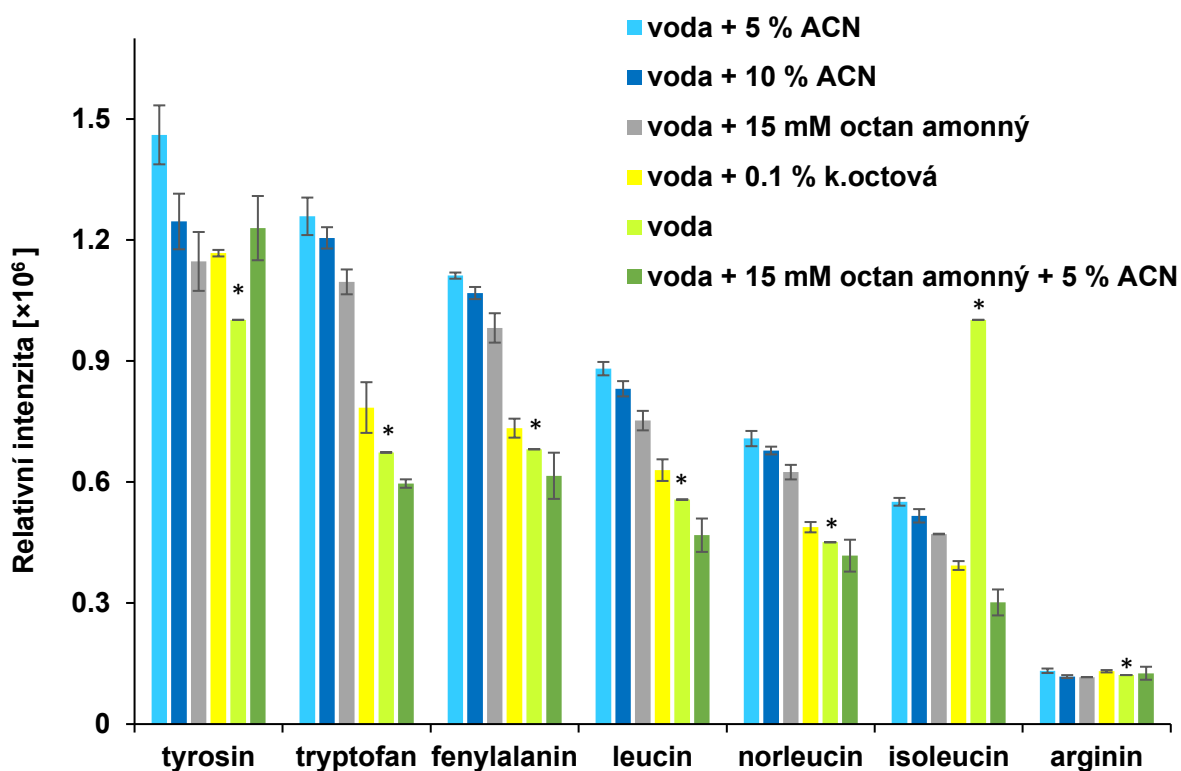
Obrázek 13: Separace guanosin-fosfátů 1) monofosfát 2) difosfát 3) trifosfát

3.3 Optimalizace rozpouštěcího kroku

Cílem optimalizace rozpouštěcího kroku bylo najít nejvhodnější rozpouštědlo či směs rozpouštědel k rozpouštění jednotlivých odparků z precipitace a extrakce dle Folche. V případě precipitace bylo nutné najít rozpouštědlo, které by rozpouštělo pouze metabolity a nikoliv lipidy. Do 2 ml skleněných vialek bylo pipetováno 180 μ l STD mixu a 20 μ l (10 \times zředěné směsi) lipidových STD (**příloha A**). Celý obsah vialky byl odpařen pod dusíkem a následně rozpouštěn v příslušných rozpouštědlech. Pro optimalizaci precipitace bylo zvoleno šest odlišných rozpouštěcích kroků a čtyři různé pro extrakci dle Folche. Pro precipitaci byly zvoleny následné rozpouštěcí kroky: voda + 5 % acetonitrilu; voda + 10 % acetonitrilu; voda + 10 mM octan amonný; voda + 0,1 % kyseliny octové; čistá voda a voda + 5 % acetonitrilu + 15 mM octan amonný. Celá optimalizace byla proměřena jak v pozitivním, tak negativním modu. Bylo zpracováno hned několik vyhodnocovacích grafů a jako příklad interpretace výsledků byl zvolen **graf 9**.

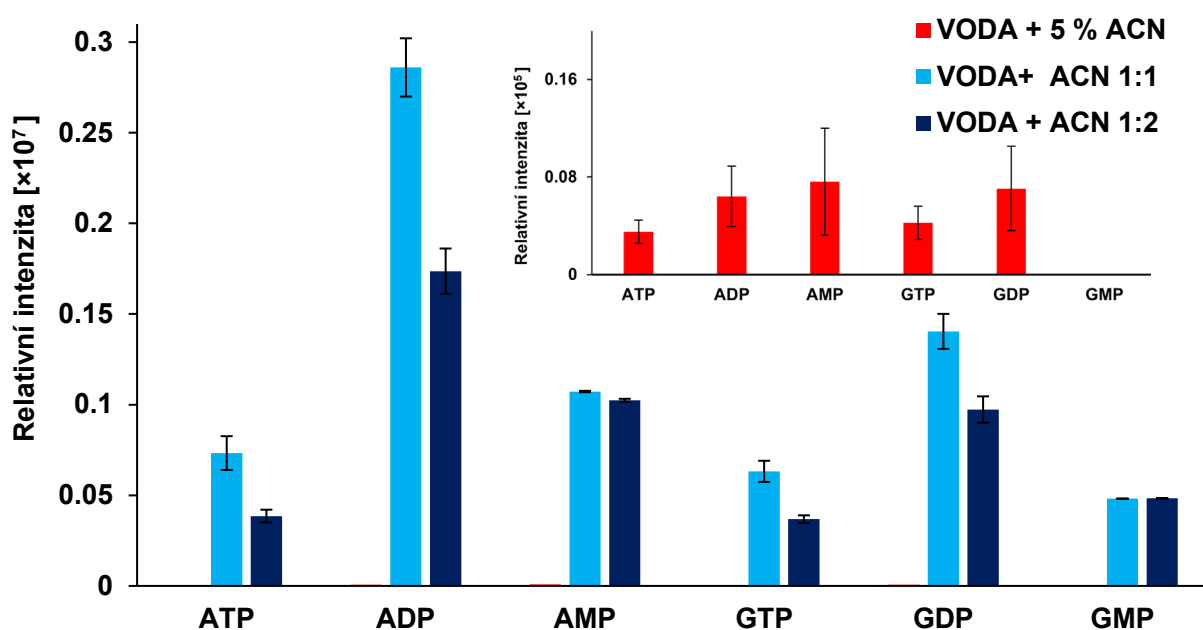
Jak je z **grafu 9** patrné, tak voda je jako rozpouštědlo nevhodná, jelikož se v jejím případě jedná o absolutní hodnoty, tzn. jednu vybranou hodnotu, protože výsledná data byla nereprodukovatelná. Voda nedokáže spolehlivě rozpustit takové rozmanité spektrum polarit, a proto byla ze všech rozpouštěcích kroků nejhorší. Zástupcem silně kyselého prostředí

bylo rozpouštědlo voda + 0,1 % kyseliny octové, jejíž výsledky byly průměrné. Bohužel pro tento typ rozpouštědla nebyla kompatibilní celková separace a jednotlivé píky byly rozmyté a rozštěpené. Jinak tomu nebylo ani v bazickém prostředí 15mM octanu amonného, kde odezva detektoru byla ještě o něco horší než u 0,1 % kyseliny octové. Srovnatelné výsledky s 15 mM octanem amonným měla i směs voda + 5 % acetonitrilu s přidavkem 15 mM octanu amonného. Jako výsledný kompromis pro precipitační rozpouštění byla zvolena směs 5 % acetonitrilu s vodou. Tento rozpouštěcí krok byl zvolen zejména proto, že pro všechny metabolity jak v pozitivním, tak negativním módu polarity poskytoval nejvyšší odezvy a zároveň nevykazoval rozpouštění lipidů. Toto tvrzení podporuje i fakt, že při vyhodnocení byla nejhorší odezva pro skupinu STD karnitinů, které je možné řadit do skupiny polárních lipidů. Další vhodnou alternativou by mohla být směs rozpouštědel voda + 10 % acetonitrilu, ale z vzrůstajícím % acetonitrilu, roste i rozpouštění příslušných lipidů.



