

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ
ANALÝZY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ
O-ALKYL METHYLFOSFONOVÝCH KYSELIN
V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Nela Váňová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Alžběta Dlabková, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Bc. Karolína Nováčková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Nele Váňové, Ph.D. a konzultantce RNDr. Alžbětě Dlabkové, Ph.D. za poskytnuté rady, vedení mé diplomové práce a vstřícný přístup po celou dobu spolupráce.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením PharmDr. Nely Váňové, Ph.D. 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.“

Hradec Králové dne

.....

podpis

Obsah

1	Seznam zkratek	8
2	Úvod	9
3	Teoretická část	10
3.1	<i>Bojové chemické látky</i>	10
3.1.1	Nervově paralytické látky.....	10
3.1.1.1	Mechanismus toxicity.....	11
3.1.1.2	Sarin.....	11
3.1.1.3	Cyklosarin.....	12
3.1.1.4	Soman.....	12
3.1.1.5	Tabun.....	13
3.1.1.6	Látka VX.....	13
3.1.1.7	VR.....	14
3.2	<i>Biologické markery značící expozici biologicky aktivních látek</i>	14
3.2.1	Aktivita acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy.....	15
3.2.2	Peptidové adukty NPL.....	16
3.2.3	Tyrosinové adukty NPL.....	17
3.2.4	Fluoridem regenerované NPL.....	17
3.2.5	AMPA.....	18
3.3	<i>Léčba otrav NPL</i>	20
3.4	<i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie</i>	21
3.4.1	Hydrofilní interakční chromatografie.....	22
3.5	<i>Hmotnostní spektrometrie</i>	24
3.5.1	Iontová past.....	25
3.6	<i>HPLC-MS</i>	26
4	Cíl práce	28
5	Metodika	29
5.1	<i>Chemikálie a spotřební materiál</i>	29
5.2	<i>Stanovení AMPA v plazmě</i>	29
5.2.1	Příprava roztoků.....	29
5.2.1.1	Příprava roztoku PMPA, IMPA a EMPA.....	29

5.2.1.2	Příprava roztoků AMPA v lidské plazmě	30
5.2.1.3	Příprava roztoku HI-6.....	30
5.2.1.4	Příprava plazmy s přídavkem NPL (soman).....	30
5.2.1.5	Kalibrační řada AMPA v plazmě	30
5.2.2	Úprava vzorku pro stanovení volných AMPA	31
5.2.2.1	Vývoj metody ultrafiltrační separace volných AMPA od plazmatických proteinů	31
5.2.2.2	Precipitace proteinů a SPE extrakce	32
5.2.3	Chromatografická analýza a detekce	33
5.2.4	Stanovení volné PMPA a PMPA uvolněné reaktivací z plazmatických proteinů ve vzorku s přídavkem somanu.....	34
5.2.4.1	Úprava vzorku před analýzou	34
5.3	<i>Stanovení fluoridem regenerovaných NPL v plazmě.....</i>	34
5.3.1	Příprava roztoků	34
5.3.1.1	Příprava roztoku plazmy se standardem PMPA.....	34
5.3.1.2	Příprava roztoku plazmy se somanem	34
5.3.1.3	Příprava octanového pufru	35
5.3.1.4	Příprava 2M fluoridu draselného.....	35
5.3.2	Úprava vzorku před analýzou.....	35
5.3.3	Analýza a detekce.....	35
6	Výsledky a diskuze	37
6.1	<i>Stanovení AMPA v plazmě</i>	37
6.1.1	Kalibrační řady AMPA.....	37
6.1.2	Chromatogramy stanovení AMPA v plazmě.....	39
6.1.3	Vývoj metody ultrafiltrace.....	41
6.1.4	Stanovení AMPA ve vzorcích s přídavkem somanu.....	44
6.2	<i>Stanovení fluoridem regenerované NPL</i>	46
7	Závěr	51
8	Seznam obrázků	52
9	Seznam tabulek.....	53
10	Seznam použité literatury	54

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá chromatografickým stanovení O-alkyl methylfosfonových kyselin v lidské plazmě a úpravou biologického materiálu před vlastní analýzou. Teoretická část se zabývala problematikou jednotlivých skupin bojových látek, jejich mechanismem účinku a metabolismem v lidském těle. Praktická část byla věnována úpravě vzorku lidské plazmy s cílem vyvinout takový postup, který umožní následné stanovení koncentrace volných O-alkyl methylfosfonových kyselin jakožto metabolitů bojových chemických látek, a pomůže je tak odlišit od těch, které se uvolní z vazby na bílkoviny lidské krve. Druhým cílem bylo vyvrátit možnou interferenci mezi derivatizačním činidlem a volnými O-alkyl methylfosfonovými kyselinami.

Metodika a chromatografická analýza byly aplikovány na vzorky lidské plazmy s přídavkem pinakolylyl methylfosfonové kyseliny (PMPA) a ethyl methylfosfonové kyseliny (EMPA). Tyto vzorky byly nejprve upraveny pomocí centrifugační filtrace, jejíž postup byl předmětem vývoje. Centrifugace probíhala v centrifugačních zkumavkách Vivaspin 6. Nejeftektivnější postup byl takový, kdy zkumavky byly nejprve propláchnuty 400 µl vody a centrifugovány 10 min při 8 000 g. Následně byl na zkumavky nanesen vzorek, centrifugován (20 min, 8 000 g) a opět byly promyty 400 µl vody (centrifugace 10 min, 8 000 g). Po tomto kroku nastala precipitace a extrakce na pevné fázi. Následovala LC-MS analýza. Tento vyvinutý postup se osvědčil a vedl k oddělení volných O-alkyl methylfosfonových kyselin od těch navázaných na plazmatické bílkoviny.

Ve druhé části diplomové práce byl analyzován vzorek plazmy s přídavkem PMPA a s přídavkem somanu. Tyto vzorky prošly fluoridovou regenerací a extrakcí na pevnou fázi. Zároveň byly oba vzorky derivatizovány 2-[(dimethylamino)methyl]fenolem (2-DMAMP). Tento druhý cíl byl rovněž splněn, nebyla potvrzena daná interference mezi kyselinou a 2-DMAMP, tudíž by nemělo docházet k falešně pozitivnímu stanovení somanu ve vzorku i za skutečnosti, že by obsahoval danou O-alkyl methylfosfonovou kyselinu.

Klíčová slova: O-alkyl methylfosfonové kyseliny, bojová chemická látka, nervově paralytické látky, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza

Abstract

The thesis deals with the chromatographic determination of O-alkyl methyl phosphonic acids in human plasma and the treatment of biological material before the actual analysis. The theoretical part deals with the problems of individual groups of warfare agents, their mechanism of action and metabolism in the human body. The experimental part was devoted to the treatment of a human plasma sample in order to develop a procedure that would allow the subsequent determination of the concentration of free O-alkyl methyl phosphonic acids as metabolites of chemical warfare agents and thus help to distinguish them from those released from binding to human blood proteins. The second objective was to refute possible interference between the derivatization reagent and free O-alkyl methyl phosphonic acids.

The methodology and chromatographic analysis were applied to human plasma samples spiked with pinacolyl methyl phosphonic acid (PMPA) and ethyl methyl phosphonic acid (EMPA). These samples were first treated by centrifugal filtration, the procedure for which was under development. Centrifugation was carried out in Vivaspin 6 centrifuge tubes. The most efficient procedure was one in which the tubes were first rinsed with 400 μ l of water and centrifuged for 10 min at 8 000 *g*. Subsequently, the tubes were spotted with sample, centrifuged (20 min, 8 000 *g*) and washed again with 400 μ l of water (centrifugation 10 min, 8 000 *g*). After this step, precipitation and solid-phase extraction were carried out. LC-MS analysis followed. This developed procedure proved successful and led to the separation of free O-alkyl methyl phosphonic acids from those bound to plasma proteins.

In the second part of the thesis, a plasma sample with the addition of PMPA and with the addition of soman was analyzed. These samples were subjected to fluoride recovery and solid-phase extraction. Simultaneously, both samples were derivatized with 2[(dimethylamino)methyl]phenol (2-DMAMP). The second objective was also fulfilled; the given interference between the acid and 2-DMAMP was not confirmed, therefore there should be no false positive determination of soman in the sample even if it contained the given O-alkyl methyl phosphonic acid.

Key words: O-alkyl methyl phosphonic acids, chemical warfare agent, nerve agents, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

1 Seznam zkratek

Acetylcholin	ACh
Acetylcholinesteráza	AChE
Alkyl methylfosfonové kyseliny	AMPA
Bojová chemická látka	BChL
Butyrylcholinesteráza	BChE
Cyklohexyl methylfosfonová kyselina	CMPA
Ethyl methylfosfonovou kyselinu	EMPA
Extrakce na pevné fázi	SPE
Fotoionizace za atmosférického tlaku	APPI
Hmotnostní spektrometrie	MS
Chemická ionizace za atmosférického tlaku	APCI
Intravenózně	i.v.
Ionizace elektrosprejem	ESI
Isopropyl methylfosfonová kyselina	IMPA
Monitorování vybrané reakce	SRM
Nervově paralytické látky	NPL
Organizace pro zákaz chemických zbraní	OPCW
Pinakolyl methylfosfonová kyselina	PMPA
Selektivní záznam iontů	SIM
Severoatlantická aliance	NATO
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	HPLC
2-[(dimethylamino)methyl]fenol	2-DMAMP

2 Úvod

Ačkoliv jsou bojové chemické látky dle Úmluvy o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a jejich zničení od roku 1997 zakázány, události nejen z historie ale i z posledních pár let stále naznačují, že schopnost tyto sloučeniny a jejich analyty umět stanovit v organismu je vysoce žádoucí. Z historie je známo, že bojové chemické látky byly používány k řešení válečných konfliktů, v nynější době je však stále aktuálnější tzv. chemický terorismus. Konkrétně v roce 2017 šlo o látku VX nalezenou na letišti v Kuala Lumpur, ve stejném roce byl taktéž použit sarin v bojích v Sýrii. Se stále vyšším rizikem potenciálního teroristického útoku se zvyšují i nároky na metody stanovení [1].

Jelikož se tyto sloučeniny mohou do těla dostávat různými cestami a jelikož neovlivňují pouze lidský organismus, ale i hospodářství, nebo zvířata, je stále více žádoucí mít o těchto sloučeninách povědomí a zlepšovat metody, kterými je lze stanovit.

3 Teoretická část

3.1 Bojové chemické látky

Pojmem bojová chemická látka (BChL) označujeme takové látky, které mohou způsobit buď smrt, nebo dokážou poškodit lidi a zvířata pomocí svého chemického účinku. Mohou mít ale vliv i na hospodářství a potravinářské výrobky [2]. Jedná se o vysoce toxické látky, které jsou například schopné narušit mechanismus přenosu nervových vzruchů do jednotlivých orgánů [3].

Dle mechanismu poškození lidského organismu dělíme BChL na [2]:

- Nervově paralytické
- Zpuchýřující
- Všeobecně jedovaté
- Dusivé
- Dráždivé

3.1.1 Nervově paralytické látky

Jako nervově paralytické látky (NPL) označujeme sloučeniny, které jsou organického původu a ve své struktuře obsahují fosfor. Do organismu vstupují různými cestami a vyznačují se vysokou toxicitou vůči savcům včetně člověka společně s rapidním nástupem účinku [2].

Nervově paralytické látky dělíme na dvě skupiny, označované jako G látky a V látky. Rozdělení do jednotlivých skupin je uvedeno v Tabulka 1 [4]:

Tabulka 1: Rozdělení nervově paralytických látek

Nervově paralytické látky	
látky řady G	látky řady V
tabun (GA)	VX
sarin (GB)	VR
soman (GD)	čínská VX
cyklosarin (GF)	

3.1.1.1 Mechanismus toxicity

NPL jsou látky ovlivňující cholinergní nervový přenos. Podstatou mechanismu jejich účinku je ireverzibilní inhibice enzymu acetylcholinesterázy (AChE), kterou můžeme najít na cholinergních synapsích nervového systému, plic, neuromuskulárního spojení a na membráně erytrocytů [2], [4], [5]. Konkrétně dochází k fosforylaci serinu v aktivním místě enzymu, čímž dochází ke zvýšené stimulaci cholinergních receptorů [6].

AChE rozkládá (hydrolyzuje) acetylcholin (ACh), který vzniká z cholinu acetylací pomocí acetylkoenzymu A. Při inhibici AChE tak dochází k hromadění ACh v synapsích, a to jak v centrálním, tak i periferním a autonomním nervovém systému. Kvůli tomu dochází i ke zvýšenému dráždění odpovídajících receptorů, čemuž odpovídají centrální, nikotinové a muskarinové klinické příznaky [2], [4].

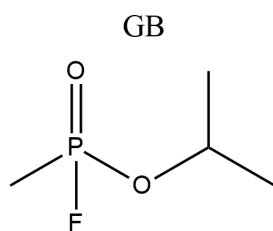
Centrální příznaky zahrnují třes, dechové problémy, ztrátu vědomí a záchvaty. Mezi muskarinové příznaky patří mióza, slinění, bronchospasmy, nauzea, zvracení a bradykardie. Mezi nikotinové příznaky řadíme svalovou slabost, hypertenzi, tachykardii a fascikulaci [4].

NPL jsou substrátovými analogy k ACh, a tudíž stejně jako jiné přirozené substráty vstupují do aktivního místa AChE, kde se kovalentně váží na hydroxylovou skupinu serinu. Zde dochází ke štěpení NPL a fosforylaci enzymu. Takto fosforylovaná AChE již nemůže štěpit ACh, nemluvě o faktu, že defosforylace enzymu trvá řádově až několik dní [7].

Podobný mechanismus účinku mají organofosfátové pesticidy, které jsou využívány napříč celým světem.

3.1.1.2 Sarin

Sarin, strukturně *O-isopropylmethylfluorofosfonát* (Obrázek 1), je též označován jako GB. Společně s ostatními (cyklosarin, soman, tabun a VX) byl vyvinut jako zbraň během druhé světové války. Taktéž byl zneužit i v bojích na Blízkém východě [8]. Stejně jako ostatní NPL, ovlivňuje nervový přenos, sarin však aktivuje i jiné neurotransmitery – např. kyselinu gama-aminomáselnou. Mimo to zapříčiňuje i změny v iontových kanálech, nebo pozměňuje molekuly zodpovědné za buněčnou adhezi [9].



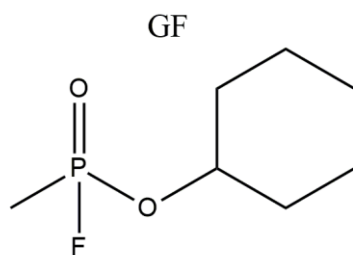
Exact Mass: 140,04024

Obrázek 1: Sarin

Chemické vzorce byly vytvořeny pomocí programu ChemDraw Ultra 20.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

3.1.1.3 Cyklosarin

Další NPL je cyklosarin (Obrázek 2), *O-cyklohexylmethylfluorofosfonát*. Jeho zkratka je GF. Při pokojové teplotě se jedná o kapalinu. K nejčastější expozici dochází skrze inhalaci aerosolu, případně po kontaktu s kůží, nebo očima. K manifestaci po inhalaci dochází již během sekund, zatímco u zkapalněné sloučeniny se příznaky objevují v řádech minut až hodin [10], [11].



