

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



Disertační práce

Matricové efekty v LC-MS analýze:  
vznik, hodnocení a jejich odstranění

Školitel: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Mgr. Pavel Svoboda

## Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, cenné rady a také za inspiraci a motivaci během celého postgraduálního studia a při přípravě disertační práce. Její přístup vždy výrazně převyšoval to, co se od běžného školitele může očekávat. Jsem moc vděčný za to, že jsem mohl být členem výzkumné skupiny paní docentky Novákové a mohl od ní získávat cenné zkušenosti a znalosti.

Chtěl bych také poděkovat panu profesoru Solichovi za možnost absolvovat zahraniční stáže a prezentovat své výsledky na zahraničních a tuzemských konferencích. Děkuji také všem kolegům z Katedry analytické chemie za pomoc, vstřícnost a přátelskou atmosféru.

Poděkování také patří zahraničním školitelům, prof. Valérii Pichon, Audrey Combes, Ph.D. a prof. Peterovi Lieberzeitovi, kteří mi předávali své znalosti a zkušenosti během šestiměsíční stáže na Oddělení analytických a bioanalytických věd a miniaturizace na ESPCI ParisTech ve Francii a během dvouměsíční stáže na Katedře analytické chemie Vídeňské univerzity v Rakousku.

Tato disertační práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 412). Poděkování patří grantovým projektům, které také finančně podporovaly výzkum a zahraniční stáže a umožnily mi prezentovat své výsledky na tuzemských i zahraničních konferencích: Grantová agentura Univerzity Karlovy (GA UK), projekt číslo 274216; Aktion Česká republika – Rakousko; FAFIS CZ.1.07/2.2.00/28.0194 a TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235.

Děkuji také své ženě Vendulce, rodině, blízkým a přátelům za jejich každodenní podporu, pomoc a trpělivost.

Pavel Svoboda

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

Hradec Králové 30. 6. 2017

Pavel Svoboda

.....

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutické fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Mgr. Pavel Svoboda

**Školitel:** doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Konzultant:** RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

**Název disertační práce:** Matricové efekty v LC-MS analýze: vznik, hodnocení a jejich odstranění

---

Disertační práce se zabývá problematikou matricových efektů v analýze využívající spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS). Technika LC-MS je velmi dobře etablovaným nástrojem na poli kvantitativní i kvalitativní analýzy, který nachází uplatnění pro široké spektrum různorodých sloučenin. Přes všechny výhody, jako je citlivost, selektivita a robustnost, spojení LC-MS trpí vážným nedostatkem, jenž je představován matricovými efekty. Tento nežádoucí jev ovlivňuje důležité parametry LC-MS metody, jako je správnost, přesnost, linearita, limit detekce a limit kvantifikace. Z tohoto důvodu by mělo být jejich hodnocení zahrnuto ve validaci každé LC-MS metody a jejich příčina v maximální možné míře odstraněna. Hodnocení matricových efektů se provádí pomocí kvantitativních a kvalitativních přístupů, jako je metoda postextrakčního přídatku, metoda postkolonové infuze a metoda porovnávací směrnice kalibračních křivek.

Projevy matricových efektů lze zmírnit nebo zcela odstranit zásahem prakticky v každém kroku celé LC-MS analýzy. Uplatnění tedy nacházejí vybrané postupy úpravy vzorku, které odstraňují jejich příčinu ještě před vlastní LC-MS analýzou. Optimalizovaná a dostatečně účinná chromatografická separace umožňuje oddělit látky zodpovědné za vznik matricových efektů od látek hodnocených před vstupem do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, který představuje primární místo vzniku těchto efektů. Projevy matricových efektů lze také zmírnit nebo odstranit změnou vybraných parametrů iontového zdroje. Již vzniklé matricové efekty lze kompenzovat pomocí kalibračních postupů.

Experimentální část disertační práce se věnuje vývoji LC-MS a SFC-MS metod pro stanovení klinicky významných látek obsažených v komplexních matricích. Předmětem zájmu byly antioxidantně působící katechiny, neurotoxická aminokyselina  $\beta$ -N-methylamino-L-alanin, cholesterol snižující statiny a tokoferoly a tokotrienoly řadící se mezi vitamíny. Při vývoji každé metody byl kladen důraz na hodnocení a odstranění matricových efektů.

