

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie**

Doktorský studijní program: Analytická chemie

Autoreferát disertační práce



Nové postupy v metabolické analýze biotekutin

Mgr. Lucie Římnáčová

Školitel: doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Školitel-konzultant: RNDr. Petr Šimek, CSc.

Praha, 2017

Disertační práce vznikla za finanční podpory těchto projektů:

- (a) Grantová agentura Univerzity Karlovy, č. 54009, Izotopicky značené alkylchloroformiáty jako nová derivatizační činidla v GC-MS a LC-MS analýze, název uvést, řešitel: L. Řimnáčová
- (b) Grantová agentura ČR, č. 13-18509S, New alkyl chloroformate labeling strategies for the targeted and comparative mass spectrometry-based metabolomics, řešitel: P. Šimek
- (c) Grantová agentura ČR, č. 17-22276S, New methods for metabolomic analysis of difficult metabolites, řešitel: P. Šimek

Práce byla vypracována v Laboratoři analytické biochemie a metabolomiky Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, v.v.i. v Českých Budějovicích.

Školitel:	doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D. Přírodovědecká fakulta Karlova univerzita v Praze
Školitel-konzultant:	RNDr. Petr Šimek, CSc Laboratoř analytické biochemie a metabolomiky Entomologický ústav Biologické centrum AV ČR, v.v.i.

8 Příloha 2: Curriculum vitae

Osobní údaje:

Jméno	Lucie Řimnáčová
Datum narození	11. 11. 1982
Místo narození	České Budějovice
Adresa	Sedlářská 2223/3, České Budějovice, 370 07
E-mail:	rimnacova@bclab.eu

Vzdělání:

2007 – 2017	Doktorské studium oboru Analytická chemie, PřF, UK v Praze
2014 – 2016 mateřství	Přerušení doktorského studia z důvodu mateřství
2002 – 2007	Magisterské studium oboru Analytické chemie, PřF, UK v Praze
1999 – 2002	Studium na ISS obchodu, služeb a podnikání, obor Analýza potravin

Zaměstnání:

2008 – doposud	Biologické centrum AV ČR, v.v.i., ENTÚ, Laboratoř analytické biochemie a metabolomiky, doktorand
2008	I.Q.A. a.s., Analytik

Jazykové znalosti:

Anglický jazyk	aktivně slovem i písmem, mezinárodní certifikát PET, B1 (2010)
----------------	--

Makuderová L., Netland O., Ueland P.M., Šimek P.: Injektor jako kritické místo GC-MS analýzy metabolitů při výzkumu jednoduhlého metabolismu, Setkání uživatelů GC/MS Thermo Scientific Finnigan, Tichonice, ČR, 4. – 5.5. 2010.

Řimnáčová L., Berková P., Košťál V., Šimek P.: Comparative metabolomics of phospholipids, sterols and steroids in model insect and human body fluids, 3rd European Lipidomic Meeting, Pardubice, 2. – 4.6.2013.

Plakátová sdělení:

Makuderová L., Šimek P., Hušek P., Mráz J.: Simultaneous GC-MS profiling of biomarkers of occupation exposure and acidic metabolites in urine, Metabolomics 2010, Amsterdam, Holandsko, 26.6. – 1.7.2010.

Řimnáčová L., Šimek P., Cimlová J., Zahradníčková H., Hušek P.: Alkyl chloroformates labelling strategies and their application in the identification and analysis of protic metabolites and xenometabolites, IMA 2011, Chania, Řecko, 18. – 22.9.2011.

Řimnáčová L., Šimek P., Mráz J., Šperlingová I.: The comparison of two analytical methods for determination of ethoxyacetic acid in human urine of ethoxyethanol-exposed people, 63. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, Slovensko, 5. – 9.9.2011.

Řimnáčová L., Šimek P., Mráz J.: Simultaneous screening of sixteen biomarkers of occupation exposure in urine, ISBM 2013, Londýn, UK, 2013.

Abstrakt

Předmětem této práce bylo studium reaktivity protických metabolitů s chlormravenčany a jejich využití v metabolické GC-MS analýze biotekutin. Tento výzkum byl veden ve třech samostatných studiích a jeho výsledkem jsou tři nové, originální metody pro GC-MS stanovení protických nízkomolekulárních metabolitů v biologickém materiálu, především biotekutinách.

První studie zkoumá objev rychlé derivatizace alicyklických hydroxylových skupin fluoralkylchlormravenčany (FCF) v bezvodém prostředí [1]. Působením FCF dochází k okamžité přeměně této hydroxylové skupiny na karbonát a tento krok lze snadno spojit s mikroextrakcí kapalina-kapalina (LLME) vznikajících derivátů do organické fáze. Reakce alicyklické hydroxy skupiny s FCF byla testována celkem na 12 klinicky významných steroidech a 4 tokoferolech. Byly popsány analytické vlastnosti zkoumaných analytů a metoda byla validována pro stanovení 6 diagnostických sterolů a 4 tokoferolů v lidském séru a plodové vodě. Nová metoda byla dále úspěšně použita k identifikaci a stanovení sterolů a tokoferolů ve tkáních hmyzu, ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) [2].

Druhá studie byla zaměřena na zkoumání reaktivity protických, zejména kyselých močových metabolitů s FCF, především s heptafluorbutylchlormravenčanem (HFBCF). Technikami GC-MS a LC-HRMS byly podrobně zkoumány reakční produkty 153 močových metabolitů a dvou vnitřních standardů. Nový postup byl validován pro stanovení 132 metabolitů v lidské moči a úspěšně ověřen pomocí GC-MS analýzy certifikovaného vzorku moči se známými koncentracemi diagnosticky významných organických kyselin a na analýze vzorků moči získaných od 100 zdravých dobrovolníků. Objem 25 µl moči umožnil přímé stanovení 112 fyziologických metabolitů v tomto souboru vzorků [3]. Analytický protokol popsané metody byl dále připraven pro kapitulu v knize [4].

Třetí studie popisuje rychlou GC-MS metodu pro stanovení kyselých močových biomarkerů expozice průmyslovým zdravím škodlivým

látkám v lidské moči. Byly zkoumány reakce biomarkerů expozice benzenu, toluenu, styrenu, xylenů, alkoxyethanolů, sirouhlíku, furalu a *N,N*-dimethylformamidu s různými alkylchlormravenčany (RCF). Většina uvedených biomarkerů poskytovala jeden předpokládaný produkt, některé však poskytovaly s RCF ještě další neobvyklý produkt. Jejich struktura byla jednoznačně potvrzena pomocí techniky LC-HRMS a derivatizačních činidel značených stabilními izotopy. Na základě získaných poznatků byla vypracována a validována nová GC-MS metoda pro současné stanovení 14 biomarkerů expozice v lidské moči a ověřena pomocí analýzy vzorku certifikované referenční moči.