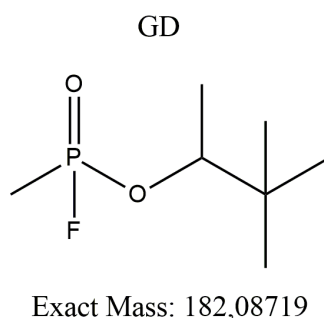
Exact Mass: 180,07154

Obrázek 2: Cyklosarin

3.1.1.4 Soman

Soman, *2-(fluoromethylfosforyl)oxy-3,3-dimethylbutan* (Obrázek 3). Ve své struktuře má vysoce rozvětvenou alkoxylovou skupinu a obsahuje dvě chirální centra. Podobně jako u jiných NPL, i u somanu probíhá specifický typ reakce (tzv. „stárnutí“, taktéž „aging“), při níž je po vzniku komplexu enzym-soman dochází k dealkylaci esterové skupiny somanu. Poté je nemožná reaktivace enzymu, což vyústí ve v trvalou nefunkčnost AChE (i navzdory aplikaci reaktivátoru) a hromadění ACh. U somanu probíhá aging nejrychleji ze všech NPL – mezi 5 až 8 minutami – zatímco u VX nejpomaleji – až 24 hodin [12], [13].

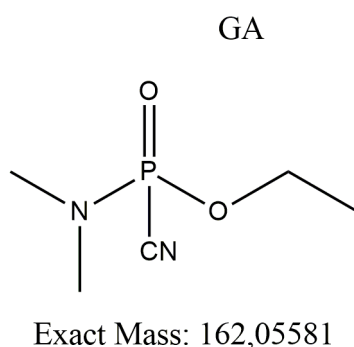
Jeho letální koncentrace u lidí je $70 \text{ mg} \times \text{min} / \text{m}^3$ a po inhalaci působí již během 10 minut, což z něho dělá jednu z nejtoxičtějších látek z řad NPL, jeho toxicita předstihuje sarin i tabun [14].



Obrázek 3: Soman

3.1.1.5 Tabun

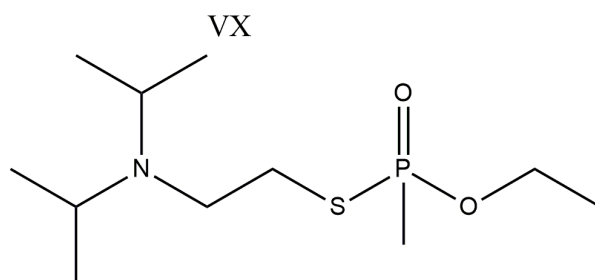
Tabun, taktéž *N,N*-dimethylfosforamidokyanidát (Obrázek 4), nebo GA, je látka dobře rozpustná ve vodě [15]. Oproti V-látkám, které uvolňují thioly, při hydrolyze tabunu dochází k uvolňování kyanidu. Vzhledem k jeho vysoké toxicitě, lze pro výzkumné účely použít diethylkyanofosfát s podobnými vlastnostmi [16].



Obrázek 4: Tabun

3.1.1.6 Látka VX

Sloučenina se systematickým vzorcem *O*-ethyl-*S*-((2-*N,N*-propyl)aminoethyl)-propyl (Obrázek 5) je vysoce toxická NPL reagující kromě AChE s celou řadou endogenních proteinů, například se sérovým albuminem. S albuminem tvoří addukty, které mohou být detekovány bioanalytickými metodami. Albumin je na svých tyrosinových reziduiích fosforylován zbytkem od ethyl-methylfosfonothiové kyseliny pocházející z VX [17].

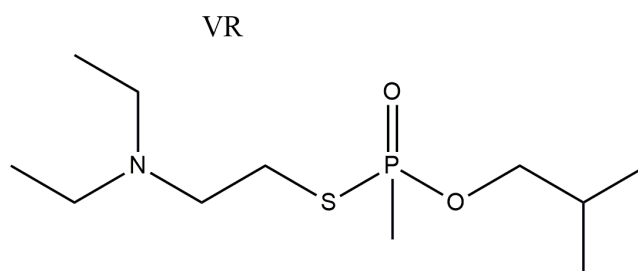


Exact Mass: 267,14219

Obrázek 5: VX

3.1.1.7 VR

Látka VR, tzv. „ruská látka VX“ se vzorcem S-(2-diethylamino)ethyl-O-(izobutyl)methylfosfonothionát (Obrázek 6) je strukturní izomer látky VX. Oproti látce VX je o něco méně prozkoumána, jelikož podklady o její existenci byly prokázány teprve nedávno. Je však známo, že se jedná o málo těkavou látku, která však dokáže pronikat kůží i sliznicemi. Látka VR je typická svým dlouhým setrváním v lidské krvi [18].



Exact Mass: 267,14219

Obrázek 6: VR

3.2 Biologické markery značící expozici biologicky aktivních látek

Jelikož jsou BChL převážně velmi reaktivní, lze jen velmi složitě v těle detekovat původní sloučeninu. Z tohoto důvodu se používají jako biologické markery otrav adukty s endogenními látkami, nebo metabolity BChL [1].

Z důvodu stále většího rizika zneužití BChL roste i potřeba včasného a citlivého stanovení metabolitů těchto sloučenin v lidském organismu. Doposud byly vyvinuty metody stanovující různé metabolity, nebo peptidové a proteinové adukty, případně adukty DNA pro většinu BChL. Zároveň byly tyto metody i validovány, a to buď

u pokusných zvířat, nebo v malé míře i u člověka. Většina markerů se stanovuje z moči, nebo krve [19].

Markery otrav NPL lze dle Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW) rozdělit na dvě skupiny, a to na primární a sekundární. Primární stačí k průkazu otravy NPL za předpokladu, že jsou prokázány dvěma metodami, případně ještě dalším markerem. Na druhé straně markery sekundární mohou sloužit pouze k potvrzení již zmíněného primárního markeru a nelze jimi danou otravu v organismu jednoznačně diagnostikovat. Mezi primární markery v plazmě (krvi) řadíme tyrosinové adukty, produkty fluoridové regenerace NPL, peptidové adukty či alkyl methylfosfonové kyseliny (AMPA) uvolněné reaktivátorem z enzymu inhibovaného příslušnou NPL, kdežto markery sekundární jsou volné AMPA rozpuštěné v plazmě [20], [21].

Krom stanovení specifických markerů expozice NPL existují i méně specifické metody jako je stanovení aktivity AChE dle Ellmana [6].

3.2.1 Aktivita acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy

Původní metodou, jež sloužila ke stanovení NPL, byla Ellmanova metoda, která měřila aktivitu AChE v erythrocytech a následně byla modifikována i na měření aktivity butyrylcholinesterázy (BChE). Mezi její nevýhody však patří neslučitelnost s retrospektivní detekcí a neschopnost specifické identifikace sloučenin [6].

Původní Ellmanova metoda je založena na reakci thiocholinu (acetylthiocholin pro AChE, butyrylthiocholin pro BChE) s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (tzv. Ellmanovo činidlo). Výsledkem je žlutý produkt 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina, kterou detekujeme spektrofotometricky. Tato metoda sestává ze dvou kroků. V tom prvním dochází k hydrolýze thioesteru (acetylthiocholinu) na thiocholin a kyselinu působením AChE nebo BChE. Druhý krok se skládá z reakce thiocholinu s chromogenem (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) za vzniku konjugátu [22], [23].

Absorpční maximum tohoto produktu je při 412 nm. Během hydrolýzy substrátu se zaznamenává zvýšená absorbance při již zmíněných 412 nm, z čehož lze odvodit aktivitu enzymu. Ta se vypočítá jako reakční rychlost z lineární části závislosti absorbance na vlnové délce. Reakce probíhá při pH 8 [22].

Ač může být tato metoda použita pro stanovení aktivity AChE a BChE v homogenátech tkání, plazmě či buněčných suspenzích, její limitací je interference s hemoglobinem při vlnové délce 412 nm. Proces je narušen vysokým množstvím hemoglobinu, což vedlo k vývoji modifikovaných metod. Interference však způsobují i látky obsahující buď oxim, či thiol [22], [23]. Oximy, stejně jako fluoridy, přesouvají organofosforový zbytek ze serinových residuí aktivního místa. Díky tomu se látky obsahující ve své molekule oxim využívají i v terapii otrav NPL, čímž se podrobněji zabývá kapitola 3.3 [25].

Ellmanova metoda je dnes běžně zavedena do praxe, a to především k posouzení zdravotního stavu těch, kteří pracují s organofosforovými inhibitory – zemědělci a průmysloví pracovníci [24].

Krom výše zmíněné lze pro stanovení aktivity esteráz použít i jiné metody, jako například titrační, elektrometrické, měření pH za použití indikátoru, fluorimetrické, spektrofotometrické, enzymové a polarografické. Z důvodu náročnosti, zdlouhavého měření, nebo nízké specifity enzymu a substrátu však žádná z těchto metod není uvedena do klinické praxe [24].

3.2.2 Peptidové adukty NPL

Peptidové adukty vznikají fosforylací serinových residuí v aktivním místě AChE či BChE [25]. BChE je snadno extrahovatelná z krevní plazmy, s NPL reaguje až pětsetkrát rychleji než s albuminem a oproti AChE se v séru vyskytuje ve výrazně vyšším množství. Schopnost detekovat inhibovanou BChE až 16 dní po vystavení se NPL z ní dělá jeden z nejefektivnějších biomarkerů pro retrospektivní detekci [6].

Princip extrakce BChE ze vzorku tkví v reakci BChE s protilátkami proti BChE, které jsou konjugované na ferromagnetický protein G. Po této extrakci následuje štěpení enzymu pomocí pepsinu a následně stanovení specifických fosforylovaných nonapeptidů. V současné době patří mezi nejpoužívanější metody analýzy spojení kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostní spektrometrií (MS) – LC-MS/MS [6].

AChE a BChE inhibované NPL podléhají procesu zvanému stárnutí. Tento proces vede ke ztrátě strukturálních informací o příslušné NPL. Nejrychleji ke stárnutí dochází u cholinesteráz inhibovaných somanem, pomaleji pak u cyklosarinu, sarinu

a tabunu [25]. Toto vede k nutnosti stanovovat nonapeptidové adukty NPL v jejich zestárlé (dealkylované) i původní nezestárlé formě [26].

Z důvodů užšího detekčního okna, je zde snaha o detekci takových proteinových aduktů, které mají delší životnost. Zároveň, ve srovnání s reaktivací pomocí fluoridových iontů (viz kapitola 3.2.4), se jedná o jednodušší metodu, která nabízí detekci různých aduktů, objevování nových potenciálních biomarkerů a je schopna identifikovat více aktivních míst enzym [27]. Ve studii B. G. Pantazides et al. (2014) byla snaha o zvýšení robustnosti metody, kdy se k pepsinovému trávení přidávaly nativní a značené peptidy. Analýza BUCHE pak probíhala pomocí spojení imunomagnetické separace a následné analýzy na principu LC-MS/MS s izotopovou dilucí [6]. Oproti tomu M. J. van der Schans et al. (2008) používali centrifugační ultrafiltry Amicon, po nichž následovala analýza pomocí HPLC a MS detekce s využitím skenu prekurzorových iontů [28].

3.2.3 Tyrosinové adukty NPL

NPL se v lidském těle váží na proteiny, kterými jsou například albumin, či BChE [6]. Tyrosinové adukty v lidském těle vznikají elektrofilní aromatickou substitucí (fosforylací) tyrosinových zbytků na albuminu [25], [29].

Modifikovaný albumin je poměrně častý biomarker, na jeho tyrosin v pozici 411 se váží NPL. K tomuto procesu dochází u sarinu, somanu, cyklosarinu a tabunu. Na rozdíl od ostatních proteinů tento tyrosin nepodléhá stárnutí, ani nedegraduje v přítomnosti oximů. Zároveň, ač se jedná o nejhojněji zastoupený protein v lidské krvi, s NPL reaguje až pětisetnásobně pomaleji než cholinesterázy [6], [25], [29].

Byla objevena celá řada analytických technik, díky kterým lze analyzovat markery otrav NPL. Pro tyrosinové adukty například ve své studii N. H. Williams et al. (2006) použili kapilární LC s C₁₈ kolonou a mobilní fázi složenou z A: 0,05% TFA ve vodě a B: 0,05% TFA v acetonitrilu. Pro MS detekci byl použit trojitý kvadrupól [25].

3.2.4 Fluoridem regenerované NPL

Jednou z technik je forma reaktivace pomocí fluoridových iontů – fluoridová reaktivace. Dochází k uvolnění fosforylované skupiny z enzymu během inkubace s fluoridovými ionty, čímž se původní NPL zregeneruje a lze ji stanovit [28].

Tyto produkty mohou být extrahovány a detekovány pomocí plynové chromatografie s MS detekcí, nebo plamenově-fotometrickou detekcí s využitím dusíko-fosforového detektoru [25]. Další možností je stanovení pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou MS detekcí po regeneraci sarinu a následné derivatizační reakci 2-[(dimethylamino)methyl]fenolem (2-DMAMP) [30].

V porovnání s ostatními metodami, fluoridová reaktivace nemůže být použita pro zestárlé adukty [27], protože stárnutí zvyšuje odolnost vůči vytěsnění organofosforové skupiny fluoridem [25].

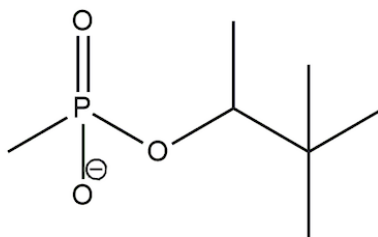
3.2.5 AMPA

AMPA jsou produkty hydrolýzy NPL. G látky s obecným vzorcem O-alkyl alkyl(methyl, ethyl, n-propyl, i-propyl)fosfonofluoridáty a V látky s obecným vzorcem O-alkyl S-dialkyl(methyl, ethyl, n-propyl, i-propyl)aminoethyl alkyl(methyl, ethyl, n-propyl, i-propyl)fosfonthioáty poskytují hydrolytické produkty ve formě alkyl alkylfosfonových kyselin [1], [31].

NPL podléhají po vstupu do lidského organismu degradaci, tudíž by jejich analýza byla vhodná pouze v případě, že by vzorky krve byly odebrány těsně po expozici. Z tohoto důvodu je vhodnější detekovat AMPA jakožto biomarkery expozice NPL [1], [25].

Konkrétně u somanu to je pinakolyl methylfosfonová kyselina (PMPA) (Obrázek 7), u sarinu isopropyl methylfosfonová kyselina (IMPA) (Obrázek 8), u cyklosarinu cyklohexyl methylfosfonová kyselina (CMPA) (Obrázek 9) a u látky VX se jedná o ethyl methylfosfonovou kyselinu (EMPA) (Obrázek 10) [1].

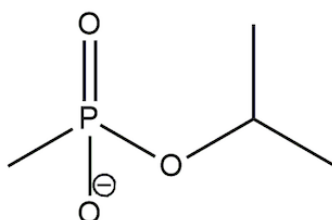
PMPA



m/z: 179.08426 (100.0%), 180.08761 (7.6%)

Obrázek 7: PMPA

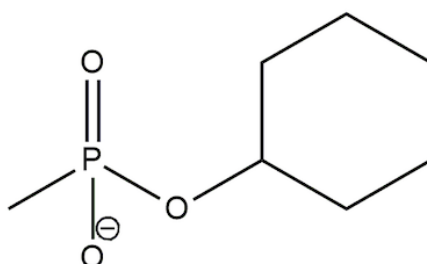
IMPA



m/z: 137.03731 (100.0%), 138.04066 (4.3%)

Obrázek 8: IMPA

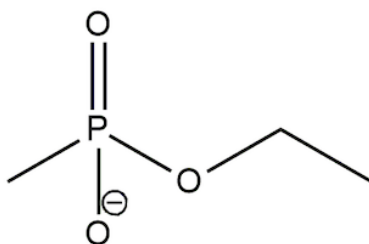
CMPA



m/z: 177.06861 (100.0%), 178.07196 (7.6%)

Obrázek 9: CMPA

EMPA



m/z: 123.02166 (100.0%), 124.02501 (3.2%)

Obrázek 10: EMPA

Jak již bylo výše zmíněno, AMPA jsou kyseliny rozpustné v plazmě (séru) a slouží jako sekundární biomarkery (tzn. jsou pouze potvrzením otravy, která již byla prokázána jiným – primárním – markerem) [20], [21].