**Abstract**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Mgr. Pavel Svoboda

**Supervisor:** Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Advisor:** RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

**Title of Doctoral Thesis:** Matrix effects in LC-MS analysis: occurrence, evaluation, and their elimination

---

The dissertation thesis deals with the issue of matrix effects in analysis using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). LC-MS represents a well-established, widely used, and powerful tool in the field of qualitative and quantitative analysis of a wide range of different compounds. Despite all the advantages offered by LC-MS such as sensitivity, selectivity, and robustness, it suffers from a major drawback represented by matrix effects. This undesirable phenomenon affects important parameters of LC-MS method such as accuracy, precision, linearity, limit of detection, and limit of quantification. Therefore, an evaluation of these effects should be involved in validation of every single LC-MS method and their source should be eliminated. The assessment is generally performed by qualitative and quantitative approaches such as post-extraction addition, post-column infusion, and comparison of slopes of calibration curves.

The matrix effects can be reduced or fully eliminated by an intervention in each step of the whole LC-MS analysis. Sample preparation procedures may remove the origin of the matrix effects even prior the LC-MS analysis. Efficient chromatographic method allows to separate the interferences from the analyte of the interest before reaching ion source of the mass spectrometer which represents the primary place of their formation. The matrix effects can be also prevented by changing ion source parameters. Different calibration approaches may fully compensate the already exhibited matrix effects.

Experimental part of the dissertation thesis focuses on development of LC-MS and SFC-MS methods for determination of clinically relevant compounds contained in complex matrices and the evaluation and removing of the matrix effects. The target analytes were represented by antioxidant catechins, neurotoxic amino acid  $\beta$ -*N*-methylamino-L-alanine, cholesterol-lowering statins, and vitamins.

**Seznam zkratek**

2D-LC	Dvourozměrná kapalinová chromatografie (Two-dimensional Liquid Chromatography)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
BEH	Hybridní materiál obsahující ethylenové můstky (Ethylene-Bridged Hybrid)
BMAA	$\beta$ -N-methylamino-L-alanin
CSH	Hybridní materiál s nabitým povrchem (Charged Surface Hybrid)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LC-MS	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Coupling of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry)
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-Liquid Extraction)
ME	Matricové efekty (Matrix Effects)
MEPS	Mikroextrakce plněným tuhým sorbentem (Microextraction by Packed Sorbent)
MIP	Molekulárně vtištěné polymery (Molecularly Imprinted Polymers)
MIS	Molekulárně vtištěné polymery připravené sol-gel metodou (Molecularly Imprinted Silica)
MISPE	Extrakce na tuhou fázi využívající molekulárně vtištěné polymery (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction)
MS	Hmotnostní spektrometrie/Hmotnostní spektrometr (Mass Spectrometry/Mass Spectrometer)

---

MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
NIP	Nevtištěný polymer (Non-Imprinted Polymer)
NIS	Nevtištěný polymer připravený sol-gel metodou (Non-Imprinted Silica)
PE	Procesní účinnost (Process efficiency)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
RE	Výtěžnost (Recovery)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SFC	Superkritická fluidní chromatografie (Supercritical Fluid Chromatography)
SIL-IS	Vnitřní standard značený stabilními izotopy (Stable Isotopically Labelled Internal Standard)
SIM	Selektivní záznam vybraného iontu (Selected Ion Monitoring)
SPE	Extrakce na tuhou fázi (Solid Phase Extraction)
SRM	Selektivní záznam vybrané reakce (Selected Reaction Monitoring)
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UHPSFC	Ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography)