Nové poznatky získané při výzkumu reaktivity alicyklické hydroxylové skupiny a dalších protických funkčních skupin metabolitů s chlormravenčany v souhrnu vedly k vypracování 3 nových analytických postupů přípravy biologických vzorků s perspektivním uplatněním především v oblasti GC-MS metabolické analýzy.

7 Příloha 1: Seznam publikací, prezentací a plakátových sdělení

Publikace:

Římnáčová L., Hušek P., Šimek P.: A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* **1339**, 154–167 (2014).

Košťál V., Urban T., Římnáčová L., Berková P., Šimek P.: Seasonal changes in minor membrane phospholipid classes, sterols and tocopherols in overwintering insect, *Pyrrhocoris apterus*, *J. Insect Physiol.* **59**, 934–941 (2013).

Hušek P., Švagera Z., Hanzlíková D., Římnáčová L., Zahradníčková H., Opekarová I., Šimek P.: Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by in-situ heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* **1443**, 211–232 (2016).

Hušek P., Švagera Z., Hanzlíková D., Opekarová I., Římnáčová L., Zahradníčková H., Šimek P.: GC-MS Metabolomic Profiling of Protic Metabolites Following Heptafluorobutyl Chloroformate Mediated Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, Theodoridis G., Gika H.G., Wilson I.D., eds., *Sample Preparation Protocol*, Springer, kapitola v knize, v tisku.

Římnáčová L., Šimek P., Mráz J., Pejchal V., Moos M., Opekar S., Hušek P.: Simultaneous GC-MS profiling of acidic biomarkers of occupational exposure and endogenous metabolites in human urine, připraveno k odeslání do redakce *Journal of Chromatography A*.

Prezentace:

Makuderová L., Šimek P., Mráz V., Stránský V., Čabala R.: Profiling of biomarkers of occupation exposure using extractive derivatization with chloroformates and GC-MS, Introduction, 5th ISC Modern Analytical Chemistry, Praha, ČR, 23.9.2009.

6 Seznam zkratk

AMCC – kyselina *S*-(*N*-methylkarbamoyl)merkapturová
BAA – kyselina butoxyoctová
EAA – kyselina ethoxyoctová
ECF – ethylchlormravenčan
EI – elektronová ionizace
FCA – kyselina furan-2-karboxylová
FCF - fluoralkylchlormravenčany
GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HCF – *n*-hexylchlormravenčan
HFBCF – 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchlormravenčan
HMDB – Human Metabolome Data Base
Chol – cholesterol
LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LLOQ – lower limit of quantification, nízký limit stanovení
LOD – mez detekce
LOQ – mez stanovení
MA – kyselina mandlová
MAA – kyselina methoxyoctová
m-MHA – kyselina *m*-methylhippurová
o-MHA – kyselina *o*-methylhippurová
PGA – kyselina fenylglyoxylová
PICI – pozitivní chemická ionizace
p-MHA – kyselina *p*-methylhippurová
RCF – alkylchlormravenčany
S-BMA – kyselina *S*-benzylmerkapturová
S-FPMA – kyselina *S-p*-fluorofenylmerkapturová
SIM – selected ion monitoring
S-PMA – kyselina *S*-fenylmerkapturová
S-TMA – kyselina *S-p*-tolylmerkapturová
t,t-MA – kyselina *t,t* - mukonová
TFECF – 2,2,2-trifluoroethylchlormravenčan
TFEOC – trifluoroethoxykarbonát
TIC – total ion current

Obsah

1	Úvod.....	7
1.1	Metabolomika a derivatizace.....	7
1.2	Derivatizace hydroxylových skupin pomocí fluoralkylchlormravenčanů a její reálné využití pro stanovení sterolů a tokoferolů pomocí GC/MS.....	8
1.3	Stanovení metabolitů v lidské moči po derivatizaci s heptafluorbutylchlormravenčanem (HFBCF) a GC/MS analýza.....	9
1.4	Stanovení biomarkerů pracovní expozice v lidské moči metodou GC/MS.....	9
2	Cíle práce	11
3	Výsledky a diskuse.....	12
3.1	Derivatizace hydroxylových skupin pomocí fluoralkylchlormravenčanů a její reálné využití pro stanovení sterolů a tokoferolů pomocí GC/MS.....	12
3.1.1	Testování reaktivity hydroxylové skupiny	12
3.1.2	Aplikace metody pro stanovení sterolů a tokoferolů v lidském séru a plodové vodě a její validace.	13
3.1.3	Aplikace metody pro stanovení sterolů v membránách hmyzu <i>Pyrrhocoris apterus</i>	14
3.2	Stanovení metabolitů v lidské moči po derivatizaci s HFBCF a GC/MS analýza.....	14
3.2.1	Reakční produkty metabolitů po derivatizaci s HFBCF..	14
3.2.2	Validace metody	16
3.2.3	Kvantifikace metabolitů v lidské moči.....	17
3.3	Stanovení biomarkerů pracovní expozice v lidské moči metodou GC/MS.....	18
3.3.1	Reakční produkty metabolitů xenobiotik po derivatizaci s ECF.	18
3.3.2	Hippurové kyseliny.....	18
3.3.3	Merkapturové kyseliny	19
3.3.4	Kvantifikace a validace metody.....	20
3.3.5	Analýza referenčního materiálu a vzorků moči po expozici ethoxyethanolem.....	20
4	Závěry	22

5	Použitá literatura	24
6	Seznam zkratk	28
7	Příloha 1: Seznam publikací, prezentací a plakátových sdělení	29
8	Příloha 2: Curriculum vitae	31

- [33] Lai J.F., Franke A.A.: Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: review nad overview of new developments, *J. Chromatogr., B* **931**, 23–41 (2013).
- [34] Amaral C., Gallardo E., Rodrigues R., Pinto Leito R., Quelhas D., Tomaz C., Cordoso M.L.: Quantitative analysis of five sterols in amniotic fluid by GC-MS: Application to the diagnosis of cholesterol biosynthesis defects, *J. Chromatogr., B* **878**, (2010) 2130–2136.
- [35] Baardman M.E., Erwich J.J.H.M., Berger R.M.F., Hofstra R.M.W., Kerstjens-Frederikse W.S., Lütjohann D., Plösch T.: The origin of fetal sterols in second-trimester amniotic fluid: endogenous synthesis or maternal-fetal transport, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **207**, 202e19–202e25 (2012).
- [36] Pedersen K. J.: The uncatalysed and the metal-ion catalysed decarboxylation of oxaloacetic acid, *Acta Scand.* **6**, 285–303 (1952).
- [37] Chen F. M. F., Slebioda M., Benoiton N. L.: Mixed carboxylic-carbonic acid anhydrides of acylamino acids and peptides as a convenient source of 2,4-dialkyl-5(4H)-oxazolones, *International Journal of Peptide and Protein Research* **31**, 339 – 344 (1988).
- [38] Budzikiewicz H., Djerassi C., Williams D.H.: Mass spectrometry of organic compounds (1967).
- [39] Šperlingová I., Dabrowská L., Stránský V., Dušková J., Kučera J., Tvrđíková M., Tichý M.: Determination of butoxyacetic acid (biomarker of ethylene glycol monobutyl ester exposure) in human urine candidate reference material, *Analytical Biochemistry* **397**, 433–438 (2010).