Graf 9: Optimalizace rozpouštěcího kroku pro precipitaci. * značí absolutní hodnotu

V případě hledání rozpouštěcího kroku pro extrakci dle Folche byly zvoleny následné rozpouštěcí kroky: voda:acetonitril (1:1, v/v); voda:acetonitril (1:2, v/v); voda:acetonitril (1:3 v/v) a voda:acetonitril:methanol (1:2:2, v/v/v). Bylo zjištěno, že vyšší poměr vody a organického rozpouštědla než je 1:2 (v/v) způsobí zpětné vysrážení přítomných metabolitů a tím pádem je takto připravený vzorek nepoužitelný. Na základě těchto informací bylo pomocí všech STD provedeno porovnání směsí voda: ACN 1:1 (v/v) a 1:2 (v/v). Bylo zjištěno (**graf 10**), že poměr rozpouštědel 1:1 je pro extrakci dle Folche vhodnější a poskytuje lepší rozpustnost látek, tedy i vyšší odezvy. V grafu 10 je také znázorněné i porovnání se směsí vody + 5 % acetonitrilu (nejvhodnější pro proteinovou precipitaci). Jelikož jsou hodnoty 5 % acetonitrilu s vodou mnohonásobně nižší (jedná se o více než řád nižší odezvy) lze konstatovat, že Folchova extrakce bude v porovnání s precipitací daleko vhodnější.

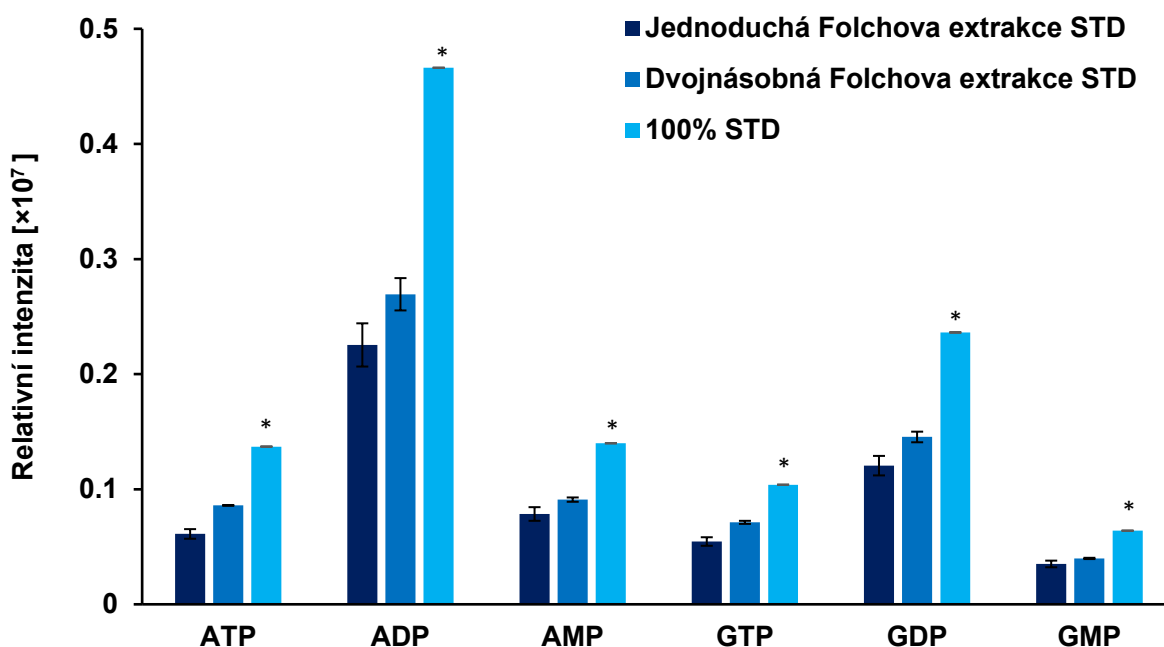


Graf 10: Optimalizace rozpouštění pro Folchovu extrakci

Součástí optimalizace rozpouštěcího kroku byl také proveden experiment, který porovnával 3 odlišné typy vod a to, ultra-čistou vodu s pH=5,95, školní deionizovanou vodu pH=4,39 a ultra-čistou vodu okyselenou kyselinou octovou na pH=4,39. Z výsledků vyplývá, že v tomto rozsahu pH retence ani odezva detektoru nehraje žádnou významnou roli.

3.4 Optimalizace extrakce

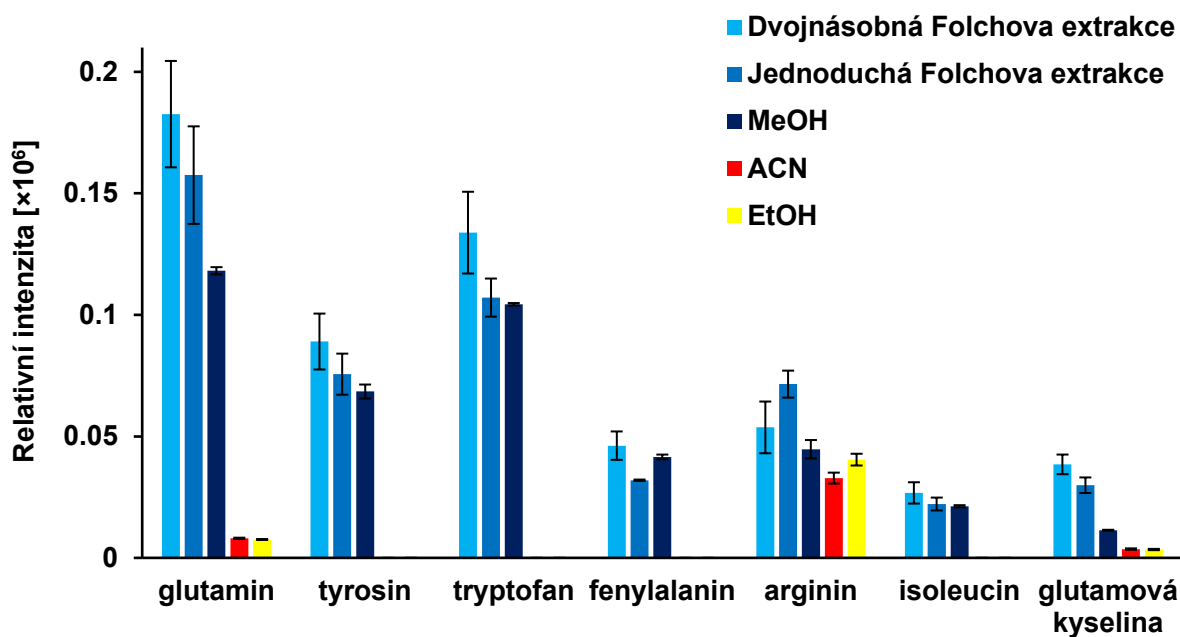
Na základě předchozí optimalizace rozpouštěcího kroku pomocí standardů bylo zjištěno, že při použití většího % acetonitrilu vzroste i odezva látek. Jelikož s vyšším % organického rozpouštědla roste i rozpouštění lipidů, bylo nevyhnutné použít extrakci dle Folche, kdy jsou lipidy extrahovány do organické fáze, zatímco metabolity do vodné. Nejdříve bylo na standardech provedeno porovnání mezi jednoduchou a dvojnásobnou extrakcí dle Folche (**graf 11**). Bylo pipetováno 180 μl STD mixu a 20 μl (10 \times zředěné) směsi STD lipidů do 4ml skleněných vialek. Ty byly následně podrobeny Folchově extrakci, tzn. že byly přidány 2ml chloroformu a 1 ml methanolu. Celá směs byla homogenizována při 40 $^{\circ}\text{C}$ asi 15 minut. Následně bylo do směsi pipetováno dalších 600 μl vody a celý proces byl opakován. Takto zhomogenizovaná směs byla centrifugována 6 minut při 6000 otáčkách/minutu. Z vialek bylo odebráno 750 μl vodné fáze do menších 2 ml skleněných vialek. Polovina vzorků byla podrobena násobné extrakci, což znamená, že do zbylé směsi organické fáze bylo znovu pipetováno dalších 600 μl deionizované vody a celý postup byl zopakován. Vzniklá horní vodná vrstva byla přidána k původní a veškeré vzorky byly odpařeny pod dusíkem. Po dokonalém odpaření byly vzorky rozpuštěny v acetonitrilu a vodě 1:1 (v/v) a spolu s původním STD mixem proměřeny.