## Seznam obrázků

Obr. 1: Vznik a důsledky matricových efektů.....	3
Obr. 2: Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek – projevy matricových efektů .....	5
Obr. 3: Metoda postextrakčního přídavku – schéma .....	6
Obr. 4: Metoda postkolonové infuze – schéma zapojení.....	7
Obr. 5: Metoda postkolonové infuze – projevy matricových efektů .....	7
Obr. 6: Místa možného zásahu proti matricovým efektům .....	8
Obr. 7: Extrakce na tuhou fázi – schéma postupu .....	10
Obr. 8: Extrakce z kapaliny do kapaliny – schéma postupu .....	11
Obr. 9: Molekulárně vtištěné polymery – schéma přípravy .....	12
Obr. 10: Molekulárně vtištěné polymery – hodnocení selektivity.....	13
Obr. 11: Aptamery – schéma přípravy .....	14
Obr. 12: Imobilizované aptamery – hodnocení selektivity.....	15
Obr. 13: Produkce protilátek.....	16
Obr. 14: Imobilizované protilátky – hodnocení selektivity .....	17
Obr. 15: Zředění vzorku – dopad na ionizaci analyzované látky.....	18
Obr. 16: Vířivá difuze – člen A van Deemterovy rovnice.....	20
Obr. 17: Podélná difuze – člen B van Deemterovy rovnice.....	21
Obr. 18: Odpor proti převodu hmoty – člen C van Deemterovy rovnice .....	21
Obr. 19: Grafické vyjádření van Deemterovy rovnice .....	22
Obr. 20: Mimokolonové příspěvky – místo vzniku.....	22
Obr. 21: BEH částice .....	26
Obr. 22: Povrchově porézní částice .....	27
Obr. 23: Retence analytu v HILIC módu – schéma.....	29
Obr. 24: Dvourozměrná LC separace – schéma .....	31
Obr. 25: Porovnání ionizačních technik APCI a ESI.....	33
Obr. 26: Geometrie iontového zdroje – poloha přívodu vzorku z LC systému vůči vstupnímu kuželi .....	35
Obr. 27: Metoda echo-píku – schéma zapojení .....	38
Obr. 28: Porovnání MS-sken chromatogramů vzorku standardu a sinicových extraktů upravených a neupravených MISPE metodou.....	44
Obr. 29: Hodnocení matricových efektů v extraktech hlívy ústříčné (A), Pu-erh čaje (B) a červené fermentované rýže (C) .....	53



## Seznam tabulek

Tab. 1: Matricové efekty v nálevech neochucených a ochucených čajů.....	41
Tab. 2: Matricové efekty zatěžující přístroje I, II a III kompenzované pomocí stabilních izotopicky značených vnitřních standardů a bez kompenzace (Přístroj III).....	47
Tab. 3: Hodnocení matricových efektů tokoferolů (T) a tokotrienolů (T <sub>3</sub> ) ve vzorcích lidského séra.....	50

**Obsah**

1.	Úvod .....	1
2.	Cíl práce .....	2
3.	Teoretická část.....	3
3.1	Vznik matricových efektů.....	3
3.2	Hodnocení matricových efektů .....	5
3.2.1	Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek.....	5
3.2.2	Metoda postextrakčního přídávku .....	6
3.2.3	Metoda postkolonové infuze .....	6
3.3	Odstranění matricových efektů.....	8
3.3.1	Úprava vzorku .....	8
3.3.2	Chromatografická separace .....	19
3.4.3	Hmotnostní spektrometrie.....	32
3.4.4	Kalibrační přístupy.....	35
4.	Komentáře k publikovaným pracím.....	39
4.1	Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro stanovení osmi katechinů ve vzorcích čaje a vliv matricových efektů .....	39
4.2	Syntéza molekulárně vtištěných polymerů pro selektivní SPE extrakci $\beta$ -N-metylamino-L-alaninu.....	42
4.3	Vývoj MEPS-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení statinů.....	45
4.4	Vývoj UHPSFC-MS metody pro stanovení derivátů tokoferolů a tokotrienolů v lidském séru.....	48
4.5	Vývoj MISPE-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení lovastatinu v Pu-erh čaji, hlívě ústřičné a červené fermentované rýži.....	51
5.	Závěr .....	54
6.	Seznam použité literatury .....	55
7.	Seznam publikací a abstraktů .....	67
7.1	Publikace zahrnuté v disertační práci .....	67
7.2	Kapitola uvedená v monografii .....	68
7.3	Přednášky uvedené v konferenčních sbornících.....	69
7.4	Postery uvedené v konferenčních sbornících.....	70
8.	Přílohy – publikace zahrnuté v disertační práci .....	73

8.1	Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects.....	73
8.2	Synthesis of a molecularly imprinted sorbent for selective solid-phase extraction of $\beta$ -N-methylamino-L-alanine.....	82
8.3	Development of MEPS-UHPLC-MS/MS multistatin methods for clinical analysis.....	91
8.4	Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum .....	108
8.5	Development of matrix effect-free MISPE-UHPLC-MS/MS method for determination of lovastatin in Pu-erh tea, oyster mushroom, and red yeast rice.....	122