- [22] García-Llatas G., Vidal C., Cilla A., Barberd R., Lagarda M.J.: Simultaneous quantification of serum phytosterols and cholesterol precursors using a simple gas chromatographic method, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114**, 520–526 (2012).
- [23] Du M., Ahn D.U.: Simultaneous analysis of tocopherols, cholesterol, and phytosterols using gas chromatography, *J. Food Sci.* **67**, 1696–1700 (2002).
- [24] Pianese P., Salvia G., Campanozzi A., D'Apollito O., Russo A.D., Pettoello-Mantovani M., Corso G.: Sterol profiling in red blood cell membranes and plasma of newborns receiving total parenteral nutrition, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **47**, 645–651 (2008).
- [25] Quehenberger O., Armando A.M., Brown A.H., Milne S.B., Myers D.S., Merrill A.H., Bandyopadhyay S., Jones K.N., Kelly S., Shaner R.L., Sullards C.M., Wang E., Murphy R.C., Barkley R.M., Leiker T.J., Raetz C.R.H., Guan Z., Laird G.M., Six D.A., Russell D.W., McDonald J.G., Subramaniam S., Fahy E., Dennis E.A.: Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma, *J. Lipid Res.* **51**, 3299–3305 (2010).
- [26] Andrade I., Santos L., Ramos F.: Advances in analytical methods to study cholesterol metabolism: the determination of serum noncholesterol sterols, *Biomed. Chromatogr.* **27**, 1234–1242 (2013).
- [27] Nikkilä K., Riikonen S., Lindfors M., Miettinen T.A.: Serum squalene and noncholesterol sterols before and after delivery in normal and cholestatic pregnancy, *J. Lipid Res.* **37**, 2687–2695 (1996).
- [28] Lembcke J., Ceglarek U., Fiedler G.M., Baumann S., Liechtle A., Thiery J.: Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS, *J. Lipid Res.* **46**, 21–26 (2005).
- [29] Honda A., Yamashita K., Miyazaki H., Shirai M., Ikegami T., Xu G., Numazawa M., Hara T., Matsuzaki Y.: Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS, *J. Lipid Res.* **49**, 2063–2073 (2008).
- [30] Matysik S., Klunemann H.H., Schmitz G.: Gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of oxysterols, plant sterols, and cholesterol precursors, *Clin. Chem.* **58**, 1557–1564 (2012).
- [31] Hatam L.J., Kayden H.J.: High-performance liquid-chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular-elements of the blood, *J. Lipid Res.* **20**, 639–645 (1979).
- [32] Demirkaya F., Kadioglu Y.: Simple GC-FID method development and validation for determination of alpha-tocopherol (vitamin E) in human plasma, *J. Biochem. Biophys. Methods* **70**, 363–368 (2007).

1 Úvod

1.1 Metabolomika a derivatizace

V každé tělní tekutině probíhají metabolické děje a sloučeniny účastnící se metabolismu se nazývají metabolity. Komplexní sada metabolitů je označována jako metabolom, z čehož pak vyplývá, že metabolomika je komplexní analýza metabolomu [5]. K metabolomice se vztahuje několik důležitých pojmů. Nejčastěji se využívá tzv. metabolického profilování, kde se analyzuje, identifikuje a částečně kvantifikuje vybraný počet metabolitů, který náleží do třídy chemicky podobných sloučenin (např. aminokyseliny, sacharidy nebo polární lipidy), nebo které jsou společně zapojené do určité metabolické dráhy. Dále dělíme metabolomiku na cílenou a necílenou. U necílené sledujeme všechny metabolity v daném médiu (např. všechny organické kyseliny a aminokyseliny v moči) a u cílené provádíme kvalitativní a kvantitativní stanovení vybraných konkrétních analytů [6].

Současným trendem je stanovit co nejvíce metabolitů v jediné analýze za využití standardizovaných a efektivních metod. Problémem při kvantifikaci velkého počtu metabolitů je jejich fyzikálně-chemická variabilita, široké koncentrační rozmezí a přítomnost dalších sloučenin. Pro získání relevantních dat je pro metabolomickou analýzu důležitá reprodukovatelnost analytické metody včetně přípravy vzorku. Nemalé nároky jsou kladeny na citlivost metody.

Plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) patří v současné době v metabolomice mezi běžně používané analytické metody. Je vhodná především pro analýzu těkavých, termostabilních a nízkomolekulárních sloučenin, avšak velké množství metabolitů těchto vlastností nedosahuje, a proto bývá nezbytné je chemicky modifikovat – derivatizovat. Mezi často používané derivatizace patří silylace, methylace, oximace, acylace a v neposlední řadě derivatizace s chlormravenčany (RCF) [7]. RCF jsou vysoce reaktivní činidla, která reagují s kyselinami za přítomnosti alkoholu a pyridinu za vzniku esterů [8],

s thio skupinou za vzniku thiokarbonátů, s hydroxy skupinou (alkoholovou či fenolickou) za vzniku karbonátů a s amino skupinou za vzniku karbamátů [9]. Novější a často výhodnější je derivatizace s fluorovanými analogy RCF. Tyto chlormravenčany jsou více reaktivní než jejich alkylované analogy a poskytují velmi těkavé deriváty, které jsou navzdory jejich značné molekulové hmotnosti vhodné pro GC analýzu.

1.2 Derivatizace hydroxylových skupin pomocí fluoralkylchlormravenčanů a její reálné využití pro stanovení sterolů a tokoferolů pomocí GC-MS

Organické sloučeniny steroidní povahy obsahující hydroxylovou skupinu je často výhodné analyzovat pomocí GC. Pro toto stanovení je ale nezbytná derivatizace hydroxylové skupiny, protože aktivní vodík, který hydroxylová skupina obsahuje, způsobuje interakce v injektoru nebo na koloně. Dalším problémem volného hydroxylu může být, že pro zplynění látek steroidní povahy jsou třeba vysoké teploty a labilní hydroxyl má tendenci dehydratovat. Derivatizací se nejen zvýší těkavost a stabilita sloučeniny, ale i separační a detekční vlastnosti. [7].

