

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vývoj a validace UHPLC-MS/MS metody pro stanovení
močoviny v kondenzátu vydechovaného vzduchu a její
aplikace v klinickém výzkumu**

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

Konzultant: PharmDr. Kateřina Matoušová, Ph.D.

Hradec Králové, 2022

Bc. Lenka Vrbová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 11. 5. 2022

Bc. Lenka Vrbová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla z celého srdce poděkovat dvěma nejdůležitějším ženám, bez kterých by tato diplomová práce nevznikla. Doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. v první řadě děkuji za příležitost a možnost psát práci pod jejím vedením, dále děkuji za ochotu, trpělivost, cenné rady a čas, který mi při vypracovávání diplomové práce věnovala. PharmDr. Kateřině Matoušové, Ph.D. děkuji za vstřícnost, pomoc, přátelský přístup a za nespočet konzultací a rad při zpracování experimentální části. Velký dík patří také mojí milující rodině, která mi byla velkou oporou nejen během vypracování této práce, ale po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Lenka Vrbová

Školitel: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Kateřina Matoušová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace UHPLC-MS/MS metody pro stanovení močoviny v kondenzátu vydechovaného vzduchu a její aplikace v klinickém výzkumu

Klíčová slova: močovina, kondenzát vydechovaného vzduchu, UHPLC-MS/MS

Analýza kondenzátu vydechovaného vzduchu představuje jednoduchou a neinvazivní metodu měření biomarkerů nejen dýchacích cest. Protože jsou naměřené hladiny těchto mediátorů ovlivněny ředěním zkondenzovanou vodní párou, je pro správnou klinickou interpretaci naměřených dat nezbytné stanovit biomarker ředění. Močovina se zdá být vhodnou molekulou.

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit rychlou, jednoduchou a citlivou analytickou metodu pro stanovení koncentrace močoviny v kondenzátu vydechovaného vzduchu pro klinický výzkum a praxi.

Pro analýzu močoviny byla zvolena ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie v tandemovém uspořádání s hmotnostní spektrometrií. K separaci byla využita kolona Kinetex HILIC 100 A o rozměrech 100 × 2,10 mm (Phenomenex, USA) s povrchově porézními částicemi o velikosti 1,7 μm. Mobilní fázi tvořily acetonitril, methanol a voda v poměru 81 : 9 : 10, organická složka byla obohacena 0,1% kyselinou mravenčí. Jako vnitřní standard byla zvolena izotopově značená molekula močoviny (¹⁵N₂-močovina).

Po optimalizaci extrakčního procesu, separačních a detekčních podmínek byla nově vyvinutá metoda aplikována na vzorky kondenzátu vydechovaného vzduchu 54 pacientů. Koncentrace močoviny se pohybovaly v rozmezí 0,22 μmol/l–11,95 μmol/l.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Lenka Vrbová

Supervisor: assoc. prof. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Kateřina Matoušová, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of urea in exhaled breath condensate and its application in clinical research

Key words: urea, exhaled breath condensate, UHPLC-MS/MS

Exhaled breath condensate analysis is a simple non-invasive method of measuring biomarkers not only from the respiratory tract. For the proper clinical interpretation of the measured data it is necessary to find the dilution biomarker due to dilution of target analytes with condensed water vapour. Urea seems to be the molecule of choice.

The aim of this diploma thesis was to develop a fast, simple and sensitive analytical method for determining urea concentration levels in exhaled breath condensate for clinical research.

Ultra-high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection was chosen for urea analysis. Kinetex HILIC 100 A column, 1.7 μm particle size, 100 \times 2.10 mm (Phenomenex, USA) was used for the separation. The mobile phase was composed of acetonitrile, methanol and water in a ratio of 81 : 9 : 10, the organic part was enriched with 0.1% formic acid. An isotopically labeled urea molecule ($^{15}\text{N}_2$ -urea) was used as an internal standard.

After optimizing the extraction process, separation and detection conditions, the newly developed method was applied to exhaled breath condensate samples from 54 patients. Urea concentrations ranged from 0.22 $\mu\text{mol/l}$ –11.95 $\mu\text{mol/l}$.

OBSAH

1. Úvod.....	12
2. Cíl práce.....	13
3. Teoretická část.....	14
3.1 Kondenzát vydechaného vzduchu.....	14
3.1.1 Úvod.....	14
3.1.2 Původ a složení EBC.....	14
3.1.3 Odběr vzorků EBC.....	16
3.1.4 Přístrojové vybavení pro odběr EBC.....	17
3.1.5 Problematika odběru vzorků EBC.....	19
3.1.6 Biomarkery plicních onemocnění v EBC.....	22
3.1.7 Problematika ředění EBC.....	23
3.1.8 Močovina jako biomarker ředění EBC.....	24
3.1.9 Stanovení močoviny v EBC.....	25
3.2 Vývoj a validace bioanalytické metody.....	29
3.2.1 Referenční standardy a kontrolní vzorky.....	30
3.2.2 Vybrané validační parametry.....	30
4. Experimentální část.....	35
4.1 Použité přístrojové vybavení.....	35
4.1.1 Přístroje a pomůcky.....	35
4.1.2 Chromatografické kolony.....	36
4.2 Použité chemikálie.....	36
4.3 Příprava roztoků.....	36
4.3.1 Mobilní fáze.....	36
4.3.2 Zásobní roztok standardu močoviny.....	37

4.3.3	Zásobní roztok vnitřního standardu močoviny	37
4.3.4	Směs standardů	37
4.3.5	Rozpouštědlo vzorku	38
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1	Optimalizace chromatografické metody	39
5.1.1	Vnitřní standard	39
5.1.2	Detekční podmínky.....	40
5.1.3	Volba stacionární fáze a složení mobilní fáze	41
5.1.4	Složení rozpouštědla vzorku.....	47
5.1.5	Úprava biologického materiálu	48
5.1.6	Nastříkovaný objem	50
5.2	Souhrn vybraných podmínek.....	51
5.3	Validace metody	52
5.3.1	Zdánlivý počet teoretických pater.....	52
5.3.2	Faktor symetrie	52
5.3.3	Opakovatelnost	53
5.3.4	Přesnost a preciznost metody.....	54
5.3.5	Selektivita	55
5.3.6	Matricové efekty	55
5.3.7	Výtěžnost.....	55
5.3.8	Stabilita.....	55
5.3.9	Limit detekce	56
5.3.10	Limit kvantifikace	56
5.3.11	Linearita.....	56
5.4	Aplikace metody na reálné vzorky.....	58

6. Závěr.....	61
7. Seznam použité literatury.....	62

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
ALF	tekutina výstelky dýchacích cest (<i>Airway Lining Fluid</i>)
AMAC	octan amonný (<i>Ammonium Acetate</i>)
AMFO	mravenčan amonný (<i>Ammonium Formate</i>)
ARDS	syndrom akutní dechové tísně (<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>)
CE	kolizní energie (<i>Collision Energy</i>)
CF	cystická fibróza (<i>Cystic Fibrosis</i>)
DECCS	jednorázový systém pro odběr kondenzátu vydechaného vzduchu (<i>Disposable Exhaled Condensate Collection System</i>)
EBC	kondenzát vydechaného vzduchu (<i>Exhaled Breath Condensate</i>)
EIA	enzymová imunoanalýza (<i>Enzyme Immunoassay</i>)
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky (<i>European Medicines Agency</i>)
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>Electrospray Ionization</i>)
FA	kyselina mravenčí (<i>Formic Acid</i>)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>Food and Drug Administration</i>)
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GC-MS	spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GERD	gastroezofageální reflux (<i>Gastroesophageal Reflux Disease</i>)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>)
HME	filtr pro výměnu tepla a vlhkosti (<i>Heat and Moisture Exchange Filter</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPV	lidský papilomavirus (<i>Human Papillomavirus</i>)

CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IFN – γ	interferon gamma
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčivé přípravky (<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
IL	interleukin
IS	vnitřní standard (<i>Internal Standard</i>)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC	kapalinová chromatografie (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LLOQ	dolní mez stanovitelnosti (<i>Lower Limit of Quantitation</i>)
ME	matricové efekty (<i>Matrix Effect</i>)
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
miRNA	microRNA (<i>Micro Ribonucleic Acid</i>)
MRM	sken více iontových reakcí (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
PCR	polymerázová řetězcová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Q	kvadrupól (<i>Quadrupole</i>)
QC	kontrolní vzorek (<i>Quality Control</i>)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)

RIA	radioimunoanalýza (<i>Radioimmunoassay</i>)
RP	reverzní fáze (<i>Reversed Phase</i>)
RSD	relativní směrodatná odchylka (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SST	test způsobilosti systému (<i>System Suitability Test</i>)
TURBO	přenosná jednotka pro výzkum získaných biomarkerů (<i>Transportable Unit for Research of Biomarkers Obtained</i>)
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
ULOQ	horní mez stanovitelnosti (<i>Upper Limit of Quantification</i>)
UV	ultrafialová oblast (<i>Ultraviolet</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)

1. ÚVOD

Plíce existují v prostředí, v němž jsou neustále z jedné strany vystaveny krvi bohaté na škodlivé odpadní látky a z druhé strany přicházejí do kontaktu se vzduchem z vnějšího prostředí, který obsahuje široké spektrum infekčních i neinfekčních agens. Zřejmě proto patří onemocnění plic a dýchacích cest mezi nejčastější nemoci. I přes to je diagnostika v současné době založena převážně na nepřímých postupech, které nelze považovat za optimální. Přímé hodnocení lze totiž provádět pouze pomocí invazivních postupů, které slouží pro získání analytických vzorků, mezi něž se řadí bronchoalveolární laváž, bronchiální biopsie či odběr indukovaného sputa.

Proto probíhají četné studie, které usilují o identifikaci méně invazivních nebo zcela neinvazivních postupů získávání analytických vzorků, ve kterých budou koncentrace biochemických analytů primárně odrážet lokální patofyziologické procesy v plicích. Aktuálně se mezi slibné postupy řadí analýza vydechovaného vzduchu, konkrétně analýza zkondenzovaného vydechovaného vzduchu, protože obsahuje mediátory běžně stanovované ve vzorcích bronchoalveolární laváže či ve vzorcích indukovaného sputa. Hladiny těchto biomarkerů jsou ovlivněny zkondenzovanou vodní párou. Jakékoli zvýšení koncentrace může být způsobeno nejen zvýšením koncentrace daného biomarkeru v tekutině výstelky dýchacích cest, ale také zvýšením objemu či počtu aerosolových částic, či snížením množství zkondenzované vodní páry. Proto není možné činit jakékoli klinické závěry, pokud nejsou k dispozici informace týkající se ředění.

Možným biomarkerem ředění je, v klinických laboratořích běžně stanovovaná, molekula močoviny. V kondenzátu vydechovaného vzduchu je i močovina vysoce ředěna, proto nemohou být pro její stanovení použity běžné rutinně využívané metody jako je např. spektrofotometrie. Nově vyvíjené analytické postupy pro stanovení močoviny v kondenzátu vydechovaného vzduchu buď nedosahují požadované citlivosti, vyžadují velké objemy vzorku nebo je zpracování biologického materiálu pracné kvůli potřebným derivatizačním krokům.

2. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyvinout snadnou, rychlou a především citlivou analytickou metodu pro stanovení koncentrace močoviny v kondenzátu vydechovaného vzduchu s využitím ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie v tandemovém uspořádání s hmotnostním spektrometrem. Dílčím cílem práce byla minimální úprava biologického materiálu před analýzou a validace vyvinuté analytické metody, která bude sloužit pro potřeby II. Interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové pro přepočet ředění biomarkerů plicních onemocnění v kondenzátu vydechovaného vzduchu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kondenzát vydechovaného vzduchu

3.1.1 Úvod

Kondenzát vydechovaného vzduchu (EBC) je biologická tekutina, v jejímž složení dominuje voda, zároveň však obsahuje diagnosticky významné aerosolové částice tekutiny výstelky dýchacích cest (ALF) [1]. Analýza EBC je moderní neinvazivní metodou detekce biomarkerů pocházejících především z ALF dolních dýchacích cest pacientů s plicním onemocněním [2,3]. Jde o unikátní techniku řadící se mezi funkční vyšetření plic, odráží funkci epitelu dýchacích cest na molekulární úrovni. EBC se odebírá při klidovém dýchání pacienta jako produkt ochlazení a následné kondenzace vydechovaného aerosolu [2]. Na rozdíl od invazivních a technicky náročných metod, jako jsou bronchoalveolární laváž, indukované sputum či biopsie, je odběr EBC pro pacienta snadný, nenáročný, vyžaduje pouze klidové dýchání [4,5].

Až do nedávna byla bronchoalveolární laváž jediný způsob odběru vzorků ALF od pacientů, kteří neprodukují sputum. Přestože poskytuje důležité klinické informace, zahrnuje bronchoalveolární laváž i určitá rizika a nepohodlí, včetně zhoršené výměny dýchacích plynů, infekce či výskytu artefaktů spojených s instilací tekutiny do dýchacích cest. Zároveň se jedná o nákladnou metodu, kterou nelze opakovat v častých intervalech [3]. A jelikož většinu biochemických analytů detekovaných v EBC tvoří známé látky, které jsou běžně stanovovány ve vzorcích bronchoalveolární laváže či ve vzorcích indukovaného sputa, lze konstatovat, že analýza EBC je potenciálním kandidátem na novou neinvazivní metodu vhodnou pro longitudinální studie a pro všechny pacienty všech věkových skupin bez ohledu na závažnost jejich onemocnění, která by mohla nahradit doposud používané nepřímé či invazivní metody [5].

3.1.2 Původ a složení EBC

Vydechovaný vzduch představuje jeden z nejdostupnějších diagnostických vzorků. Uvolňuje se spontánně a ve velkém množství, čímž zabezpečuje neustálou výměnu kyslíku a oxidu uhličitého v plicích. Dýcháním se navíc denně ztrácí přibližně 350 ml vody, která se

uvolňuje jako pára z povrchu dýchacích cest. Úplné nasycení vydechovaného vzduchu vodní párou je zásadní, minimalizuje vysoušení dýchacích cest a lokální zvýšení koncentrací látek rozpuštěných v ALF, které by mohly poškodit plicní epitel a narušit tak výměnu plynů. Dále vydechovaný vzduch obsahuje stopové koncentrace stovky různých sloučenin exogenního i endogenního původu, které jsou v diagnostice využívány jako biomarkery onemocnění [6,7].

Zkondenzovaná vodní pára tvoří 99,9 % objemu vzorků EBC a zásadně v nich ovlivňuje ředění přítomných sloučenin. Protože vodní pára nemůže fungovat jako nosič pro elektrolyty a jiné netěkavé sloučeniny, obsahuje EBC kromě ve vodě rozpustných těkavých sloučenin také aerosolové částice z dolních cest dýchacích, které zachycují netěkavé sloučeniny ALF v extrémně nízkých koncentracích. Tyto aerosolové částice tvoří 0,1 % objemu EBC, tudíž každý 1 ml EBC obsahuje < 1 μ l aerosolových částic ALF. Objem i počet aerosolových částic může být zvýšen jejich zvýšenou sekrecí v dýchacích cestách, kašlem i dalšími, dosud nedefinovanými, procesy. Na rozdíl od vodní páry neplní žádnou jinou známou funkci než šíření infekcí, není tedy důvod se domnívat, že tvorba aerosolových částic je konstantně udržována nebo že je spojena s produkcí vodní páry [7].