## 1. Úvod

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS) představuje účinný a velmi dobře etablovaný nástroj, a to jak pro kvantitativní, tak i kvalitativní analýzu. LC-MS spojení využívající hmotnostní analyzátor typu trojitého kvadrupólu je zlatým standardem na poli cílené analýzy. LC-MS spojení, v němž se uplatňuje vysokorozlišující a dostatečně rychle skenující hmotnostní analyzátor, je technikou volby pro necílenou analýzu vícesložkových vzorků. Mezi největší přednosti LC-MS instrumentace patří především citlivost, selektivita, robustnost a také možnost použití pro široké spektrum analytů. Po uvedení LC-MS techniky do praxe se zpočátku předpokládalo, že právě díky vysoké selektivitě nebude nutné před vlastní LC-MS analýzou aplikovat složité postupy úpravy vzorku. Některá očekávání byla natolik vysoká, že se dokonce předpokládalo, že vůbec nebude nutné používat separační techniku před vlastní MS detekcí. Úprava vzorku zpravidla reprezentuje nejpracnější a časově nejnáročnější část celé analýzy. Uvedení LC-MS techniky mělo tedy zvýšit prostupnost vzorků v analytických laboratořích a také snížit náklady na celou analýzu. Nicméně přes výše zmíněné přednosti LC-MS instrumentace stoprocentně nenaplnila svůj potenciál a veškerá očekávání. Na vině jsou matricové efekty, které negativně ovlivňují ionizaci při LC-MS spojení.

Tento nežádoucí jev se vykytuje u iontových zdrojů pracujících za atmosférického tlaku, projevuje se při spojení s kapalinovými, superkritickými i plynovými chromatografy a negativně promlouvá do kvalitativní i kvantitativní analýzy. Matricové efekty ovlivňují správnost, přesnost, linearitu a limit kvantifikace a limit detekce dané metody. Výrobci hmotnostních spektrometrů mezi sebou v současnosti soupeří především o to, který z nich uvede na trh přístroj s nejvyšší citlivostí nebo nejvyšším rozlišením. Toto zápolení samozřejmě posouvá dále nejen analytickou chemii jako vědní obor, ale i vědu obecně. Předmětem soupeření by ale také mělo být uvedení iontového zdroje nezatíženého matricovými efekty, který by byl zároveň vhodný pro spojení se všemi chromatografickými technikami.

## 2. Cíl práce

Úkolem teoretické části disertační práce bylo shrnout dosavadní poznatky o matricových efektech. V následujících kapitolách jsou tedy diskutovány příčiny vedoucí ke vzniku matricových efektů, následně metody používané pro jejich hodnocení a nakonec postupy, které snižují, zcela odstraňují nebo kompenzují jejich dopad na LC-MS analýzu. Praktická část zahrnuje vývoj LC-MS metod pro stanovení klinicky relevantních látek v komplexních vzorcích. V každé práci je kladen důraz na hodnocení a také na následné odstranění přítomných matricových efektů.