Jako modelová sloučenina pro vývoj metody byl vybrán cholesterol (Chol). Je jednoduše sledovatelný pomocí GC-MS jak v derivatizované formě, tak s volnou hydroxylovou skupinou a tudíž lze snadno sledovat výtěžek reakce. Derivatizační reakce hydroxylové skupiny cholesterolu s různými chlormravenčany byla nejprve zkoumána ve vodném prostředí za použití optimalizovaných metod pro stanovení amino- a karboxylových kyselin v lidských biotekutinách [10 – 12] a v průmyslových vodách [13 – 15]. V druhém případě byly testovány alkylované a fluorované chlormravenčany a jejich reaktivita s hydroxylovou skupinou Chol v nevodném prostředí. Po nalezení optimálních podmínek reakce byl vybrán trifluorethylchlormravenčan (TFECF) a set stanovovaných sloučenin byl rozšířen. Reakce byla pak porovnána se silylací a byly porovnány a vyhodnoceny výhody a nevýhody obou metod. Metoda byla také využita pro sledování sezonních změn koncentrací 3 sterolů (β -sitosterol, kampesterol a

- N. A. Alterman, P. Hutzinger, eds., *Amino Acid Handbook*, Chapter 13, Springer Media & Business Media, New York, 828, 137–152 (2012).
- [12] Šimek P., Hušek P., Zahradníčková H.: Gas chromatographic-sass spectrometric analysis of biomarkers related to folate and cobalamin status in human serum after dimercaptopropanesulfonate reduction and heptafluorobutyl chloroformate derivatization, *Anal. Chem.* **80**, 5776–5782 (2008).
- [13] Vincenti M., Biazzi S., Ghiglione N., Valsania M.C., Richardson S.D.: Comparison of highly-fluorinated chloroformates as direct aqueous sample derivatizing agents for hydrophilic analytes and drinking-water disinfection by-products, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **16**, 803–813 (2005).
- [14] Vincenti M., Ghiglione N., Valsania M.C., Davit P., Richardson S.D.: Synthesis of highly fluorinated chloroformates and their use as derivatizing agents for hydrophilic compounds and drinking-water-disinfection by-products, *Helv. Chim. Acta* **87**, 370–375 (2004).
- [15] Minerio C., Vincenti M.: Determination of trace amounts of highly hydrophilic compounds in water by direct derivatization and gas-chromatography-mass spectrometry, *J. Fresenius Anal. Chem.* **350**, 403–409 (1994).
- [16] Koek M.M., Jellema R.H., van der Greef J., Tas A.C., Hankemeier T.: Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives, *Metabolomics* **7**, 307–328 (2011).
- [17] Pasikanti K.K., Ho P.C., Chan E.C.Y.: Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids, *J. Chromatogr. B* **871**, 202–211 (2008).
- [18] Hušek P., Šimek P.: Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis. Review on a decade use of the reagents as esterifying agents, *Curr. Pharm. Anal.* **2**, 23–43 (2006).
- [19] Zahradníčková H., Hartvich P., Šimek P., Hušek P.: Gas chromatographic analysis of amino acid enantiomers in Carbetocin peptide hydrolysates after fast derivatization with pentafluoropropyl chloroformate, *Amino Acids* **35** 445–450 (2008).
- [20] Hušek P.: Improved procedure for the derivatization and gas-chromatographic determination of hydroxycarboxylic acids treated with chloroformates, *J. Chromatogr., A* **630**, 429–437 (1993).
- [21] Saraiva D., Semedo R., Castilho M.-C., Silva J.M., Ramos F.: Selection of the derivatization reagent – the case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC-MS analyses, *J. Chromatogr., B* **879**, 3806–3811 (2011).

5 Použitá literatura

- [1] Římnáčová L., Hušek P., Šimek P.: A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* **1339**, 154–167 (2014).
- [2] Košťál V., Urban T., Římnáčová L., Berková P., Šimek P.: Seasonal changes in minor membrane phospholipid classes, sterols and tocopherols in overwintering insect, *Pyrrhocoris apterus*, *J. Insect Physiol.* **59**, 934–941 (2013).
- [3] Hušek P., Švagera Z., Hanzlíková D., Římnáčová L., Zahradníčková H., Opekarová I., Šimek P.: Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by in-situ heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1443**, 211 – 232 (2016).
- [4] Hušek P., Švagera Z., Hanzlíková D., Opekarová I., Římnáčová L., Zahradníčková H., Šimek P.: GC-MS Metabolomic Profiling of Protic Metabolites Following Heptafluorobutyl Chloroformate Mediated Dispersive Liquid Liquid Microextraction, Theodoridis G., Gika H.G., Wilson I.D., eds., *Sample Preparation Protocol*, Springer, kapitola v knize, v tisku.
- [5] Musilová J., Glatz Z.: Metabolomics – Basic Concepts, Strategies and Methodologies, *Chem. Listy* **105**, 745–751 (2011).
- [6] Mishur R.J., Rea S.L.: Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: Detection of biomarkers of aging of age-related diseases, *Mass Spectrom. Rev.* **31**, 70–95 (2012).
- [7] Blau K., Halket J.: *Handbook of derivatives for chromatography*, Wiley, New York (1993).
- [8] Hušek P., Rijks J.A., Leclercq P.A., Cramers C.A.: Fast esterification of fatty acids with alkyl chloroformates, *J. High Resolut. Chromatogr.* **13**, 633–638 (1990).
- [9] Hušek P.: Amino acid derivatization in five minutes, *FEBS Lett.* **280**, 354–356 (1991).
- [10] Hušek P., Šimek P., Hartvich P., Zahradníčková H.: Fluoroalkyl chloroformates in treating amino acids for gas chromatographic analysis, *J. Chromatogr., A* **1186** 391–400 (2008).
- [11] Šimek P., Hušek P., Zahradníčková H.: Heptafluorobutyl chloroformate-based sample preparation protocol for chiral and nonchiral amino acid analysis by gas chromatography, *Methods in Molecular Biology*,

cholesterol) a 2 tokoferolů (γ - a δ -) v membránách hmyzu – ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) [2].

1.3 Stanovení metabolitů v lidské moči po derivatizaci s heptafluorobutylchloromravenčanem (HFBCF) a GC-MS analýza

GC-MS je efektivní nástroj pro stanovení metabolitů v moči, jelikož se jedná o techniku vysoce účinnou, citlivou a robustní [16, 17]. Možností modifikace malých polárních analytů je derivatizace s fluorovanými analogy chlormravenčanů.

V této studii byla vyvinuta nová GC-MS metoda pro cílené stanovení metabolických produktů v moči. Byly zde studovány reakční produkty a analytické vlastnosti více než 150 známých standardů obsahujících amino a karboxylovou skupinu, které se vyskytují v moči. Touto metodou bylo proměřeno 19 diagnostických metabolitů v certifikované moči a dále pak 100 vzorků ranních močí získaných od zdravých dobrovolníků obou pohlaví. Metoda byla validována.

1.4 Stanovení biomarkerů pracovní expozice v lidské moči metodou GC-MS.

Někteří lidé jsou ve svém pracovním prostředí exponováni chemikáliemi, které mohou být potenciálně nebezpečné. Mnoho významných organických průmyslových škodlivin (rozpouštědla, monomery) je z organismu vylučováno močí ve formě karboxylových kyselin, které se stanovují jako biomarkery pracovní expozice. Mezi nejčastěji sledované patří metabolity benzenu, toluenu, styrenu, xylenů a alkoxyethanolů. Jejich biologické limity se pohybují v rozmezí od desítek μg do tisíců mg na litr moči, resp. na g kreatininu.