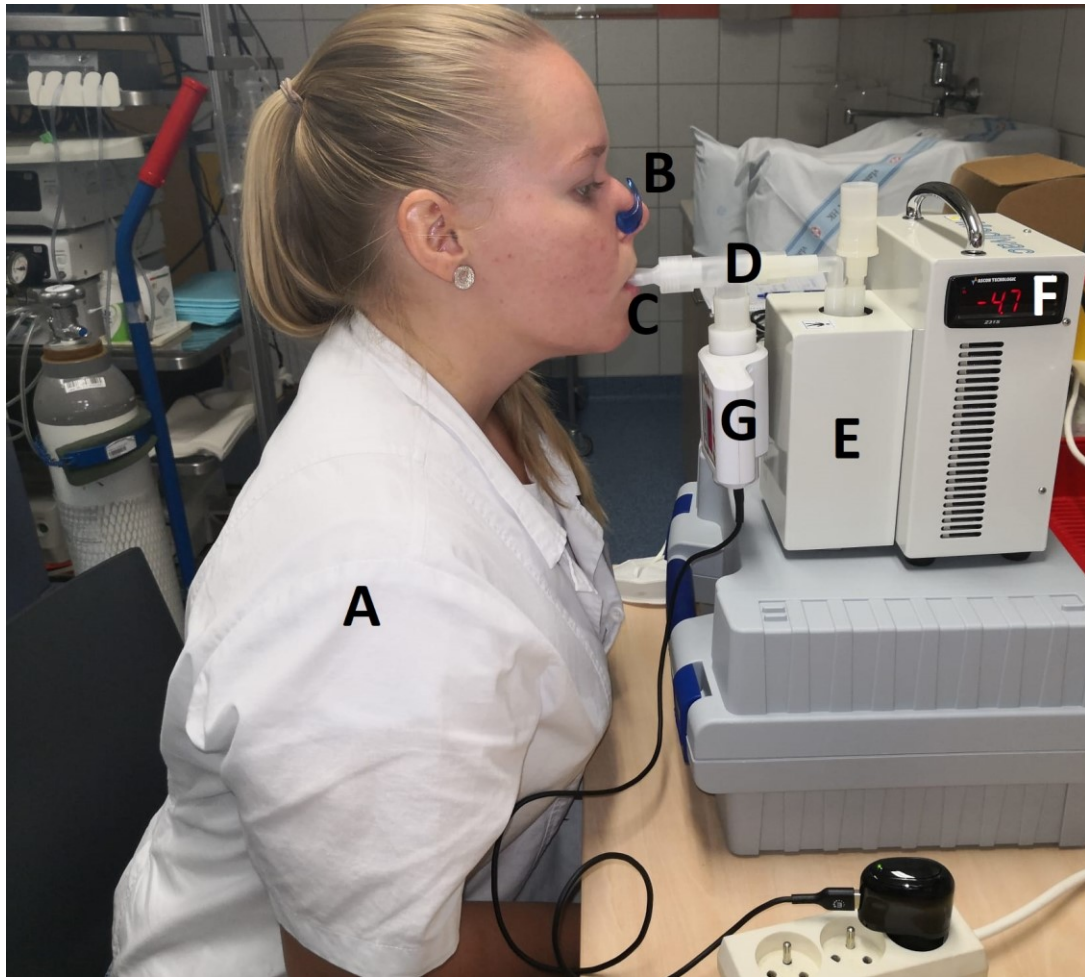
Za vstup těkavých a netěkavých sloučenin do EBC zodpovídají různé mechanismy. Zatímco těkavé sloučeniny jsou přítomny v EBC díky jejich rozdělení mezi plynnou a vodnou fází, přesný mechanismus toho, jak netěkavé látky vstupují do vydechovaného vzduchu, je předmětem vědecké diskuze [6].

Ačkoli počet a velikost aerosolových částic v EBC lze kvantifikovat, místa, odkud se respirační kapičky uvolňují, nejsou přesně známa. Při výdechu může docházet k odlučování částic aerosolu nejen z bronchiolů, bronchů či z trachey, ale také z hrtanu, hltanu, horní části trávicího traktu, z nosní a ústní dutiny [4,6]. Ve studii Bondesson et al. [8] bylo s využitím radioaktivního indikátoru prokázáno, že aerosolové částice vznikají především v centrálních dýchacích cestách. Bez ohledu na to, zda je znám původ aerosolových částic, jejich přesná kvantifikace se zdá být jedním z předpokladů pro standardizaci hodnocení netěkavých mediátorů v EBC, zejména při odhadu stupně ředění [6].

3.1.3 Odběr vzorků EBC

Odběr vzorků EBC (**Obrázek č. 1**) je jednoduchým neinvazivním postupem, který vyžaduje pouze klidové dýchání pacienta prostřednictvím odběrového systému, který je standardně vybaven náustkem, jednocestným ventilem a chlazenou kondenzační odběrovou nádobou na jejíž vnitřních stěnách se vydechovaná vodní pára, obsahující rozpuštěné sloučeniny, kondenzuje a definitivně se shromažďuje pro následnou analýzu. Jednocestný ventil odděluje vdechovaný a vydechovaný vzduch. Umožňuje tak pacientovi pohodlně a přirozeně dýchat skrze přístroj [2,9]. Na první pohled snadný proces odběru EBC vyžaduje standardizaci z hlediska účinnosti kondenzátoru, materiálu sběrné zkumavky, optimální teploty při odběru či potenciální kontaminace [6].

Pro odběr EBC existuje celá řada zařízení, která se výrazně liší nejen v ceně, ale také ve zmíněné účinnosti. Kritérií pro výběr konkrétního přístroje je hned několik. Skleněné laboratorní kondenzátory jsou levné, jsou chlazeny recirkulující ledovou vodou, ke zvýšení účinnosti sběru EBC zde mohou být jednoduše použity chladiva o nižší teplotě. Užitečný je i lapač slin mezi ústy a kondenzátorem, který rovněž snižuje riziko kontaminace [10]. Povrchy kondenzačních zařízení jsou nejčastěji skleněné, polystyrenové nebo polypropylenové a adhezivní vlastnosti těchto materiálů mohou modifikovat složení EBC [5]. Kondenzát lze do sběrné zkumavky sbírat samovolně, gravitací, nebo s využitím speciálního pístu, který zvyšuje účinnost tím, že zachytí maximální možné množství odebraného EBC [6]. Posledním, zde zmíněným, stěžejním faktorem je zvolená teplota kondenzátoru při odběru a to zejména kvůli nestabilitě některých složek v EBC, např. lipidových zánětlivých mediátorů [5].



Obrázek č. 1: Odběr vzorku EBC pomocí přístroje Turbo DECCS System

Pacient (A) se pohodlně posadí, nasadí si kolíček na nos (B) a začne klidně a přirozeně dýchat přes náustek (C) odběrového systému. Vydechovaný vzduch je veden jednorázovým polypropylenovým systémem (D) až do odběrové nádoby, která je uložena v kondenzátoru (E) ochlazující vydechovaný vzduch na teplotu $-4,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (F). V tuto chvíli dochází vlivem nízké teploty ke kondenzaci vydechovaného vzduchu a ke shromažďování vzorku EBC. Na tomto snímku je při odběru měřen také objem vydechovaného vzduchu (G).

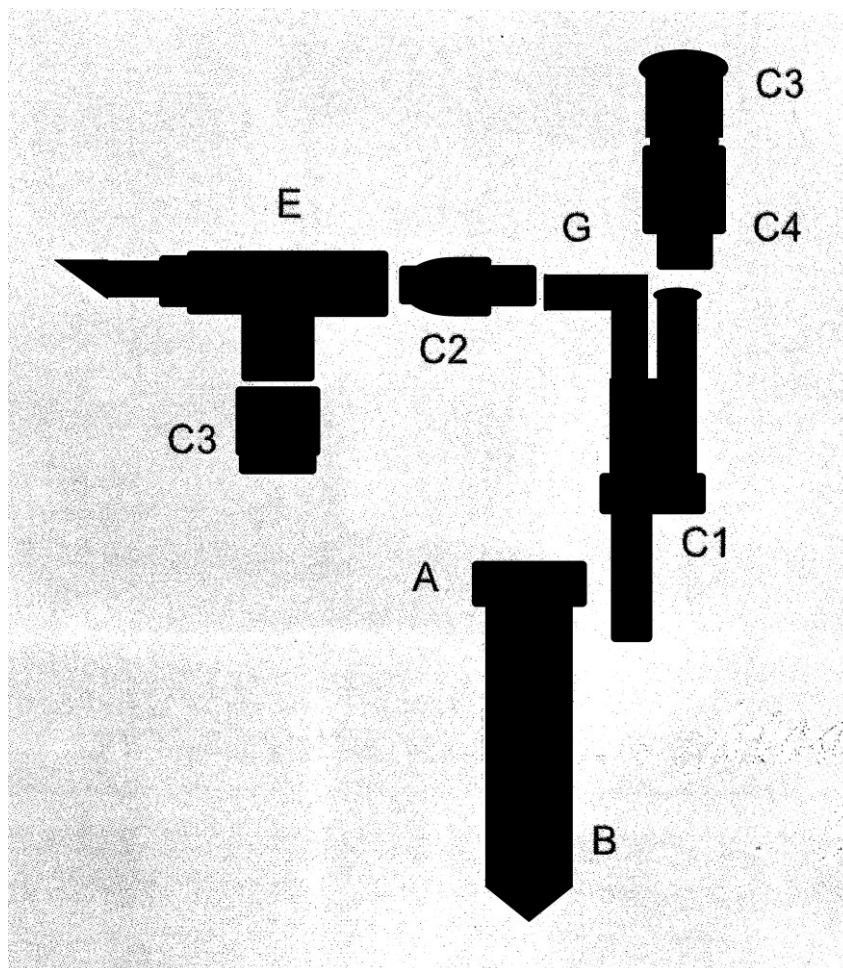
3.1.4 Přístrojové vybavení pro odběr EBC

Mezi komerčně dostupná zařízení pro odběr EBC patří EcoScreen 2, Turbo DECCS System a R-Tube. Systém Turbo DECCS italské firmy MEDIVAC byl použit pro odběr vzorků EBC pro tuto diplomovou práci. Jedná se o nejúplnější a nejuniverzálnější systém na trhu. Jádrem tohoto zařízení tvoří jednorázový sběrný okruh ve spojení s kondenzátorem [11].

Sběrné okruhy jsou vyrobeny z polypropylenu lékařské kvality. Skládají se z náustku, lapače slin, trubice, jednocestného ventilu a ze sběrné zkumavky (**Obrázek č. 2**), která se

vkládá do elektrického chladicího systému Peltierova typu. Veškeré sběrné okruhy jsou jednorázové, snižuje se tím riziko kontaminace monitorovaných pacientů i odebíraných vzorků [11].

Přístroj obsahuje samostatné termoelektrické chladicí zařízení, jehož funkcí v systému je chlazení sběrné zkumavky (**Obrázek č. 1**). K provozu nepotřebuje žádný externí zdroj chlazení, jako je např. chladnička, potřebuje pouze přístup k externímu napájecímu připojení. Teplota kondenzátoru při odběru vzorku se zobrazuje na displeji digitálního termostatu s výchozím nastavením na $-5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ [11].



Obrázek č. 2: Schéma pro sestavení jednorázového sběrného okruhu

Před zahájením odběru EBC je nutné si sestavit jednorázový sběrný okruh a to tak, že sejmeme víčko (A) ze sběrné zkumavky (B), následně zašroubujeme uzávěr (C1) na sběrnou zkumavku (B). Kloub (G) připevníme nejprve k uzávěru (C1) a poté k lapači slin (C2). Lapač slin (C2) a jednocestný ventil (C3) připevníme k náustku (E). Na závěr připevníme nástavec (C4) na speciální víčko (C1) a v okruhu již druhý, tzv. no-rebreathing, jednocestný ventil (C3) připevníme k nástavci (C4). Laskavě poskytnuto FNHK a upraveno.

Zařízení VOLMET slouží k měření objemu vydechaného vzduchu v průběhu odběru EBC. Umisťuje se na sběrný okruh (**Obrázek č. 3**). Displej umožňuje nastavit prahovou hodnotu objemu vydechnutého vzduchu, vyjádřenou v litrech, které má být v rámci jednoho odběru dosaženo. Tato hodnota je pak stejná pro všechny sledované pacienty, není závislá na době potřebné k jejímu dosažení. Tento přístup umožňuje standardizaci metodiky odběru vzorků EBC [11]. Praktické využití bude zmíněno níže.



Obrázek č. 3: VOLMET na jednorázovém sběrném okruhu

Převzato ze zdroje [11]

3.1.5 Problematika odběru vzorků EBC

Příprava pacienta před odběrem EBC

Fyzická námaha se doporučuje s odstupem 1 hodiny před odběrem vzorku, protože může být zodpovědná za změny koncentrací některých sloučenin v EBC [2]. Dále se pacientům doporučuje 3 hodiny před odběrem EBC nekouřit, protože kouření má okamžitý vliv na koncentraci H_2O_2 , 8-isoprostanu a metabolitů NO v EBC [12,13]. Při měření hladin adenosinu

v EBC je nutné se vyhnout nápojům s kofeinem [13]. Konzumace 1 l syceného nápoje před odběrem EBC způsobuje významné snížení pH vzorku [14]. Konečně nebylo prokázáno, že by konzumace potravy měla jakýkoli vliv na koncentraci biomarkerů v EBC [13].

Doba trvání odběru vzorku EBC

Důležitým kritériem pro volbu délky odběru vzorku je získání potřebného množství EBC pro následnou analýzu. Doba, po kterou musí pacient klidně dýchat, se v jednotlivých studiích liší. Uvádí se, že po 10 minutách klidového dýchání je možné od pacienta získat 1–3 ml EBC [2]. Délka odběru pro získání potřebného množství EBC se liší také s použitým typem odběrového systému [15].

U vzorků EBC, laskavě poskytnutých II. Interní gastroenterologickou klinikou Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FNHK pro tuto diplomovou práci, byl čas klidového dýchání pacienta nastaven na 10 minut. V současné době tato klinika aplikuje nové poznatky do klinické praxe, díky nimž dokáže individualizovat čas odběru pro každého pacienta. Časový úsek 10 minut byl pro některé, především nemocné nebo dětské pacienty, stále příliš dlouhý. Zároveň se s postupujícím časem odběru zhoršovala i kvalita získaného materiálu, pacienti více slinili nebo kašlali. Možným řešením, jak zmíněná úskalí minimalizovat či eliminovat, je použití výše zmíněného přístroje pro měření objemu vydechovaného vzduchu. Lékaři FNHK byla nastavena hodnota objemu vydechovaného vzduchu na 20 l dvakrát za sebou, v součtu tedy na 40 l pro jeden vzorek EBC. Ze zkušeností, 20 l vzduchu zvládne pacient vydechnout během cca 2 minut. Výhodou této metody je, kromě výše zmíněné standardizace, zkrácení a individualizace doby odběru podle dechových možností pacienta a zároveň možnost odpočinout si mezi odběry. Množství odebraného vzorku EBC s využitím přístroje pro měření objemu vydechovaného vzduchu je srovnatelné s množstvím vzorku, který byl odebírán 10 minut.

Podmínky při odběru vzorku EBC

Množství a složení odebraného EBC je silně ovlivňováno podmínkami okolního prostředí a rozdílnými vzorci dýchání pacientů. McCafferty et al. [16] prokázali, že zvýšená minutová ventilace plic má za následek zvýšený objem získaného EBC, snížená minutová ventilace způsobuje opak. Zastoupení proteinů, dusitanů a hodnota pH se však při odlišných způsobech dýchání nemění. Ve stejné studii byl objem odebraného EBC snížen také v případech, kdy

pacienti dýchali v prostředí studeného a suchého vzduchu. Ve studii Kullmann et al. [17] bylo zjištěno, že teplota a vlhkost prostředí přispívají k variabilitě pH EBC. Z těchto důvodů by zmíněné faktory měly být v rámci standardizace odběru EBC kontrolovány.

Kontaminace vzorku EBC

Protože hlavním cílem analýzy EBC je detekovat sloučeniny pocházející z dolních cest dýchacích, je nutné vyloučit kontaminaci vzorku mediátory a proteiny slin, dutiny ústní a horních cest dýchacích [18]. Kontaminaci EBC lze předcházet použitím lapače slin, vypláchnutím ústní dutiny před odběrem 4,5% hydrogenuhličitanem sodným a pravidelným polykáním během odběru EBC [2,7]. K vyloučení kontaminace EBC slinami bylo navrženo změřit slinnou amylázu v odebraných vzorcích. Pokud jsou však dodržována uvedená preventivní opatření, je amyláza v EBC sotva detekovatelná [19,20].

Přetrvává určitá nejistota ohledně nosní kontaminace vzorků EBC, protože nosní sekrety často obsahují zánětlivé mediátory. Použití kolíčků na nos prokazatelně snižuje kontaminaci EBC nosními sekrety, pro řadu pacientů je však jejich používání krajně nepříjemné. Navíc spojení mezi nosem a ústy může představovat další cestu, kterou se kontaminanty dostávají do vydechaného vzduchu. Dále jsou pacienti instruováni, aby požádali o nový odběr, pokud si v průběhu odběru říhnou [10].