Graf 11: Porovnání extrakcí dle Folcha s STD. * značí absolutní hodnotu.

K porovnání výsledků byl vybrán **graf 11** se zástupci fosfátovaných nukleotidů. V porovnání jednoduchého a násobného postupu je zřejmé, že dvojnásobná extrakce má v případě fosfátových nukleotidů o 23-29 % větší výtěžnost než jednoduchá. Byla zpracována tabulka porovávající vzájemnou výtěžnost mezi jednotlivými typy Folchovy extrakce, a to jak v pozitivním, tak negativním módu polarity (**příloha B, C**). Při porovnávání byla také vypočítána celková výtěžnost extrakce, a to porovnáním intenzity STD násobné extrakce a původního STD mixu. Bylo zjištěno, že celková výtěžnost extrakce velmi záleží na povaze látek a vypočítané hodnoty jsou shrnuty v **příloze B a C**.

Současně při optimalizaci extrakce byly připraveny různé vzorky plazmy, kde bylo zvoleno pět odlišných postupů extrakce (**graf 12**), pro ověření správnosti výběru extrakčního kroku. Znovu byla provedena jednoduchá i dvojnásobná extrakce dle Folche dle stejného postupu jako u STD a byla provedena precipitace organickým rozpouštědlem, a to konkrétně methanolem, acetonitrilem a ethanolem. Při precipitaci stejně jako u Folchovy extrakce bylo pipetováno 25 μ l plazmy. Precipitace byla provedena přidavkem 250 μ l námi zvoleného precipitačního rozpouštědla. Vzniklá směs byla po dobu 20 sekund míchána a následně 15 minut homogenizována v ultrazvukové lázni. Poté byla extrakční směs odstředěna po dobu 3 minut při 3000 otáčkách/min. Nakonec byly vzorky filtrovány přes 0,2 μ m filtr a převedeny do 2 ml vialek ve kterých byly následně odpařeny pod proudem dusíku. Odparky byly poté rozpuštěny v 250 μ l směsi 5 % acetonitrilu a vody a 30 sekund míchány a následně vloženy ještě do ultrazvukové lázně po dobu 5 minut.



Graf 12: Výsledné porovnání různých typů extrakce provedených na vzorcích plazmy

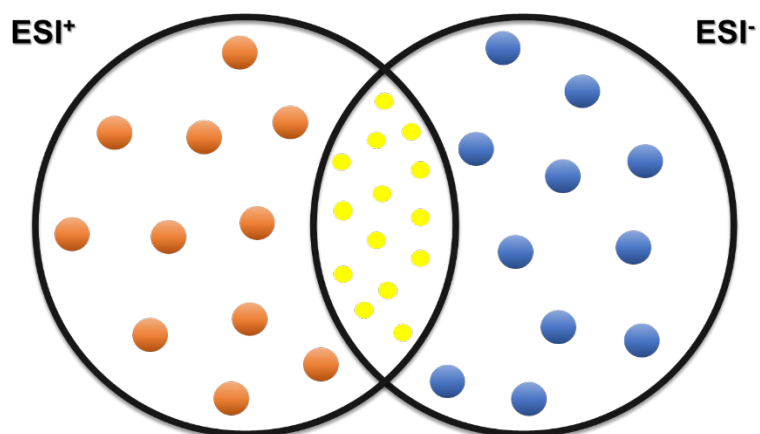
Jak je z **grafu 12** patrné, tak v porovnání s ostatními extrakcemi je dvojnásobná Folchova extrakce nejvhodnější variantou pro metabolickou analýzu. Oproti tomu precipitace jak acetonitrilem, tak ethanolom je nedokonalá, jelikož v porovnání s methanolem vykazuje veliké nedostatky v samotné extrakci metabolitů. Ze získaných dat lze tvrdit, že nejvhodnějších precipitací pro metabolickou analýzu je precipitace methanolem, avšak ve srovnání s násobnou extrakcí dle Folcha jsou její výsledky stále horší.

3.5 Identifikace metabolitů v lidské plazmě

Na základě, již výše vyhotovené optimalizace byla provedena finální identifikace metabolitů v lidské plazmě. Jako extrakční metoda byla použita dvojnásobná Folchova extrakce, přičemž bylo pro extrakci pipetováno 50 μ l plazmy. Nejdříve byly identifikovány metabolity, které byly použity jako standardy při optimalizaci metody. Identifikovány byly pomocí shodných retenčních časů a přesně určené m/z do 5 mDa (viz **tabulka 9**). Takto identifikovaných metabolitů bylo nakonec 36. Byl vypracován Vennův diagram (**obr.14**), který charakterizuje detekci metabolitů v pozitivním módu, negativním módu nebo v obou módech polarity současně. Z Vennova diagramu vyplývá, že rozložení jednotlivých metabolitů je ve všech módech srovnatelný, a to konkrétně 11 metabolitů v pozitivním módu, 11 metabolitů v negativním módu a 14 metabolitů v obou módech zároveň.

Tabulka 9: Identifikované metabolity v lidské plazmě potvrzené pomocí standardů

| <i>ESI⁺</i> | | | | | |
|------------------------|-----------------|---|---|------------------|--------------|
| <i>Metabolit</i> | <i>Rt [min]</i> | <i>Experimentální m/z [M+H]⁺</i> | <i>Teoretické m/z [M+H]⁺</i> | <i>Správnost</i> | |
| | | | | <i>[ppm]</i> | <i>[mDa]</i> |
| uracil | 4.25 | 113.0350 | 113.0350 | 0 | 0 |
| kreatin | 13.06 | 132.0770 | 132.0776 | 4.5 | 0.6 |
| kyselina asparágová | 14.56 | 175.1189 | 175.1189 | 0.5 | 0.1 |
| L-karnitin | 13.06 | 162.1127 | 162.1124 | -1.9 | -0.3 |
| taurin | 11.9 | 126.0218 | 126.0219 | 0.8 | 0.1 |
| palmitoylkarnitin | 6.84 | 400.3380 | 400.3426 | 11.5 | 4.6 |
| oktanoylkarnitin | 8.59 | 288.2178 | 288.2174 | -1.3 | -0.4 |
| dekanoylkarnitin | 7.92 | 316.2492 | 316.2487 | -1.6 | -0.5 |
| acetyl-L-karnitin | 12.68 | 204.1235 | 204.1235 | 0 | 0 |
| ATP | 13.96 | 508.0039 | 508.0040 | 0.2 | 0.1 |
| ADP | 13.59 | 428.0386 | 428.0370 | -3.7 | -1.6 |
| AMP | 13.32 | 348.0758 | 348.0710 | -13.8 | -4.8 |
| GDP | 14.02 | 444.0296 | 444.0320 | 5.4 | 2.4 |
| CTP | 14.39 | 483.9910 | 483.9920 | 2.1 | 1 |
| Acetyl-CoA | 13.26 | 810.1334 | 810.1330 | -0.1 | -0.1 |
| <i>ESI</i> | | | | | |
| <i>Metabolit</i> | <i>Rt [min]</i> | <i>m/z [M-H]⁻</i> | | <i>Správnost</i> | |
| | | <i>Experimentální</i> | <i>Teoretické</i> | <i>[ppm]</i> | <i>[mDa]</i> |
| lysin | 14.68 | 145.0964 | 145.0970 | 4.1 | 0.6 |
| alanin | 13.00 | 88.0387 | 88.0392 | 5.9 | 0.5 |
| serin | 13.26 | 104.0331 | 104.0342 | 10.2 | 1.1 |
| prolin | 12.45 | 114.0544 | 114.0548 | 3.7 | 0.4 |
| valin | 12.47 | 116.0699 | 116.0705 | 5.3 | 0.6 |
| treonin | 13.08 | 118.0495 | 118.0497 | 1.9 | 0.2 |
| leucin | 10.91 | 130.0858 | 130.0862 | 3.1 | 0.4 |
| histidin | 13.36 | 154.0603 | 154.0611 | 4.9 | 0.8 |
| tyrosin | 12.68 | 180.0651 | 180.0654 | 1.8 | 0.3 |
| tryptofan | 11.63 | 203.0813 | 203.0821 | 3.7 | 0.8 |
| ornitin | 14.56 | 131.0806 | 131.0821 | 11.1 | 1.5 |
| glutamin | 13.23 | 145.0603 | 145.0613 | 7.0 | 1.0 |
| fenylalanin | 10.96 | 164.0704 | 164.0705 | 0.7 | 0.1 |
| isoleucin | 11.48 | 130.0858 | 130.0862 | 3.1 | 0.4 |
| asparagin | 13.30 | 131.0440 | 131.0450 | 8.1 | 1.1 |
| kyselina glutamová | 13.35 | 146.0445 | 146.0447 | 1.6 | 0.2 |
| taurin | 11.90 | 124.0057 | 124.0062 | 4.3 | 0.5 |
| uridin | 4.25 | 243.0620 | 243.0611 | -3.7 | -0.9 |
| citruilin | 13.36 | 174.0876 | 174.0878 | 1.2 | 0.2 |
| glukoza-6-fosfát | 13.80 | 259.0199 | 259.0220 | 8.1 | 2.1 |
| citrát sodný | 16.68 | 256.9601 | 256.965 | 19.1 | 4.9 |