Protože v rámci hygienického dozoru je obvykle požadováno stanovení (předem známé) dominantní škodliviny, vypracované pracovní postupy bývají optimalizovány pro stanovení jednotlivých biomarkerů (zatímco ostatní se nehledají). Laboratoř tak musí udržovat a validovat řadu

metod. Alternativou je stanovení co největšího počtu analytů jednotným analytickým postupem – tzv. profiling. Pro tento účel se nabízí derivatizace RCF s následným plynově chromatografickým stanovením [18].

metabolitů poskytovalo (78 %) jeden produkt, 25 (16 %) produkty dva a kyselina 2-methylcitronová a kyselina citronová produktů více. Ze zkoumaného souboru 5 metabolitů nebylo možno detekovat a 3 metabolity byly vhodné pouze pro LC-MS analýzu. Po validaci na GC-MS byla metoda aplikována na reálné vzorky lidské moči a na moč obsahující certifikované množství vybraných metabolitů. Výsledky ukázaly, že vypracovaná metoda je vhodná pro cílenou metabolickou analýzu lidské moči.

Třetí studie se zabývala výzkumem rychlé a jednoduché metody pro stanovení xenometabolitů v lidské moči. Jednalo se o metabolity benzenu, toluenu, xylenu, styrenu, alkoxyalkoholů, sirovodíku, furalu a *N,N*-dimethylformamidu. Metabolity byly derivatizovány ECF in situ a získaný extrakt přímo podroben GC-MS analýze. Většina analytů poskytovala jeden předpokládaný produkt, jen ve skupině hippurových a merkapturových kyselin byl současně pozorován další produkt, jejichž struktura byla objasněna pomocí LC-HRMS a izotopicky značeným ECF. Vyvinutá metoda byla validována pro 14 běžných biomarkerů expozice a úspěšně otestována na certifikovaném referenčním materiálu, porovnána se zavedenou silylační metodou [39] a bylo dokázáno, že je použitelná pro stanovení uvedených metabolitů v laboratorní praxi.

4 Závěry

Byly vypracovány tři nové metody pro GC-MS stanovení protických metabolitů v biotekutinách (lidská moč, lidské sérum a plodová voda) založených na in situ derivatizaci s alkylchlormravenčany a jejich fluorovanými analogy.

První z metod [1] popisuje novou, efektivní derivatizaci sekundární alicyklické hydroxylové skupiny ve sterolech a steroidech. Jako modelová sloučenina pro vývoj metody byl použit cholesterol a byly prověřeny různé alkylované chlormravenčany i jejich fluorované analogy pro reakci ve vodném i v bezvodém prostředí. Ke stoprocentní přeměně hydroxylové skupiny na očekávaný karbonát docházelo při použití činidel TFECF a HFBCF v bezvodém prostředí. Acylační reakce byla kombinována s mikroextrakcí kapalina-kapalina mezi isooktanovou a acetonitrilovou fází. Vyvinutá metoda byla úspěšně testována pro GC-MS analýzu 12 modelových sterolů a steroidů a 4 tokoferolů. Každý z analytů poskytoval jeden pík s výbornými separačními vlastnostmi a dobře definovaná EI spektra obsahující diagnostické ionty vhodné pro kvantitativní analýzu. Po těchto experimentech byla metoda validována pro stanovení 6 diagnostických sterolů a 4 tokoferolů v lidském séru a plodové vodě a aplikována pro stanovení sterolů a tokoferolů v reálných vzorcích séra a plodové vody. Obdržené výsledky dobře korelovaly s výsledky popsány ve dřívějších studiích [21 – 35]. Metoda derivatizace byla také použita pro stanovení sterolů a tokoferolů u hmyzu – ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). [2]

Ve druhé studii [3] byla vyvinuta, popsána a validována GC-MS metoda založená na derivatizaci protických skupin pomocí HFBCF a současné mikroextrakci kapalina-kapalina, díky níž je možno stanovit profil 132 metabolitů v lidské moči. Vzorek moči (25 µl) byl podroben derivatizaci a následně analýze technikou GC-MS. Bylo celkem sledováno 153 klinicky významných močových metabolitů (56 aminokyselin a jejich konjugátů, 84 organických kyselin, 9 biogenních aminů a 4 další polární analyty). 120

2 Cíle práce

1. Studium reaktivity protických funkčních skupin s alkylchlorformiáty ve vybraných skupinách metabolitů, v první řadě alicyklické hydroxylové skupiny steroidů a tokoferolů a uplatnění nových poznatků v metabolomické GC-MS analýze.
2. Výzkum vznikajících reakčních produktů heptafluorbutylchlormravenčanu se 153 protickými močovými metabolity pro optimalizaci podmínek přípravy vzorků moči a jejich GC-MS metabolomickou analýzu.
3. Studium xenobiotik v lidské moči po expozici organismu organickým rozpouštědly benzenu, toluenu, styrenu, xylenu, alkoxyethanolů, sirouhlíku, furalu a *N,N*-dimethylformamidu a jejich derivatizace alkylchlorformiáty a GC-MS stanovení.

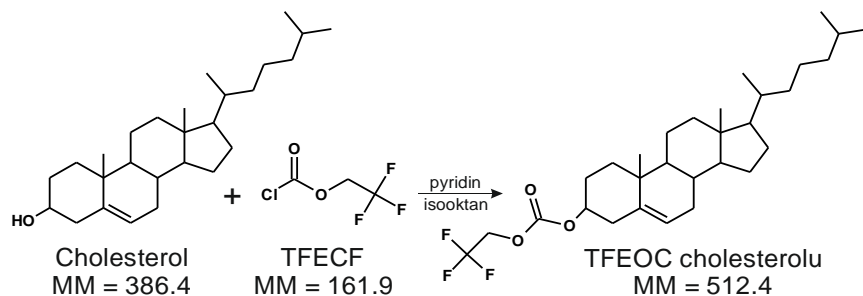
Výzkum byl realizován ve třech samostatných studiích a na základě nových poznatků byly vypracovány tři nové originální postupy analýzy protických metabolitů v biotekutinách technikou GC-MS.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Derivatizace hydroxylových skupin pomocí fluoralkylchlormravenčanů a její reálné využití pro stanovení sterolů a tokoferolů pomocí GC-MS

3.1.1 Testování reaktivity hydroxylové skupiny

Pro studium reaktivity alicyklické hydroxylové skupiny s různými chlormravenčany byl vybrán jako modelová sloučenina Chol. Reakční schéma acylace Chol s TFECF je uvedeno na Obr. 1.



Obr. 1: Reakční schéma cholesterolu s TFECF a výsledný produkt – trifluoroethoxy karbonát (TFEOC) cholesterolu.