AMPA se však mohou uvolňovat i po reaktivaci inhibované AChE či BChE, a to příslušným reaktivátorem. Tím může být například oxim, který je zodpovědný za následné obnovení aktivity enzymu skrze nukleofilní atak oximu na inhibovanou cholinesterázu. Takto uvolněné AMPA mohou sloužit jako primární marker, avšak příprava vzorku pro ně musí být specifická. Nutno podotknout, že AMPA jsou nejspecifičtější markerem expozice NPL v moči [20], [21], [32].

Dle Hermana et al. (2020) byla pro stanovení AMPA využita nejprve úprava pomocí extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction, SPE) na kolonkách Strata Si-1 (200 mg, 3 ml) a po následném odpaření pod proudem dusíku byly AMPA detekovány pomocí LC-MS metody [1]. Tato metoda v upravené formě byla použita pro praktickou část této diplomové práce.

3.3 Léčba otrav NPL

Mezi hlavní léčebné prostředky patří oximy, atropin a neuroprotektivní léky. **Atropin** patří mezi klíčové komponenty v léčbě otravy NPL. Jedná se o blokátor muskarinových receptorů, který je dle britské armády a Severoatlantické aliance (NATO) doporučován v dávce 5-10 mg intravenózně (i.v.) [4].

Oximy jsou látky, které jsou při včasném podání (před zestárnutím) schopné reaktivace AChE. Výsledná odpověď organismu však nezáleží jen na typu BChL ale

i typu oximu. Existují studie, které potvrzují, že některé NPL odpovídají na léčbu jinak v závislosti na zvoleném oximu, vychází však pouze z *in vitro* testů a studií prováděných na zvířatech [4].

Nejčastěji využívaným oximem je pralidoxim a to v dávce 2 g i.v. Dospělý člověk však může být léčen i vyššími dávkami a to buď rozděleně, či infuzí [4].

Nutno zmínit, že existuje i negativní účinek oximů. Při jejich dlouhodobém užívání může dojít k inaktivaci střevních enzymů, proto je vždy nutné zvážit závažnost otravy a dbát na převýšení benefitů nad riziky léčby [4].

Vojáci a tzv. „first responders“ (speciálně vyškolené osoby, povolané v život ohrožujících situacích [33]) mohou mít přístup ke speciálně navržené terapii ve formě autoinjektorů, které obsahují atropin, oxim a mohou obsahovat i antikonvulziva. Tyto injekce se podávají intramuskulárně [4].

Dle studií prováděných na hlodavcích zjišťujeme, že akutní expozice NPL vede ke zvyšování permeability hematoencefalické bariéry a způsobuje dlouhodobé poškození CNS. Z tohoto pohledu je tedy výzkum a výroba neuroprotektivních látek vysoce žádoucí. V blízké budoucnosti se tak mohou začít používat například propofol, či ketamin. Benzodiazepiny se již standardně v antidotní terapii využívají [4].

3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) řadíme mezi separační metody, při kterých dochází k distribuci látky mezi dvě nemísitelné fáze, a to stacionární a mobilní. K umožnění distribuce vzorku mezi tyto dvě fáze je zapotřebí fázové rozhraní, kdy při dělení látek dochází k mnohonásobnému ustalování rovnováhy právě mezi tyto dvě fáze. Samotnou distribuci nám pak popisuje distribuční konstanta K_D . Čím je hodnota K_D vyšší, tím déle zůstanou molekuly vzorku ve stacionární fázi, tudíž mají vyšší retenci [34].

V námi zmíněné HPLC je mobilní fází kapalina a stacionární fáze je tuhá látka. U HPLC je mobilní fáze čerpána pomocí vysokotlakého čerpadla [34].

HPLC instrumentace začíná zásobníky mobilních fází, ze kterých je pomocí vysokotlakého čerpadla čerpána mobilní fáze, která skrz autosampler (dávkovač)

putuje nejdříve na předkolonu a později na kolonu. Ta je umístěna v termostatu z důvodu udržování potřebné teploty. Za kolonou zpravidla nalézáme detektor spojený s příslušným počítačovým systémem (detektor může být například UV/VIS, fluorescenční, či hmotnostní). Mobilní fáze musí být před vstupem do systému odplyněna, k čemuž dochází v tzv. degaseru (odplynovač) [34].

U HPLC můžeme využít řadu chromatografických systémů. Existuje systém s normálními fázemi, kde stacionární fáze je polární a mobilní fáze má polaritu nižší než stacionární, dále pak systém reverzních fází, kde je tomu přesně naopak. Dále lze zmínit například iontově výměnnou chromatografii, či hydrofilní interakční chromatografii (Hydrophilic interaction chromatography, HILIC), o které se rozepíši dále [34].

3.4.1 Hydrofilní interakční chromatografie

Spojení HILIC (Obrázek 11) bylo poprvé použito u techniky, při které interagovaly analyty s hydrofilní stacionární fází, a k eluci docházelo za pomoci relativně hydrofobní dvojsložkové mobilní fáze, která obsahovala vodnou komponentu jakožto dostatečně silné eluční činidlo [34]. V současné době je metoda HILIC vysoce robustní a používá se pro separaci hydrofobních a polárních látek [35].

Konkrétní mechanismus těchto interakcí zatím není zcela znám. Předpokládá se rozdělení analytů mezi hydrofilní vodnou složku imobilizovanou na stacionární fázi a hydrofobní složkou mobilní fáze. Na polární centra ve stacionární fázi se preferenčně váží molekuly vody, což má za následek vznik difúzní vrstvy, jejíž gradient koncentrace vody stoupá směrem k mobilní fázi. Jinými slovy se tak stacionární fáze dá označit za jakéhosi „přenašeče“ vody [34].

Dále se v mechanismu HILIC uplatňují vodíkové vazby, iontové a hydrofobní interakce. Souhrnně lze tedy říct, že princip HILIC systému lze pokládat za komplexní [34].

Jako polární stacionární fáze je využíván silikagel, nebo stacionární fáze, které obsahují aminovou či hydroxyethylovou skupinu, zwitterion, případně polární skupiny, které jsou navázány na polymerní, hybridní, či silikagelový materiál. Za jedny z nejpoužívanějších stacionárních fází jsou považovány silikagelové fáze a silikagely s aminopropylou skupinou. Mobilní fáze obsahuje převážně organickou složku –

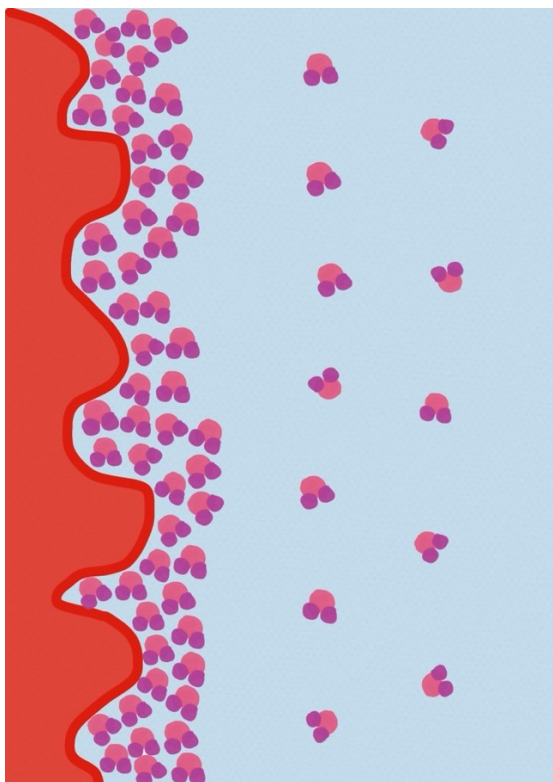
hlavně acetonitril v minimálním množství 50 %. Vodná složka mobilní fáze je pak tvořena malým přídávkem vody nebo těkavého pufru. Pro zachování podmínek je nutné, aby mobilní fáze obsahovala alespoň 2,5 % vodné složky [34].

Charakterem stacionární fáze se HILIC podobá systému normálních fází, avšak využívá mobilní fáze používané u reverzních fází. Což je důvodem, proč lze na HILIC analyzovat takové sloučeniny, které se na reverzních fázích špatně zadržují. Pořadí eluovaných sloučenin se však u HILIC a reverzní fáze liší. HILIC je vhodná pro analýzu hydrofilních, silně polárních a ionizovaných látek při zachování technik používaných na reverzních fázích. HILIC nabízí řadu výhod oproti chromatografii na reverzních fázích. Řadíme mezi ně nízký protitlak při použití vysoce organických eluentů, díky němuž můžeme použít dlouhé kolony a/nebo vyšší průtoky. Dalšími výhodami je lepší tvar píku zásaditých sloučenin, které v systému reverzních fází často poskytují asymetrické píky. Oproti systému normálních fází je HILIC výrazně reprodukovatelnější a díky složení mobilní fáze je použitelný i ve spojení s MS detekcí, která je s mobilními fázemi v normálním systému nekompatibilní [34], [35], [36], [37].

Na druhé straně má HILIC i své nevýhody, mezi které se řadí dlouhá doba ekvibrace kolony s mobilní fází, což je limitující hlavně z důvodu, že se poté HILIC provádí zpravidla ve formě izokratické eluce [36].

Nejhojněji se HILIC používá v oblasti biologických technologií, farmaceutických věd a enviromentálních studií. Konkrétně je tato metoda vhodná pro separaci sacharidů a nukleosidů, kvantitativní analýzu glykopeptidů, hodnocení kvality potravin, ale i analýzu metabolitů v plazmě a moči [37].

Vzhledem k výše zmíněným vlastnostem HILIC se tato metoda jevila jako nejvhodnější pro námi zamýšlené využití, tzn pro analýzu nízkomolekulárních polárních sloučenin, mezi které patří i AMPA.



Obrázek 11: Schéma HILIC: červeně je označena stacionární fáze, modře mobilní fáze a molekuly vody vytváří difúzní vrstvu (volná inspirace dle Lucie Novákové, Michal Douša, a Petr Česla a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 2. vydání. Praha: Česká chromatografická škola, 2021)

3.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda založená na ionizaci molekul ve vzorku, který je v plynné fázi, a následné separaci těchto molekul v závislosti na poměru jejich hmotnosti ku náboji (m/z). Výsledný záznam se graficky vyjadřuje jako hmotnostní spektrum, tedy závislost relativní intenzity iontů na poměru m/z [38].

Na základě výsledného hmotnostního spektra tak lze získat informaci o molekulové hmotnosti molekuly, případně jejich fragmentů, a tím identifikovat a stanovit danou látku [38]. Mimo to jsou MS detektory i vysoce citlivé a selektivní. Je dnes běžnou praxí, že se využívají v bioanalytických výzkumech, potravinové analýze, proteomice, či při vývoji a výzkumu léků [34].

K ionizaci analytů se používá množství technik. Mezi nejužívanější techniky ve spojení s HPLC patří ionizace za atmosférického tlaku (tzv. API techniky), kam spadá ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a také fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [34].

Tyto tři techniky se řadí mezi tzv. měkké ionizační techniky, u kterých nenastává tak velká fragmentace v průběhu ionizace. U nich po ionizaci dochází ke vzniku pseudomolekulárních iontů $[M+H]^+$ u záznamu kladných iontů, nebo $[M-H]^-$ u záznamu záporných iontů. Oproti tomu tvrdé ionizační techniky zapříčiňují rozsáhlou fragmentaci tím, že molekula získá velký nadbytek své vnitřní energie a dochází u nich často k zániku molekulárního iontu, který posléze ve spektru není vidět. Existují k nim i knihovny spekter [34].

Hmotnostní analyzátor najdeme mezi iontovým zdrojem a detektorem. Jeho funkcí je rozdělit ionty na základě m/z poměru a jejich následné urychlení a fokusace [34].

Je běžnou praxí MS spojovat s chromatografickými technikami jako jsou plynová chromatografie, či již zmíněná HPLC [38].

Mezi nejpoužívanější analyzátory patří kvadrupól, trojný kvadrupól, iontová past, orbitální past, průletový analyzátor a iontová cyklotronová rezonance.

3.5.1 Iontová past

Iontová past (Ion Trap) je analyzátozem, do kterého jsou ionty dávkovány z externího iontového zdroje pomocí krátkých napěťových pulzů. Díky tlumícímu plynu (převážně helium) jsou ionty drženy uprostřed pasti. Z důvodu malého prostoru uvnitř pasti je potřeba zajistit, aby nedošlo k jejímu přeplnění a následně ke vzniku prostorového náboje. Ten by mohl způsobit nesprávné výsledky měření hmoty [39].

Jedná se o typ kvadrupólového MS analyzátoru složeného ze tří elektrod. Dvě z nich jsou téměř identické, liší se pouze počtem otvorů v elektrodách, a nazývají se koncové hyperbolické elektrody. První obsahuje jeden otvor, kterým elektrony nebo ionty vstupují, a druhá obsahuje otvorů více – pro průchod iontů na detektor. Třetí z nich je tzv. prstencová elektroda a je umístěna mezi koncovými elektrodami [40].

Principem analýzy na iontové pasti je lineární zvyšování amplitudy střídavého napětí na prstencovou elektrodu. Po dosažení specifické amplitudy pro daný iont dojde k jeho vypuzení na detektor, jelikož každý iont je vypuzován s jeho vlastní specifickou amplitudou [39], [40].

Iontová past může mít dvě formy – sférickou a lineární [41].

Sférická iontová past obsahuje ve svém centru prstencovou elektrodu, na níž se aplikuje potenciál a kolem ní dvě další elektrody uzavřené hyperbolickým víkem. Cílové ionty jsou následně zachyceny v prostoru mezi těmito dvěma elektrodami. Následně dochází ke střídání stejnosměrného a střídavého napětí, čímž dojde k nestabilitě daného iontu, který je posléze vyvržen na detektor [41].

Oproti tomu lineární iontová past využívá systém čoček, které dané ionty odpuzují směrem do středu pasti. Následně jsou ionty vyvrženy z pasti buď axiálně, nebo radiálně – záleží na konstrukci dané iontové pasti. Past s axiálním vypuzením je používána při tandemovém systému, zatímco lineární iontovou past s radiálním vypuzením lze použít jako detektor i samostatně. Obecně je lineární iontová past považována za efektivnější pro detekci iontů než past sférická. Mimo jiné má lepší fokusaci a zachycení iontů, což zlepšuje jejich vypuzení a následnou detekci. Oproti trojrozměrným pastím má větší vnitřní objem, což přispívá k vyšší plnicí kapacitě iontů [41].

3.6 HPLC-MS

Spojení kapalinové chromatografie s MS je považováno za metodu volby v analýze sloučenin obsažených v biologickém materiálu. Jedním z problémů, který může nastat při analýze tohoto typu jsou tzv. matricové efekty [42].

Matricové efekty jsou způsobené látkami pocházejícími z matrice, ze které pochází vzorek a které se současně koeluuji v blízkosti naší stanovované látky. Zároveň mohou interagovat s procesem ionizace, způsobovat potlačení (supression), nebo zesílení (enhancement) MS signálu. Tyto problémy bývají způsobené především ionizací za atmosférického tlaku. Příčinou je změna vlastností roztoku mobilní fáze (případně plynu), která je způsobená méně těkavými až netěkavými látkami – ty mění schopnost tvořit a následně odpařovat kapičky, které by v plynné fázi následně putovaly na detektor [43]. Jedná se o efekty, které jsou nepříznivé, ale na které třeba dbát při analýze biologického materiálu. Naštěstí existuje celá řada metod, díky kterým lze tyto efekty minimalizovat. Patří mezi ně použití vhodného vnitřního standardu, který nám poukáže na výchyly v měření i na úrovni ionizace, upravení chromatografických podmínek, nebo cílená úprava vzorku před analýzou, která v ideálním případě odstraní možné zdroje matricových efektů. Použití vhodného

vnitřního standardu vykompenzuje také chyby, které mohou vzniknout v průběhu úpravy vzorku.