Obrázek 14: Vennův diagram detekovaných metabolitů v lidské plazmě pomocí ESI⁺ a ESI⁻

Další metabolity v lidské plazmě byly identifikovány pomocí přesně určeného m/z charakterizované pomocí odchylky v ppm a mDa (**příloha D**).

ZÁVĚR

V této práci byla optimalizována separační metoda sloužící k identifikaci metabolitů v lidské plazmě. K dosažení separace, s ohledem na problematické funkční skupiny některých metabolitů, byl využit bioinertní UHPLC systém s bioinertní kolonou. K detekci byl poté použit hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením XEVO G2 XS QTOF.

V rámci diplomové práce byla vyvinuta nová metoda pro metabolomickou analýzu v lidské plazmě zahrnující také přípravu vzorku. Metoda byla optimalizována s využitím 69 standardů. Optimalizovaná separační metoda využívá gradientovou eluci se složením acetonitril + 0,005% kyselina octová jako MF A a voda + 15 mM octan amonný + 0,005% kyselina octová jako MF B. Pro separaci byla zvolena kolona Acquity Premier BEH Amid (150×2.1 mm; 1.7 μm) s teplotou 45°C a průtokem 0,4 ml/min. Celková doba analýzy je 20 minut včetně ekvilibrace kolony. Vyvinutá metoda umožňuje identifikovat skupiny látek jako aminokyseliny, karnitiny, organické kyseliny ale i látky složitější pro separaci, jako jsou vícekrát fosfátované nukleotidy např. ATP, ADP, AMP. Tato metoda umožňuje i separaci izomerů např. leucin/izoleucin/norleucin nebo glukózy/galaktózy. Současně byla také hledána vhodná metoda přípravy vzorků pro analýzu metabolitů z lidské plazmy. Bylo porovnáváno pět extrakčních protokolů, kde jako nejlepší se ukázala dvojnásobná extrakce dle Folche. Pro metabolomickou analýzu byla odebírána horní vodná vrstva, přičemž nežádoucí lipidy byly extrahovány do organické fáze.

Cílem práce bylo aplikovat optimalizovanou metodu pro analýzu lidské plazmy se zaměřením na polární metabolity. Výsledkem byla identifikace 121 metabolitů v lidské plazmě na základě přesně určeného m/z a pro 36 z nich byla identifikace navíc potvrzena pomocí retenčního času standardu. V budoucnosti budou další kroky směřovat k provedení MS/MS analýzy, validaci metody s následnou kvantitativní analýzou a aplikací pro série reálných vzorků lidské plazmy.

CITACE

- [1] Patti G.J, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2012**, 13(4), 263-269. ISSN 1471-0072. DOI :10.1038/nrm3314
- [2] Wishart D.S, Guo A, Oler E et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research*. **2022**, 50(1), 622-631. ISSN 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gkab1062
- [3] Johnson C.H, Patterson A.D, Idle J.R, Gonzalez F.J. Xenobiotic Metabolomics: Major Impact on the Metabolome. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **2012**, 52(1), 37-56. ISSN 0362-1642. DOI:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134748
- [4] Zheng X, Aly N.A, Zhou Y, et al. A structural examination and collision cross section database for over 500 metabolites and xenobiotics using drift tube ion mobility spectrometry. *Chem. Sci*. **2017**, 8(11), 7724-7736. ISSN 2041-6520. DOI:10.1039/C7SC03464D
- [5] Madariaga-Mazón A, Hernández-Alvarado R.B, Noriega-Colima K.O, Osnaya-Hernández A, Martinez-Mayorga K. Toxicity of secondary metabolites. *Physical Sciences Reviews*. **2019**, 4(12). ISSN 2365-659X. DOI:10.1515/psr-2018-0116
- [6] Dass Ch. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, **2007**. ISBN 978-0-471-68229-5.
- [7] Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Hoboken, NJ: J. Wiley, **2007**. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [8] Zou W, She J, Tolstikov V. A Comprehensive Workflow of Mass Spectrometry-Based Untargeted Metabolomics in Cancer Metabolic Biomarker Discovery Using Human Plasma and Urine. *Metabolites*. **2013**, 3(3), 787-819. ISSN 2218-1989. DOI:10.3390/metabo3030787

- [9] Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, Tziotis D, Lehmann R, Schmitt-Kopplin P. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *Journal of Chromatography A*. **2013**, 1292, 51-65. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2013.04.017
- [10] Chetwynd A. J, David A. A review of nanoscale LC-ESI for metabolomics and its potential to enhance the metabolome coverage. *Talanta*. **2018**, 182, 380-390. ISSN 00399140. DOI:10.1016/j.talanta.2018.01.084
- [11] Allen F, Greiner R, Wishart D. Competitive fragmentation modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification. *Metabolomics*. **2015**, 11(1), 98-110. ISSN 1573-3882. DOI:10.1007/s11306-014-0676-4
- [12] Cole R. B, et. al. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. Second edition. New Jersey: Wiley, **2010**. ISBN 978-0-471-74107-7.
- [13] Zubarev R. A, Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **2013**, 85(11), 5288-5296 . ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac4001223
- [14] Xian F, Hendrickson C. L, Marshall A. G. High Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **2012**, 84(2), 708-719. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac203191t
- [15] Medhe S. Mass Spectrometry: Detectors Review. *Chemical and Biomolecular Engineering*. India, **2018**, 3(4), 51-58. ISSN 2578-8884. DOI:10.11648/j.cbe.20180304.11
- [16] McLafferty F. W. Tandem mass spectrometry (MS/MS): a promising new analytical technique for specific component determination in complex mixtures. *Accounts of chemical research*. **1980**, 33-39.
- [17] Bligh E. G, Dyer W.J, Kurzchalia T. V, Shevchenko A, Schwudke D. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **1959**, 37(8), 911-917. ISSN 0576-5544. DOI:10.1139/o59-099

- [18] Kulyyassov A, Fresnais M, Longuespée R. Targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of proteins: Basic principles, applications, and perspectives. *PROTEOMICS*. **2021**, 21(23-24). ISSN 1615-9853. DOI:10.1002/pmic.202100153
- [19] Cajka T, Fiehn O. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Analytical Chemistry*. **2016**, 88(1), 524-545. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/acs.analchem.5b04491
- [20] Zhang X, Quinn K, Cruickshank-Quinn C, Reisdorph R, Reisdorph E. The application of ion mobility mass spectrometry to metabolomics. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2018**, 42, 60-66. ISSN 13675931. DOI:10.1016/j.cbpa.2017.11.001
- [21] May J.C, McLean J.A. Ion Mobility-Mass Spectrometry: Time-Dispersive Instrumentation. *Analytical Chemistry*. **2015**, 87(3), 1422-1436. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac504720m
- [22] Ibrahim Y.M, Garimella S.V.B, Prost S.A, Wojcik R, Norheim R.V, Baker E.S, Rusyn I, Smith R.D. Development of an Ion Mobility Spectrometry-Orbitrap Mass Spectrometer Platform. *Analytical Chemistry*. **2016**, 88(24), 12152-12160. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/acs.analchem.6b03027
- [23] Kanu A. B, Dwivedi P, Tam M, Matz L, Hill H.H. Ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **2008**, 43(1), 1-22. ISSN 10765174. DOI:10.1002/jms.1383
- [24] Nováková L, Douša M, Česla P. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, **2021**. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [25] Sitnikov D.G, Monnin C.S, Vuckovic D. Systematic Assessment of Seven Solvent and Solid-Phase Extraction Methods for Metabolomics Analysis of Human Plasma by LC-MS. *Scientific Reports*. **2016**, 6(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: DOI:10.1038/srep38885