Reaktivita hydroxy skupiny byla v první fázi zkoušena ve vodném prostředí, byly testovány již zaběhlé metodiky, které byly použity již dříve, například pro stanovení polárních metabolitů v lidských biotekutinách [10 – 12, 19, 20] nebo v průmyslových vodách [13, 15]. Chol byl podroben derivatizaci s různými chlormravenčany (methyl-, ethyl- (ECF), *iso*-butyl-, hexyl- (HCF) chlormravenčan, TFECF a HFBCF) a výsledné karbonáty byly měřeny metodou GC-MS. Pro vyhodnocení derivatizační účinnosti byl na GC-MS také měřen nezreagovaný Chol. Z výsledků bylo patrné, že reaktivita hydroxylové skupiny Chol s RCF ve vodném prostředí je nízká, mezi 4 – 10 %, a že stoupá se zavedením fluorovaných chlormravenčanů (výtěžek 41 % při použití TFECF a 48 % při použití HFBCF). Dále se ukázalo, že vliv na

(*tert*-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamidem (MTBSTFA), přičemž je tato metoda mnohem rychlejší a derivatizace a extrakce probíhá v jednom kroku.

následnou derivatizací s přírodními i s isotopicky značenými ECF. Ukázalo se, že derivatizační produkt AMCC a sirovodíku poskytuje stejné hmotnostní spektrum a jejich retenční časy se shodují. Při stanovení stability jednotlivých derivátů bylo zjištěno, že produkt derivatizace AMCC není stabilní, a tudíž tato kyselina nebyla dále kvantifikována.

3.3.4 Kvantifikace a validace metody

Metoda byla validována pro 14 metabolitů xenobiotik. Bylo měřeno v SIM módu, kde byly sledovány charakteristické diagnostické ionty pro každou látku. Byla určena kalibrační závislost, LOD a mez stanovitelnosti (LOQ). Všechna validační data byla uspokojivá, kromě LOQ pro *S*-PMA (0,07 mg/l), protože pro tuto kyselinu je biologický limit nižší (0,05 mg/l). Dále byla zjištěna přesnost, preciznost, výtěžnost a stabilita. Preciznost byla v rozmezí 0,2 – 14,9 %, přesnost v rozmezí 80 – 120 %, výtěžnost v rozmezí 91 – 108 %. Deriváty kyselin určené pro validaci metody byly shledány stabilní (± 8 %).

3.3.5 Analýza referenčního materiálu a vzorků moči po expozici ethoxyethanolem

Validovaná metoda byla ověřena na stanovení známého množství kyselin v moči u dvou typů referenčních materiálů. První referenční vzorek (IP 45) obsahoval známé množství kyselin MAA, EAA, BAA, PGA, *t,t*-MA, *o*-, *m*- a *p*-MHA a druhý (RM 6009) obsahoval známou koncentraci PGA a MA. Naměřené hodnoty byly v dobré shodě s hodnotami referenčními.

Metoda byla dále využita k analýze vzorků moči zdravého dobrovolníka, který byl vystaven po dobu 4 hodin expozici ethoxyethanolem a v jehož moči byl hledán metabolit tohoto alkoholu – EAA. Metoda byla porovnána s klasickou silylační derivatizační metodou stanovení EAA [39]. Koncentrace EAA v moči nejprve narůstala a po dosažení maxima, cca po 8 hodinách, začala klesat. Z výsledků je patrné, že EAA je v moči detekovatelná ještě 188 hodin po ukončení expozice. Ukázalo se, že nová derivatizace s ECF je schopna konkurovat klasické silylaci s *N*-methyl-*N*-

reaktivitu má nahrazení samotného pyridinu za roztok pyridinu s *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem. Zde se výtěžek reakce zvedl z 5 % na 53 % při použití HCF a ze 41 % na 93 % při použití TFECF. Avšak ani u jednoho z použitých postupů nebylo dosaženo přeměny Chol na příslušný karbonát se 100% účinností. Tudíž byla do studie zařazena další série pokusů, kde se testované reakce převedly do bezvodého prostředí. Ukázalo se, že reakční výtěžky jsou vyšší v bezvodém prostředí, ale ke kompletnímu vzniku požadovaného derivátu vedla pouze cesta při použití fluorovaných chlormravenčanů (TFECF a HFBCF).

Aby bylo dokázáno, že derivatizace je účinná i pro další skupiny látek, byl set analytů rozšířen o jiné živočišné a rostlinné steroly, o zástupce hydroxycholesterolů a steroidních hormonů a tokoferolů. Zde se ukázalo, že vyvinutá metoda funguje i pro tyto látky a po reakci s TFECF dochází ke vzniku příslušných karbonátů, které v systému GC-MS poskytují jeden pík a definovaná MS spektra. Druhá hydroxylová skupina, obsažená ve struktuře hydroxycholesterolů a některých steroidů také podléhala derivatizaci, stejně jako fenolický hydroxyl u tokoferolů. Velkou výhodou reakce oproti derivatizacím se silylačními činidly je to, že pokud je ve struktuře látky přítomna keto skupina, zůstává po reakci nezměněna. U silylací je pro chránění keto skupin potřebná oximace.

3.1.2 Aplikace metody pro stanovení sterolů a tokoferolů v lidském séru a plodové vodě a její validace

Metoda byla pak použita pro stanovení 10 sterolů a tokoferolů v lidském séru a v plodové vodě. Před aplikací na reálné vzorky byla tato metoda validována. Všechna validační kritéria byla splněna. Steroly se v biotekutinách vyskytují jak ve volné formě, tak ve formě vázané, tudíž byl každý vzorek před derivatizací podroben saponifikaci [21]. Byl k dispozici soubor dvaceti vzorků krevního séra obdrženy od deseti matek, vždy před porodem a po porodu, a pěti vzorků plodové vody. Nalezené koncentrace stanovovaných volných i vázaných sterolů a tokoferolů se shodovaly s hodnotami, které byly naměřeny v dřívějších studiích [21 – 35].

3.1.3 Aplikace metody pro stanovení sterolů a tokoferolů v membránách hmyzu *Pyrrhocoris apterus*

Ve vzorcích hmyzu byly identifikovány tři různé steroly, cholesterol, β -sitosterol a kampesterol. Obsah cholesterolu byl relativně nízký, v rozsahu 0,2 – 0,4 mol% ve svalové tkáni a mezi 0,5 – 0,8 mol% v tukové tkáni. Rostlinné steroly (β -sitosterol a kampesterol) byly obsaženy ve vyšší koncentraci, kampesterol v koncentračním rozmezí 1,2 – 2,5 mol% ve svalové tkáni a 1,5 – 4,6 mol% v tukové části, β -sitosterol v rozmezí 5,1 – 8,0 mol% ve svalové tkáni a 6,8 – 15,2 mol% v tukové tkáni. Zatímco koncentrace cholesterolu byla během roku téměř stejná u obou zkoumaných tkání, rostlinné steroly vykazovaly podobné sezonní trendy, minimum během jara a léta a maximum během podzimu a zimy. Ve vzorcích byly dále nalezeny dva izomery tokoferolu. δ -Tokoferol se vyskytoval v koncentračním rozmezí 0,1 – 1,2 mol% ve svalech a 0,3 – 5,5 mol% v tukové tkáni a γ -tokoferol v koncentračním rozmezí 3,0 – 8,6 mol% ve svalové části a 9,1 – 31,3 mol% v tukové části. Tato studie pomohla porozumění a pochopení sezonních změn stanovovaných sloučenin v hmyzích buněčných membránách ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*).