Výsledkem detekce pomocí MS může být více záznamů. V této diplomové práci byl uplatňován selektivní záznam jednoho nebo více iontů (Selected Ion Monitoring, SIM), který je vyjádřen jako závislost signálu námi vybraného iontu na čase. Byl použit i sken selektivního monitorování vybrané reakce (Selected Reaction Monitoring, SRM), kde se sledují charakteristické fragmentové ionty [34].

4 Cíl práce

Teoretická část mé diplomové práce si kladla za cíl seznámit čtenáře s problematikou NPL, jejich metabolismem a biomarkery NPL, které lze stanovit chromatografickými metodami.

Cílem praktické části diplomové práce bylo vyvinout postup úpravy vzorku plazmy, který povede k oddělení plazmatických bílkovin (především BChE) od nízkomolekulárních látek rozpuštěných v plazmě před stanovením AMPA jako biomarkerů otrav NPL, což umožní odlišit volné AMPA od těch, které se uvolní reaktivací z plazmatických bílkovin. Úprava vzorku specifická pro AMPA uvolněné z vazby na bílkoviny se vyžaduje z toho důvodu, aby mohly být nalezené AMPA považovány za primární biomarker, tedy sám o sobě dostačující důkaz otravy NPL.

Konkrétně šlo o stanovení markeru od somanu (PMPA).

Dalším cílem bylo ověřit, zda přítomné volné AMPA nereagují s derivatizačním činidlem 2-DMAMP a neinterferují tak se zavedenou metodou stanovení fluoridem regenerovaných NPL.

5 Metodika

5.1 Chemikálie a spotřební materiál

PMPA (97%) a EMPA (98%) byly zakoupeny u firmy Merck (Darmstadt, Německo), IMPA (metanolvý roztok) pak u firmy Cerilliant (Darmstadt, Německo). Soman (98%, stanoveno GC-MS) pochází z Vojenského výzkumného ústavu (Brno, Česká republika). Asoxim dichlorid (HI-6) byl syntetizován na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Vojenské lékařské fakulty, s čistotou (HPLC-UV) ≥ 90 %. Acetonitril (pro LC-MS) pochází od firmy Supelco (Darmstadt, Německo). Ultračistá deionizovaná voda byla připravena pomocí úpravy vody Aqua Osmotic 06 firmy Aqua Osmotic (Tišnov, Česká republika). Metanol (pro LC-MS) a bezvodý isopropanol byly zakoupeny u firmy VWR Chemicals BDH (Rochester, NY). Dusík pochází z generátoru dusíku NM32LA firmy Peak Scientific (Inchinnan, Velká Británie). Octan amonný, bezvodý octan sodný ($\geq 99,0\%$), fluorid draselný ($\geq 99,5\%$) a 2-DMAMP byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Darmstadt, Německo). Octová kyselina (pro LC-MS) pochází od firmy Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika). Mravenčan amonný (pro MS) byl zakoupen u firmy Fluka Analytical (Darmstadt, Německo). Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) o pH 7,4, rovněž od firmy Sigma-Aldrich (Darmstadt, Německo) byl připraven dle návodu výrobce rozpuštěním 1 tablety ve 200 ml deionizované vody. Pro výzkumné účely byla použita dobrovolně darovaná plazma od pracovníků Katedry toxikologie a vojenské farmacie.

Při analýze byly použity Ultrafiltrační zkumavky Vivaspin 500 a Vivaspin 6 od firmy Sartorius (Goettingen, Německo), SPE kolony Strata Si-1 Silica (55 μm , 70 Å, 200 mg/3 ml) a Strata-X 33 μm Polymeric Reversed Phase (30 mg/1 ml) od firmy Phenomenex (Torrance, USA). HPLC kolony Kinetex HILIC (2,6 μm , 150 \times 3 mm) a Gemini NX (5 μm \times 150 mm \times 4,6 mm) rovněž pocházejí od firmy Phenomenex (Torrance, USA).

5.2 Stanovení AMPA v plazmě

5.2.1 Příprava roztoků

5.2.1.1 Příprava roztoku PMPA, IMPA a EMPA

Zásobní roztok PMPA o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním 5 mg PMPA v 5 ml deionizované vody.

Roztok PMPA, který byl použit jako vnitřní standard (IS) pro analýzu EMPA byl připraven smícháním 500 µl tohoto zásobního roztok s 500 µl deionizované vody (výsledná koncentrace 0,5 mg/ml).

IMPA sloužila jako IS pro analýzu PMPA. Zásobní roztok IMPA o koncentraci 0,5 mg/ml byl připraven smícháním 50 µl metanolového roztok (koncentrace 1 mg/ml) s 50 µl acetonitrilu.

Zásobní roztok EMPA o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním 5 mg EMPA v 5 ml deionizované vody.

5.2.1.2 Příprava roztoků AMPA v lidské plazmě

Vzorky pro vývoj metody oddělování volných AMPA od těch navázaných na plazmatické bílkoviny byly připraveny přidáním 50 µl zásobního roztoku PMPA, nebo EMPA k 950 µl lidské plazmy. Výsledná koncentrace AMPA ve vzorku činila 50 µg/ml.

5.2.1.3 Příprava roztoku HI-6

Roztok HI-6 byl připraven rozpuštěním 100 mg HI-6 v 10 ml deionizované vody.

5.2.1.4 Příprava plazmy s přidavkem NPL (soman)

20 mg koncentrovaného somanu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodného isopropanolu. 20 µl tohoto roztoku bylo přidáno k 1980 µl plazmy. Následně byla plazma inkubována ve vyhřívané třepačce (MTC-100 Thermo Shaker Incubator, Hangzhou, Čína) po dobu 6 hodin při 37 °C a 300 rpm.

5.2.1.5 Kalibrační řada AMPA v plazmě

Kalibrační řada obsahovala 7 bodů. Nejprve byly naředěny vzorky PMPA (příp. EMPA) deionizovanou vodou postupně pomocí dvojkové dělicí řady na koncentrace:

1. 1 mg/ml
2. 0,5 mg/ml
3. 0,25 mg/ml
4. 125 µg/ml
5. 62,5 µg/ml
6. 31,25 µg/ml
7. 15,63 µg/ml

V první zkumavce byl zásobní roztok PMPA, příp. EMPA (z kapitoly 5. 2. 1. 1) V následujících šesti zkumavkách bylo po 0,5 ml deionizované vody. Z první zkumavky bylo 0,5 ml přeneseno pipetou do druhé zkumavky, která již obsahovala deionizovanou vodu. Stejný postup se opakoval až do poslední zkumavky.

Následně bylo přidáno vždy 50 μ l z každé zkumavky do 450 μ l plazmy, tudíž vznikly výsledné koncentrace, vždy se stejným množstvím matrice:

1. 100 μ g/ml
2. 50 μ g/ml
3. 25 μ g/ml
4. 12,5 μ g/ml
5. 6,25 μ g/ml
6. 3,125 μ g/ml
7. 1,563 μ g/ml

Do každé zkumavky bylo rovněž přidáno 5 μ l roztoku IS. Takto připravené kalibranty prošly procesem precipitace proteinů, extrakcí na pevné fázi (Solid Phase Extraction, SPE) a analýzou popsanou dále. Kalibrační křivka byla sestrojena v programu MS Excell jako závislost poměru ploch pod píkem analytu a IS na koncentraci analytu.

5.2.2 Úprava vzorku pro stanovení volných AMPA

5.2.2.1 Vývoj metody ultrafiltrační separace volných AMPA od plazmatických proteinů

Pro separaci volných AMPA od plazmatických bílkovin bylo testováno použití centrifugačních filtračních zkumavek Vivaspin 500 a Vivaspin 6.

Nejprve byla optimalizována doba centrifugace. Zkumavky s plazmou byly centrifugovány po dobu 5, 10 nebo 30 min a byl vyhodnocen objem kapaliny, který zůstal ve vrchní části ultrafiltrační zkumavky – ve frakci bílkovin.

Do zkumavek byla plazma s přídavkem AMPA (50 μ g/ml) pipetována přímo bez iniciálního proplachu nebo byly prvně propláchnuty 400 μ l vody nebo fosfátového pufru (PBS) a centrifugovány 10 min při 20 °C a 8 000 \times g. Po nanesení 500 μ l vzorku následovala centrifugace 20 min při 8 000 \times g. Následně bylo do zkumavky přidáno opět 400 μ l PBS nebo vody a opět byly centrifugovány 20 min při 8 000 \times g.

Všechny varianty postupu při proplachování ultrafiltračních zkumavek před a po nanesení vzorku shrnuje Tabulka 2.

Po ultrafiltraci byla provedena precipitace proteinů, SPE a LC-MS analýza vzorku (viz následující kapitoly 5. 2. 2. 2 a 5. 2. 3) v obou částech ultrafiltrační zkumavky – ve vrchní části ve frakci bílkovin i ve spodní části ve frakci nízkomolekulárních látek. Účinnost ultrafiltrace byla vyhodnocena na základě porovnání množství AMPA stanoveného v obou frakcích s množstvím AMPA stanoveném v kontrolním vzorku (kalibrační řada), který byl upraven pouze pomocí proteinové precipitace a SPE bez oddělení bílkovin ultrafiltrací.

Tabulka 2: Postup proplachů

Proplach před nanesením vzorku	Vzorek	1. proplach po nanesení vzorku
	500 µl plazmy	
	500 µl plazmy	400 µl PBS
	500 µl plazmy	400 µl voda
400 µl voda	500 µl plazmy	400 µl voda
400 µl voda	500 µl plazmy	400 µl PBS
400 µl PBS	500 µl plazmy	400 µl PBS
400 µl PBS	500 µl plazmy	400 µl voda

5.2.2.2 Precipitace proteinů a SPE extrakce

Po ultrafiltraci, jejíž postup je popsán výše, bylo k frakcím v obou částech ultrafiltrační zkumavky (Vivaspin 6) přidáno 5 µl roztoku IS. Následovala precipitace proteinů a SPE. SPE extrakce byla provedena postupem zavedeným na pracovišti, dle Herman et al. 2020 [1].

Proteiny v 0,5 ml plazmy byly precipitovány 5 ml acetonitrilu, následně se vzorek nechal stočit 5 minut při 20 °C a 3850 × g v centrifuze Hettich UNIVERSAL 320/320R (Tutlingen, Německo).

Následovala SPE s kolonkami Strata Si-1 Silica dle protokolu:

1. 3 ml 75% acetonitrilu
2. 3 ml 100% acetonitrilu
3. veškerý supernatant ze zkumavky po stočení
4. 1 ml 100% acetonitrilu
5. 1 ml 90% acetonitrilu
6. 2x eluce 1 ml 75% acetonitrilu
7. Odpaření do sucha pod proudem dusíku (50 °C)
8. Rekonstituce v 500 µl acetonitrilu

Vzorek rozpuštěný v acetonitrilu byl analyzován pomocí HPLC-MS.

5.2.3 Chromatografická analýza a detekce

HPLC analýza probíhala na přístroji Vanquish Core metodou dle Hermana et al. 2020 [1]. Byla použita HILIC stacionární fáze firmy Kinetex (2,6 µm, 150 × 3 mm) s předkolonou SecurityGuard ULTRA HILIC 129. Teplota v kolonovém prostoru byla 40 °C a autosampleru 6 °C. Jako mobilní fáze byl použit 20 mM octan amonný – acetonitril (14:86) (v/v) a její průtok byl 0,75 ml/min. Jednalo se o isokratickou eluci. Nastříkovaný objem vzorku činil 10 µl.

Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním 1 542 mg octanu amonného v 1 l ultračisté deionizované vody.

MS detekce se uskutečnila na přístroji LTQ XL (lineární iontová past) s vyhřívaným elektrosprejem a lineární iontovou pastí (Thermo Scientific, San Jose, USA) při následujících parametrech iontového zdroje:

Vložené napětí zdroje: 4 kV

Teplota zdroje: 350

Teplota kapiláry: 275

Průtok sušícího plynu: 20 arb.

Průtok zamlžujícího plynu: 10 arb.

MS data byla získána v režimu monitorování vybraných iontů (selected ion monitoring, SIM), v negativním módu.

PMPA: [M-H]⁻ *m/z* 179

IMPA: [M-H]⁻ *m/z* 137

EMPA: [M-H]⁻ *m/z* 123

5.2.4 Stanovení volné PMPA a PMPA uvolněné reaktivací z plazmatických proteinů ve vzorku s přidavkem somanu

5.2.4.1 Úprava vzorku před analýzou

500 µl plazmy s přidavkem somanu (viz kapitola 5. 2. 1. 4) bylo nanášeno na ultrafiltrační zkumavku Vivaspin 6, která byla předem propláchnuta 400 µl deionizované vody (centrifugace 10 min při 8000 × *g*), po nanášení vzorku byla zkumavka centrifugována 20 min při 8000 × *g*, poté bylo do vrchní části přidáno dalších 400 µl vody a zkumavka opět centrifugována 20 min při 8000 × *g*. Jedná se o postup ultrafiltrace, který byl na základě předchozích experimentů vyhodnocen jako nejvhodnější.

Ve frakci proteinů (vrchní část zkumavky) byla provedena reaktivace pomocí HI-6. K 500 µl plazmy bylo přidáno 50 µl roztoku HI-6 (10 mg/ml ve vodě). Vzorek se nechal centrifugovat 5 min při 20 °C a 3850 × *g*.

Poté bylo ke každé frakci přidáno 5 µl IS a vzorky byly precipitovány 5 ml acetonitrilu. Následovala centrifugace po dobu 5 minut při 20 °C a 5000 rpm.

Poté byla provedena SPE s kolonkami Strata Si-1 Silica postupem, který je popsán v kapitole 5. 2. 2. 2 a LC-MS analýza dle postupu v kapitole 5. 2. 3.

Z důvodu vyhodnocení účinnosti reaktivace, byla připravena druhá sada vzorků, u níž byl postup přípravy a analýzy totožný, ale byl vynechán krok reaktivace HI-6.

5.3 Stanovení fluoridem regenerovaných NPL v plazmě

5.3.1 Příprava roztoků

5.3.1.1 Příprava roztoku plazmy se standardem PMPA

100 µl zásobního roztoku PMPA z bodu 5.2.1.1 bylo přidáno k 900 µl lidské plazmy. Výsledná koncentrace PMPA ve vzorku činila 100 µg/ml.

5.3.1.2 Příprava roztoku plazmy se somanem

20 mg koncentrovaného somanu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého isopropanolu. 20 µl tohoto roztoku bylo přidáno k 1980 µl plazmy a následně bylo inkubováno ve vyhřívané třepačce 6 hodin při 37 °C a 300 rpm.

5.3.1.3 Příprava octanového pufru

Octanový pufr o pH 3,5 byl připraven rozpuštěním 88,6 mg bezvodého octanu sodného a 1 082 μ l octové kyseliny ve 100 ml deionizované vody.

5.3.1.4 Příprava 2M fluoridu draselného

Roztok 2M fluoridu draselného byl připraven rozpuštěním 232,4 mg KF ve 2 ml deionizované vody.