- [26] Cubbon S, Antonio C, Wilson J, Thomas-Oates J. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. *Mass Spectrometry Reviews*. **2010**, 29(5), 671-684. ISSN 02777037. DOI:10.1002/mas.20252
- [27] Buszewski B, Noga A.S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2012**, 402(1), 231-247. ISSN 1618-2642. DOI:10.1007/s00216-011-5308-5
- [28] Kohler I, Verhoeven M, Haselberg R, Gargano A.F.G. Hydrophilic interaction chromatography – mass spectrometry for metabolomics and proteomics: state-of-the-art and current trends. *Microchemical Journal*. **2022**, 175. ISSN 0026265X. DOI:10.1016/j.microc.2021.106986
- [29] Narduzzi L, Royer A.L, Bichon E, Guitton Y, Buisson C, Le Bizec B, Dervilly-Pinel G. Ammonium Fluoride as Suitable Additive for HILIC-Based LC-HRMS Metabolomics. *Metabolites*. **2019**, 9(12). ISSN 2218-1989. DOI:10.3390/metabo9120292
- [30] Hosseinkhani F, Huang L, Dubbelman A, Guled F, Harms A.C, Hankemeier T. Systematic Evaluation of HILIC Stationary Phases for Global Metabolomics of Human Plasma. *Metabolites*. **2022**, 12(2). ISSN 2218-1989. DOI:10.3390/metabo12020165
- [31] Li J, Wang Q.L, Liu Y, Ke Y, Fan Q, Zhou P, An M, Liu H.L. Simultaneous determination of 24 free amino acids in MGC803 cells by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **2019**, 1132. ISSN 15700232. DOI:10.1016/j.jchromb.2019.121792
- [32] Virgiliou Ch, Gika H.G, Theodoridis G.A. HILIC-MS/MS Multi-Targeted Method for Metabolomics Applications. *Metabolic Profiling*. New York, **2018**, 65-81. ISBN 978-1-4939-7642-3. DOI:10.1007/978-1-4939-7643-0_5
- [33] Arase S, Kimura S, Ikegami T. Method optimization of hydrophilic interaction chromatography separation of nucleotides using design of experiment approaches I: Comparison of several zwitterionic columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2018**, 158, 307-316. ISSN 07317085. DOI:10.1016/j.jpba.2018.05.014

- [34] Klesper E, Corwin A, Turner D.A. High pressure gas chromatography above critical temperatures. *Journal of Organic Chemistry*. United States, **1962**, 2(27), 700-701. ISSN 0022-3263.
- [35] Shulaev V, Isaac G. Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry – A metabolomics perspective. *Journal of Chromatography B*. **2018**, 1092, 499-505. ISSN 15700232. DOI:10.1016/j.jchromb.2018.06.021
- [36] Van de Velde B, Guillarme D, Kohler I. Supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry in metabolomics: Past, present, and future perspectives. *Journal of Chromatography B*. **2020**, 1161. ISSN 15700232. DOI:10.1016/j.jchromb.2020.122444
- [37] Wolrab D, Peterka O, Chocholoušková M, Holčápek M. Ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography / mass spectrometry in the lipidomic analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2022**, 149. ISSN 01659936. DOI:10.1016/j.trac.2022.116546
- [38] Waters. [cit. 2022-11-21].
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>
- [39] Delano M, Walter T.H, LauberM.A, et al. Using Hybrid Organic–Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Analytical Chemistry*. **2021**, 93(14), 5773-5781. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/acs.analchem.0c05203
- [40] Liu R, bao Z.X, Zhao P.J, Li G.H. Advances in the Study of Metabolomics and Metabolites in Some Species Interactions. *Molecules*. **2021**, 26(11). ISSN 1420-3049. DOI:10.3390/molecules26113311
- [41] Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski M.J, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2015**, 113, 108-120. ISSN 07317085. DOI:10.1016/j.jpba.2014.12.017
- [42] Oliver, S. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*. **1998**, 16(9), 373-378. ISSN 01677799. DOI:10.1016/S0167-7799(98)01214-1

- [43] Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2007**, 387(2), 525-527. ISSN 1618-2642. DOI:10.1007/s00216-006-0687-8
- [44] Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2012**, 403(6), 1523-1548. ISSN 1618-2642. DOI:10.1007/s00216-012-6039-y
- [45] LIU, Xiaojing a Jason W. LOCASALE. Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2017, **42**(4), 274-284 [cit. 2022-12-30]. ISSN 09680004. Dostupné z: DOI:10.1016/j.tibs.2017.01.004
- [46] Cvačka J, Vrkoslav V, Hubálek M, Vlk M, ed. *Sborník 23.ročníku Školy hmotnostní spektrometrie*. První. Praha- 2, Nové Město: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, **2022**. ISBN 978-80-88195-32-0.
- [47] Pinu F. Grape and Wine Metabolomics to Develop New Insights Using Untargeted and Targeted Approaches. *Fermentation*. **2018**, 4(4). ISSN 2311-5637. DOI:10.3390/fermentation4040092
- [48] Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin J.P, Schopfer F.J. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLOS ONE*. **2018**, 13(11). ISSN 1932-6203. DOI:10.1371/journal.pone.0207082
- [49] Koulman A, Lane G.A, Harrison S.J, Volmer D.A. From differentiating metabolites to biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2009**, 394(3), 663-670. ISSN 1618-2642. DOI:10.1007/s00216-009-2690-3
- [50] Lei Z, Huhman D.V, Sumner L.W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*. **2011**, 286(29), 25435-25442. ISSN 00219258. DOI:10.1074/jbc.R111.238691
- [51] SYSI-AHO Ma, KATAJAMAA M, YETUKURI L, OREŠIČ M. Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards. *BMC Bioinformatics*. **2007**, 8(1). ISSN 1471-2105. DOI:10.1186/1471-2105-8-93

- [52] Volný M. Quantitative Analysis by Mass Spectrometry. *Chemické Listy*. Prague, **2020**, 114(3), 179186.
- [53] Fomenko M.V, Yanshole L.V, Tsentelovich Y.P. Stability of Metabolomic Content during Sample Preparation: Blood and Brain Tissues. *Metabolites*. **2022**, 12(9). ISSN 2218-1989. DOI:10.3390/metabo12090811
- [54] Pawliszyn J. Sample Preparation: Quo Vadis?. *Analytical Chemistry*. **2003**, 75(11), 2543-2558. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac034094h
- [55] Gika H, Theodoridis G. Sample preparation prior to the LC–MS-based metabolomics/metabonomics of blood-derived samples. *Bioanalysis*. **2011**, 3(14), 1647-1661. ISSN 1757-6180. DOI:10.4155/bio.11.122
- [56] Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **2003**, 785(2), 263-275. ISSN 15700232. DOI:10.1016/S1570-0232(02)00914-5
- [57] Bruce S.J, Jonsson P, Antti H, Cloarec O, Trygg J, Marklund S.L, Moritz T. Evaluation of a protocol for metabolic profiling studies on human blood plasma by combined ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry: From extraction to data analysis. *Analytical Biochemistry*. **2008**, 372(2), 237-249. ISSN 00032697. DOI:10.1016/j.ab.2007.09.037
- [58] Pereira H, Martin J.F, Joly Ch, Sébédio J.L, Pujos-Guillot E. Development and validation of a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. *Metabolomics*. **2010**, 6(2), 207-218. ISSN 1573-3882. DOI:10.1007/s11306-009-0188-9
- [59] Want E.J, O'maille G, Smith C.A, Brandon T.R, Uritboonthai W, Qin Ch, Trauger A.S, Siuzdak G. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2006**, 78(3) 743–752 DOI:10.1021/ac051312t
- [60] Bonjoch N.P, Tamayo P.R. *Handbook of plant ecophysiology techniques: Protein content quantification by Bradford method*. Španělsko: Kluwer Academic Publishers, **2001**, 283-295.