3.2 Stanovení metabolitů v lidské moči po derivatizaci s HFBCF a GC-MS analýza

3.2.1 Reakční produkty metabolitů po derivatizaci s HFBCF

Set metabolitů byl vybrán na základě studia současné literatury a metabolických databází. Jednalo se hlavně o aminokyseliny (56 aminokyselin a jejich konjugátů) a karboxylové kyseliny (86), biogenní aminy (9) a dva interní standardy (kyselina 4-fenylmásečná a homofenylalanin). Reakční produkty každého analytu byly studovány ve vodném prostředí a v umělé moči a jejich elektronová (EI) spektra a hmotová spektra měřená pomocí chemické ionizace v pozitivním módu (PICI) byla prozkoumána. Když reakční produkt nebyl pozorován nebo byl přítomen v nízkém výtěžku, organická fáze byla odpařena, obsah byl znovu rozpuštěn v mobilní fázi a

spekter naměřena i PICI spektra. Ze získaných MS spekter bylo určeno, že pík s vyšší retencí náleží očekávanému ethylesteru kyseliny a pík s nižší retencí byl určen, dle spekter a literatury [37], jako cykлизovaná forma hippurové kyseliny – 2-fenyloxazol-5(4*H*)-on. Tato hypotéza byla poté potvrzena měřením standardu 2-fenyloxazol-5(4*H*)-onu. Z literatury je známo [37], že oxazolony mají tendenci se rozpadnout po přidání alkoholu. Po provedených experimentech byl do derivatizační reakce zařazen poslední krok – přidání 50 μ l ethanolu, kdy je oxazol on převeden na ethylester.

3.3.3 Merkapturové kyseliny

Druhou problematickou skupinou byla skupina merkapturových kyselin. U kyselin *S*-fenylmerkapturové (*S*-PMA), *S*-tolylmerkapturové (*S*-TMA) a *S*-*p*-fluorfenylmerkapturové (*S*-FSPMA) docházelo ke vzniku dvou píků v poměru 1 : 1. Dříve eluující pík byl neznámý produkt, později eluující pík byl očekávaný ethylester. *S*-benzylmerkapturová kyselina (*S*-BMA) dávala také dva produkty v poměru 2 : 5, opět dříve eluující pík byl neznámý produkt, a druhý pík ethylester. Pro identifikaci neočekávaných produktů byly použity isotopicky značené ethylchlormravenčany (D_3 -ECF a $^{13}C_2$ -ECF). Byla naměřena EI i PICI spektra a bylo určeno, že pro *S*-PMA, *S*-TMA a *S*-FSPMA kromě očekávaného ethylesteru dochází ke vzniku thiokarbonátů. Tento fakt byl v souladu nejen s hmotovými spektry ale i s literaturou [38]. U *S*-BMA byla pro dříve eluující pík navržena struktura benzylmerkaptanu. Tato hypotéza byla potvrzena proměřením komerčně dostupného standardu benzylmerkaptanu metodou GC-MS a porovnáním retenčních časů a MS spektra.

Výjimku ve skupině merkapturových kyselin tvořila AMCC. Tato kyselina poskytovala po derivatizaci pouze jeden produkt, ale z EI spektra bylo jasné, že se nejedná o žádný z očekávaných produktů. Derivatizace pak byla provedena i s izotopicky značenými ECF a u všech derivatizovaných produktů byla proměřena jak EI, tak PICI spektra. Z těchto naměřených dat se zdálo být možné, že vznikající produkt je derivatizovaný sirovodík. Tato domněnka byla potvrzena vyrobením sirovodíku v Kippově přístroji a jeho

detekovány ve vyšší koncentraci, než 100 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu. V reakčním mediu je takový nadbytek derivatizačního činidla (10 μl , tj. přibližně 60 μmol), že při objemu moči 25 μl není problém derivatizovat všechny metabolity i ve vyšších koncentračních hladinách.

3.3 Stanovení biomarkerů pracovní expozice v lidské moči metodou GC-MS

3.3.1 Reakční produkty metabolitů xenobiotik po derivatizaci s ECF

Derivatizace s ECF se ukázala jako vhodná pro stanovení všech šestnácti vyšetřovaných analytů. Pro většinu z nich docházelo ke vzniku jednoho očekávaného produktu s jasně definovaným hmotnostním spektrem. Monoethylester vznikal u kyselin: methoxyoctové (MAA), ethoxyoctové (EAA), butoxyoctové (BAA), furan-2-karboxylové (FCA), fenylglyoxylové (PGA) a u dvou vnitřních standardů, kyseliny 2-fenylmáslé a pentafluorofenoxyoctové, diethylester vznikl pro kyselinu *t,t*-mukonovou (*t,t*-MA) a její vnitřní standard kyselinu adipovou – $^{13}\text{C}_2$, ethylester-ethylkarbonát pro kyselinu mandlovou (MA) a ethylester-ethylkarbamát pro kyselinu 2-thiothiazolidin-4-karboxylovou a její vnitřní standard kyselinu *D*-azetidin 2-karboxylovou. U metabolitů kyselin hippurových a merkapturových docházelo ke vzniku produktů dvou, kde kromě očekávaného ethylesteru vznikal ještě produkt další. Poslední problematickou kyselinou byla kyselina *S*-(*N*-methylkarbamoyl)merkapturová (AMCC), kde vznikal pouze jeden produkt, ale dle hmotnostního spektra se nejednalo o očekávaný derivát. Pro tyto látky bylo zapotřebí dalších experimentů pro objasnění jejich struktury, což je popsáno dále.

3.3.2 Hippurové kyseliny

První z problematických skupin látek byla skupina hippurových kyselin (hippurová, *o*-, *m*- a *p*-methylhippurová (*o*-, *m*- a *p*-MHA)). Po derivatizaci s ECF byly pozorovány dva chromatografické píky pro každou z hippurových kyselin v poměru 2 : 1. Pro ethyl deriváty byla kromě EI

změřen na LC-MS. U většiny testovaných metabolitů docházelo ke vzniku jednoho definovaného derivátu a tento derivát poskytoval jeden pík v TIC (total ion current) GC-MS chromatogramu (120 analytů, 78 % všech zkoumaných).