5.3.2 Úprava vzorku před analýzou

Prvním krokem byla fluoridová regenerace, kdy k 500 μ l stočeného vzorku plazmy s přídatkem standardu PMPA (koncentrace 100 μ l/ml) nebo somanu bylo přidáno 1 ml octanového pufru (pH 3,5). Po přidání 600 μ l 2M fluoridu draselného se vzorek inkuboval po dobu 15 min při 25 °C a poté se 5 min centrifugoval při 5 000 \times g a 20 °C. Následovala SPE extrakce na kolonkách Strata-X 33 μ m Polymeric Reversed Phase dle protokolu:

1. 1 ml metanol
2. 1 ml voda
3. Vzorek po inkubaci a centrifugaci
4. 1 ml 5% metanol ve vodě
5. Eluce 250 μ l metanolu do zkumavky s vodou a 2-DMAMP

V kroku 5 bylo zároveň přidáno derivatizační činidlo 2-DMAMP, se kterým byl vzorek 15 min inkubován na vyhřívané třepačce při 25 °C a 300 rpm. Derivatizační metoda byla převzata z postupu publikovaného autorským kolektivem Blanca et al. 2020 [30].

5.3.3 Analýza a detekce

Vzorek se analyzoval pomocí HPLC, metodou převzatou od Blanca et al. 2020 [30], která se obdobně jako tato práce zabývala stanovením regenerovaných NPL (konkrétně sarinu) s využitím derivatizace pomocí 2-DMAMP a následnou LC-MS/MS analýzou. Stacionární fáze byla Gemini NX 5 μ m \times 150 mm \times 4,6 mm. Mobilní fáze se skládala z 1 mM mravenčanu amonného ve vodě (A) a 1 mM mravenčanu amonného v metanolu (B). Teplota v kolonovém prostoru byla stanovena na 35 °C s průtokem 0,8 ml/min. Teplota autosampleru byla stanovena na 6 °C. Jednalo se o gradientovou eluci:

- 0 minut: 5% B
- 0,5 min 5% B
- 7 min 100% B
- 8 min 100% B
- 9 min 5% B
- 15 min 5% B

Vložené napětí zdroje bylo 4,5 kV a jeho teplota činila 370 °C. Teplota kapiláry byla 275 °C. Průtok sušícího plynu odpovídal 30 arb. a průtok zamířujícího plynu 10 arb.

MS data byla získána v režimu monitorování vybraných reakcí (selected reaction monitoring, SRM), v pozitivním módu.

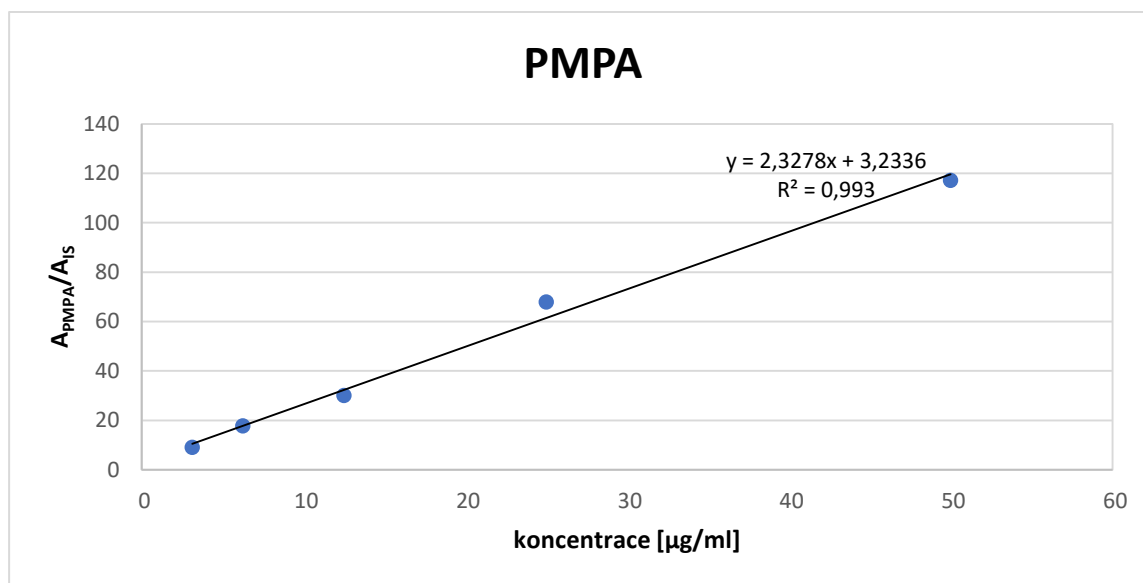
GD-DMAMP: $[M-H]^+$ m/z 314→230; 185

6 Výsledky a diskuze

6.1 Stanovení AMPA v plazmě

6.1.1 Kalibrační řady AMPA

Kalibrační křivka pro stanovení PMPA v plazmě vytvořená jako závislost poměru ploch pod píkem analytu a IS na koncentraci PMPA dle postupu uvedeného v metodice je zobrazena na Obrázek 12. Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu koncentrací od 3,125 µg/ml do 50 µg/ml s rovnicí přímky $y = 2,3278x + 3,2336$ a determinačním koeficientem $R^2 = 0,993$.



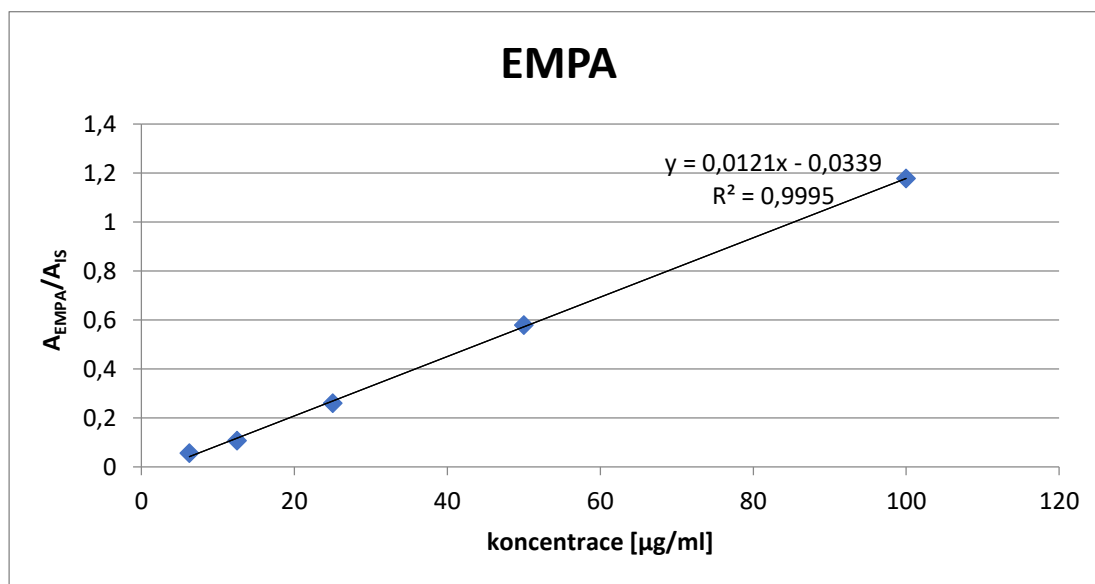
Obrázek 12: Kalibrační přímka pro PMPA v plazmě

Následující tabulka (Tabulka 3) popisuje přesnost kalibrační přímky pro stanovení PMPA v plazmě. Přesnost vyjadřuje rozdíl mezi skutečnou hodnotou a naměřenou udaný v procentech.

Tabulka 3: Přesnost kalibrační řady (poměr skutečné hodnoty ku naměřené vynásobený stem) pro PMPA se zpětně přepočítanou koncentrací

koncentrace [ug/ml]	přepočítaná koncentrace [ug/ml]	přesnost (%)
3,125	2,83	90,51
6,25	5,96	95,43
12,5	11,06	88,51
25	25,80	103,20
50	48,19	96,37

Obrázek 13 ukazuje kalibrační křivku pro EMPA tvořenou jako závislost poměru ploch pod píkem EMPA a IS na koncentraci EMPA. Křivka je v lineárním rozsahu od 6,25 µg/ml do 100 µg/ml, její rovnice přímky je $y = 0,0121x - 0,0339$ a determinační koeficient $R^2 = 0,9995$.



Obrázek 13: Kalibrační přímka pro EMPA v plazmě

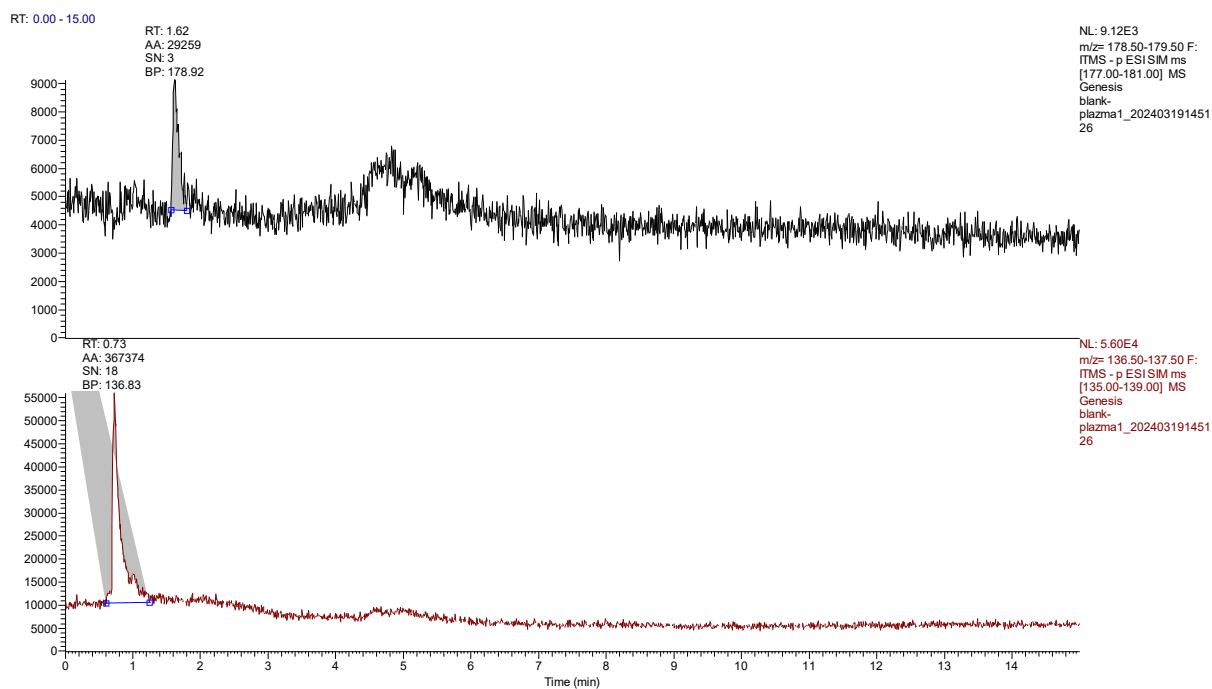
Tato tabulka (Tabulka 4) ukazuje přesnost kalibrační přímky pro stanovení EMPA v plazmě. Přesnost vyjadřuje rozdíl mezi skutečnou hodnotou a naměřenou udaný v procentech.

Tabulka 4: Přesnost kalibrační řady (poměr skutečné hodnoty ku naměřené vynásobený stem) pro EMPA se zpětným přepočtem koncentrace

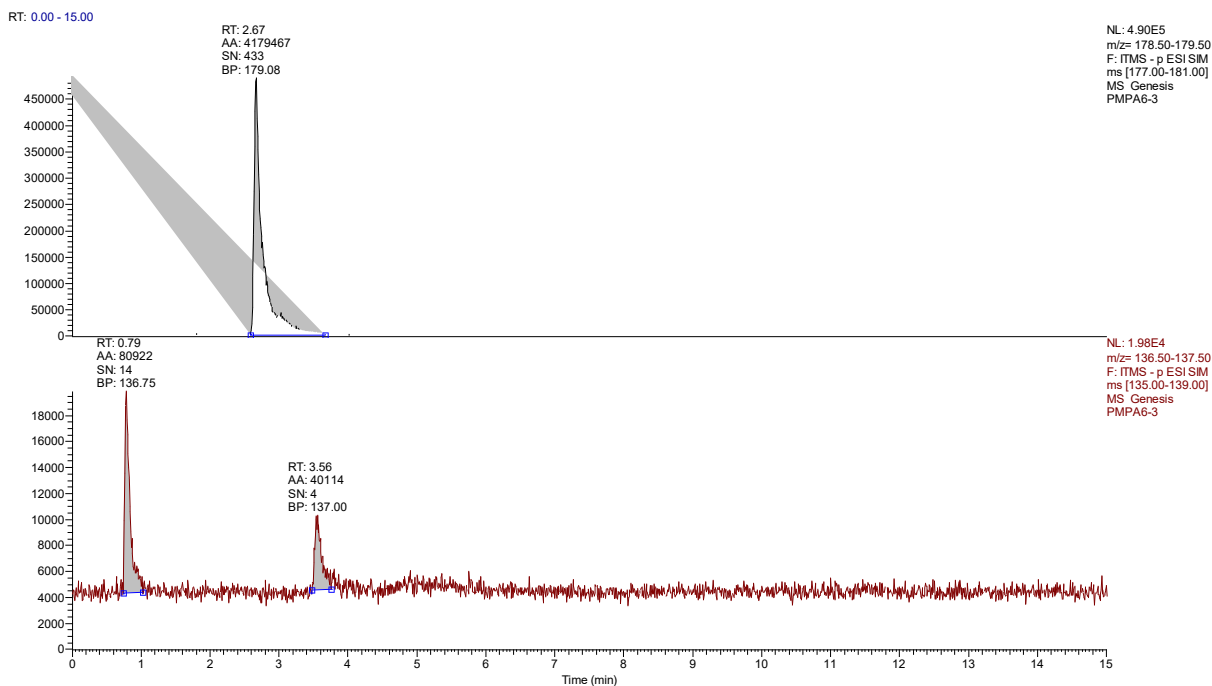
koncentrace [ug/ml]	přepočítaná koncentrace [ug/ml]	přesnost (%)
6,25	7,43	118,92
12,5	11,61	92,85
25	24,30	97,22
50	50,58	101,16
100	100,11	100,11

6.1.2 Chromatogramy stanovení AMPA v plazmě

Retenční čas PMPA v plazmě činil 2,7 min, retenční čas námi použitého IS byl 3,6 min. Obrázek 14 a Obrázek 15 zobrazují vzorově extrahované chromatogramy pro ionty $[M-H]^-$ m/z 179 (pro PMPA) a $[M-H]^-$ m/z 137 (odpovídá IS) blankové plazmy a plazmy s přidavkem PMPA v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$.