Skladování vzorku EBC

Odebraný vzorek EBC musí být buď ihned analyzován, nebo je nutné ho skladovat v předem odměřených alikvotech v mrazicím boxu při doporučené teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, která zaručuje stabilitu mnoha obsažených analytů [11]. Dobu skladování vzorku určuje stabilita příslušných stanovovaných biomarkerů. Dále je potřeba se vyhnout opakovaným cyklům zmrazování a rozmrazování, což vede ke ztrátě nestabilních chemických sloučenin [21].

Zpracování a analýza vzorku EBC

Jakým způsobem je vzorek EBC zpracován závisí na tom, jaké konkrétní analyty budou stanovovány a jaké pro to budou zvoleny postupy. EBC se každopádně osvědčil jako vhodná matrice pro aplikaci technologicky vyspělých metod současného biomedicínského výzkumu. V případě analýzy vzorku EBC chromatografickými metodami se nejčastěji provádí nejprve extrakce a zakoncentrování stanovovaných analytů. Po úpravě vzorku následuje samotná analýza příslušně zvolenou analytickou metodou [14].

3.1.6 Biomarkery plicních onemocnění v EBC

EBC je zdrojem velkého množství organických a anorganických sloučenin včetně malých lipidových mediátorů, malých proteinů či nukleových kyselin (**Tabulka č. 1**). Tyto biomarkery odrážejí stav plicní tkáně. Ke změnám v jejich koncentraci může docházet u plicních onemocnění, jako jsou např. astma, chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), bronchoektázie či rakovina [22].

Tabulka č. 1: Přehled vybraných biomarkerů plicních onemocnění v EBC

	Biomarker	Metoda stanovení	Onemocnění
	pH	pH metr	Astma, CHOPN, kašel související s GERD, akutní poranění plic, ARDS
Malé anorganické molekuly	H ₂ O ₂	Spektrofotometrie, fluorimetrie, chemiluminiscence	Astma, CHOPN, kuřáci, bronchiektázie, ARDS
Biomarkery odvozené od oxidu dusnatého	Dusičnany	Fluorimetrie	Zvýšený u kuřáků s CHOPN
	S-Nitrosothioly	Spektrofotometrie	Astma, CF, CHOPN
	3-nitrotyrosin	LC-MS, EIA	Astma, CF
Lipidové mediátory	8-isoprostan	EIA, GC-MS	Astma, kouření, CHOPN, akutní poranění plic, ARDS, CF, cvičením vyvolaný bronchospasmus
	Leukotrien B4	EIA	CHOPN, CF, astma, NSCLC
	Cysteinové leukotrieny	EIA	Alergické astma, cvičením vyvolaný bronchospasmus
	Prostaglandin D2	EIA	Alergické astma
	Prostaglandin E2	EIA	CHOPN, CF
	Tromboxan A2	RIA	Astma
Cytokiny a chemokiny	IL -2	Multiplexová imunoanalýza	Astma
	IL -4	Multiplexová imunoanalýza	Astma
	IL-5	Multiplexová imunoanalýza	Astma

CHOPN - chronická obstrukční plicní nemoc; GERD - gastroezofageální reflux; ARDS - syndrom akutní dechové tísně; CF - cystická fibróza; LC-MS - spojení kapalínové chromatografie s hmotnostním spektrometrem; EIA - enzymová imunoanalýza; GC-MS - spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem; NSCLC - nemalobuněčný karcinom plic; RIA – radioimunoanalýza; PCR – polymerázová řetězová reakce; HPV - lidský papilomavirus; qPCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce; miRNA – microRNA.

Tabulka č. 1: Přehled vybraných biomarkerů plicních onemocnění v EBC - pokračování

	Biomarker	Metoda stanovení	Onemocnění
Cytokiny a chemokiny	IL-6	Multiplexová imunoanalýza	Astma, exacerbace CHOPN
	IFN- γ	Multiplexová imunoanalýza	Astma
	IL-18	Multiplexová imunoanalýza	Astma
	IL-1 β	Multiplexová imunoanalýza	Exacerbace CHOPN
	IL-8	Multiplexová imunoanalýza	Astma, exacerbace CHOPN
	IL-10	Multiplexová imunoanalýza	Astma, exacerbace CHOPN
	IL-12	Multiplexová imunoanalýza	Exacerbace CHOPN
Nukleové kyseliny	DNA	PCR	Exacerbace CHOPN, detekce HPV v plicích, rakovina
	miRNA	qPCR	Astma a CHOPN

CHOPN - chronická obstrukční plicní nemoc; GERD - gastroezofageální reflux; ARDS - syndrom akutní dechové tísně; CF - cystická fibróza; LC-MS - spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem; EIA - enzymová imunoanalýza; GC-MS - spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem; NSCLC - nemalobuněčný karcinom plic; RIA – radioimunoanalýza; PCR – polymerázová řetězová reakce; HPV - lidský papilomavirus; qPCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce; miRNA – microRNA.

3.1.7 Problematika ředění EBC

Jelikož jsou těkavé organické látky, běžně přítomné v plynné fázi vydechaného vzduchu, rozpuštěny v EBC ve zkondenzované vodní páře, jejich výslednou koncentraci ovlivňuje především rozdělovací koeficient plyn/kapalina, teplota kondenzátoru či jejich rozpustnost ve vodě, nikoli však ředění. Naopak u aerosolových částic, které obsahují diagnosticky významné netěkavé sloučeniny, je problematika ředění stěžejní [22]. V několika studiích, i přes využití vysoce citlivých analytických metod, byly koncentrace těchto látek značně proměnlivé [10].

Velká část této variability je pravděpodobně způsobena rozdíly v ředění aerosolových částic ALF zkondenzovanou vodní párou. Jakékoli pozorované zvýšení koncentrace mediátoru by mohlo být teoreticky způsobeno zvýšením jeho koncentrace v ALF. Existuje ale také možnost, že došlo ke zvýšení objemu nebo počtu aerosolových částic ALF či ke snížení množství zkondenzované vodní páry. Proto není možné činit jakékoli závěry, týkající se změn koncentrací v ALF ze změn koncentrací v EBC, pokud nejsou k dispozici informace, týkající se

ředění aerosolových částic vodní párou. Vzhledem k tomu, že ředění netěkavých sloučenin je v EBC vyšší, než ředění v ALF, je nutné stanovit indikátor ředění EBC schopný odrážet skutečné hladiny každého jednoho biomarkeru v dýchacích cestách. Ředění částic aerosolu je hlavním problémem pro správnou klinickou interpretaci naměřených dat [5].

Effros et al. [10] ve své studii popsali atributy ideálního biomarkeru ředění EBC. Měl by mít známou a stabilní plazmatickou koncentraci a vysokou difúzní kapacitu přes buněčnou membránu, zároveň by neměl být produktem dýchacího traktu. Přestože doposud nebyl žádnou studií definován zlatý standard ředění EBC, bylo mnoho indikátorů ředění navrhováno a testováno, např. močovina, celková koncentrace bílkovin, celková koncentrace kationtů (Na^+ , K^+ , Ca^+ , Mg^{2+}) či vodivost lyofilizovaných a vakuově odpařených vzorků EBC [19,23].

Protože ředění všech netěkavých rozpuštěných látek ALF zkondenzovanou vodní párou by mělo být stejné, je pravděpodobné, že k výpočtu ředění by bylo možné použít látky přítomné v EBC. V ideálním případě by se koncentrace biomarkeru ředění měla rovnat jeho koncentraci v plazmě [5].

3.1.8 Močovina jako biomarker ředění EBC

Močovina byla využita jako slibný biomarker ředění již několikrát. Odůvodnění pro její použití je založeno na fyziologických vlastnostech této molekuly. Jedná se o molekulu bez náboje, s molekulovou hmotností 60,06 g/mol, která je rovnoměrně distribuována po celém těle, tudíž se koncentrace v tkáňových tekutinách a v krvi rovnají [5,24]. Je tedy pravděpodobné, že koncentrace močoviny v plazmě a v ALF jsou velmi podobné. Dále močovina není produkována, ani ve významných množstvích degradována, plicní tkáně a rychle se vyrovnává přes bariéry oddělující krev a vzdušné prostory. I když ji mohou produkovat některé mikroorganismy v dýchacích cestách, výrazná difuzibilita této molekuly by tyto mikrobiální vstupy měla kompenzovat. Zároveň má močovina relativně pomalý obrat v lidském organismu a nízké kolísání v průběhu 24 hodin. Další důležitou vlastností, kterou disponuje molekula močoviny, je relativní netěkavost, proto močovina v EBC s největší pravděpodobností pochází spíše z ALF než z vydechaného plynu [25].

Folesani et al. [26] svou studií potvrdili, že močovina je difuzibilní sloučenina s velmi omezenou těkavostí. Hodnocení vlivu kondenzační teploty na koncentraci močoviny v EBC

vedlo k charakterizaci těkavých vlastností molekuly močoviny *ex vivo*. Zdánlivý pokles koncentrace močoviny s klesající teplotou kondenzátoru byl totiž způsoben zvyšujícím se počtem molekul zkondenzované vody, čímž docházelo k většímu ředění netěkavých molekul. Močovinu *ex vivo* lze tedy považovat za převážně netěkavou sloučeninu. Druhou stěžejní vlastnost močoviny, difuzibilitu, potvrdila studie Folesani et al. [26] ve spolupráci s dialyzovanými pacienty. Výsledek této studie potvrzuje, že fenomén volné difúze má tendenci normalizovat hladiny močoviny v krvi a v dýchacích cestách a že koncentrace močoviny v EBC odráží trend močoviny v ALF.

3.1.9 Stanovení močoviny v EBC

V důsledku ředění vodní párou jsou koncentrace močoviny v EBC mnohem nižší, než např. v moči nebo v krvi. Proto nemohou být pro stanovení močoviny v EBC použity komerčně dostupné chemické a kolorimetrické testovací soupravy, jednoduše nejsou dostatečně citlivé k detekci nízkých hladin močoviny. Úspěšnější mohou být pouze ve chvíli, kdy se použijí ve spojení s různými formami úpravy a zakoncentrování vzorku [25].

Effros et al. [3] měřili koncentraci močoviny, resp. koncentraci amonných kationtů, po ošetření močoviny ureázou. Nejprve musely být vzorky lyofilizovány, pro odstranění již přítomných kationtů ve vzorku, po následném ošetření ureázou byla koncentrace amonných kationtů měřena pomocí iontové chromatografie.

V sedmdesátých, osmdesátých a devadesátých letech minulého století byly vyvíjeny první chromatografické metody pro stanovení močoviny v EBC. Většina z nich využívala plynovou chromatografii ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Zásadním problémem těchto metod byla potřeba komplikovaných postupů přípravy a derivatizace vzorků EBC [27-29]. Další vývoj byl proto směřován k přímému stanovení močoviny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v tandemu s hmotnostním spektrometrem bez složité úpravy a derivatizace vzorků [24]. Metody studií, které se snažily vynechat krok derivatizace, vyžadovaly ke stanovení močoviny velké objemy vzorků EBC, které je obtížné získat. Dalším krokem při vývoji nové bioanalytické metody pro stanovení močoviny v EBC je tedy zvýšení citlivosti analýzy, aby bylo možné použít malé množství EBC bez nutnosti derivatizace [25].

Hmotnostní spektrometrie je klíčovým nástrojem pro selektivní a citlivou detekci stopových hladin metabolitů v biologických tekutinách [30]. Hmotnostní spektrometrie nabízí ideální metodu pro analýzu EBC, protože schopnost současně a citlivě detekovat více iontů nabízí potenciál měřit jak biomarker onemocnění, tak i biomarker ředění, to vše při nízkých koncentracích sloučenin v EBC [31]. Následující **Tabulka č. 2** obsahuje přehled metod, využívající kapalinovou chromatografii (LC), pro stanovení močoviny v EBC publikovaných v letech 2008–2020.

Tabulka č. 2: Přehled publikovaných LC metod pro stanovení močoviny v EBC

Odběr EBC	Úprava vzorku	Analytický systém	Mobilní fáze	Kolona	IS	Průtok	Detekce	Retenční čas	Citlivost	Ref. Rok
Ventilátor- inline HME Expirační větev ventilátoru	Derivatizace močovina → 2-hydroxypyrimidin	HPLC-MS/MS	A: MeOH + H ₂ O (10:90) + 0,2% CH ₃ COOH B: MeOH + H ₂ O (90:10) + 0,2% CH ₃ COOH Gradient 100 % A → 40 % A	Phenomenex Synergi Polar-RP 150 × 2,0 mm, 4 μm	¹⁵ N ₂ -močovina	180 μl/min	ESI-MS/MS	< 4 min	LOD 0,41 μmol/l	[24] 2010
Turbo DECCS	NE	HPLC -UV	20mM kyselina methansulfonová Izokratická eluce	Dionex CS11 250 × 4,0 mm, 4 μm	NS	0,5 ml/min	190 nm	NS	LOD 200 000 μmol/l	[26] 2008
R-Tube	EBC + roztok IS → odpařit 7h; 30 ± 5 °C → digestoř → rozpusťit v ACN → zakoncentrování	HPLC-MS	A: 100% ACN B: 10mM AMAC + 0,025% CH ₃ COOH Izokratická eluce 95 % A a 5 % B	Dionex Acclaim Mixed- Mode HILIC-1 150 × 4,6 mm, 5 μm	¹⁵ N ₂ -močovina	1 ml/min	ESI-MS/MS	4 min	LOD 60 μmol/l	[25] 2014
R-Tube	Lyofilizace EBC a resuspendace v HPLC H ₂ O	UHPLC-MS/MS	Gradient 5% MeOH + 0,1% FA → 80% MeOH + 0,1% FA	Atlantis T3 C18 150 × 2,0 mm, 1,8 μm	¹³ C-močovina	250 μl/min	ESI-MS/MS	1,8 min	NS	[31] 2008

HME - filtr pro výměnu tepla a vlhkost; ACN – acetonitril; MeOH – methanol; FA – kyselina mravenčí; AMAC – octan amonný; NS - nespecifikováno; UHPLC – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie; UV – ultrafialová oblast; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; ESI - ionizace elektrosprejem.

Tabulka č. 2: Přehled publikovaných LC metod pro stanovení močoviny v EBC – pokračování

Odběr EBC	Úprava vzorku	Analytický systém	Mobilní fáze	Kolona	IS	Průtok	Detekce	Retenční čas	Citlivost	Ref. Rok
R-Tube	Lyofilizace EBC 24h; -60 °C; 25 mTorr Rekonstituce v ACN/H ₂ O (80:20)	UHPLC-MS/MS	ACN/H ₂ O 90:10 + 5mM AmAc Isokratická eluce	HILIC CQUITY UHPLC BEH Amide 100 × 1,0 mm, 1,7 μm	¹³ C-močovina	0,3 ml/min	ESI-MS/MS	NS	LOD 0,03 μmol/l	[30] 2013
EcoScreen	Ne Pouze přidání IS	HPLC-MS/MS	157,5 mg AMAC v 1 l H ₂ O/ACN (5:95) Isokratická eluce	BEH amide HPLC 100 × 3,0 mm, 2,5 μm	¹⁵ N ₂ -močovina	0,5 ml/min	ESI-MS/MS	NS	NS	[32] 2020

HME - filtr pro výměnu tepla a vlhkost; ACN – acetonitril; MeOH – methanol; FA – kyselina mravenčí; AMAC – octan amonný; NS - nespecifikováno; UHPLC – ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie; UV – ultrafialová oblast; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie; ESI - ionizace elektrosprejem.

3.2 Vývoj a validace bioanalytické metody

Na začátku celého procesu vývoje bioanalytické metody musí být nejprve plně porozuměno stanovovanému analytu, konkrétně jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem, metabolismu *in vitro* i *in vivo*, jeho vazbě na proteiny apod. V dalším kroku by měly být zváženy aspekty analytických metod, které byly pro analýzu daného analytu již v minulosti použity. Při samotném vývoji bioanalytické metody je hlavním cílem definovat záměr, provozní podmínky, omezení a vhodnost této metody pro zamýšlený účel a zajistit, aby byla daná metoda optimalizována pro následující validaci. Validace je další nezbytnou součástí vývoje bioanalytické metody. Proces validace bioanalytické metody má za cíl posoudit, současně také zdokumentovat a konečně potvrdit, že je takto optimalizovaná metoda vhodná pro zamýšlené použití a k získávání relevantních dat o analyzovaných vzorcích. Výstupem celé validace je validační protokol [33,34].

Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (ICH) uvádí podmínku, že u každé nově vyvinuté bioanalytické metody pro kvantifikaci analytů musí být provedena úplná validace. Mezi parametry úplné validace patří ověření selektivity, specifity, matricových efektů či přenosu analytu, ale také určení kalibračního rozmezí, přesnosti, preciznosti, meze stanovitelnosti a detekce, stability a robustnosti. Součástí každé validované metody by měl být také test způsobilosti systému. Vybrané validační parametry budou vysvětleny níže. Pokud je metoda vyvíjena pro stanovení více analytů nebo je určena pro stanovení analytu v různých biologických matricích, měla by být validace provedena pro všechny analyty i matrice odděleně. Jak při vývoji metody, tak i při její validaci je velice důležité zachovat pokud možno co nejvíce identické podmínky, při nichž bude probíhat rutinní analýza studovaných vzorků, např. odběrový materiál, antikoagulační činidla apod. Častým problémem při vývoji bioanalytické metody je získání blankové matrice, tedy matrice bez cílového analytu. Řešením může být použití uměle připravené blankové matrice [34,35].

Existuje také možnost provést pouze částečnou validaci a to buď v případě malých změn v již plně validované metodě, nebo pokud dojde k určitým změnám v analytickém systému. Podmínkou částečné validace je splnění kritérií testovaných parametrů jako při úplné validaci. Třetí možností je křížová validace, při níž jsou výsledky analýzy porovnávány s výsledky, které

byly získány buď jinou metodou ve stejné laboratoři, nebo stejnou metodou v jiné laboratoři [34].

Jak bylo zmíněno výše, v současné době je nezbytné, aby byly veškeré bioanalytické metody v rámci kontroly kvality validovány. Jelikož požadavky na validaci vychází z požadavků různých autorit, jako je např. americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA), Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) a mnoho dalších, existuje celá řada více či méně podobných směrnic a doporučení pro validaci bioanalytické metody, jejichž harmonizace je pro lepší přehled nezbytná [33,34].

3.2.1 Referenční standardy a kontrolní vzorky

Jak v průběhu validace metody, tak i při analýze studovaných vzorků se využívá kontrolních vzorků, které mohou být připraveny v laboratoři obohacením blankové matrice určitým množstvím cílového analytu ve formě roztoku referenčního standardu k dosažení požadované koncentrace. Je podstatné, aby byl referenční standard identický se stanovovaným analytem, měl vysokou čistotu a byl získán od věrohodného a dohledatelného zdroje. Je možné využít i komerčně dostupný certifikovaný kontrolní materiál, obsahující daný analyt v příslušné matrici [34].

Je-li v bioanalytické metodě využíván k detekci hmotnostní spektrometr (MS), doporučuje se jako vnitřní standard (IS) použít izotopově značený analyt. Je však nezbytné, aby měl standard vysokou izotopovou čistotu, aby nedocházelo k izotopové výměnné reakci [34].

3.2.2 Vybrané validační parametry

3.2.2.1 Selektivita (*Selectivity*)

Selektivita značí schopnost bioanalytické metody rozlišit a změřit, čili kvalitativně i kvantitativně stanovit cílový analyt ve studovaném vzorku a to i v přítomnosti potenciálně interferujících látek v matrici tohoto vzorku. Označení metody za selektivní tedy znamená, že za konkrétních podmínek umožňuje tato metoda stanovení obsahu analytu i v přítomnosti jiných látek [33].

Při chromatografickém hodnocení selektivity pomocí blankových vzorků, vzorků matrice bez cílového analytu nebo vnitřního standardu, musí být prokázáno, že v retenčním čase cílového analytu nebo IS není pozorována žádná významná odezva zapříčiněná potenciálně interferujícími látkami matrice vzorku, přesněji odezva by neměla být vyšší než 20 % dolního kvantifikačního limitu (LLOQ) cílového analytu a 5 % IS. Hodnocení by mělo probíhat na šesti individuálních zdrojích příslušné matrice bez cílového analytu, nejlépe od mužů i žen, zdravých i nemocných. Výjimku tvoří vzácné matrice, u nichž je povolen menší počet zdrojů [34].

3.2.2.2 Specifita (*Specificity*)

Pokud je ve studovaném vzorku biologické matrice očekávána přítomnost látek podobných cílovému analytu, měl by být dopad těchto látek vyhodnocen během validace metody. Specifita je schopnost bioanalytické metody detekovat a odlišit analyt od všech ostatních látek, včetně látek jemu příbuzných jako jsou např. strukturně podobné látky, metabolity či izomery cílového analytu, nečistoty nebo produkty rozkladu vznikající při úpravě vzorku [34].

3.2.2.3 Matricové efekty (*Matrix Effect*)

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie poskytlo mnoho výhod, např. vyšší citlivost či selektivitu. Ruku v ruce s výhodami přináší toto spojení také nevýhody, mezi něž se řadí i matricové efekty. Matricové efekty jsou definovány jako změna odezvy cílového analytu v důsledku rušivé a často neidentifikovatelné složky v matrici vzorku [34,36].

Stanovení matricových efektů by mělo být provedeno pomocí minimálně šesti blankových vzorků dané matrice získaných od individuálních dárců a to na dvou koncentračních hladinách. Matrice využitá pro stanovení matricových efektů by se měla co nejvíce podobat matrici studovaných vzorků a to včetně např. antikoagulačních přísad. Zároveň, pokud je zamýšleným využitím dané metody např. analýza vzorků pacientů s plicním onemocněním, měly by být matricové efekty stanovovány v právě takovýchto vzorcích. V případě vzácných matric, jako je např. mozkomíšní mok, lze pro stanovení matricových efektů zvolit náhradní matrici, její výběr a použití musí být zdůvodněny. Matricové efekty by měly být stanoveny také pro vnitřní standard [34,36].

Matricové efekty (ME) lze vypočítat pomocí následující rovnice, která využívá poměr plochy píku cílového analytu, který byl do blankové matrice přidán až po úpravě vzorku (B) k ploše píku analytu bez matrice (A), čili k ploše píku čistého roztoku analytu [33].

$$ME(\%) = \frac{B}{A} \cdot 100$$

Matricové efekty jsou vypočteny pro každou ze šesti matric samostatně a musí splňovat kritérium pro preciznost $RSD \leq 15\%$ [36].

3.2.2.4 Kalibrační křivka a kalibrační rozmezí (*Calibration Curve and Range*)

Kalibrační křivka vizualizuje lineární závislost odezvy analytického systému na nominální koncentraci analytu. Kalibrační standardy pro sestavení kalibrační křivky jsou připravovány obohacováním matrice známým množstvím referenčního standardu cílového analytu [34].

Kalibrační rozmezí je voleno tak, aby pokrývalo předpokládané koncentrační hladiny analytu ve studovaných vzorcích, vždy musí být ohraničeno nejnižším bodem kalibrace, dolní mezí stanovitelnosti LLOQ a nejvyšším bodem kalibrace, horní mezí stanovitelnosti ULOQ. Dále by v rámci sestavování kalibrační křivky měly být změřeny také blankový vzorek, nulový vzorek (blankový vzorek s přídavkem IS) a minimálně šest koncentrací kalibračních standardů. Po sestavení kalibrační křivky je zapotřebí zpětně vypočítat koncentraci kalibračních standardů. Přesnost zpětně vypočítaných koncentrací každého kalibračního standardu by měla být v rozmezí $\pm 15\%$, u LLOQ $\pm 20\%$. Výše uvedená kritéria by měla splňovat alespoň 75 % všech kalibračních standardů s minimem šesti koncentračních hladin [34].

3.2.2.5 Přesnost a preciznost (*Accuracy and Precision*)

Příprava vzorků pro stanovení přesnosti a preciznosti

Stanovení přesnosti a preciznosti se provádí pomocí kontrolních materiálů. Vzorky pro kontrolu kvality jsou určeny k tomu, aby napodobily studované vzorky. Jak bylo několikrát řečeno, měly by být připraveny obohacováním blankové matrice známým množstvím referenčního standardu analytu, následně zpracovány za podmínek předpokládaných pro studované vzorky a konečně analyzovány za účelem posouzení validity dané bioanalytické metody [34].

ICH uvádí, že k validaci metody by měly být připraveny minimálně 4 úrovně koncentrace kontrolních vzorků a to v celém rozsahu kalibrační křivky. Tyto 4 úrovně by měly ideálně zahrnovat LLOQ, trojnásobek LOQ (nízká hladina koncentrace kontrolního vzorku), 30-50 % rozsahu kalibrační křivky (střední hladina koncentrace kontrolního vzorku) a minimálně 75 % ULOQ (vysoká hladina koncentrace kontrolního vzorku) [34].

Hodnocení přesnosti a preciznosti

Přesnost a preciznost by měla být stanovena analýzou kontrolních vzorků v rámci jedné série měření (within-run) a také mezi měřeními (between-run). Přesnost a preciznost v rámci jedné série by měla být vyhodnocena analýzou alespoň 5 vzorků pro každou úroveň koncentrace kontrolního vzorku. Přesnost a preciznost mezi sériemi by měla být vyhodnocena analýzou každé koncentrační úrovně kontrolního vzorku alespoň 3 vzorků v nejméně 2 odlišných dnech [34].

Přesnost

Přesnost je validačním parametrem, který udává míru těsnosti shody mezi naměřeným výsledkem a nominální referenční hodnotou. Celková přesnost každé úrovně koncentrace by se měla pohybovat v rozmezí $\pm 15\%$ od nominální hodnoty koncentrace. Výjimku tvoří LLOQ, kde by odchylka neměla překročit $\pm 20\%$ [34].

Preciznost

Parametr preciznosti vyjadřuje míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky měření, která se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Naměřené hodnoty preciznosti by se měly pohybovat v rozmezí $RSD \pm 15\%$. Výjimku opět tvoří LLOQ, kde je povolená $RSD \pm 20\%$ [34].

3.2.2.6 Přenos analytu (*Carry-over*)

Přenos analytu se projevuje jako změna naměřené koncentrace a to v důsledku zbytkového analytu z předchozího vzorku, který zůstává v analytickém přístroji. Přenos analytu by měl být posuzován a minimalizován v průběhu vývoje metody. Během validace by měl být přenos analytu posouzen analýzou slepých vzorků ihned po analýze kalibračního standardu odpovídající ULOQ. ICH definuje, že k přenosu analytu nedochází, pokud je odezva v blankové matici v odpovídajícím retenčním čase nižší než 20% LLOQ cílového analytu a 5% IS [34].

3.2.2.7 Stabilita (*Stability*)

Aby bylo zajištěno, že každý krok provedený během přípravy, zpracování a analýzy vzorku či zvolené podmínky při skladování neovlivní koncentraci cílového analytu či IS, mělo by být v rámci validace provedeno hodnocení jejich stability. Jak podmínky skladování, tak i podmínky analýzy jako jsou např. doba a teplota uchování vzorků, matrice vzorku, antikoagulant či materiál odběrové nádoby aplikované na vzorky pro testování stability by měly identicky kopírovat podmínky používané pro studované vzorky. Stabilita je hodnocena pomocí kontrolních vzorků na dvou koncentračních hladinách [34].

V rámci validace by měla být prověřena stabilita zásobních a pracovních roztoků analytu a IS, stabilita matrice po opakovaném zmrazování a rozmrazování, krátkodobá stabilita matrice při práci na pracovním stole, stabilita již zpracovaného vzorku např. v autosampleru a dlouhodobá stabilita analytu v matrici skladované v mrazáku [34].

3.2.2.8 Test způsobilosti systému (*System Suitability Test*)

Test způsobilosti systému (SST) by měl být součástí každé bioanalytické metody, protože zaručuje adekvátní účinnost chromatografického systému před jeho použitím. SST je pak prováděn vždy na počátku každého měření, při určitých změnách v systému nebo při podezření na chybu v systému s využitím kontrolních vzorků nebo referenčních vzorků. Zvolené parametry SST by měly ideálně zahrnovat parametry pro dávkování vzorku např. opakovatelnost nástřiku, parametry pro separaci např. rozlišení a parametry pro detekci např. poměr signál /šum. SST není součástí směrnic ICH, naopak autority jako např. FDA či Český lékopis považují SST jako nutnou součást každé validované bioanalytické metody [33,36].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístrojové vybavení

4.1.1 Přístroje a pomůcky

UHPLC systém Nexera, Shimadzu (Japonsko):

- Centrální komunikační jednotka CBM-20A
- Degaser DDU-20A₃
- Dvě vysokotlaká čerpadla LC-30AD s rozsahem průtoku 0,0001–5 ml/min
- Autosampler SIL-30AC pro vzorky ve vialkách i v mikrotitračních destičkách; teplotní rozsah 4–40 °C
- Rack Changer II modul pro manipulaci a uchování mikrotitračních destiček
- Kolonový termostat CTO-20AC; teplotní rozsah 4–85 °C
- Šesticestný selekční ventil FCV-32AH
- Detektor
 - Hmotnostní spektrometr LCMS 8030 s trojitým kvadrupólem, Shimadzu (Japonsko) s ionizací elektrosprejem (ESI)
- Počítačový software LabSolutions 5.41 SP1

Analytické váhy AG CPA 623S, Sartorius (Německo)

Vakuová odparka Concentrator plus AD 5301, Eppendorf (Německo)

Vortex Lab Dancer, Ika Werke (Německo)

Mechanické pipety mLine, Sartorius (Německo)

Magnetická míchačka s ohřevem, Ika Werke (Německo)

pH metr Sentron Argus (Nizozemsko)

Vakuová pumpa Vacc Space 50, Chromservis (Česká republika)

Filtry Hydrophilic Polypropylene membrane filters 100/pack, GH polypack 47 mm, 0,2 µm, Pall Life Science (USA)

Mikrotitrační destičky Brandplates puregrade 350 µl (Německo)

4.1.2 Chromatografické kolony

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

Kinetex® HILIC 100 A, 50 × 2,10 mm, 1,7 μm, Phenomenex (USA)

Kinetex® HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm, Phenomenex (USA)

4.2 Použité chemikálie

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

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

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

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

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

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

Močovina - Urea puriss. p.a., ACS reagent, reag. Ph. Eur., = 99 57-13-6 - Sigma Aldrich (Česká republika)

¹⁵N₂močovina - Urea-¹⁵N₂ 15N 98atom, 99 CP 2067-80-3 - Sigma Aldrich (Česká republika)

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Mobilní fáze

Při optimalizaci složení mobilní fáze (MF) byly zkoušeny různé poměry následujících roztoků: LC-MS voda, LC-MS voda s 0,1% kyselinou mravenčí (FA), octan amonný (AMAC), mravenčan amonný (AMFO), acetonitril (ACN) s 0,1% FA a methanol (MeOH) s 0,1% FA.

Oba pufry byly připraveny o koncentraci 10 mmol/l tak, že navážka 77 mg octanu amonného byla rozpuštěna ve vodě LC-MS kvality ve 100ml odměrné baňce a doplněna po rysku. Taktéž navážka 63 mg mravenčanu amonného byla rozpuštěna v LC-MS vodě ve 100ml odměrné baňce a doplněna po rysku. Oba pufry byly následně přefiltrovány pomocí vakuové pumpy přes hydrofilní polypropylenové membránové filtry s velikostí pórů 0,2 μm. Hodnota pH takto připraveného octanu amonného byla 6,2. Část octanu amonného byla okyselena na

pH 3,1 přidáním 100 µl FA. Naměřené pH připraveného a použitého mravenčanu amonného bylo 6,0.

Finální složení mobilní fáze obsahovalo 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O.

4.3.2 Zásobní roztok standardu močoviny

Na analytických vahách bylo naváženo 6 mg močoviny. Tato navážka byla následně rozpuštěna ve vodě LC-MS kvality v 50ml odměrné baňce a doplněna po rysku. Výsledná koncentrace takto připraveného roztoku odpovídala 2000 µmol/l. Zásobní roztok standardu močoviny byl uchováván v lednici při 4 °C po dobu 6 měsíců. Ze zásobního roztoku byly průběžně připravovány pracovní roztoky požadovaných koncentrací. Tyto pracovní roztoky byly ředěny dle aktuální potřeby vodou LC-MS kvality, ACN či mobilní fází.