- [61] Pereira H, Martin J.F, Joly Ch, Sébédio J.L, Pujos-Guillot E. Development and validation of a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. *Metabolomics*. **2010**, 6(2), 207-218. ISSN 1573-3882. DOI:10.1007/s11306-009-0188-9
- [62] Müller E, Berger R, Blass E, Sluyts D, Pfennig A. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Verlag: John Wiley & Sons, **2008**, 21, 249-307. ISSN 9783527306732 DOI:10.1002/14356007.b03_06.pub2
- [63] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T.V, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*. **2008**, 49(5), 1137-1146. ISSN 00222275. DOI:10.1194/jlr.D700041-JLR200
- [64] Folch J, Lees M, Stanley G.H.S. A simple method for total lipid extraction and purification. *Journal of Biological Chemistry*. **1957**, 1(226), 497-509.
- [65] Patterson R.E, Ducrocq A.J, Mcdougall D.J, Garrett T.J, Yost R.A. Comparison of blood plasma sample preparation methods for combined LC–MS lipidomics and metabolomics. *Journal of Chromatography B*. **2015**, 1002, 260-266. ISSN 15700232. DOI:10.1016/j.jchromb.2015.08.018
- [66] Ulmer C.Z, Jones Ch.M, Yost R.A, Garrett T.J, Bowden J.A. Optimization of Folch, Bligh-Dyer, and Matyash sample-to-extraction solvent ratios for human plasma-based lipidomics studies. *Analytica Chimica Acta*. **2018**, 1037, 351-357. ISSN 00032670. DOI:10.1016/j.aca.2018.08.004
- [67] Perez De Souza L, Alseekh S, Scossa F, Fernie A.R. Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research. *Nature Methods*. **2021**, 18(7), 733-746. ISSN 1548-7091. DOI:10.1038/s41592-021-01116-4
- [68] Zimmer D, Pickard V, Czembor W, Müller Ch. Comparison of turbulent-flow chromatography with automated solid-phase extraction in 96-well plates and liquid–liquid extraction used as plasma sample preparation techniques for liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 854(1-2), 23-35. ISSN 00219673. DOI:10.1016/S0021-9673(99)00535-X

- [69] Li L, Li R, Zhou J, et al. MyCompoundID: Using an Evidence-Based Metabolome Library for Metabolite Identification. *Analytical Chemistry*. **2013**, *85*(6), 3401-3408. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac400099b
- [70] Go E.P. Database Resources in Metabolomics: An Overview. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. **2010**, *5*(1), 18-30. ISSN 1557-1890. DOI:10.1007/s11481-009-9157-3
- [71] Guijas C, Montenegro-Burke R.J, Domingo-Almenara X, et al. METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Analytical Chemistry*. **2018**, *90*(5), 3156-3164. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/acs.analchem.7b04424
- [72] Horai H, Arita M, Kanaya S, et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*. **2010**, *45*(7), 703-714. ISSN 10765174. DOI:10.1002/jms.1777
- [73] Sud M, Fahy E, Cotter D, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research* [online]. **2007**, *35*, 527-532. ISSN 0305-1048. DOI:10.1093/nar/gkl838
- [74] Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*. **2011**, *40*(1), 109-114 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0305-1048. DOI:10.1093/nar/gkr988
- [75] Paglia G, Langridge J, Astarita G. *Development of a Metabolomic Assay for the Analysis of Polar Metabolites Using HILIC UPLC/QToF MS*. Waters Corporation, Manchester, UK and Milford, MA, USA, **2013**.
- [76] Karlíková K, Šíroková J, Friedecký D, et al. Metabolite Profiling of the Plasma and Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Journal of Proteome Research*. **2016**, *15*(9), 3158-3166. ISSN 1535-3893. DOI:10.1021/acs.jproteome.6b00356

PŘÍLOHY

| | |
|--|----|
| Příloha A: Seznam použitých standardů a znázorněné rozdělení do jednotlivých směsí, abych nedocházelo k izomerickým překryvům, případně chybné identifikaci | 68 |
| Příloha B: Srovnání jednotlivých Folchových extrakcí (jednoduchá/dvojnásobná) a výtěžnost násobné Folchovy extrakce měřené v negativním modu..... | 72 |
| Příloha C: Srovnání jednotlivých Folchových extrakcí (jednoduchá/dvojnásobná) a výtěžnost násobné Folchovy extrakce měřené v pozitivním modu..... | 73 |
| Příloha D: Identifikované metabolity v lidské plazmě | 74 |

Příloha A: Seznam použitých standardů a znázorněné rozdělení do jednotlivých směsí, abych nedocházelo k izomerickým překryvům, případně chybné identifikaci

| Standard | Číslo směsi | Koncentrace zásobního roztoku [μg/μl] | Pipetovaný objem [μl] | Koncentrace [nmol/ml plazmy] |
|----------------------------|--------------------|--|------------------------------|-------------------------------------|
| Glycin | 1 | 1.0 | 93.7 | 250 |
| Alanin | 1 | 1.0 | 89 | 200 |
| Serin | 1 | 1.0 | 52.5 | 100 |
| Prolin | 1 | 1.0 | 28.8 | 50 |
| Valin | 1 | 1.0 | 29.3 | 50 |
| Threonin | 1 | 1.0 | 29.8 | 50 |
| Leucin | 2 | 1.0 | 32.8 | 50 |
| Kyselina asparágová | 2 | 1.0 | 33.3 | 50 |
| Lysin | 2 | 1.0 | 36.5 | 50 |
| Adenin | 2 | 1.0 | 17.0 | 0.25 |
| Histidin | 2 | 1.0 | 77.5 | 100 |
| Arginin | 2 | 1.0 | 43.5 | 50 |
| Tyrosin | 2 | 1.0 | 45.3 | 50 |
| Tryptofan | 2 | 1.0 | 25.5 | 25 |
| Norleucin | 3 | 1.0 | 32.8 | 50 |
| Ornitin | 3 | 1.0 | 33.0 | 50 |
| Glutamin | 3 | 1.0 | 37 | 50 |
| Methionin | 3 | 1.0 | 37 | 50 |
| Guanin | 3 | 1.0 | 37 | 0.5 |

Příloha A: pokračování ...

| Standard | Číslo směsi | Koncentrace zásobního roztoku [µg/µl] | Pipetovaný objem [µl] | Koncentrace [nmol/ml plazmy] |
|------------------------------------|--------------------|--|------------------------------|-------------------------------------|
| Fenylalanin | 3 | 1.0 | 41 | 50 |
| 2-deoxyadenosin | 3 | 1.0 | 10 | 1 |
| Isoleucin | 4 | 1.0 | 32.8 | 50 |
| Asparagin | 4 | 1.0 | 33.0 | 50 |
| Kyselina glutamová | 4 | 1.0 | 36.8 | 50 |
| L-karnitin | 4 | 1.0 | 40.3 | 5 |
| Adenosin | 4 | 1.0 | 14 | 0.1 |
| Guanosin | 4 | 1.0 | 7 | 5 |
| Putrescin | 4 | 1.0 | 22.0 | 50 |
| N-acetyl-5-hydroxytryptamin | 5 | 1.0 | 5.5 | 5 |
| Melatonin | 5 | 1.0 | 5.8 | 5 |
| Taurin | 5 | 1.0 | 31.3 | 50 |
| D,L-lauroylkarnitin | 5 | 1.0 | 2 | 0.01 |
| D,L-myristoylkarnitin | 5 | 1.0 | 2 | 0.01 |
| D,L-palmitoylkarnitin | 5 | 1.0 | 2 | 0.01 |
| D-glukóza | 5 | 1.0 | 45.0 | 50 |
| Uridin | 6 | 1.0 | 6.1 | 5 |
| Myo-inositol | 6 | 1.0 | 45.0 | 50 |
| 1-methyl-L-tryptofan | 6 | 1.0 | 54.5 | 50 |

Příloha A: pokračování ...