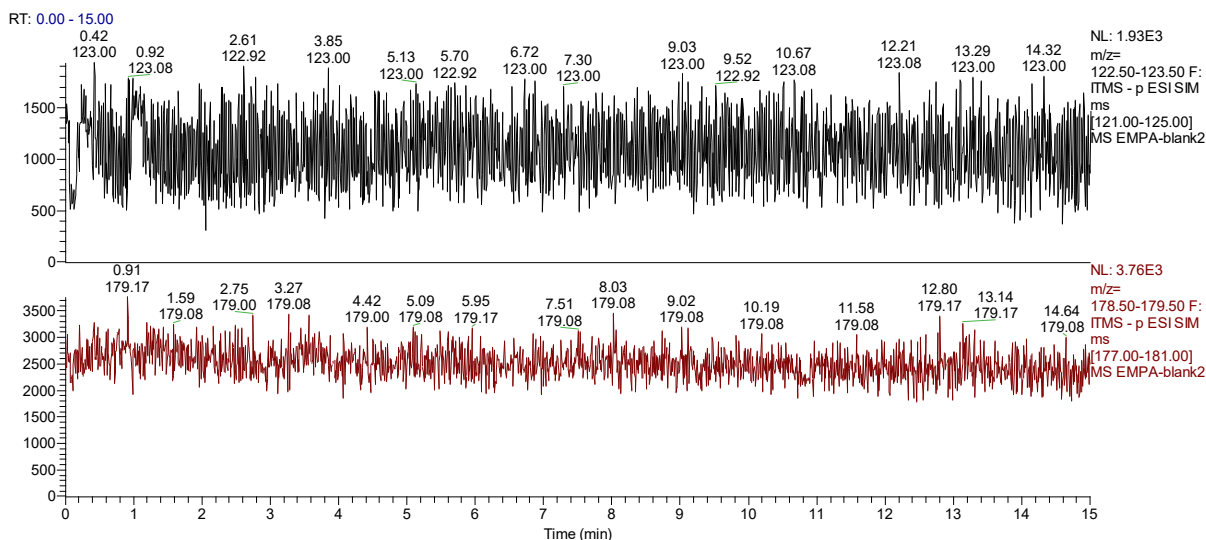


Obrázek 14: Chromatogram blanku plazmy pro PMPA (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)

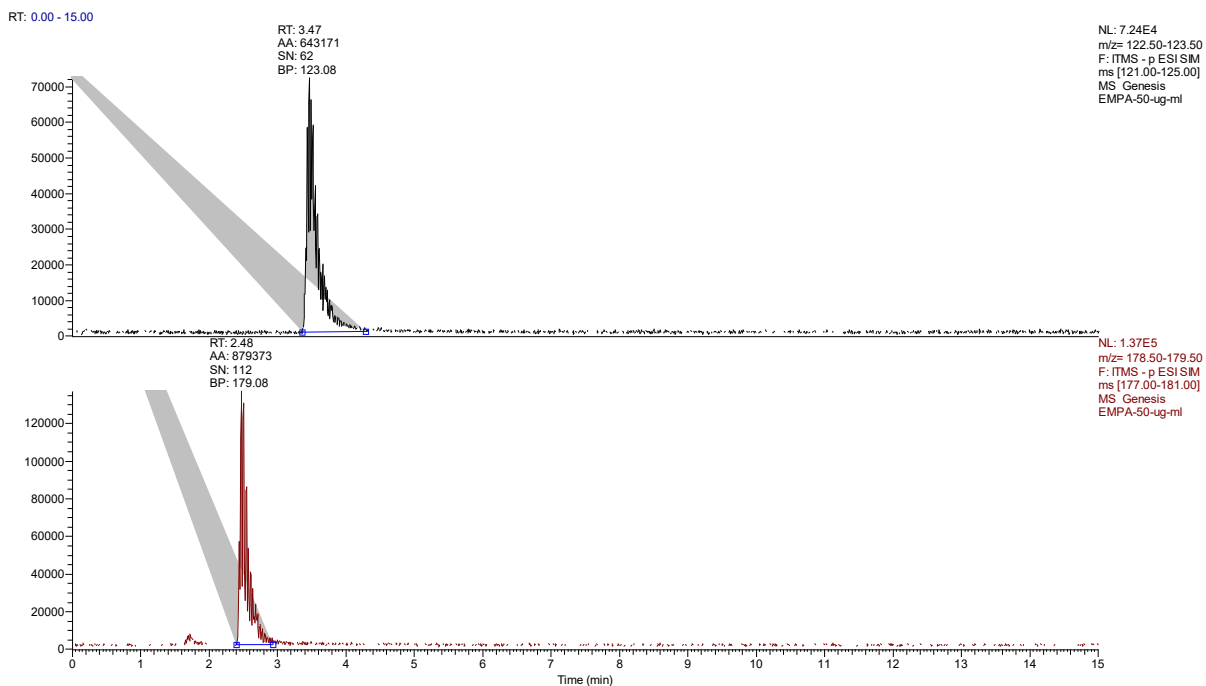


Obrázek 15: Chromatogram PMPA s IS v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)

Retenční čas EMPA v plazmě byl 3,5 min a retenční čas pro IS 2,5 min. Obrázek 16 a Obrázek 17 ukazují vzorově extrahované chromatogramy pro ionty s $[M-H]^-$ m/z 123 (pro EMPA) a $[M-H]^-$ m/z 179 (odpovídá IS) v blankové plazmě a v plazmě obsahující přídatek EMPA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 16: Chromatogram blanku plazmy pro EMPA (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)



Obrázek 17: Chromatogram EMPA s IS v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)

6.1.3 Vývoj metody ultrafiltrace

Pro oddělení proteinů od volně rozpuštěných nízkomolekulárních látek byla zvolena ultrafiltrace, pro kterou se rozhodly i studie dle Dong et al. 2020 [44] a dle Yang et al. 2020 [45]. Oproti tomu ve studii dle Ahmed et al. 2020 [46] byla použita metoda membránové separace a ve studii dle Gao et al. 2020 [47] se uplatňuje princip kombinace filtrační membrány s hydrofilními kapilárami. Pro tuto diplomovou práci byla zvolena ultrafiltrace z toho důvodu, že bylo potřeba oddělit vysokomolekulární proteiny (konkrétně BuChE) od látek nízkomolekulárních, což poskytuje princip ultrafiltrace.

Byly testovány dvě sady zkumavek – VivaSpin 500 a VivaSpin 6. Oboje mají cut off molekulární hmotnosti 30 kDa, což je v porovnání s BUCHE (Mw = 340 kDa) téměř dvanáctinásobně nižší hodnota [48].

VivaSpin 500 s objemem 500 μ l neobstály hned při úvodních analýzách, jelikož při delší době v centrifuze praskaly, přestože byla dodržena maximální centrifugační síla uvedená v návodu od výrobce. Zároveň byla testována i nižší centrifugační síla, která však zapříčinila nižší objem přefiltrované kapaliny. Z důvodu popraskání Vivaspin

500 byla pozornost zaměřena na VivaSpin 6, které už vydržely delší dobu centrifugace (10 i 20 min) a i po opětovném použití nejevily známky opotřebení.

Nejprve byla kalibrována doba centrifugace, a to na základě množství nepřefiltrované kapaliny. První pokusy s vodou dopadly po 10 min centrifugace (12 000 g) tak, že byla přefiltrována beze zbytku. Při stejném pokusu s plazmou byly však výsledky rozdílné – množství kapaliny ve frakci bílkovin se v každém vzorku lišilo o $\pm 50 \mu\text{l}$. Byl tedy navýšen čas centrifugace na 20 min, kdy ve frakci bílkovin pravidelně zůstávalo 0,2 ml. Po delší centrifugaci (40 min) se už objem nepřefiltrované plazmy ve vrchní části ultrafiltrační zkumavky neměnil a zůstával 0,2 ml.

Následující Tabulka 5 shrnuje množství volné PMPA, které zůstalo v horní části zkumavky ve frakci bílkovin, množství volné PMPA přefiltrované do spodní části (frakce nízkomolekulárních látek) a celkovou výtěžnost (součet hmotnosti v obou frakcích).

Ve vzorku, který byl proplachován po centrifugaci plazmy pouze vodou (bez iniciálního proplachu) před nanesením vzorku a ve vzorku, u něžž byla zkumavka před i po nanesení plazmy proplachována PBS došlo při analýze vzorku k chybě analýzy vlivem vysoké hladiny šumu, kvůli níž nebylo možné vyhodnotit hmotnost ve frakci bílkovin.

Tabulka 5: Postup proplachů při ultrafiltraci plazmy s přidavkem AMPA s množstvím PMPA v jednotlivých frakcích Vivaspin 6 a celkovým výtěžkem analýzy

Proplach před nanesením vzorku	Vzorek	1. proplach po nanesení vzorku	Hmotnost PMPA ve frakci bílkovin ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$) n=3	Hmotnost PMPA ve frakci nízkomolekulárních látek ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$) n=3	Celková hmotnost (μg)	výtěžek (%)
	500 μl plazmy		$2,68 \pm 0,51$	$6,92 \pm 1,99$	9,60	38,40
	500 μl plazmy	400 μl PBS	$5,4 \pm 0,59$	$15,57 \pm 1,90$	20,98	83,91
	500 μl plazmy	400 μl voda	chyba měření	$24,56 \pm 5,71$	24,56	98,25
400 μl voda	500 μl plazmy	400 μl voda	$2,42 \pm 0,40$	$16,58 \pm 0,88$	19,00	75,99
400 μl voda	500 μl plazmy	400 μl PBS	$3,19 \pm 0,44$	$13,75 \pm 0,50$	16,94	67,78
400 μl PBS	500 μl plazmy	400 μl PBS	chyba měření	$20,89 \pm 1,14$	20,89	83,54
400 μl PBS	500 μl plazmy	400 μl voda	$3,38 \pm 0,47$	$11,75 \pm 1,49$	15,14	60,54

Jako nejvhodnější byl vybrán postup, kdy byla zkumavka propláchnuta 400 μl vody s centrifugací 10 min (8 000 g), poté po nanesení vzorku, centrifugována (20 min, 8 000 g) a poté opět propláchnuta 400 μl vody při centrifugaci 20 min (8 000 g).

Při tomto postupu činila hmotnost ve frakci bílkovin pouze $2,42 \pm 0,40 \mu\text{g}$, zatímco do frakce nízkomolekulárních látek prošlo $16,58 \pm 0,88 \mu\text{g}$ (tedy 66,32 % z původního množství PMPA ve vzorku) a zároveň nedošlo k velkým ztrátám analytu, protože celkový výtěžek ultrafiltrace byl 75,99 %. Druhý proplach už nepřinesl zvýšení podílu PMPA přefiltrované do frakce nízkomolekulárních látek.

Na spektrech z MS lze u proplachu PBS vidět šum a velmi nízký signál pro IS. Spekulovalo se i nad možností, že během úpravy vzorku dochází k přenosu některé ze složky PBS, která interferuje se stanovovanými analyty.

Plazma s přídavkem EMPA pak byla upravována pouze dle nejvhodnějšího postupu zmíněného výše a její výsledky popisuje Tabulka 6.

Tabulka 6: Množství EMPA v jednotlivých frakcích Vivaspin 6 a celkovým výtěžkem analýzy

Proplach před nanesením vzorku	Vzorek	1. proplach po nanesení vzorku	Množství EMPA ve frakci bílkovin ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$)	Množství EMPA ve frakci nízkomolekulárních látek ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$)	Celkové množství (μg)	výtěžek (%)
400 μl voda	500 μl plazmy	400 μl voda	pod hranicí detekce	$18,35 \pm 2,49$	18,35	73,40

Při výše zmíněném postupu bylo množství ve frakci bílkovin pod hranicí detekce, zatímco do frakce nízkomolekulárních látek přešlo $18,35 \pm 2,49 \mu\text{g}$. Opět nedošlo k velkým ztrátám analytu, protože celkový výtěžek ultrafiltrace činil 73,40 % (byl tedy srovnatelný s PMPA).

Díky tomuto postupu došlo k oddělení signifikantního množství plazmatických bílkovin, od kterých lze následně oddělit AMPA reaktivací, od volných AMPA, které prošly do frakce nízkomolekulárních látek. Zároveň lze díky oddělení plazmatických bílkovin s navázanými AMPA provést jejich reaktivaci a následné stanovení, čímž je lze prohlásit za primární biomarkery otravy NPL.

Metoda centrifugace séra byla taktéž použita ve studii dle Hofmann et al. 2023 [49]. Konkrétně byly použity Vivaspin 500 s obdobnou dobou centrifugace, avšak nedocházelo u nich k prvotnímu proplachu vodou před nanesením vzorku. Metoda ultrafiltrační centrifugace v této studii byla však pouze součástí úpravy vzorku před analýzou, z důvodu odstranění nežádoucích látek v séru.

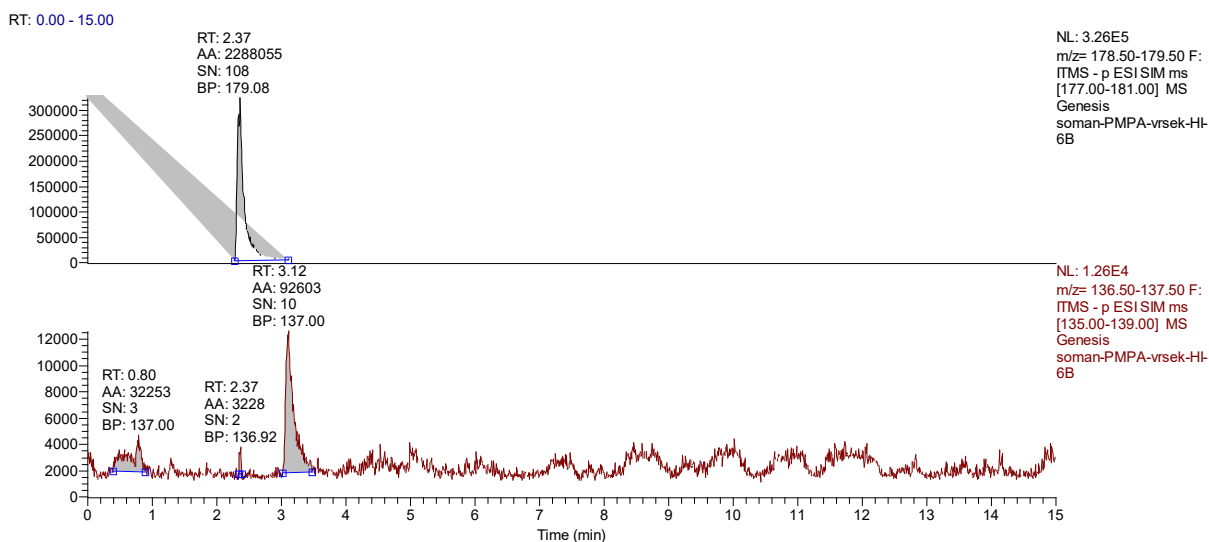
6.1.4 Stanovení AMPA ve vzorcích s přídavkem somanu

Následující tabulka (Tabulka 7) popisuje výsledné množství PMPA u vzorku plazmy s přídavkem somanu po následné reaktivaci frakce bílkovin pomocí HI-6 v porovnání se vzorkem plazmy s přídavkem somanu bez reaktivace frakce bílkovin. Sloupec s celkovým množstvím popisuje sumu množství PMPA ve frakci bílkovin po reaktivaci HI-6 a množství PMPA ve frakci nízkomolekulárních látek bez reaktivace HI-6.

Tabulka 7: Množství PMPA ve vzorcích s a bez reaktivace HI-6

Množství PMPA ve frakci bílkovin + HI-6 ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$) n=2	Množství PMPA ve frakci bílkovin bez HI-6 ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$) n=2	Množství PMPA ve frakci nízkomolekulárních látek ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$) n=2	Celkové množství s reaktivací (μg)
4,80 \pm 0,71	1,42 \pm 0,27	11,97 \pm 1,20	16,77

Dle výsledků analýzy a chromatogramu (Obrázek 18) lze soudit, že reaktivace pomocí HI-6 má v úpravě vzorku smysl. Z původního množství 1,42 \pm 0,27 μg PMPA ve frakci bílkovin ve vzorku bez reaktivace došlo k navýšení na 4,80 \pm 0,71 μg . Z výsledků je zároveň patrné, že se nejedná o zcela specifické stanovení PMPA uvolněné z vazby na plazmatické bílkoviny, jelikož byla daná kyselina obsažena ve frakci bílkovin i před reaktivací. Tento fakt by mohl být řešen promytím sraženiny po předcházející precipitaci, případně jinými centrifugačními zkumavkami, které by dokonaleji oddělily kyseliny od vysokomolekulárních látek.



Obrázek 18: Chromatogram frakce bílkovin ve vzorku plazmy s přidavkem somanu a regenerací HI-6 (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)

Oproti studii provedené dle Herman et al. 2020 [1], kde je provedena pouze reaktivace, námi stanovený postup obsahuje navíc oddělení vysokomolekulárních látek od nízkomolekulárních ultrafiltrací. To s sebou sice nese zdlouhavější přípravu,

ale také možnost analyzovat obsah obou frakcí z důvodu odlišení volných AMPA od těch navázaných na plazmatické bílkoviny, a to zejména ve frakci bílkovin.