4.3.3 Zásobní roztok vnitřního standardu močoviny

Navážka 3,1 mg vnitřního standardu močoviny (¹⁵N₂-močovina) byla rozpuštěna v LC-MS vodě ve 25ml odměrné baňce a doplněna až po rysku. Výsledná koncentrace roztoku IS byla 2000 µmol/l. Tímto způsobem připravený zásobní roztok byl skladován v lednici při 4 °C po dobu 6 měsíců. Následně byly připravovány pracovní roztoky IS o nižší koncentraci, zásobní roztok byl ředěn ACN.

4.3.4 Směs standardů

Pro optimalizaci chromatografické metody byla použita směs standardu močoviny a vnitřního standardu v MF. Objemy jednotlivých složek směsi byly zvoleny tak, aby výsledná koncentrace každého ze standardů byla 1 µmol/l. Vzhledem ke složitosti MF jsou jednotlivé objemy složek pro přípravu 10 ml směsi uvedeny v následující **Tabulce č. 3**. Kyselina mravenčí byla přidána jako poslední v takovém množství, aby její výsledná koncentrace ve směsi byla 0,1%.

Tabulka č. 3: Složení směsi standardu močoviny a vnitřního standardu v 10 ml

Složky směsi	Objem
ACN	6480 μ l
Močovina 10 μ mol/l	1000 μ l
¹⁵ N ₂ -močovina 10 μ mol/l	1000 μ l
LC-MS H ₂ O	800 μ l
MeOH	720 μ l
FA	7,8 μ l

4.3.5 Rozpouštědlo vzorku

Pro usnadnění rozpouštění odpařených vzorků EBC byl připraven roztok. Tento roztok obsahuje všechny složky mobilní fáze a vnitřní standard. V **Tabulce č. 4** jsou uvedena množství jednotlivých složek pro 1 ml rozpouštědla vzorku, koncentrace IS je 1 μ mol/l.

Tabulka č. 4: Složky rozpouštědla vzorku a jejich objemy v 1 ml

Složky rozpouštědla vzorku	Objem
ACN	710 μ l
LC-MS H ₂ O	100 μ l
¹⁵ N ₂ -močovina 10 μ mol/l	100 μ l
MeOH	90 μ l

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace chromatografické metody

V průběhu optimalizace chromatografické metody byly postupně hledány vhodné podmínky pro analýzu standardních látek. Konkrétně byly optimalizovány detekční podmínky, vnitřní standard, nastříkovaný objem vzorku, typ stacionární fáze, složení mobilní fáze a rozpouštědla pro odpařený vzorek EBC.

Prostřednictvím odborné literatury byly dohledány potřebné informace o analyzované látce, včetně vlastností, struktury či již testovaných a publikovaných analytických metod.

5.1.1 Vnitřní standard

Jako vnitřní standard je potřeba zvolit látku, která se svou strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobá stanovovanému analytu. Hmotnostní spektrometrie umožňuje použít izotopově značenou molekulu IS. Stabilní izotopy mají podobné vlastnosti s analyzovanou látkou, liší se primárně relativní molekulovou hmotností, která zajistí jejich požadované rozlišení při MS analýze. Navíc jsou stabilní izotopy schopny vyrovnávat nepřesnosti způsobené zpracováním vzorku či odezvou detektoru.

V publikovaných studiích byly při vývoji LC-MS metody pro analýzu močoviny v EBC nejčastěji jako vnitřní standard využívány izotopově značené molekuly močoviny. Jednalo se o molekuly značené buď na atomu uhlíku [30,31], na atomu dusíku [24,25,28] nebo na atomu uhlíku i dusíku [37].

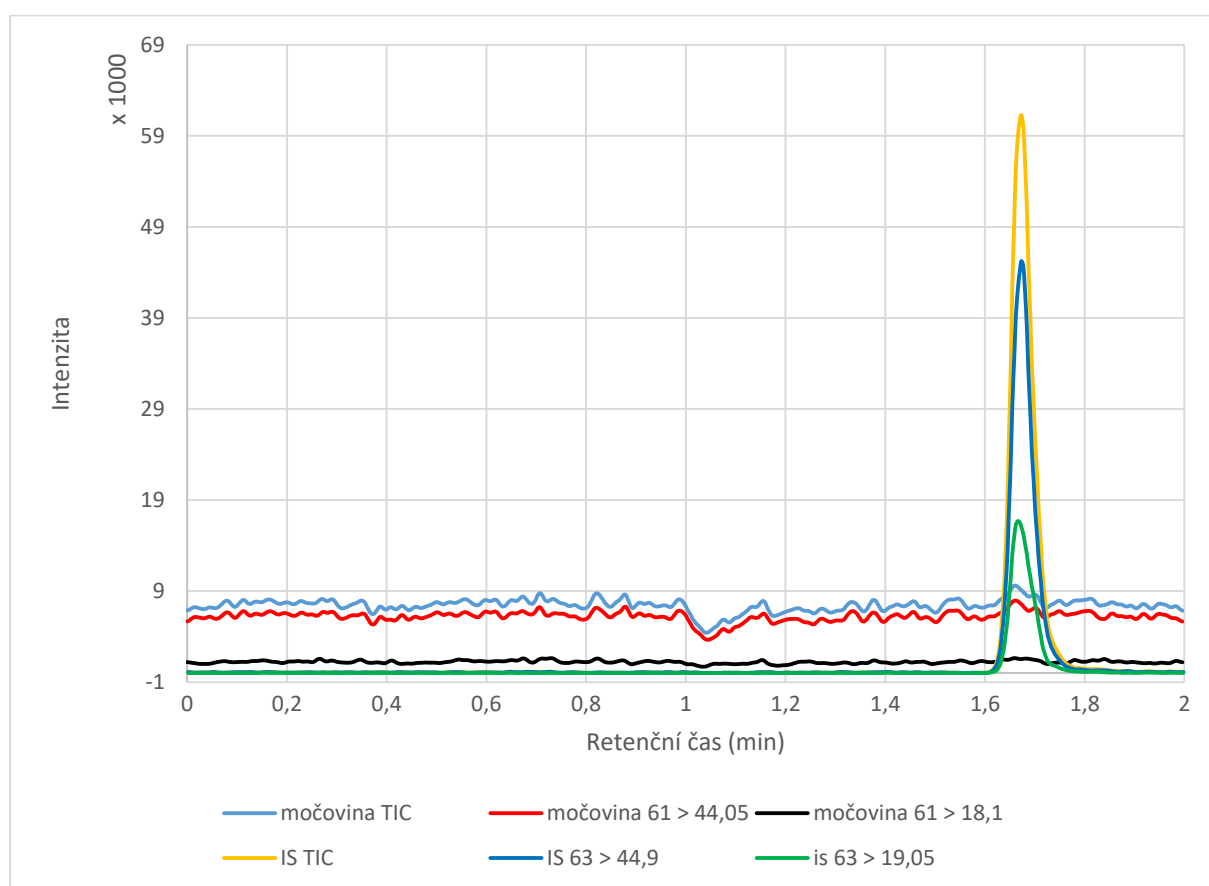
Pro UHPLC-MS/MS analýzu močoviny v EBC byla jako vnitřní standard zvolena molekula močoviny s izotopově značeným dusíkem ($^{15}\text{N}_2$ -močovina). Výhodou tohoto IS je srovnatelná struktura s analyzovanou molekulou močoviny v EBC, liší se pouze izotopovým značením ^{15}N . Díky tomu mají obě molekuly velmi podobné chromatografické vlastnosti, liší se zejména detekčními podmínkami.

5.1.2 Detekční podmínky

Vhodné detekční podmínky byly zjištěny prostřednictvím automatické optimalizace detekce s využitím standardního roztoku močoviny a IS. Hmotnostní spektrometr tímto způsobem vyhodnotil nejen tzv. MRM přechody (Multiple Reaction Monitoring), které byly následně porovnány s odbornou literaturou, ale také další důležité podmínky detekce jako je napětí na kapiláře, teplota na Heat bloku apod.

Pro větší selektivitu metody byla zvolena kombinace dvou MRM přechodů a to jak pro molekulu močoviny, tak i pro vnitřní standard. **Tabulka č. 5** uvádí detekční podmínky pro močovinu a vnitřní standard včetně nastaveného napětí, kolizních energií a času prodlevy. Další parametry detektoru jsou v **Tabulce č. 6**.

Na **Obrázku č. 4** bylo ověřeno, že IS nezpůsobil navýšení odezvy stanovovaného analytu.



Obrázek č. 4: MRM přechody pro IS

MF 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O; Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm; nastříkovaný objem: 2 μl; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

Tabulka č. 5: Detekční podmínky pro močovinu a vnitřní standard

Prekursorové ionty (m/z)	Produktové ionty (m/z)	Čas prodlevy (ms)	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
Močovina					
61	44,05	50,0	-10,0	-21,0	-18,0
61	18,10	50,0	-10,0	-13,0	-23,0
¹⁵N₂-močovina					
63	44,9	50,0	-10,0	-22,0	-18,0
63	19,05	50,0	-10,0	-12,0	-22,0

Q1 – kvadrupól 1; Q3 – kvadrupól 3, CE – kolizní energie.

Tabulka č. 6: Nastavení parametrů detekce

Typ ionizace	ESI +
Napětí na kapiláře	4,5 kV
Teplota na DL (Desolvation Line)	250 °C
Teplota na Heat bloku	400 °C
Průtok sušícího plynu	15 l/min
Průtok nebulizačního plynu	3 l/min

5.1.3 Volba stacionární fáze a složení mobilní fáze

V rámci optimalizace stacionární fáze byly testovány 3 různé typy analytických kolon – Kinetex Polar C₁₈ 100 A, 100 × 3,0 mm, 2,6 μm, Kinetex HILIC 100 A, 50 × 2,10 mm, 1,7 μm a Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm. Zároveň bylo optimalizováno složení mobilní fáze.

5.1.3.1 Kinetex Polar C₁₈ 100 A, 100 × 3,0 mm, 2,6 μm

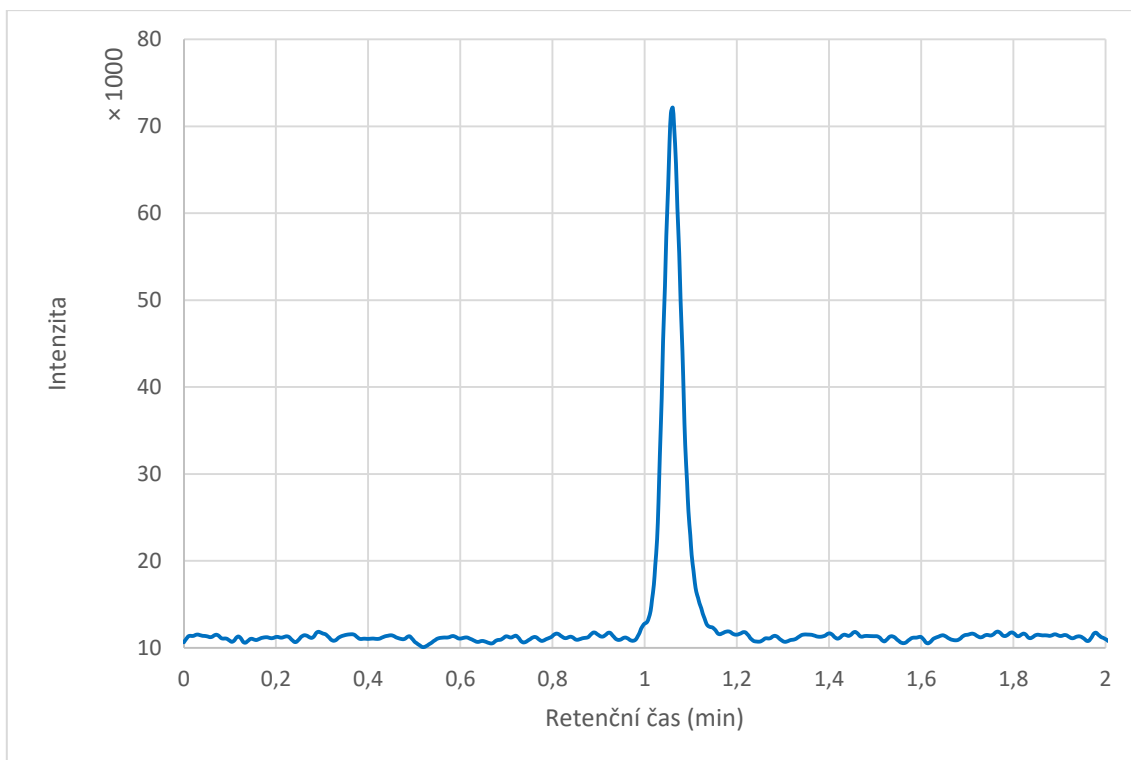
Při volbě první kolony jsme vycházeli z publikace Quan et al. [24]. Stacionární fáze zvolené kolony Kinetex Polar C₁₈ je tvořena silikagelovými povrchově porézními částicemi, jejichž povrch je chemicky modifikován. Navázaný alkyl C₁₈ zprostředkovává hydrofobní interakce, polární modifikace naopak zvyšuje retenci pro polární látky. Silikagelové povrchově porézní částice se skládají ze dvou odlišných částí sorbentu. Pevné jádro, které je tvořeno neporézním silikagelem, je pokryto několika vrstvami porézního, v tomto případě chemicky modifikovaného, silikagelu, na němž probíhá separace.

Při optimalizaci složení mobilní fáze byly na této koloně testovány různé poměry LC-MS vody a ACN. Močovina se ve všech případech eluovala z kolony v retenčním čase mrtvého objemu. Zároveň analýza neposkytovala požadovanou citlivost. Pro další fázi optimalizace byla zvolena jiná kolona.

5.1.3.2 Kinetex HILIC 100 A, 50 × 2,10 mm, 1,7 μm

Kolona Kinetex HILIC byla zvolena na základě poznatků ze studie Wang et al. [37]. Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) totiž poskytuje velmi dobrou retenci vysoce polárním látkám. Kombinuje polární stacionární fázi s vodně-organickou mobilní fází, nejčastěji ACN (50–99 %) s vodou nebo puftrem. Analyty jsou při průchodu kolonou rozdělovány mezi hydrofobní část mobilní fáze a hydrofilní vrstvu, která je tvořena vodnou složkou mobilní fáze imobilizovanou na povrch polární stacionární fáze. Stacionární fázi této kolony tvoří silikagelové povrchově porézní částice.

Na této koloně byla testována řada mobilních fází (**Tabulka č. 7**). Nejprve byl zkoušen ACN (0,1% FA) s LC-MS vodou. HILIC kolona vykazovala, v porovnání s kolonou Polar C₁₈, optimálnější vlastnosti při analýze nižších koncentrací močoviny. Kombinace 90 % ACN (0,1% FA) a 10 % LC-MS vody pro analýzu standardu močoviny o koncentraci 10 μmol/l zajistila lepší tvar a vyšší intenzitu píku. Retenční čas analytu se zvýšil. Došlo také ke snížení šumu základní linie (**Obrázek č. 5**). Pro další optimalizaci byla zvolena kolona HILIC, na níž se testovalo finální složení mobilní fáze, optimální hodnota pH, nastříkovaný objem vzorku i vnitřní standard.