| Standard | Číslo směsi | Koncentrace zásobního roztoku [μg/μl] | Pipetovaný objem [μl] | Koncentrace [nmol/ml plazmy] |
|------------------------|-------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Acetyl-L-karnitin | 6 | 1.0 | 50.8 | 50 |
| D,L-oktanoylkarnitin | 6 | 1.0 | 2 | 0.01 |
| D,L-dekanoylkarnitin | 6 | 1.0 | 2.3 | 0.01 |
| D-xyulóza | 6 | 1.0 | 37.5 | 50 |
| Kofein | 6 | 1.0 | 48.5 | 50 |
| 5-methoxyindol | 6 | 1.0 | 36.8 | 50 |
| 5-hydroxyindol | 6 | 1.0 | 33.3 | 50 |
| Adenosin 5'-trifosfát | 6 | 1.0 | 128.0 | 50 |
| Adenosin 5'-difosfát | 7 | 1.0 | 107.0 | 50 |
| Adenosin 5'-monofosfát | 7 | 1.0 | 86.0 | 50 |
| Guanosin 5'-trifosfát | 7 | 1.0 | 130.0 | 50 |
| Guanosin 5'-difosfát | 7 | 1.0 | 110.0 | 50 |
| Guanosin 5'-monofosfát | 7 | 2.0 | 45.0 | 50 |
| Cytosin | 7 | 1.0 | 5.5 | 0.01 |
| Cytidin 5'-trifosfát | 7 | 1.0 | 120.0 | 50 |
| Tymin | 7 | 1.0 | 63 | 100 |
| NADH | 7 | 1.0 | 165.0 | 50 |
| Uracil | 7 | 1.0 | 28.0 | 50 |
| Acetyl-koenzym A | 7 | 1.0 | 100.0 | 5 |
| L-Cystein | 7 | 1.0 | 30.5 | 50 |

| Standard | Číslo směsi | Koncentrace zásobního roztoku [μg/μl] | Pipetovaný objem [μl] | Koncentrace [nmol/ml plazmy] |
|----------------------------|-------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| α-Laktóza | 7 | 1.0 | 85.0 | 50 |
| D-(+)-Galaktóza | 7 | 1.0 | 45.0 | 50 |
| Kreatin | 7 | 1.0 | 33.0 | 50 |
| Citrát sodný | 7 | 1.0 | 64.0 | 50 |
| Citrulin | 7 | 2.0 | 22.0 | 50 |
| D-glukóza-6-fosfát | 7 | 1.0 | 260 | 200 |
| Koenzym A | 7 | 2.0 | 95.0 | 50 |
| 18:1 CDP DG | 7 | 1.0 | 50.0 | 0.1 |
| Cer 18:1;O2/18:1 | 8 | 1 | 14.08 | 10 |
| DG 18:1/0:0/18:1 | 8 | 2 | 7.72 | 10 |
| TG 18:1/18:1/18:1 | 8 | 3 | 7.4 | 10 |
| PC 18:1/18:1 | 8 | 2 | 9.8 | 10 |
| LPC 18:1 | 8 | 2 | 6.5 | 10 |
| PE 18:1/18:1 | 8 | 2 | 9.3 | 10 |
| LPE 18:1 | 8 | 2 | 6 | 10 |
| SM 18:1;O2/18:1 | 8 | 2 | 9.1 | 10 |
| LacCer 18:1;O2/16:0 | 8 | 2.5 | 8.6 | 10 |
| GlcCer 18:1;O2/16:0 | 8 | 1 | 17.52 | 10 |
| CE 18:1 | 8 | 2 | 8.1 | 10 |

Příloha B: Srovnání jednotlivých Folchových extrakcí (jednoduchá/dvojnásobná) a výtěžnost dvojnásobné Folchovy extrakce měřené v negativním modu

| Standard | Jednoduchá vs. dvojnásobná [%] | Výtěžnost dvojnásobné extrakce [%] |
|------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Prolin | 84 | 56 |
| Threonin | 72 | 56 |
| Serin | 73 | 84 |
| Valin | 82 | 59 |
| Lysin | 93 | 40 |
| Kyselina asparágová | 118 | 76 |
| Leucin | 84 | 53 |
| Histidin | 65 | 51 |
| Adenin | 75 | 70 |
| Taurin | 91 | 57 |
| Tyrosin | 83 | 53 |
| Tryptofan | 82 | 45 |
| fenylalenin | 82 | 46 |
| Guanin | 83 | 46 |
| Norleucin | 83 | 52 |
| Glutamin | 87 | 59 |
| Methionin | 75 | 41 |
| Isoleucin | 79 | 51 |
| Guanosin | 88 | 53 |
| Kyselina glutámová | 87 | 52 |
| Asparagin | 77 | 62 |
| N-acetyl-5-hydroxytryptamin | 69 | 41 |
| Melatonin | 69 | 5 |
| 1-methyl-L-tryptophan | 73 | 46 |
| Uridin | 94 | 47 |
| Alanin | 81 | 58 |

Příloha C: Srovnání jednotlivých Folchových extrakcí (jednoduchá/dvojnásobná) a výtěžnost dvojnásobné Folchovy extrakce měřené v pozitivním módu.

| Standard | Jednoduchá vs. dvojnásobná [%] | Výtěžnost dvojnásobné extrakce [%] |
|--------------------------|---------------------------------------|---|
| Adenin | 74 | 62 |
| Arginin | 84 | 64 |
| Asparagin | 81 | 64 |
| Adenosin | 76 | 57 |
| 2-deoxyadenosin | 78 | 56 |
| Cytosin | 66 | 83 |
| Uracil | 86 | 65 |
| L-karnitin | 105 | 48 |
| Lauroylkarnitin | 55 | 14 |
| Myristoylkarnitin | 85 | 4 |
| Palmitoylkarnitin | 116 | 2 |
| Acetyl-L-karnitin | 83 | 68 |
| Oktanoylkarnitin | 62 | 52 |
| Dekanoylkarnitin | 87 | 65 |
| ATP | 71 | 63 |
| ADP | 84 | 58 |
| AMP | 86 | 65 |
| GTP | 77 | 69 |
| GDP | 83 | 62 |
| GMP | 88 | 63 |
| CDP DG 18:1 | 5 | 5 |
| Acetyl-CoA | 88 | 60 |
| Fenylalanin | 91 | 71 |
| CoA | 109 | 34 |
| Tymin | 81 | 58 |
| Kreatin | 83 | 56 |
| Citrulin | 88 | 48 |

Příloha D: Identifikované metabolity v lidské plazmě. * značí možnost další izomerní formy