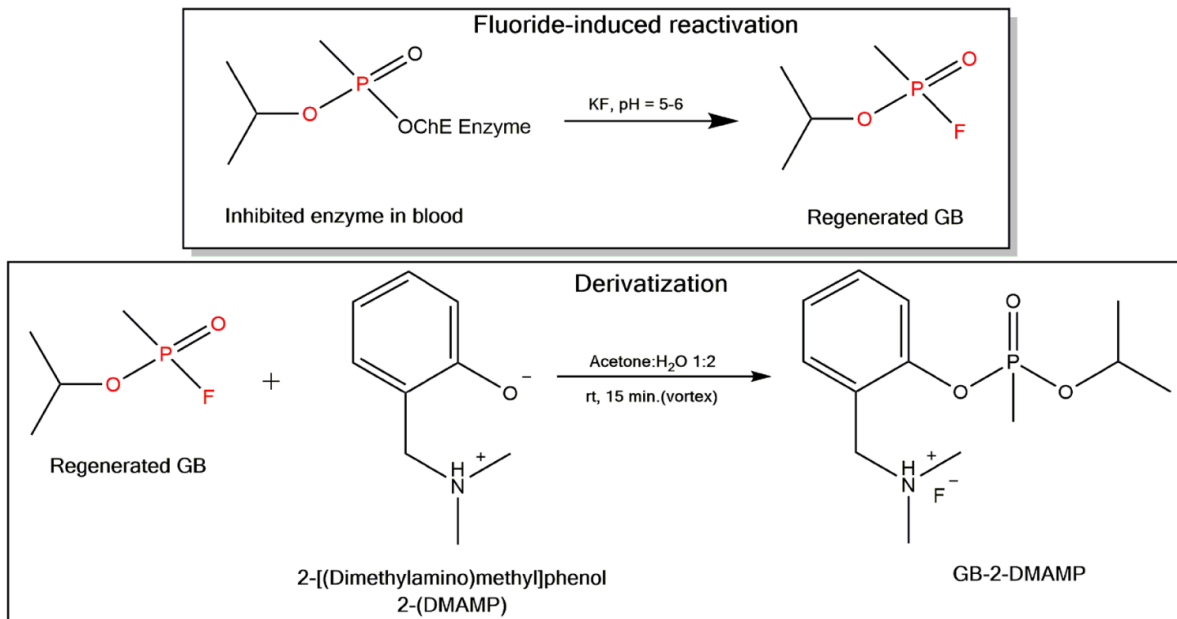
S využitím databáze PubMed a ScienceDirect se nepodařilo najít publikaci, která by popisovala úpravu vzorků specifickou pro AMPA uvolněné z vazby na proteiny lidské plazmy.

Například ve studii od Miki et al. 1999 [50] byly stanoveny AMPA pomocí GC-MS s použitím derivatizačního činidla pentafluorbenzyl bromid. V této studii ovšem také nedošlo k oddělení bílkovin jakožto součást úpravy vzorku před analýzou. Pro úpravu byly použity pouze Ag kazety.

6.2 Stanovení fluoridem regenerované NPL

Druhým cílem práce, krom vývoje metody oddělení volných AMPA, bylo ověřit, zda volné AMPA potenciálně nereagují s derivatizačním činidlem 2-DMAMP a neinterferují tak se zavedenou metodou stanovení fluoridem regenerovaných NPL.

Metoda fluoridové regenerace umožňuje stanovit opětovně regenerované NPL. V této diplomové práci byla použita konkrétně derivatizace pomocí 2-DMAMP (viz kapitola 3. 2. 4). Na následujícím schématu (Obrázek 19) lze vidět strukturu derivátu (konkrétně šlo v této studii o sarin) po derivatizaci 2-DMAMP.



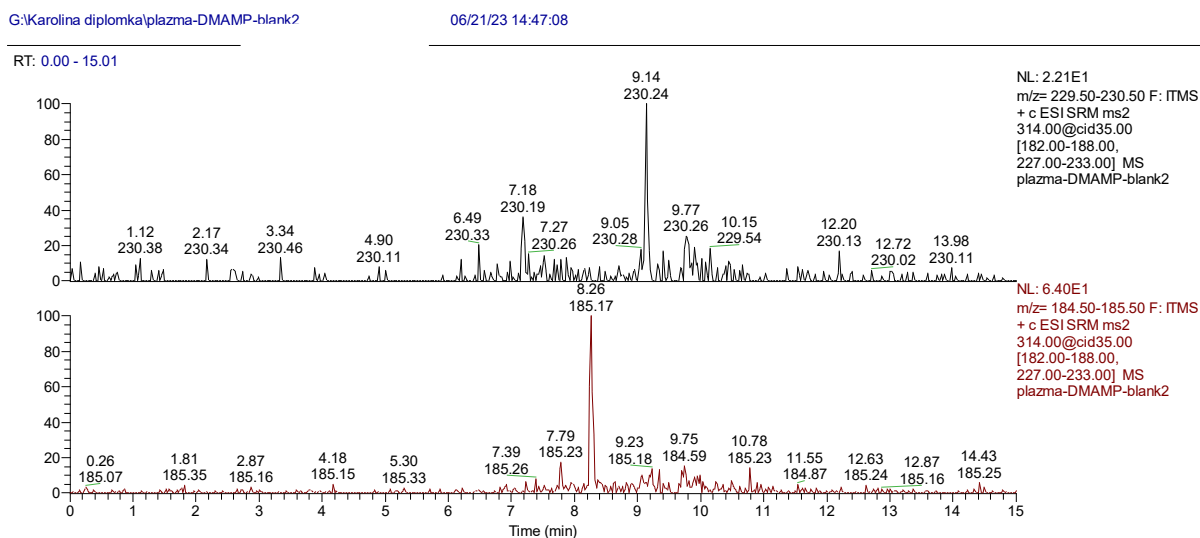
Obrázek 19: Znázornění metody derivatizace NPL (sarinu) pomocí 2-DMAMP (převzato z: *Retrospective determination of regenerated nerve agent sarin in human blood by liquid chromatography–mass spectrometry and in vivo implementation in rabbit*; M. Blanca et al. 2019)

Na obrázku (Obrázek 21) je vidět typický extrahovaný chromatogram 2-DMAMP derivátu somanu získaný po fluoridové regeneraci, SPE a 2-DMAMP derivatizací vzorku plazmy s přidavkem somanu v porovnání s chromatogramem blankové plazmy zpracované a analyzované stejným postupem (Obrázek 20). Oba chromatogramy byly získány v režimu SRM – horní část chromatogramu odpovídá SRM přechodu 314-229, dolní část pak m/z 314-184. Na chromatogramu stanovení somanu lze vidět pík s retenčním časem 6,55 min odpovídající danému derivátu.

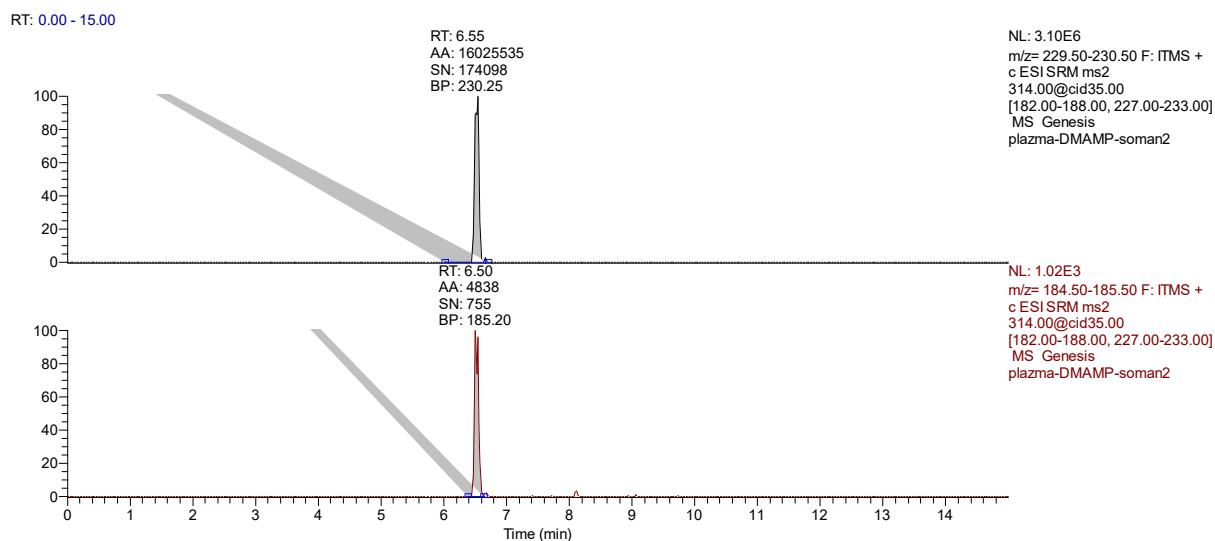
Obrázek 22 ukazuje extrahovaný chromatogram pro téže iontové přechody získané analýzou vzorku plazmy s přidavkem PMPA (nikoliv somanu). Vzorek plazmy s přidavkem PMPA prošel totožným procesem úpravy, tedy fluoridovou regenerací, SPE a reakcí s derivatizačním činidlem 2-DMAMP. Na jeho chromatogramu lze vidět pík s retenčním časem 6,82 min, který se blíží retenčnímu času analytu (jeho retenční čas byl 6,55 min). Důležité však je, že retenčním časem nespadá do intervalu $\pm 0,2$ min, což je interval, ve kterém by mohlo dojít k interferenci s tímto analytem. Vzhledem k tomu, že byla použita vysoká koncentrace PMPA a není přítomen konfirmační přechod, jedná se o zanedbatelnou skutečnost.

Závěrem bylo potvrzeno, že uvolněné AMPA neinterferují s použitým derivatizačním činidlem 2-DMAMP. Tudíž by nemělo dojít k falešně pozitivnímu stanovení somanu, v případě že by ve vzorku byla přítomná PMPA (která je jeho degradačním produktem), ale vzorek by žádný soman neobsahoval. Zároveň by přítomnost volné PMPA neměla zanechat systematickou chybu do kvantitativního stanovení somanu, pokud by byly ve vzorku přítomny obě tyto látky zároveň, což je u reálných vzorků pravděpodobná situace.

Z tohoto závěru plyne, že lze danou derivatizační metodu použít v praxi. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu přípravy bez nutnosti vzorek odpařovat, což v praxi usnadní diagnostiku.



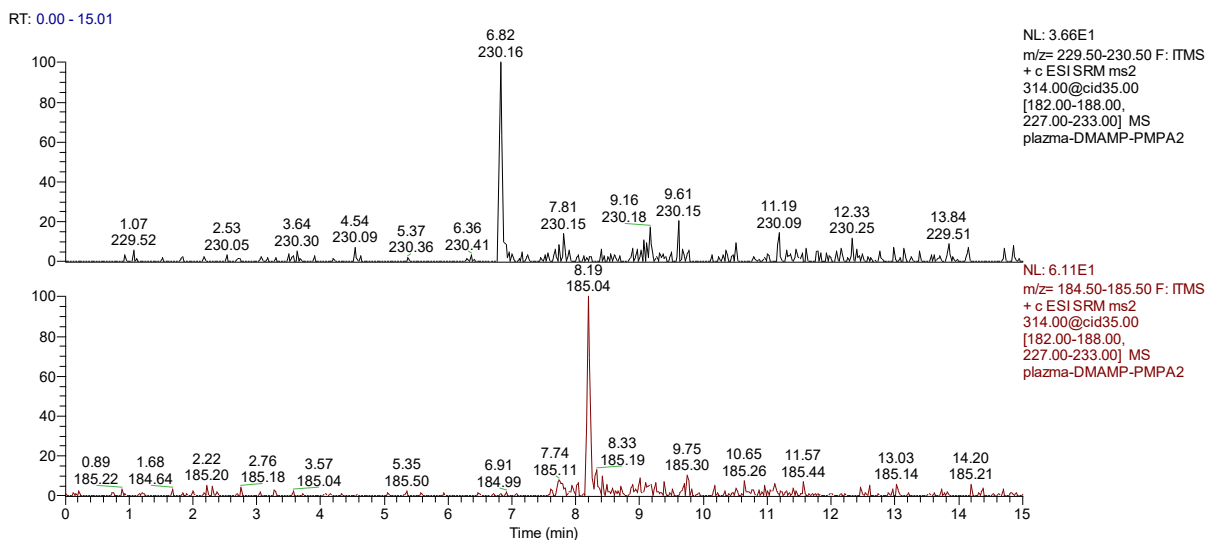
Obrázek 20: Chromatogram blanku plazmy pro stanovení fluoridem regenerovaných NPL (RT – retenční čas; AA – plocha pod pikem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značí m/z)



Obrázek 21: Chromatogram stanovení somanu v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)

Obdobný postup fluoridové reaktivace s následnou derivatizací pomocí 2-DMAMP byl použit i ve studii dle Blanca et al. 2020 [30], která se zabývala sarinem. Tam současně provedli i test interference se slepými vzorky. Ty podrobili stejné přípravě jako vzorky s přísadkami. Žádná interference nebyla potvrzena, jelikož slepý vzorek nevykazoval rušivé píky v oblasti retenčního času GB-2-DMAMP.

Také studie dle Weissberg et al. [51] se taktéž zabývala derivatizací pomocí 2-DMAMP. Tato studie vliv interferencí s AMPA nezkoumala, ale stanovila výhody použití derivatizace pomocí 2-DMAMP. Těmi jsou především jeho dobrá rozpustnost ve vodě, která umožňuje derivatizaci ve vodném prostředí, a potřeba pouze malého množství vzorku.



Obrázek 22: Chromatogram stanovení PMPA v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)

Dle doposud zjištěných informací je pravděpodobné, že by obdobný postup mohl být aplikován i na ostatní látky řady G a jejich metabolity, jejichž struktura a molární hmotnost je podobná námi zkoumanému somanu a jeho metabolitu. Z výsledků jiných studií je známo, že 2-DMAMP derivatizace funguje například i u sarinu. Avšak tato diplomová práce se zabývala pouze somanem a jeho metabolitem, tudíž není možné s přesností říct, jak by tato metoda fungovala u ostatních NPL.

7 Závěr

Cílem praktické části této diplomové práce bylo najít techniku úpravy vzorku, díky níž by bylo možné odlišit volné AMPA od těch, které jsou navázané na plazmatické bílkoviny. Bylo tedy nutné vyvinout takový postup, který povede k oddělení plazmatických bílkovin od látek nízkomolekulárních. Tento cíl se podařilo splnit, byla vyvinuta metoda, kdy se nejprve proplachují Vivaspin 6 vodou (centrifuga 10 min, 8 000 g), poté se nanese vzorek (centrifugace 20 min, 8 000 g) a následně se vzorek ještě jednou propláchně vodou (centrifugace 20 min, 8 000 g).

Tento postup byl vyvinut pro odlišení volné PMPA a následně byl použit i pro oddělení volné EMPA. Ověřen byl i na vzorcích plazmy s přídavkem somanu, avšak vzorky s přídavkem látky VX nebylo z časových důvodů již možné ověřit.

Jednalo se o inovativní postup oddělení volných AMPA od těch navázaných na bílkoviny krevní plazmy ještě před proběhnutím reaktivace, což umožnilo specificky stanovit po následné reaktivaci uvolněné AMPA, díky čemuž se dají označit za primární biomarker otravy NPL. Standardně se totiž stanovují volné AMPA bez předchozí reaktivace. A pokud se stanoví po reaktivaci bez předchozího oddělení od proteinů, je možné stanovit pouze celkové množství AMPA.