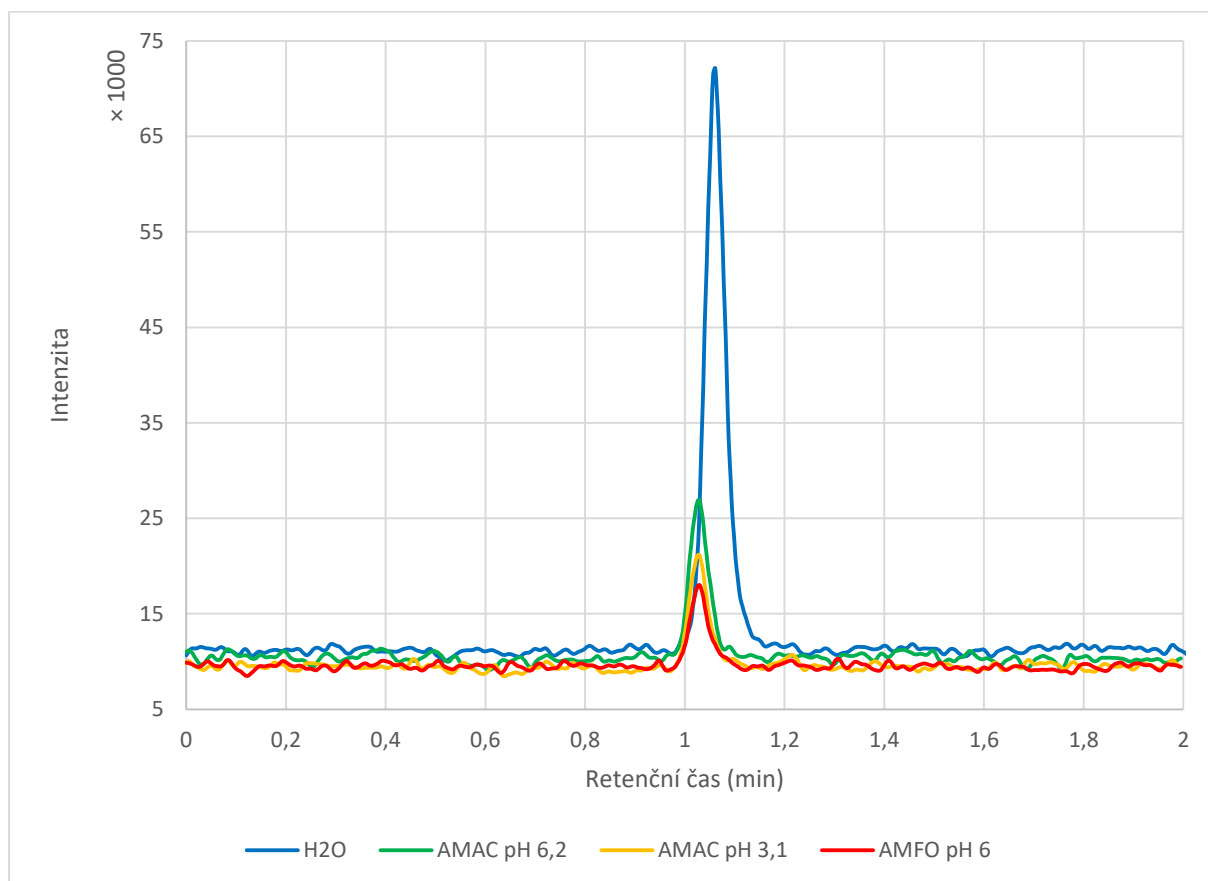


Obrázek č. 5: Chromatogram

Standard močoviny (10 $\mu\text{mol/l}$); 90 % ACN (0,1% FA) : 10 % LC-MS H₂O; Kinetex HILIC 100 A, 50 \times 2,10 mm, 1,7 μm ; nastříkovaný objem: 1 μl ; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

Protože koncentrace močoviny v EBC jsou velmi nízké, cílem další optimalizace bylo zvýšit citlivost analýzy. Kyselina mravenčí byla přidávána k organické složce mobilní fáze pro usnadnění ionizace a zlepšení následné detekce. Jelikož očekávané zvýšení intenzity píku po obohacení jak vodné, tak organické složky 0,1% FA nebylo pozorováno, ponechali jsme kyselinu mravenčí pouze v organické složce.

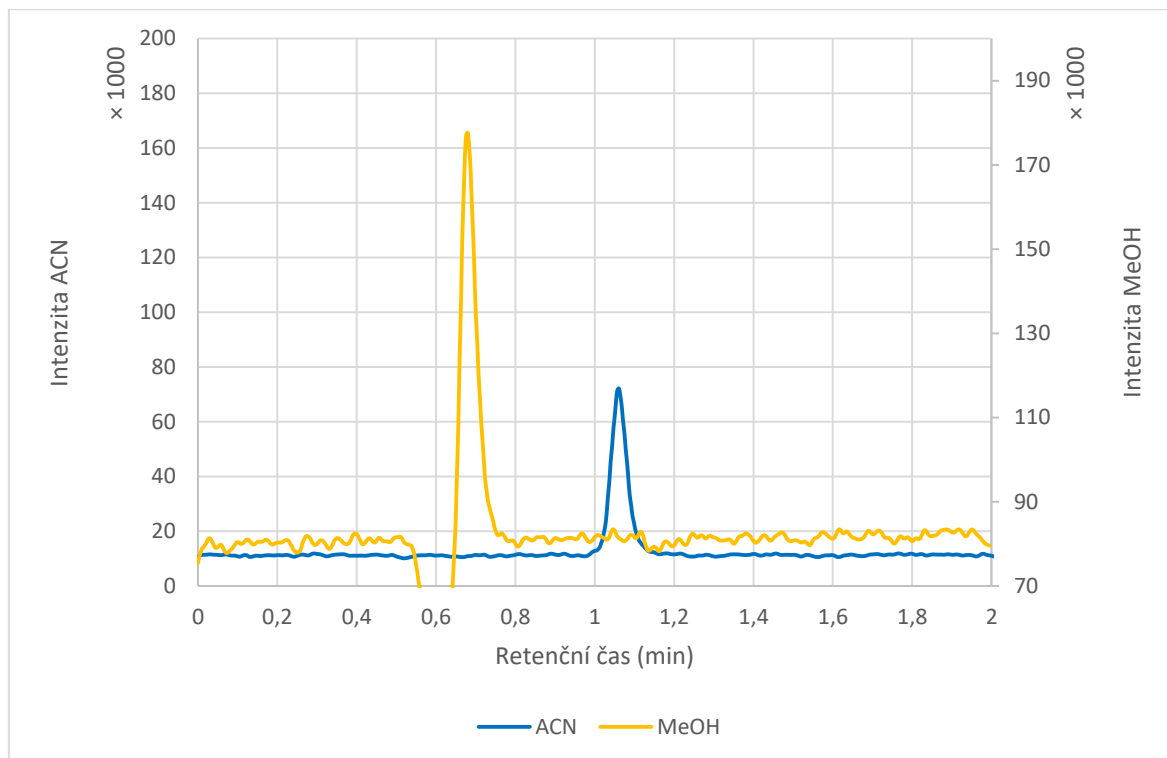
V další fázi optimalizace mobilní fáze byla voda vyměněna za pufrů. 10mM octan amonný (pH 6,2 a 3,1) ani 10mM mravenčan amonný (pH 6,0) v kombinaci s ACN (0,1% FA) nezvýšily intenzitu píku, naopak. Intenzita byla mnohonásobně nižší v porovnání s LC-MS vodou (**Obrázek č. 6**).



Obrázek č. 6: Chromatogram

Standard močoviny (10 $\mu\text{mol/l}$); 1) 90 % ACN (0,1% FA) : 10 % LC-MS H₂O; 2) 90 % ACN (0,1% FA) : 10 % 10mM AMAC (pH 6,2); 3) 90 % ACN (0,1% FA) : 10 % 10mM AMAC (pH 3,1); 3) 90 % ACN (0,1% FA) : 10 % 10 mM AMFO (pH 6,0); Kinetex HILIC 100 A, 50 × 2,10 mm, 1,7 μm ; nastříkovaný objem: 1 μl ; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

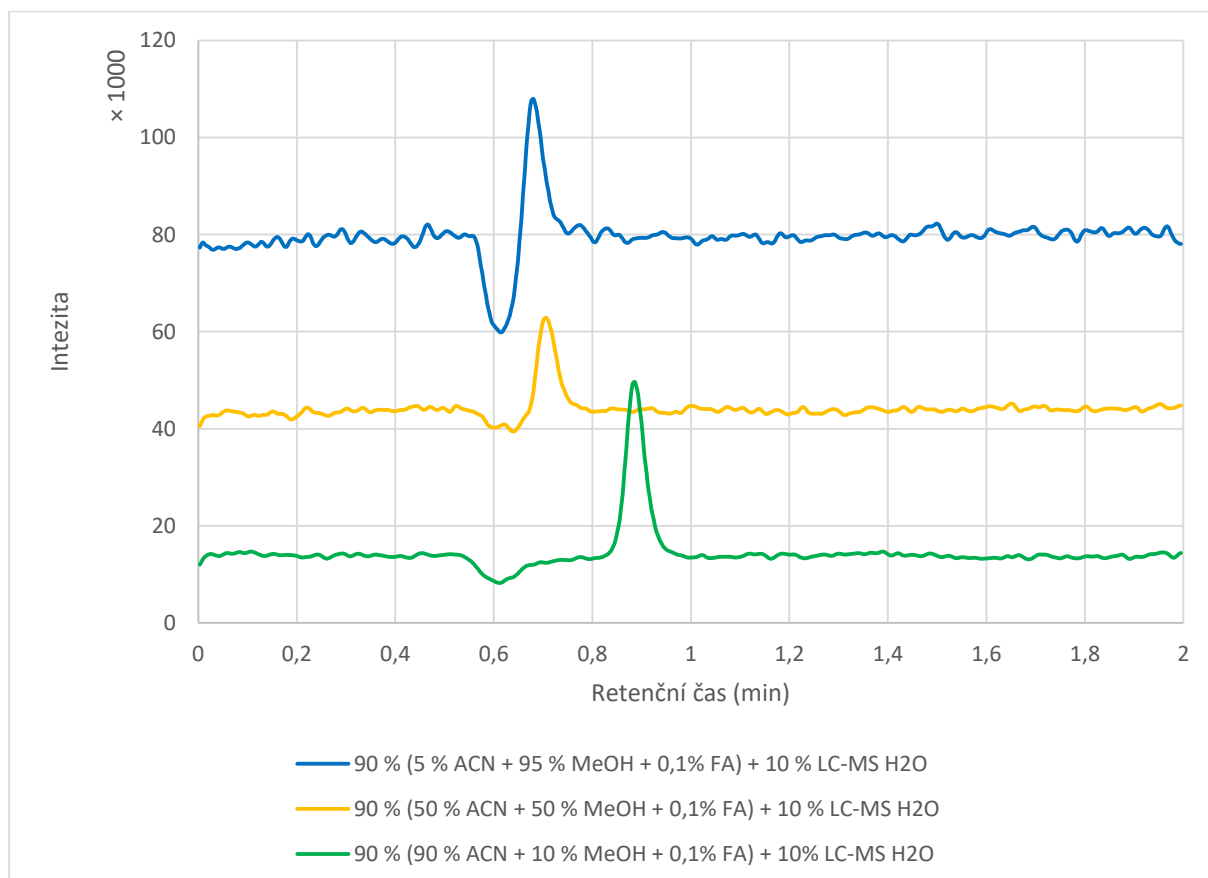
V dalším kroku byl ACN (0,1% FA) vyměněn za methanol (0,1% FA). Při složení mobilní fáze MeOH (0,1% FA) : LC-MS voda v poměru 90 : 10 bylo dosaženo nejvyšší intenzity píku. Toto zlepšení však doprovázel i posun retenčního času analytu k mrtvému retenčnímu času kolony. Mrtvý retenční čas měl hodnotu 0,65 min, retenční čas močoviny byl 0,68 min (**Obrázek č. 7**). Dále byl optimalizován retenční čas.



Obrázek č. 7: Chromatogram

Standard močoviny (10 $\mu\text{mol/l}$); 1) 90 % ACN (0,1% FA) : 10 % LC-MS H_2O ; 2) 90 % MeOH (0,1% FA) : 10 % LC-MS H_2O ; Kinetex HILIC 100 A, 50 \times 2,10 mm, 1,7 μm ; nastříkovaný objem: 1 μl ; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

Pro posun retenčního času při současném zachování vysoké intenzity píku byly zkoušeny různé poměry ACN, MeOH a vody (**Tabulka č. 7**). V rámci organické složky MF přídavek 5 % ACN k MeOH nic nezměnil, až přídavek 50 % ACN mírně posunul retenční čas. Jak ukazuje **Obrázek č. 8**, kombinace 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS vody byla nejlepším kompromisem mezi intenzitou píku a retenčním časem analytu.



Obrázek č. 8: Chromatogram

Standard močoviny (1 $\mu\text{mol/l}$); 1) 90 % (5 % ACN + 95 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O; 2) 90 % (50 % ACN + 50 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O; 3) 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10% LC-MS H₂O; Kinetex HILIC 100 A, 50 \times 2,10 mm, 1,7 μm ; nastříkovaný objem: 1 μl ; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

Tabulka č. 7: Složení mobilních fází (organická složka vždy obsahovala 0,1% FA)

Rozpouštědlo	Poměr											
LC-MS H ₂ O	10		-	-	-	10	5	10	10	10	10	10
LC-MS H ₂ O + 0,1% FA	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mM AMAC pH 6,2	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10mM AMAC pH 3,1		-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
10mM AMFO pH 6,0	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
ACN	90	90	90	90	90	-	-	4,5	9	45	81	85,5
MeOH	-	-	-	-	-	90	95	85,5	81	45	9	4,5

5.1.3.3 Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm

Kolona HILIC se při optimalizaci chromatografických podmínek osvědčila. Proto byla vyzkoušena i totožná kolona, pouze v delším provedení (100 mm). Na první pohled došlo změnou kolony pouze k očekávané změně retenčního času analytu. Přesto, při porovnání některých validačních parametrů, jako je opakovatelnost nástřiku či faktor symetrie byly hodnoty 100mm kolony optimálnější. Jako finální analytická kolona byla tedy vybrána Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm. Při průtoku 0,2 ml/min umožňovala rychlou analýzu do 2 minut. Tato kolona poskytovala pro polární molekulu močoviny dobrou retenci a intenzitu píku. Retenční čas analytu byl 1,6 minut (**Obrázek č. 11**).

5.1.4 Složení rozpouštědla vzorku

Literatura uvádí, že pro chromatografickou separaci v HILIC módu je optimální, aby rozpouštědlo vzorku mělo podobné složení jako mobilní fáze [33]. V rámci optimalizace složení rozpouštědla vzorku byly testovány ACN, MeOH, LC-MS voda a jejich kombinace.

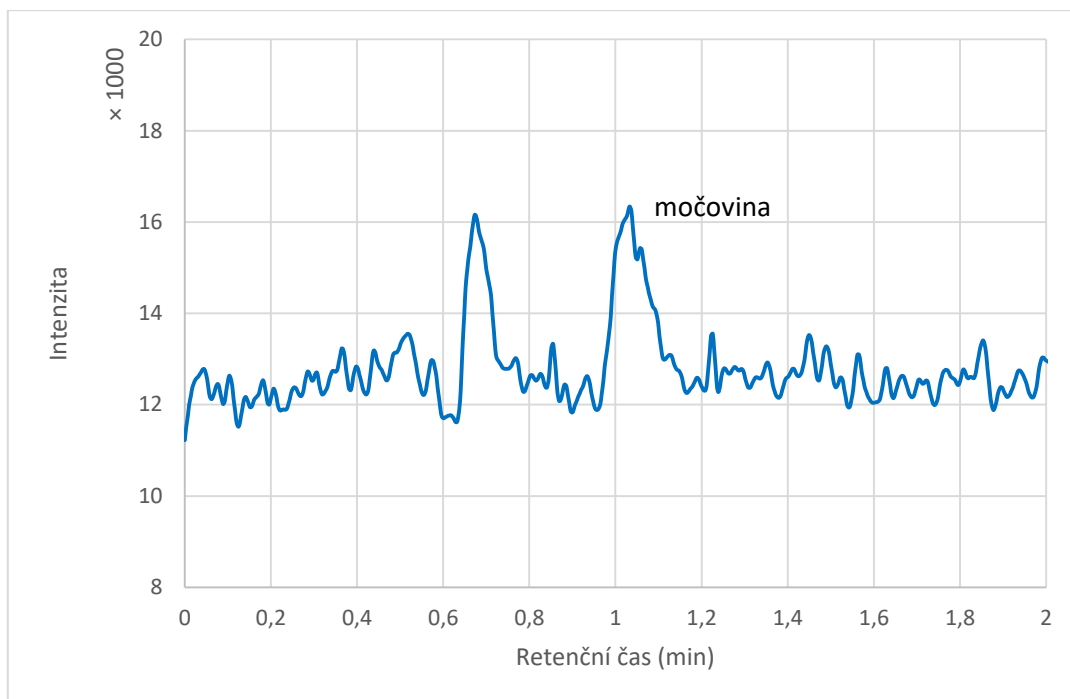
I přes složitost přípravy se opravdu potvrdilo, že pro analýzu na HILIC koloně je nejideálnější složení rozpouštědla pro odpařený vzorek EBC totožné se složením mobilní fáze. Jednotlivé složky rozpouštědla vzorku a jejich množství uvádí **Tabulka č. 4**.