Relativní TIC EI odezva minoritních vedlejších produktů, které vznikaly hlavně u nekompletně derivatizovaných funkčních skupin, byla menší než 4 % ve srovnání s píky očekávaných majoritních produktů. Heptafluorobutylester kyseliny pyrohroznové byl detegován, ale jeho diagnostický fragment *m/z* 43 byl překryt vysokým EI signálem píku rozpouštědla. Méně reaktivní hydroxylové skupiny ve 3-hydroxykarboxylových kyselinách, hydroxyaminokyselinách a histidinu, zůstaly částečně nezderivatizované a vznikaly dva produkty.

Funkční skupiny cystinu a homocystinu byly pomocí HFBCF derivatizovány kompletně. Disulfidické můstky v obou aminokyselinách byly redukovány a vzniklý cystein a homocystein byl derivatizován. Tudíž změřený obsah cysteinu (resp. homocysteinu) odpovídal sumě cystin-cystein (resp. homocystin-homocystein).

U biogenních aminů putrescinu a kadaverinu kromě předpokládaného karbamátu vznikal ještě vedlejší produkt – isokyanát-karbamát. V případě kyseliny 2-ketoglutarové a lysinu byly pozorovány dva izomery. U některých acylovaných aminokyselin, *N*-acetylglycinu, *N*-hexanoylglycinu a kyseliny hippurové docházelo k cyklizaci za současné ztráty vody.

U polyfunkčních organických kyselin nebyla derivatizace úplně účinná. Na příklad u kyseliny citronové, která obsahuje tři stericky stíněné karboxylové skupiny a hydroxy skupinu, dochází ke vzniku tří produktů. Jedním z nich je kyselina *cis*-akonitová. U glutaminu kromě očekávaného derivátu dochází ke vzniku derivátů pyroglutamové a glutamové kyseliny (minoritně).

Kyselina mevalonová neposkytovala vyhovující GC pík. Jak ukázala pozdější LC analýza, dochází u ní pouze k esterifikaci karboxylové

skupiny a 3- a 5-hydroxy skupina se neacyluje. Podobně, amino-karboxylové funkční skupiny u citrulinu a argininu jsou derivatizovány pouze v malé míře, přičemž guanidinová (u argininu) a ureido skupina (u citrulinu) zůstávají nezreagované. LC-MS analýza také ukázala, že močovina a kyselina močová, které jsou v moči obsaženy ve vysoké koncentraci, nejsou HFBCF derivatizované a zůstávají ve vodné fázi po extrakci kapalina-kapalina.

Kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctová a 3,4-dihydroxymandlová se ukázaly jako částečně labilní. Kyselina oxaloctová se rychle rozkládá ve vodném prostředí [36]. Biogenní aminy metanefrin a normetanefrin poskytovaly nízké reakční výtěžky a jsou v moči ve velmi nízké koncentraci, tudíž nebyly vhodným subjektem pro další výzkum.

3.2.2 Validace metody

Bylo vybráno 132 analytů, které byly přidány do umělé moči a byly zkoumány jejich vlastnosti po derivatizaci s HFBCF a analýze na GC-MS. Testované metabolity byly rozděleny do dvou směsí, které obsahovaly každý analyt ve střední hladině. Tato hladina byla vybrána na základě přirozeně se vyskytující se koncentrace příslušných metabolitů v moči. Kalibrační závislosti byly proměřeny v rozmezí třech řádů okolo střední hladiny. Kalibrační data zahrnovala parametry kalibrační závislosti, koeficient determinace R^2 , mez detekce (LOD) a spodní mez stanovení (LLOQ). Bylo by žádoucí použít strukturně podobný (nejlépe izotopicky značený) interní standard pro každý analyt, ale při takto vysokém množství analytů je tento model těžko realizovatelný. Proto byly vybrány a pro kvantifikaci většiny organických a amino-karboxylových kyselin použity dva interní standardy, kyselina 4-fenylmásečná a homofenylalanin.

Koeficient R^2 byl vyhovující ve většině případech ($R^2 > 0,97$), kromě aminokyselin obsahující N-acetyl, jako je tiglylglycin, N-acetylglycin-2, propionylglycin a kyselina hippurová-1, bazických aminokyselin (lysinu a cystathioninu), kyseliny 2,6-diaminopimelové, prolyldihydroxyprolinu, dihydroxyfenylalaninu a kyseliny 4-hydroxymandlové. Kyselina citronová, která se přibližně ze 2 % během derivatizace mění na kyselinu *cis*-akonitovou,

zhoršuje kvantifikaci kyseliny *cis* a *trans*-akonitové. LOD hodnoty byly stanoveny pod koncentrační hladinou 0,2 $\mu\text{mol/l}$ u většiny metabolitů kromě kyseliny šťavelové, několika amino kyselin a izomerů výše zmíněné kyseliny akonitové. Preciznost a přesnost byly pro většinu metabolitů v rozsahu mezi 0,8 – 18 % a 81 – 123 %. Výťažnost byla stanovena z průměrné moči přidáním střední koncentrační hladiny a její hodnoty byly mezi 82 – 121 %. Tyto hodnoty splňovaly validační parametry.

Analytické vlastnosti vyvinuté metody byly dále ověřeny proměřením certifikované moči, která obsahovala 20 diagnostických organických kyselin v deklarované analytické koncentraci. Kromě kyseliny mevalonové (u které nevzniká očekávaný produkt) byly stanoveny vyhovující parametry pro všechny zbývající kyseliny. Po změření vzorků derivatizované certifikované moči ($n = 16$) byly tyto vzorky uskladněny po dobu 15 – 30 dní v mrazáku při -20°C . Na těchto vzorcích byla zjištěna tzv. within-run (měřeno v jedné sérii) a between-run (mezidenní měření) stabilita, která ukázala vyhovující stabilitu měřených derivátů. Jedinou výjimkou byl derivát tiglylglycinu, který se velmi rychle rozkládá. U tohoto analytu je nezbytné, aby k analýze došlo co nejdříve po proběhnutí reakce.

3.2.3 Kvantifikace metabolitů v lidské moči

Metoda byla finálně upravena na GC-MS analýzu v SIM (single ion monitoring) módu. K vývoji metody bylo použito 50 ženských a 50 mužských vzorků moči obdržných od zdravých jedinců. Koncentrace metabolitů naměřené v moči byly porovnány s publikovanými daty uvedenými v HMDB (Human Metabolome Data Base) databázi. Nalezené hodnoty s hodnotami v HMDB databázi dobře korelovaly a je patrné, že 25 μl moči je plně dostačující ke kvantifikaci 112 metabolitů v koncentračním rozsahu 0,2 – 400 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu. Dvacet validovaných metabolitů nebylo v moči detekováno, jejich přítomnost v moči byla pod limitem detekce metody. Nicméně, při některé metabolické poruše může dojít ke zvýšení koncentrační hladiny některého z metabolitů a pak by příslušný metabolit mohl být kvantifikován. Kyselina hippurová, kyselina citronová a histidin byly