Druhým cílem bylo ověření, že u volných AMPA nedochází k interferenci s derivatizačním činidlem 2-DMAMP, a tudíž může být daná metoda použita v praxi. Tento cíl byl rovněž splněn, jelikož žádná interference nebyla potvrzena.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Sarin	12
Obrázek 2: Cyklosarin.....	12
Obrázek 3: Soman	13
Obrázek 4: Tabun	13
Obrázek 5: VX.....	14
Obrázek 6: VR.....	14
Obrázek 7: PMPA	19
Obrázek 8: IMPA	19
Obrázek 9: CMPA	19
Obrázek 10: EMPA.....	20
Obrázek 11: Schéma HILIC: červeně je označena stacionární fáze, modře mobilní fáze a molekuly vody vytváří difúzní vrstvu (volná inspirace dle Lucie Nováková, Michal Douša, a Petr Česla a kol., <i>Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.</i> , 2. vydání. Praha: Česká chromatografická škola, 2021).....	24
Obrázek 12: Kalibrační přímka pro PMPA v plazmě.....	37
Obrázek 13: Kalibrační přímka pro EMPA v plazmě.....	38
Obrázek 14: Chromatogram blanku plazmy pro PMPA (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)	39
Obrázek 15: Chromatogram PMPA s IS v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z).....	40
Obrázek 16: Chromatogram blanku plazmy pro EMPA (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)	40
Obrázek 17: Chromatogram EMPA s IS v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z).....	41
Obrázek 18: Chromatogram frakce bílkovin ve vzorku plazmy s přidavkem somanu a regenerací HI-6 (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z).....	45
Obrázek 19: Znárodnění metody derivatizace NPL (sarinu) pomocí 2-DMAMP (převzato z: <i>Retrospective determination of regenerated nerve agent sarin in human blood by liquid chromatography–mass spectrometry and in vivo implementation in rabbit</i> ; M. Blanca et al. 2019).....	47
Obrázek 20: Chromatogram blanku plazmy pro stanovení fluoridem regenerovaných NPL (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z).....	48
Obrázek 21: Chromatogram stanovení somanu v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)	49
Obrázek 22: Chromatogram stanovení PMPA v plazmě (RT – retenční čas; AA – plocha pod píkem; SN – poměr signálu k šumu; BP – base peak značící m/z)	50

9 Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Rozdělení nervově paralytických látek</i>	<i>10</i>
<i>Tabulka 2: Postup proplachů.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabulka 3: Přesnost kalibrační řady (poměr skutečné hodnoty ku naměřené vynásobený stem) pro PMPA se zpětně přepočítanou koncentrací.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 4: Přesnost kalibrační řady (poměr skutečné hodnoty ku naměřené vynásobený stem) pro EMPA se zpětným přepočtem koncentrace.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabulka 5: Postup proplachů při ultrafiltraci plazmy s přidavkem AMPA s množstvím PMPA v jednotlivých frakcích Vivaspin 6 a celkovým výtěžkem analýzy</i>	<i>43</i>
<i>Tabulka 6: Množství EMPA v jednotlivých frakcích Vivaspin 6 a celkovým výtěžkem analýzy.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabulka 7: Množství PMPA ve vzorcích s a bez reaktivace HI-6.....</i>	<i>45</i>

10 Seznam použité literatury

- [1] D. Herman *et al.*, „OPCW BIOMEDICAL PROFICIENCY TEST IN THE LABORATORY OF ANALYTICAL CHEMISTRY AT THE DEPARTMENT OF TOXICOLOGY AND MILITARY PHARMACY“, *Military Medical Science Letters*, roč. 89, č. 3, s. 126–141, zář. 2020, doi: 10.31482/mmsl.2020.011.
- [2] Patočka Jiří a kol., *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada Publishing a. s., 2004.
- [3] B. T. Røen, S. R. Sellevåg, a E. Lundanes, „Quantification of Nerve Agent Biomarkers in Human Serum and Urine“, *Anal Chem*, roč. 86, č. 23, s. 11833–11840, pro. 2014, doi: 10.1021/ac503408x.
- [4] E. J. Hulse, J. D. Haslam, S. R. Emmett, a T. Woolley, „Organophosphorus nerve agent poisoning: managing the poisoned patient“, *Br J Anaesth*, roč. 123, č. 4, s. 457–463, říj. 2019, doi: 10.1016/j.bja.2019.04.061.
- [5] T. J. Finnegan, V. W. L. Gunawardana, a J. D. Badjić, „Molecular Recognition of Nerve Agents and Their Organophosphorus Surrogates: Toward Supramolecular Scavengers and Catalysts“, *Chemistry – A European Journal*, roč. 27, č. 53, s. 13280–13305, zář. 2021, doi: 10.1002/chem.202101532.
- [6] B. G. Pantazides *et al.*, „An enhanced butyrylcholinesterase method to measure organophosphorus nerve agent exposure in humans“, *Anal Bioanal Chem*, roč. 406, č. 21, s. 5187–5194, srp. 2014, doi: 10.1007/s00216-014-7718-7.
- [7] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, a V. M. Vasic, „Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology“, *Curr Neuropharmacol*, roč. 11, č. 3, s. 315–335, dub. 2013, doi: 10.2174/1570159X11311030006.
- [8] M. B. Abou-Donia, B. Siracuse, N. Gupta, a A. Sobel Sokol, „Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review“, *Crit Rev Toxicol*, roč. 46, č. 10, s. 845–875, lis. 2016, doi: 10.1080/10408444.2016.1220916.

- [9] M. B. Abou-Donia, B. Siracuse, N. Gupta, a A. Sobel Sokol, „Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review", *Crit Rev Toxicol*, roč. 46, č. 10, s. 845–875, lis. 2016, doi: 10.1080/10408444.2016.1220916.
- [10] K. Willis, H. Salem, a F. R. Sidell, „Cyclosarin (GF)", in *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, 2014, s. 726–730. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00608-4.
- [11] M. Zengerle, F. Brandhuber, C. Schneider, F. Worek, G. Reiter, a S. Kubik, „Highly efficient cyclosarin degradation mediated by a β -cyclodextrin derivative containing an oxime-derived substituent", *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, roč. 7, s. 1543–1554, lis. 2011, doi: 10.3762/bjoc.7.182.
- [12] A. Wiercinski a J. P. Jackson, *Nerve Agents*. 2023.
- [13] G. S. Sirin, Y. Zhou, L. Lior-Hoffmann, S. Wang, a Y. Zhang, „Aging Mechanism of Soman Inhibited Acetylcholinesterase", *J Phys Chem B*, roč. 116, č. 40, s. 12199–12207, říj. 2012, doi: 10.1021/jp307790v.
- [14] J. Chen *et al.*, „(-)-Phenserine Attenuates Soman-Induced Neuropathology", *PLoS One*, roč. 9, č. 6, s. e99818, čer. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0099818.
- [15] J. A. Tørnes, T. Vik, a T. T. Kjellstrøm, „Leakage rate of the nerve agent tabun from sea-dumped munition", *Mar Environ Res*, roč. 161, s. 105052, říj. 2020, doi: 10.1016/j.marenvres.2020.105052.
- [16] D.-H. Lee, S. A. Valenzuela, M. N. Dominguez, M. Otsuka, D. J. Milliron, a E. V. Anslyn, „A self-degradable hydrogel sensor for a nerve agent tabun surrogate through a self-propagating cascade", *Cell Rep Phys Sci*, roč. 2, č. 9, s. 100552, zář. 2021, doi: 10.1016/j.xcrp.2021.100552.
- [17] T. Kranawetvogl *et al.*, „Evidence of nerve agent VX exposure in rat plasma by detection of albumin-adducts in vitro and in vivo", *Arch Toxicol*, roč. 97, č. 7, s. 1873–1885, čvc. 2023, doi: 10.1007/s00204-023-03521-4.

- [18] A.-C. Cuquel, F. Dorandeu, F. Ceppa, C. Renard, a P. Burnat, „Le VR, version russe du neurotoxique organophosphoré VX”, *Ann Pharm Fr*, roč. 73, č. 3, s. 180–189, kvě. 2015, doi: 10.1016/j.pharma.2014.11.005.
- [19] R. M. Black, „An Overview of Biological Markers of Exposure to Chemical Warfare Agents”, *J Anal Toxicol*, roč. 32, č. 1, s. 2–9, led. 2008, doi: 10.1093/jat/32.1.2.
- [20] University of Helsinki, *Blue Book*. University of Helsinki.
- [21] „OPCW”. Viděno: 28. srpen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.opcw.org>
- [22] A. Komersová, K. Komers, a A. Čegan, „New Findings about Ellman’s Method to Determine Cholinesterase Activity”, *Zeitschrift für Naturforschung C*, roč. 62, č. 1–2, s. 150–154, úno. 2007, doi: 10.1515/znc-2007-1-225.
- [23] M. Pohanka, „[Cholinesterase activity assays and their use in the diagnosis of various pathological states including poisoning by neurotoxic agents].”, *Ceska Slov Farm*, roč. 66, č. 4, s. 147–153, 2017.
- [24] J. Žďárová Karasová, K. Kuča, D. Jun, a J. Bajgar, „Užití ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholin- esteraz při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů ”, *Chemické listy*, s. 46–50, 2010.
- [25] N. H. Williams, J. M. Harrison, R. W. Read, a R. M. Black, „Phosphylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents”, *Arch Toxicol*, roč. 81, č. 9, s. 627–639, srp. 2007, doi: 10.1007/s00204-007-0191-8.
- [26] C.-C. Liu *et al.*, „Generic detection of organophosphorus nerve agent adducts to butyrylcholinesterase in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with an improved procainamide-gel separation and pepsin digestion method”, *J Chromatogr A*, roč. 1697, s. 463990, kvě. 2023, doi: 10.1016/j.chroma.2023.463990.
- [27] J. Wang, X. Lu, R. Gao, C. Pei, a H. Wang, „Current Progress for Retrospective Identification of Nerve Agent Biomarkers in Biological Samples

- after Exposure", *Toxics*, roč. 10, č. 8, s. 439, srp. 2022, doi: 10.3390/toxics10080439.
- [28] M. J. van der Schans, A. Fidder, D. van Oeveren, A. G. Hulst, a D. Noort, „Verification of Exposure to Cholinesterase Inhibitors: Generic Detection of OPCW Schedule 1 Nerve Agent Adducts to Human Butyrylcholinesterase", *J Anal Toxicol*, roč. 32, č. 1, s. 125–130, led. 2008, doi: 10.1093/jat/32.1.125.
- [29] M. de Bruin-Hoegée, I. M. van Damme, T. van Groningen, D. van der Riet-van Oeveren, D. Noort, a A. C. van Asten, „Elucidation of in Vitro Chlorinated Tyrosine Adducts in Blood Plasma as Selective Biomarkers of Chlorine Exposure.", *Chem Res Toxicol*, roč. 35, č. 6, s. 1070–1079, čer. 2022, doi: 10.1021/acs.chemrestox.2c00053.
- [30] M. Blanca *et al.*, „Retrospective determination of regenerated nerve agent sarin in human blood by liquid chromatography–mass spectrometry and in vivo implementation in rabbit", *Arch Toxicol*, roč. 94, č. 1, s. 103–111, led. 2020, doi: 10.1007/s00204-019-02622-3.
- [31] J. Riches, I. Morton, R. W. Read, a R. M. Black, „The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography–ion trap negative ion tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B*, roč. 816, č. 1–2, s. 251–258, úno. 2005, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.11.039.
- [32] A. de Castro *et al.*, „Understanding the Interaction Modes and Reactivity of Trimedoxime toward MmAChE Inhibited by Nerve Agents: Theoretical and Experimental Aspects", *Int J Mol Sci*, roč. 21, č. 18, s. 6510, zář. 2020, doi: 10.3390/ijms21186510.
- [33] „Zdravotnická záchranná služba Královehradeckého kraje". Viděno: 27. září 2023. [Online]. Dostupné z: Zdravotnická záchranná služba Královehradeckého kraje
- [34] Lucie Nováková, Michal Douša, a Petr Česla a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 2. vydání. Praha: Česká chromatografická škola, 2021.

- [35] „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography”, Merck. Viděno: 8. únor 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/hilic>
- [36] D. V. McCalley, „A study of column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography”, *J Chromatogr A*, roč. 1554, s. 61–70, čer. 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.04.016.
- [37] Q. Sheng, M. Liu, M. Lan, a G. Qing, „Hydrophilic interaction liquid chromatography promotes the development of bio-separation and bio-analytical chemistry”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 165, s. 117148, srp. 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117148.
- [38] R. W. Smith, „Mass Spectrometry”, in *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Elsevier, 2013, s. 603–608. doi: 10.1016/B978-0-12-382165-2.00250-6.
- [39] Havlíček Vladimír a Tureček František, „Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti”, *Chemické listy*, roč. 114, s. 106–112, 2020.
- [40] R. E. March, „Ion Trap Mass Spectrometers”, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, 2017, s. 330–337. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12675-7.
- [41] D. A. Vargas Medina, E. V. S. Maciel, a F. M. Lanças, „Mass spectrometric detection, instrumentation, and ionization methods”, in *Liquid Chromatography*, Elsevier, 2023, s. 679–706. doi: 10.1016/B978-0-323-99968-7.00016-3.
- [42] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, a Y. Michotte, „Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects”, *Journal of Chromatography B*, roč. 877, č. 23, s. 2198–2207, srp. 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.01.003.
- [43] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, a Y. Michotte, „Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects”, *Journal of Chromatography B*, roč. 877, č. 23, s. 2198–2207, srp. 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.01.003.

- [44] L. Dong *et al.*, „Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium“, *J Extracell Vesicles*, roč. 10, č. 2, pro. 2020, doi: 10.1002/jev2.12044.
- [45] J. Yang *et al.*, „Purification and identification of antioxidant peptides from duck plasma proteins“, *Food Chem*, roč. 319, s. 126534, čvc. 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126534.
- [46] S. Ahmed a A. Kaplan, „Therapeutic Plasma Exchange Using Membrane Plasma Separation“, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, roč. 15, č. 9, s. 1364–1370, zář. 2020, doi: 10.2215/CJN.12501019.
- [47] Q. Gao, Y. Chang, Q. Deng, a H. You, „A simple and rapid method for blood plasma separation driven by capillary force with an application in protein detection“, *Analytical Methods*, roč. 12, č. 20, s. 2560–2570, 2020, doi: 10.1039/D0AY00240B.
- [48] J. Jasiński *et al.*, „Butyrylcholinesterase–Protein Interactions in Human Serum“, *Int J Mol Sci*, roč. 22, č. 19, s. 10662, říj. 2021, doi: 10.3390/ijms221910662.
- [49] S. Hofmann *et al.*, „Development and validation of a simple HPLC-MS/MS method for the quantification of methylmalonic acid in human serum without a derivatization step“, *Biomedical Chromatography*, roč. 37, č. 8, srp. 2023, doi: 10.1002/bmc.5657.
- [50] A. Miki, M. Katagi, H. Tsuchihashi, a M. Yamashita, „Determination of Alkylmethylphosphonic Acids, the Main Metabolites of Organophosphorus Nerve Agents, in Biofluids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid-Liquid-Solid-Phase-Transfer-Catalyzed Pentafluorobenzoylation“, *J Anal Toxicol*, roč. 23, č. 2, s. 86–93, bře. 1999, doi: 10.1093/jat/23.2.86.
- [51] A. Weissberg, M. Madmon, M. Elgarisi, a S. Dagan, „Determination of trace amounts of G-type nerve agents in aqueous samples utilizing “in vial” instantaneous derivatization and liquid chromatography–tandem mass spectrometry“, *J Chromatogr A*, roč. 1512, s. 71–77, srp. 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.002.