5.1.5 Úprava biologického materiálu

Cílem vývoje nové UHPLC-MS/MS metody pro stanovení močoviny v EBC bylo vytvořit jednoduchou a rychlou metodu s minimální úpravou biologického materiálu. Přímý nástřik na kolonu, který se nabízel jako první, představoval několik rizik. Literatura neuvádí přesné složení matrice EBC, nebylo tedy možné vyloučit zanesení a zničení kolony. Dalším důvodem pro vyloučení přímého nástřiku byla kombinace polárních vlastností molekuly močoviny, majoritního zastoupení zkondenzované vodní páry ve vzorku EBC a mechanismus HILIC.

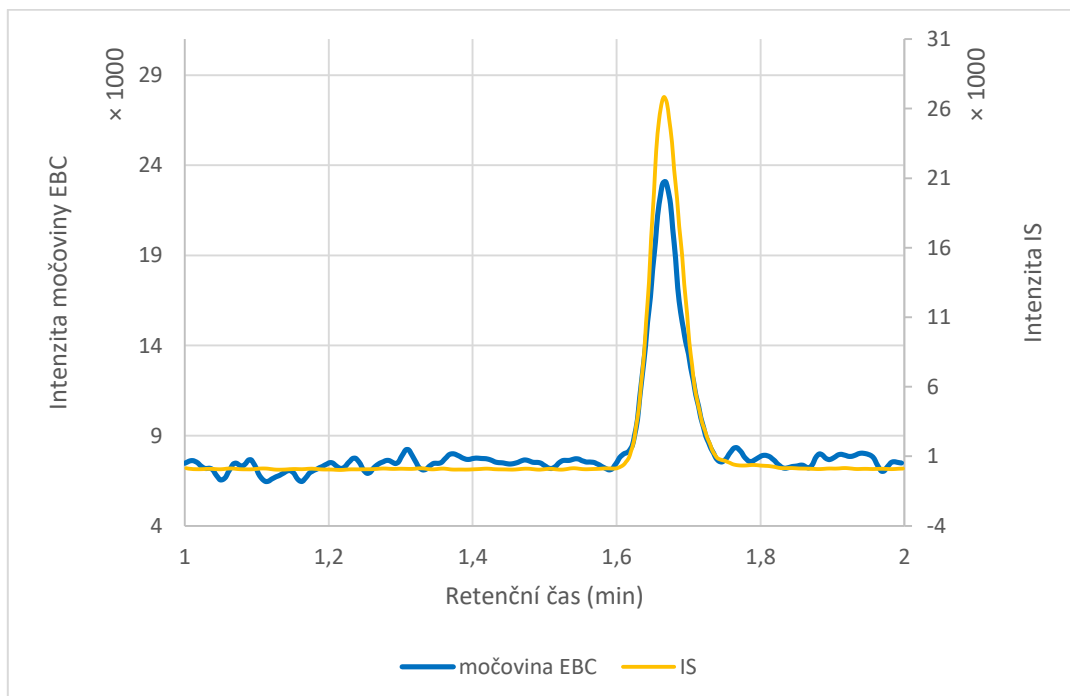
Při prvním pokusu úpravy biologického materiálu byl vzorek EBC naředěn ACN (0,1% FA) v poměru 1 : 1, aby se zmenšilo zastoupení vodné složky ve vzorku. Tento postup ředění však nebyl shledán jako optimální vzhledem k nízkým hladinám močoviny v EBC (**Obrázek č. 9**).

Pro úpravu vzorků EBC před analýzou, byl zvolen jednoduchý postup odpařování pomocí vakuové odparky. Vzorky EBC, skladované v mrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly rozmrazeny při laboratorní teplotě. 100 μl vzorku bylo pipetováno do 2ml mikrozkušavky, následovalo odpařování při teplotě $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 hodin. Po odpaření byl vzorek rozpuštěn ve 100 μl rozpouštěla, přenesen do mikrotitrační destičky a ihned analyzován. Na **Obrázku č. 10** je záznam analýzy vzorku EBC.



Obrázek č. 9: Chromatogram

EBC ředěný ACN (0,1% FA) v poměru 1 : 1; 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O; Kinetex HILIC 100 A, 50 × 2,10 mm, 1,7 μm; nastříkovaný objem: 1 μl; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

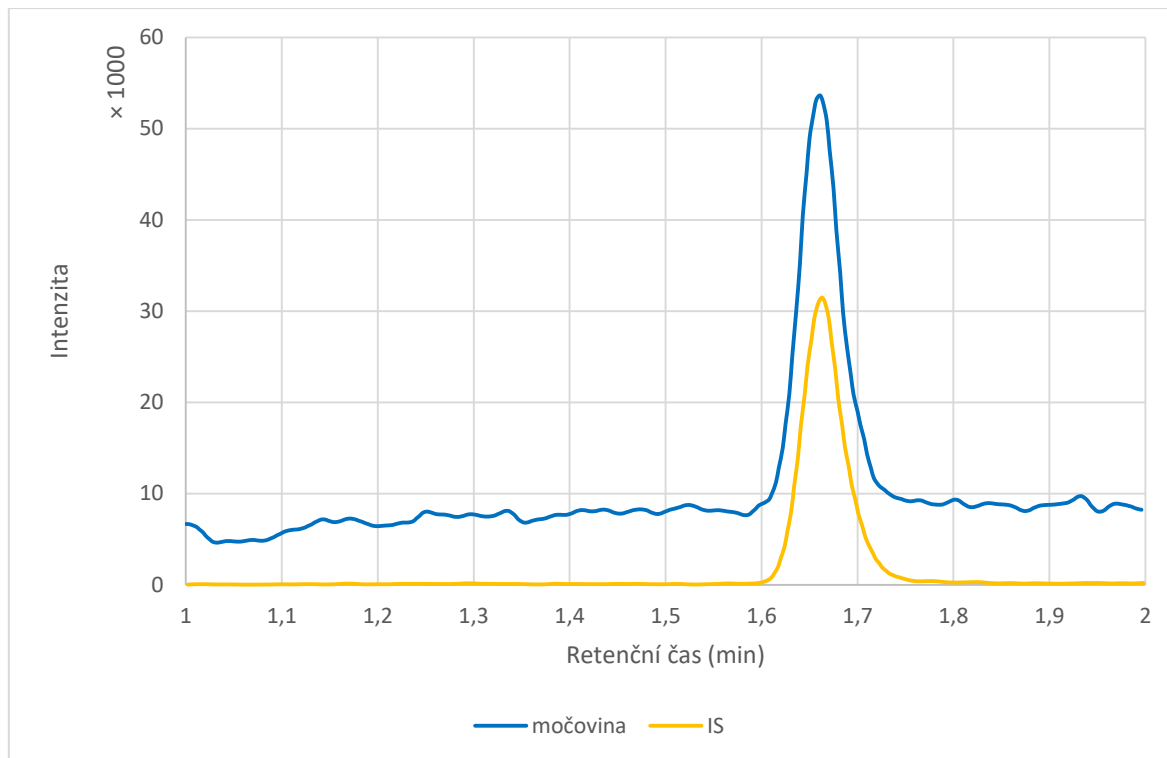


Obrázek č. 10: Chromatogram

EBC pacienta; 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O; Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm; nastříkovaný objem: 2 μl; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

5.1.6 Nastříkovaný objem

V samotném závěru optimalizace chromatografických podmínek bylo upraveno množství nastříkovaného vzorku. Změna nastříkovaného objemu z 1 μl na 2 μl nijak nezhoršila tvar píku, naopak očekávaně zvýšila jeho intenzitu (**Obrázek č. 11**).



Obrázek č. 11: Chromatogram

Standard močoviny (1 $\mu\text{mol/l}$); 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O; Kinetex HILIC 100 A, 100 \times 2,10 mm, 1,7 μm ; nastříkovaný objem: 2 μl ; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

5.2 Souhrn vybraných podmínek

Jako finální kolona byla zvolena Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm. Tato kolona umožňovala při průtoku 0,2 ml/min rychlou analýzu do 2 minut a poskytovala pro polární molekulu močoviny dobrou retenci a intenzitu píku. Zvolené podmínky pro analýzu jsou uvedeny v **Tabulce č. 8**.

Pro úpravu vzorků EBC byl zvolen postup odpařování. 2 ml EBC byly odpařovány při teplotě 45 °C po dobu 2 hodin. Následně byl vzorek rozpuštěn ve 100 μl rozpouštědla.

Tabulka č. 8: Souhrn vybraných podmínek pro analýzu močoviny v EBC

Analytická kolona	Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm
Mobilní fáze	90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) : 10 % LC-MS H ₂ O
Průtok	0,2 ml/min
Detekce	MS/MS - dle MRM přechodů
Teplota	25 °C
Vnitřní standard	¹⁵ N ₂ -močovina
Nastříkovaný objem	2 μl
Retenční čas	1,6 min

5.3 Validace metody

5.3.1 Zdánlivý počet teoretických pater

Pomocí bezrozměrné veličiny – zdánlivý počet teoretických pater (N), se vyjadřuje účinnost pro danou analytickou kolonu. Platí, že čím má kolona větší počet teoretických pater, tím je vyšší její účinnost.

Zdánlivý počet teoretických pater (N) vypočítáme podle vzorce:

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

t_R retenční čas analytu

w_h šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater pro standard močoviny byl 5 958, pro IS 5 855.

5.3.2 Faktor symetrie

Jak název napovídá, faktor symetrie (A_s) popisuje symetrii chromatografického píku. Jedná se opět o bezrozměrnou veličinu, která je velmi důležitá při kvantifikaci měřeného analytu. Hodnota faktoru symetrie se při ideální symetrii píku rovná 1,0. Hodnoty nižší než 1,0 poukazují na tzv. frontování, čili rozmývání píku v jeho přední části. Naopak hodnoty vyšší než 1,0 značí chvostování píku.

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

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

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

Hodnota faktoru symetrie pro pík standardu močoviny i pro pík vnitřního standardu byla 1,2. Faktor symetrie obou látek tedy vyhovuje požadavkům symetrie v rozmezí 0,8–1,5.

5.3.3 Opakovatelnost

Hodnota opakovatelnosti nástřiku se vyjadřuje pomocí výpočtu relativní směrodatné odchylky. Slouží ke kvantitativnímu hodnocení metody.

Pro výpočet relativní směrodatné odchylky byl 6 × za sebou analyzován směsný standard o koncentraci 1 μmol/l, z výsledných dat byly zaznamenány plochy píků a retenční časy obou standardů.

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

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

\bar{y} poměr jednotlivých naměřených hodnot

n počet jednotlivých naměřených hodnot

Tabulka č. 9: Opakovatelnost nástřiku standardu močoviny a vnitřního standardu

	Standard močoviny		Vnitřní standard	
	retenční čas	plocha	retenční čas	plocha
	1,664	830440	1,665	71507
	1,665	832445	1,664	73058
	1,662	840469	1,663	73367
	1,664	832822	1,665	68943
	1,663	850113	1,665	71722
	1,663	836104	1,664	71291
RSD (%)	0,06	0,80	0,04	2,01
Průměr	1,663	8370666	1,664	71648

Podmínky: Standard močoviny (1 μmol/l), IS (1 μmol/l); 90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) + 10 % LC-MS H₂O; Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm; nastříkovaný objem: 2 μl; průtoková rychlost: 0,2 ml/min.

Výsledné hodnoty směrodatné odchylky pro opakovatelnost nástřiku standardu močoviny a vnitřního standardu, využívající k výpočtu retenční časy, vyhovují požadavkům $RSD \leq 1\%$. Relativní směrodatná odchylka, vypočtená pomocí ploch píků, v případě standardu močoviny vyhovuje požadavkům, v případě vnitřního standardu nikoli (**Tabulka č. 9**).

5.3.4 Přesnost a preciznost metody

Přesnost a preciznost metody byla vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky naměřených ploch píků. Ověření obou těchto parametrů v rámci jedné série měření (within-run) bylo provedeno analýzou jednoho vzorku EBC na celkem šesti koncentračních hladinách. Přesnost a preciznost metody mezi měřeními (between-run) byla stanovována analýzou jiného vzorku EBC na celkem šesti koncentračních hladinách ve dvou rozdílných dnech. Dosažené hodnoty RSD pro přesnost a preciznost se pohybovaly v akceptačních kritériích v rozmezí $\pm 15\%$ od nominální hodnoty koncentrace (**Tabulka č. 10**).

Tabulka č. 10: Přesnost a preciznost metody pro EBC

	QC 1	QC 2	QC 3	QC 4	QC 5	QC 6
Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	0,1	0,3	0,5	1,5	15	150
Within-run (n=5)						
Naměřená koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	0,9	0,36	0,54	1,55	14,24	155,33
Preciznost (% RSD)	3,21	4,13	3,30	1,05	2,16	1,78
Přesnost (% RSD)	6,19	2,78	9,26	14,15	2,92	0,36
Between-run (n=3)						
Naměřená koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	0,10	0,29	0,51	1,45	14,05	155,28
Preciznost (% RSD)	5,70	2,86	4,29	2,94	0,74	3,80
Přesnost (% RSD)	11,17	5,97	5,19	12,45	4,17	0,46

QC 1–QC 6 – kontrolní vzorek 1–6.

5.3.5 Selektivita

Blanková matrice EBC není dostupná. Vzhledem k tomu, že je EBC tvořen převážně zkondenzovanou vodní párou, byly jako náhradní matrice zvoleny fyziologický roztok a redestilovaná voda. V retenčních časech močoviny a vnitřního standardu nebyly pozorovány žádné interferující látky.

5.3.6 Matricové efekty

Kvůli nedostupnosti většího množství různých matric byl vliv matrice vzorku na močovinu prokazován pouze na 4 vzorcích EBC porovnáním plochy píku analytu, který byl ke vzorku EBC přidán po jeho úpravě s plochami píků roztoků standardů příslušné koncentrace. Matricový efekt byl testován na dvou koncentračních hladinách. Výsledná průměrná hodnota matricového efektu byla 98,96 %. Splnila požadavek 100 ± 15 %.

5.3.7 Výtěžnost

Výtěžnost, neboli recovery, je obecně definována jako poměr naměřené hodnoty koncentrace analytu danou analytickou metodou k referenční hodnotě. Pro naše účely byla hodnota výtěžnosti získána pomocí vzorků EBC od dvou různých pacientů. Oba vzorky byly obohaceny roztokem standardu močoviny na výsledné koncentrace $1 \mu\text{mol/l}$ a $15 \mu\text{mol/l}$. Část vzorků však byla obohacena ještě před úpravou vzorku, druhá část až po úpravě vzorku. Tímto způsobem jsme získaly potřebné hodnoty pro výpočet poměru plochy píku vzorku obohaceného před úpravou vzorku k ploše píku vzorku obohaceného po úpravě vzorku. Průměrná výsledná hodnota výtěžnosti pro oba vzorky byla spočtena na 92,9 %.

5.3.8 Stabilita

Data o stabilitě močoviny ve vzorcích EBC nebylo možné získat. Reálné množství poskytnutého kondenzátu pro naše účely se pohybovalo okolo 1 ml. Jelikož je pro jednu analýzu potřeba 100 μl vzorku a všechny vzorky byly již minimálně jednou analyzovány, nezbývalo dostatek materiálu pro stabilitní studii.

Nicméně zásobní roztok a pracovní roztoky močoviny a vnitřního standardu, uchovávané po celou dobu vývoje metody v lednici při 4°C , byly v průběhu 6 měsíců průběžně analyzovány

a nevykazovaly žádné známky degradace. Molekula močoviny se po celou dobu jevila jako velmi stabilní.

5.3.9 Limit detekce

Limit detekce (LOD, Limit of Detection) je parametrem citlivosti metody. Udává nejnížší detekovatelnou koncentraci látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Vypočítá se jako poměr signálu k šumu krát 3. Detekční limit pro močovinu byl spočten na hodnotu 0,067 $\mu\text{mol/l}$.