| <i>ESI⁺</i> | | | | | |
|---|-----------------|------------------------------|-------------------|------------------|--------------|
| <i>Metabolit</i> | <i>Rt [min]</i> | <i>m/z [M+H]⁺</i> | | <i>Správnost</i> | |
| | | <i>Experimentální</i> | <i>Teoretické</i> | <i>[ppm]</i> | <i>[mDa]</i> |
| 2-hydroxypurin | 4.49 | 137.0461 | 137.0458 | -2.2 | -0.3 |
| Terc-butyl karbamát | 10.67 | 118.0863 | 118.0863 | 0 | 0 |
| Manóza/fruktóza/myoinositol | 5.57 | 181.0727 | 181.0706 | -11.6 | -2.1 |
| Kreatinin | 2.21 | 102.0934 | 102.0920 | -13.7 | -1.4 |
| Betain | 4.79/5.24 | 114.0667 | 114.0667 | 0 | 0 |
| Indol | 10.67 | 118.0863 | 118.0868 | 4.2 | 0.5 |
| Nikotinamid | 11.62 | 118.0661 | 118.0656 | -4.2 | -0.5 |
| D,L-pipekolová kyselina | 1.8 | 123.0561 | 123.0558 | -2.4 | -0.3 |
| Methylcystein | 2.22 | 130.0865 | 130.0868 | 2.3 | 0.3 |
| Histidinol/glutamát | 2.46 | 136.0403 | 136.0432 | 21.3 | 2.9 |
| O-acetyl-L-serin | 5.06 | 142.0866 | 142.098 | 80.2 | 11.4 |
| Kyselina 2-aminooctová | 13.35 | 148.0608 | 148.0609 | 0.7 | 0.1 |
| Methionin sufoxid | 13.29 | 160.1334 | 160.1338 | 2.2 | 0.35 |
| Pyridoxin | 1.048 | 166.0541 | 166.0530 | -6.6 | -1.1 |
| 1-methyl-histidin | 3.42 | 171.0877 | 171.0895 | 10.5 | 1.8 |
| Fosforylcholin | 13.46 | 170.0936 | 170.0930 | -3.8 | -0.65 |
| 2-Amino-3-methyl-1-butanol | 9.31 | 104.1071 | 104.1075 | 3.8 | 0.4 |
| NG-dimethyl-L-arginin | 9.63 | 104.1072 | 104.1075 | 2.9 | 0.3 |
| Thiamin | 14.07 | 203.1507 | 203.151 | 1.5 | 0.3 |
| 1-methyladenosin | 7.6 | 265.1189 | 265.112 | -26.0 | -6.9 |
| Folát | 3.34 | 282.1213 | 282.1202 | -3.9 | -1.1 |
| Bilirubin | 2.44 | 442.1590 | 442.148 | -24.9 | -11 |
| Hypoxantin | 1.64 | 387.3548 | 387.3626 | 20.1 | 7.8 |
| Kyselina α-ketoisovalerová | 4.5 | 137.0458 | 137.0463 | 3.7 | 0.5 |
| Androstenedion | 11.6 | 117.0586 | 117.0552 | -29.4 | -3.44 |
| Kyselina glukuronová | 4.99 | 287.2012 | 287.2011 | -0.3 | -0.1 |
| Kyselina glykocholová | 6.07 | 195.0514 | 195.0504 | -5.1 | -1 |
| Sfingosin-1-fosfát | 10.98 | 464.3022 | 464.3012 | -2.2 | -1 |
| Vitamin A | 12.48 | 380.2558 | 380.2565 | 1.8 | 0.7 |
| Kofein | 6.32 | 287.2371 | 287.2374 | 1.0 | 0.3 |
| Methyl – pyridin-3-karboxylát | 1.23 | 193.0740 | 193.0726 | -7.5 | -1.45 |
| Dekenoylkarnitin | 11.68 | 138.0562 | 138.0555 | -5.1 | -0.7 |
| Dekadienoylkarnitin | 8.02 | 314.2334 | 314.2331 | -1 | -0.3 |
| Dodecenoylkarnitin | 8.27 | 312.2175 | 312.2174 | -0.3 | -0.1 |
| Hydroxytetradekenoylkarnitin | 7.51 | 342.2668 | 342.2644 | -7.0 | -2.4 |
| Tetradekadienkarnitin | 8.75 | 386.2977 | 386.2906 | -18.4 | -7.1 |
| Propionylkarnitin | 7.28 | 368.2821 | 368.2800 | -5.7 | -2.1 |
| Valerylkarnitin / isovalerylkarnitin | 12.36 | 218.1396 | 218.1392 | -1.8 | -0.4 |
| | 10.47 | 246.1709 | 246.1705 | -1.6 | -0.4 |
| Tiglylkarnitin/ 3 - methylcrotonylkarnitin | 10.59 | 246.1693 | 246.1710 | 6.9 | 1.7 |

Příloha D: pokračování ...

| <i>Metabolit</i> | <i>Rt</i> [min] | <i>m/z [M+H]⁺</i> | | <i>Správnost</i> | |
|------------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------|------------------|-------|
| | | <i>Experimentální</i> | <i>Teoretické</i> | [ppm] | [mDa] |
| Oktenoylkarnitin | 9.67 | 260.1866 | 260.1861 | -1.9 | -0.5 |
| Hexanoylkarnitin | 11.22 | 244.1545 | 244.1548 | 1.2 | 0.3 |
| Galaktóza | 1.75 | 181.0725 | 181.0723 | -1.1 | -0.2 |
| Glukóza | 1.84 | 181.0725 | 181.0723 | -1.1 | -0.2 |
| <i>ESI</i> | | | | | |
| <i>Metabolit</i> | <i>Rt</i> [min] | <i>m/z [M-H]⁻</i> | | <i>Správnost</i> | |
| | | <i>Experimentální</i> | <i>Teoretické</i> | [ppm] | [mDa] |
| Kyselina močová | 12.91 | 167.0188 | 167.0205 | 10.2 | 0.002 |
| Kyselina askorbová | 0.73 | 175.0235 | 175.0240 | 2.9 | 0.5 |
| Kyselina argininojantarová | 5.05 | 289.1250 | 289.1148 | -35.3 | -10.2 |
| Hypoxantin | 4.49 | 135.0295 | 135.0306 | 8.2 | 1.1 |
| Laktát | 5.69 | 89.0236 | 89.0238 | 2.3 | 0.2 |
| Fumarát | 13.86 | 115.0019 | 115.0031 | 10.4 | 1.2 |
| Kyselina maleinová | 13.49 | 115.0023 | 115.0031 | 6.9 | 0.8 |
| Guanidinoacetát | 11.62 | 116.0489 | 116.0460 | -25 | -2.9 |
| 3-S-methylthiopropionát | 16.6 | 119.0153 | 119.0116 | -31.1 | -3.7 |
| Kyselina pyroglutamová | 13.35 | 128.0329 | 128.0347 | 14.1 | 1.8 |
| N-acetyl-L-alanin | 13.07 | 130.0592 | 130.0504 | -67.7 | -8.8 |
| Malát | 13.87 | 133.0128 | 133.0136 | 6.0 | 0.8 |
| Karbamoyl-fosfát | 6.02 | 139.9834 | 139.9740 | -67.2 | -9.4 |
| Fenylpyruvát | 12.68 | 163.0386 | 163.0390 | 2.5 | 0.4 |
| Kyselina 3-methylfenyloctová | 0.63 | 149.0581 | 149.0605 | 16.1 | 2.4 |
| Xantin | 5.84 | 151.0248 | 151.0256 | 5.3 | 0.8 |
| Kyselina hydroxyfenyloctová | 0.65 | 151.0376 | 151.0395 | 12.6 | 1.9 |
| Kyselina akonitová | 14.24 | 173.0078 | 173.0086 | 4.6 | 0.8 |
| Kyselina skorbová | 0.73 | 175.0228 | 175.0242 | 8 | 1.4 |
| Pyrofosfát | 14.4 | 176.9340 | 176.9350 | 5.7 | 1 |
| Kyselina homocysteová | 1.66 | 182.0116 | 182.0123 | 3.8 | 0.7 |
| Kyselina 4-pyridoxová | 1.05 | 182.0426 | 182.0450 | 13.2 | 2.4 |
| Kyselina indoakrylová | 3.1 | 186.0551 | 186.0555 | 2.2 | 0.4 |
| Kyselina xanthurenová | 5.9 | 204.0302 | 204.0296 | -2.9 | -0.6 |
| Kyselina patothenová | 7.85 | 218.1030 | 218.1028 | -0.9 | -0.2 |
| Deoxyuridin | 13.22 | 227.0640 | 227.0667 | 11.9 | 2.7 |
| Celobióza | 13.07 | 341.1068 | 341.1083 | 4.4 | 1.5 |
| Kyselina taurodeoxycholová | 2.85 | 498.2885 | 498.2889 | 0.8 | 0.4 |
| Melibióza | 13.08 | 341.1087 | 341.1083 | -1.2 | -0.4 |
| Kyselina urokanová | 11.3 | 137.0351 | 137.0351 | 0 | 0 |
| 1-methylxantin | 2.88 | 165.0412 | 165.0412 | 0 | 0 |
| Kyselina indoxylsírová | 0.75 | 212.0016 | 212.0018 | 0.7 | 0.15 |
| Kyselina aminobutanová | 13.36 | 102.0543 | 102.0555 | 11.8 | 1.2 |
| N-acetylglutamová kyselina | 10.5 | 188.0539 | 188.0558 | 10.1 | 1.9 |

Příloha D: pokračování ...

| <i>Metabolit</i> | <i>Rt</i> <i>[min]</i> | <i>m/z [M-H]</i> | | <i>Správnost</i> | |
|------------------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|--------------|
| | | <i>Experimentální</i> | <i>Teoretické</i> | <i>[ppm]</i> | <i>[mDa]</i> |
| Kyselina dokosahexaenová | 1.04 | 327.2368 | 327.2324 | -13.4 | -4.4 |
| 2-Furoylglycin | 13.35 | 168.0261 | 168.0296 | 20.8 | 3.5 |
| Galactitol / mannitol/* | 13.09 | 181.0703 | 181.0712 | 5 | 0.9 |
| | 12.86 | 181.0697 | 181.0712 | 8.3 | 1.5 |
| | 12.69 | 181.0689 | 181.0712 | 12.7 | 2.3 |
| | 12.47 | 181.0700 | 181.0712 | 6.6 | 1.2 |
| Manosa/fruktosa/myoinositol | 13.18 | 179.0538 | 179.0549 | 6.1 | 1.1 |