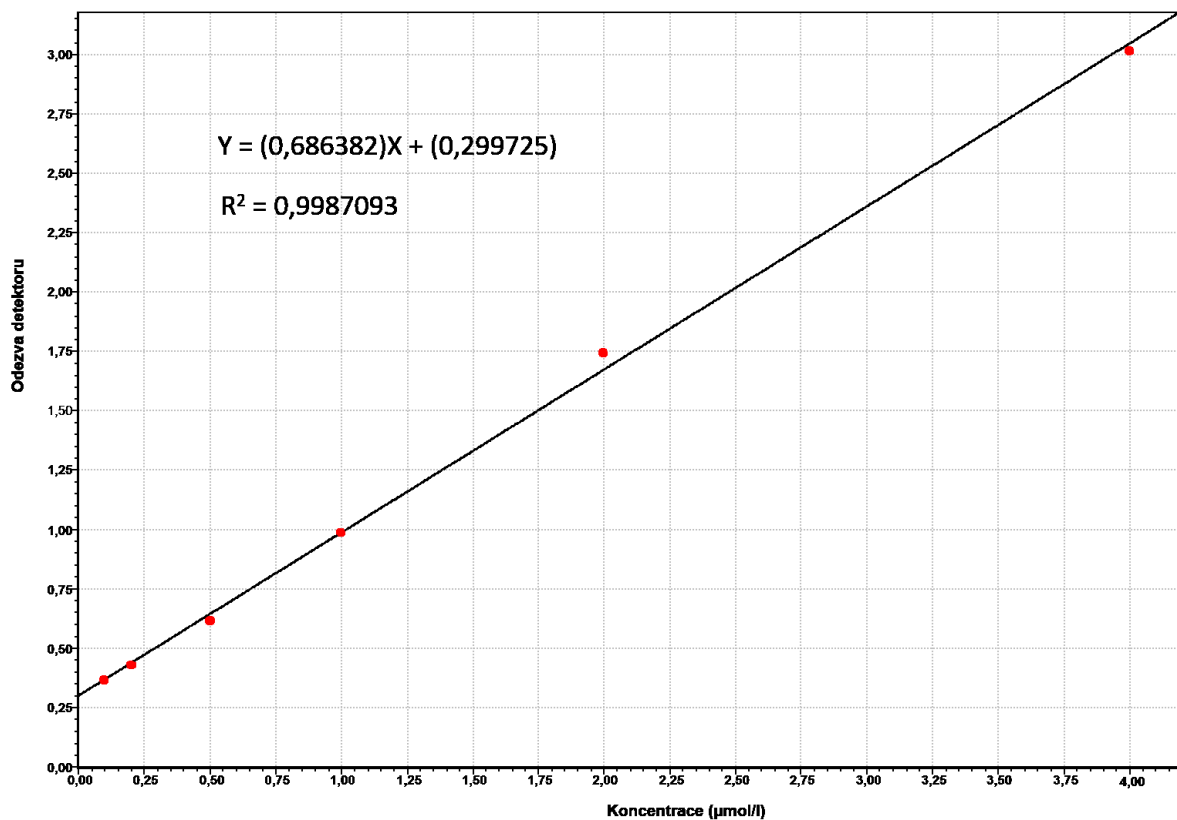
5.3.10 Limit kvantifikace

Limit kvantifikace neboli mez stanovitelnosti (LOQ, Limit of Quantification) také udává míru citlivosti metody. Hodnota vyjadřuje nejnížší koncentraci analyzované látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Pro biologický materiál se počítá jako poměr signálu k šumu krát 10. Hodnota LOQ pro močovinu byla vypočtena na 0,22 $\mu\text{mol/l}$.

Dolní mez stanovitelnosti (LLOQ, Lower Limit of Quantification) je hodnota nejnížší koncentrace analyzované látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Vypočítá se jako poměr signálu k šumu krát 5. LLOQ hodnota pro močovinu byla spočtena na 0,11 $\mu\text{mol/l}$. Dle směrnic EMA by měla kalibrační křivka začínat na této koncentraci.

5.3.11 Linearita

Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí 6 kalibračních hladin standartního roztoku močoviny a IS. Lineární rozsah byl v rozmezí 0,1–4 $\mu\text{mol/l}$. Spodní hladina odpovídá hodnotě LLOQ (**Obrázek č. 12**). Vzorke EBC pacientů, u kterých byly hladiny močoviny vyšší, než kalibrační rozsah metody, mohly být ředěny.



Obrázek č. 12: Kalibrační křivka

5.4 Aplikace metody na reálné vzorky

Zdali je metoda využitelná pro klinickou praxi bylo ověřeno stanovením koncentrace močoviny v EBC u 54 patientských vzorků laskavě poskytnutých II. Interní gastroenterologickou klinikou Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FNHK. Jelikož se u kuřáků očekávala vyšší hladina močoviny v EBC, byla kromě pohlaví a věku pacientů doplněna data o tom, zdali se jedná o kuřáka či nekuřáka.

Analýza všech vzorků proběhla úspěšně bez jakýchkoli komplikací. Koncentrace močoviny se s výjimkou jedno vzorku pohybovaly v kalibračním rozsahu metody. Nejnižší naměřená hodnota koncentrace byla 0,22 $\mu\text{mol/l}$, naopak nejvyšší koncentrace dosahovala hodnoty 11,95 $\mu\text{mol/l}$ (**Tabulka č. 11**).

Veškeré tyto vzorky byly již v minulosti neúspěšně analyzovány Ústavem klinické biochemie a diagnostiky FNHK. Referenční intervaly použité metody, rutinně stanovující koncentraci močoviny v séru, plazmě nebo v moči, se totiž řádově pohybují v jednotkách mmol/l .

Tabulka č. 11: Výsledky analýzy močoviny v EBC

Číslo pacienta	Kuřák/nekuřák	Pohlaví	Věk	Urea ($\mu\text{mol/l}$)
1	nekuřák	žena	38	0,38
2	občasný kuřák	žena	52	0,44
3	nekuřák	žena	44	1,66
4	nekuřák	muž	40	0,82
5	nekuřák	žena	46	0,35
6	nekuřák	muž	38	0,66
7	nekuřák	žena	63	0,58
8	nekuřák	muž	43	0,55
9	nekuřák	žena	30	0,50
10	nekuřák	žena	55	0,45

Tabulka č. 11: Výsledky analýzy močoviny v EBC - pokračování

Číslo pacienta	Kuřák/nekuřák	Pohlaví	Věk	Urea ($\mu\text{mol/l}$)
11	nekuřák	žena	26	2,08
12	nekuřák	žena	67	0,34
13	nekuřák	muž	32	0,33
14	nekuřák	žena	36	0,50
15	kuřák	žena	43	0,44
16	nekuřák	žena	44	0,55
17	kuřák	žena	45	0,61
18	kuřák	žena	57	0,59
19	nekuřák	muž	17	0,43
20	nekuřák	žena	30	0,34
21	stop kuřák	muž	42	0,61
22	nekuřák	muž	41	0,47
23	nekuřák	muž	39	0,46
24	kuřák	muž	24	0,30
25	nekuřák	muž	24	0,32
26	nekuřák	žena	40	0,61
27	kuřák	žena	49	0,40
28	nekuřák	žena	49	0,28
29	nekuřák	žena	43	0,75
30	kuřák	žena	33	0,39
31	nekuřák	žena	49	0,31
32	nekuřák	muž	27	0,47
33	nekuřák	muž	44	0,50

Tabulka č. 11: Výsledky analýzy močoviny v EBC - pokračování

Číslo pacienta	Kuřák/nekuřák	Pohlaví	Věk	Urea ($\mu\text{mol/l}$)
34	nekuřák	žena	49	0,22
35	kuřák	žena	35	0,57
36	kuřák	žena	36	11,95
37	kuřák	žena	57	0,40
38	kuřák	muž	57	0,41
39	kuřák	muž	65	0,50
40	kuřák	muž	50	0,47
41	kuřák	žena	46	0,84
42	kuřák	muž	41	0,43
43	kuřák	muž	44	0,48
44	kuřák	žena	36	1,66
45	kuřák	žena	37	3,79
46	kuřák	žena	41	1,30
47	kuřák	žena	44	0,33
48	kuřák	žena	48	0,29
49	kuřák	žena	56	0,74
50	kuřák	muž	53	0,35
51	nekuřák	žena	38	0,30
52	nekuřák	žena	31	0,37
53	nekuřák	žena	57	0,42
54	nekuřák	žena	51	0,40

6. ZÁVĚR

Byla vyvinuta chromatografická metoda pro stanovení koncentrace močoviny v kondenzátu vydechaného vzduchu. Jako optimální podmínky pro stanovení byly zvoleny:

Analytická kolona	Kinetex HILIC 100 A, 100 × 2,10 mm, 1,7 μm
Mobilní fáze	90 % (90 % ACN + 10 % MeOH + 0,1% FA) : 10 % LC-MS H ₂ O
Průtok	0,2 ml/min
Detekce	MS/MS - dle MRM přechodů
Teplota	25 °C
Vnitřní standard	¹⁵ N ₂ -močovina
Nastříkovaný objem	2 μl
Retenční čas močoviny	1,6 min

Metoda byla validována. Byly ověřeny tyto parametry: zdánlivý počet teoretických pater, faktor symetrie, opakovatelnost, přesnost, preciznost, selektivita, matricové efekty, výtěžnost, stabilita, linearita, limit detekce a limit kvantifikace.

Pro úpravu vzorků kondenzátu vydechaného vzduchu, před UHPLC-MS/MS analýzou, byl zvolen jednoduchý postup odpařování pomocí vakuové odparky.

Tato nová metoda bude aplikována v klinickém výzkumu i v praxi. Díky stanovení koncentrace močoviny v kondenzátu vydechaného vzduchu bude možné odhadnout ředění, a tudíž skutečné hladiny každého jednoho biomarkeru v dýchacích cestách, protože ředění je momentálně hlavním problémem pro správnou klinickou interpretaci naměřených dat.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Peterová E, Chládek J, Kohoutová D, et al. Exhaled Breath Condensate: Pilot Study of the Method and Initial Experience in Healthy Subjects. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2018;61(1):8-16. doi:10.14712/18059694.2018.17.
- [2] Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005;26(3):523-548. doi:10.1183/09031936.05.00029705.
- [3] Effros RM, Biller J, Foss B, et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(12):1500-1505. doi:10.1164/rccm.200307-920OC.
- [4] Jackson AS, Sandrini A, Campbell C, et al. Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(3):222-227. doi:10.1164/rccm.200601-107OC.
- [5] Cepelak I, Dodig S. Exhaled breath condensate: a new method for lung disease diagnosis. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(8):945-952. doi:10.1515/CCLM.2007.326.
- [6] Kubáň P, Foret F. Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Anal Chim Acta*. 2013;805:1-18. doi:10.1016/j.aca.2013.07.049.
- [7] Rosias PP, Dompeling E, Hendriks HJ, et al. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004;15(1):4-19. doi:10.1046/j.0905-6157.2003.00091.x.
- [8] Bondesson E, Jansson LT, Bengtsson T, et al. Exhaled breath condensate-site and mechanisms of formation. *J Breath Res*. 2009;3(1):016005. doi:10.1088/1752-7155/3/1/016005.
- [9] Czebe K, Barta I, Antus B, et al. Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir Med*. 2008;102(5):720-725. doi:10.1016/j.rmed.2007.12.013.

- [10] Effros RM, Dunning MB 3rd, Biller J, et al. The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(6):L1073-L1080. doi:10.1152/ajplung.00069.2004.
- [11] Turbo DECCS System. *Medivac.it* [online]. [cit. 2022-03-11]. Dostupné z: <https://www.medivac.it/en/turbo-deccs-systems/>
- [12] Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, et al. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax.* 2001;56(6):456-461. doi:10.1136/thorax.56.6.456.
- [13] Calušić AL, Varnai VM, Macan J. Acute effects of smoking and food consumption on breath condensate pH in healthy adults. *Exp Lung Res.* 2011;37(2):92-100. doi:10.3109/01902148.2010.521616.
- [14] Konstantinidi EM, Lappas AS, Tzortzi AS, et al. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *ScientificWorldJournal.* 2015;2015:435160. doi:10.1155/2015/435160.
- [15] Montuschi P, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(4):615-620. doi:10.1067/mai.2002.122461.
- [16] McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S, et al. Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations. *Thorax.* 2004;59(8):694-698. doi:10.1136/thx.2003.016949.
- [17] Kullmann T, Barta I, Antus B, et al. Environmental temperature and relative humidity influence exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2008;31(2):474-475. doi:10.1183/09031936.00128007.
- [18] Zakrzewski JT, Barnes NC, Costello JF, et al. Lipid mediators in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1987;136(3):779-782. doi:10.1164/ajrccm/136.3.779.
- [19] Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(5):663-669. doi:10.1164/ajrccm.165.5.2101018.

- [20] Huszár E, Vass G, Vizi E, et al. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J*. 2002;20(6):1393-1398. doi:10.1183/09031936.02.00005002.
- [21] American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children—1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(6):2104-2117. doi:10.1164/ajrccm.160.6.ats8-99.
- [22] Bajaj P, Ishmael F. Exhaled Breath Condensates as a Source for Biomarkers for Characterization of Inflammatory Lung Diseases. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*. 2013,pp.17-29. doi:10.4236/jasmi.2013.31004.
- [23] Effros RM, Biller J, Foss B, et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(12):1500-1505. doi:10.1164/rccm.200307-920OC.
- [24] Quan Z, Purser C, Baker RC, et al. Determination of derivatized urea in exhaled breath condensate by LC-MS. *J Chromatogr Sci*. 2010;48(2):140-144. doi:10.1093/chromsci/48.2.140.
- [25] Pitiranggon M, Perzanowski MS, Kinney PL, et al. Determining urea levels in exhaled breath condensate with minimal preparation steps and classic LC-MS. *J Chromatogr Sci*. 2014;52(9):1026-1032. doi:10.1093/chromsci/bmt150.
- [26] Folesani G, Corradi M, Goldoni M, et al. Urea in exhaled breath condensate of uraemics and patients with chronic airway diseases. *Acta Biomed*. 2008;79 Suppl 1:79-86.
- [27] Björkhem I, Blomstrand R, Ohman G. Determination of serum urea by mass fragmentography. *Clin Chim Acta*. 1976;71(2):199-205. doi:10.1016/0009-8981(76)90531-3.
- [28] Patterson BW, Carraro F, Wolfe RR. Measurement of ¹⁵N enrichment in multiple amino acids and urea in a single analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*. 1993;22(9):518-523. doi:10.1002/bms.1200220905.
- [29] Beylot M, David F, Khalfallah Y, et al. Determination of (¹³C) urea enrichment by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*. 1994;23(8):510-513. doi:10.1002/bms.1200230808.

- [30] Monge ME, Pérez JJ, Dwivedi P, et al. Ion mobility and liquid chromatography/mass spectrometry strategies for exhaled breath condensate glucose quantitation in cystic fibrosis studies. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013;30;27(20):2263-71. doi: 10.1002/rcm.6683.
- [31] Esther CR Jr, Jasin HM, Collins LB, et al. A mass spectrometric method to simultaneously measure a biomarker and dilution marker in exhaled breath condensate. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22(5):701-705. doi:10.1002/rcm.3408.
- [32] Kruizinga MD, Birkhoff WAJ, van Esdonk MJ, et al. Pharmacokinetics of intravenous and inhaled salbutamol and tobramycin: An exploratory study to investigate the potential of exhaled breath condensate as a matrix for pharmacokinetic analysis. *Br J Clin Pharmacol.* 2020;86(1):175-181. doi:10.1111/bcp.14156.
- [33] Nováková L, Douša M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [34] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - Bioanalytical Method Validation M10. *Ich.org* [online]. [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: <http://www.ich.org/products/guidelines/multidisciplinary/article/multidisciplinaryguidelines.html#10>
- [35] Javorská L. Vývoj bioanalytických metod pro stanovení diagnostických markerů a léčiv s využitím chromatografických technik. Hradec Králové, 2019. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie.
- [36] Kučerová K. Využití technik HPLC a UHPLC-MS/MS pro klinický výzkum. Hradec Králové, 2020. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie.
- [37] Wang J, Gao Y, Dorshorst DW, et al. Development of a multi-matrix LC-MS/MS method for urea quantitation and its application in human respiratory disease studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;133:96-104. doi:10.1016/j.jpba.2016.11.001.