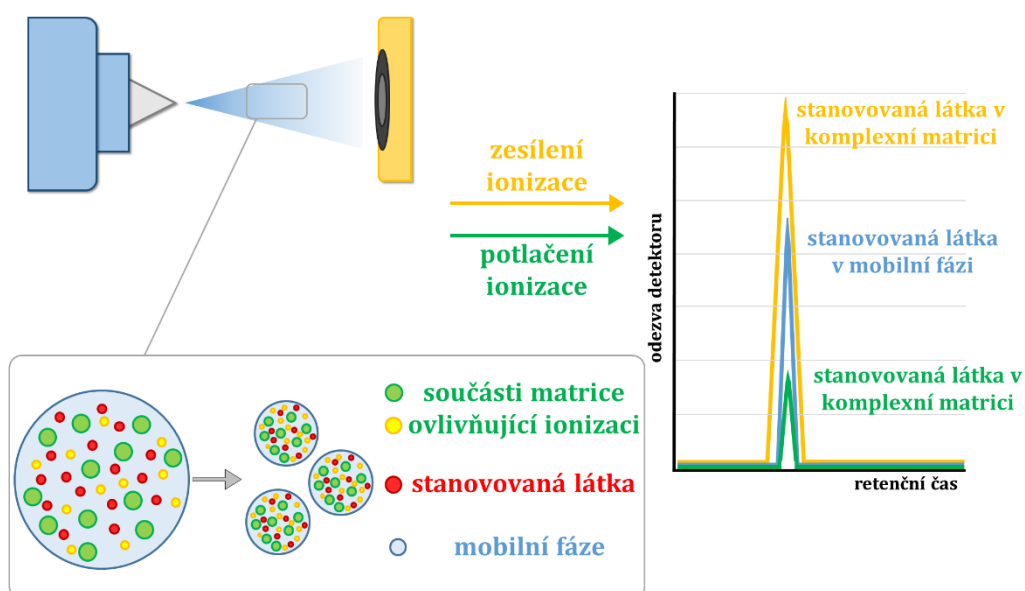
Cílem první publikované práce bylo vyvinout rychlou UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení vybraných katechinů v čajových vzorcích, a to s minimálními příspěvky matricových efektů. Pro snížení jejich projevů byla použita jednoduchá a časově nenáročná metoda v podobě ředění vzorku. Vybrané parametry hmotnostního spektrometru byly důkladně optimalizovány, a to z důvodu zvýšení citlivosti UHPLC-MS/MS metody. Druhá práce měla za úkol odstranit matricové efekty zatěžující HPLC-MS/MS metodu vyvinutou pro stanovení neurotoxického  $\beta$ -*N*-methylamino-L-alaninu (BMAA) ve vzorcích sinic. Pro tento účel byl použit sorbent využívající techniky molekulárně vtištěných polymerů (MIP). Třetí práce srovnávala UHPLC-MS/MS metodu využívající tři různé hmotnostní spektrometry typu trojitého kvadrupólu, jež se mezi sebou lišily konstrukcí iontového zdroje a transportní optiky, rychlostí skenování a technologií kolizní cely. Mezi porovnávané parametry byly zařazeny i příspěvky matricových efektů, jejichž projevy byly sníženy pomocí kombinace zahrnující mikroextrakci plněným tuhým sorbentem (MEPS) a kompenzační přístup využívající stabilní izotopicky značené vnitřní standardy. Úkolem čtvrté práce byl vývoj metody pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů v lidském séru. MS detekci předcházela úprava vzorku pomocí proteinové precipitace a extrakce z kapaliny do kapaliny a separace prostřednictvím superkritické fluidní chromatografie. Pátá práce využívala MIP sorbent, a to pro selektivní extrakci lovastatinu obsaženého v Pu-erh čaji, červené fermentované rýži a hlívě ústřičné. Výsledné extrakty byly analyzovány UHPLC-MS/MS metodou.

### 3. Teoretická část

#### 3.1 Vznik matricových efektů

Fenomén matricových efektů byl poprvé popsán v roce 1993, kdy Kebarle a Tang [1] pozorovali pokles odezvy MS detektoru využívající ionizaci elektrosprejem, a to pro vybrané organické látky při zvyšování koncentrace jiných organických sloučenin obsažených v daném analyzovaném vzorku [2]. Tyto efekty byly popsány ve všech typech běžně analyzovaných matric, jakými jsou plazma, sérum, moč, rostlinné a živočišné tkáně a vzorky vody nebo půdy [3][4].

Mechanismus vzniku matricových efektů není podrobně vysvětlen. Předpokládá se, že za vznik matricových efektů zodpovídají látky, které koeluují se stanovovaným analytem [4][5]. Látky, které nejsou v průběhu chromatografické separace účinně odděleny od látek stanovovaných, výrazně promlouvají do procesu vzniku iontů v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. To vede k potlačení nebo naopak zesílení ionizace analyzované látky. Výsledným projevem matricových efektů je tedy ovlivnění odezvy MS detektoru, což následně vede k nesprávným výsledkům (**Obr. 1**). Projevy matricových efektů nelze předpovědět, liší se vzorek od vzorku, a proto je ovlivněna linearita, správnost a přesnost LC-MS metody. Vlastní potlačení nebo zesílení ionizace ovlivňuje citlivost detektoru, a tím tedy i limit detekce a limit kvantifikace. Při stopové analýze může být potlačení ionizace natolik silné, že ve výsledku způsobí falešně negativní výsledky [5][6].



Obr. 1: Vznik a důsledky matricových efektů

Příčinou matricových efektů jsou nejen organické a anorganické sloučeniny pocházející z komplexní matrice analyzovaného vzorku, ale také látky uvolňované z chromatografického systému nebo látky zavedené během procesu úpravy vzorku. Jedná se tedy o aditiva mobilní fáze, pufrů, nečistoty obsažené v mobilní fázi a rozpouštědlech použitých pro úpravu vzorku, látky uvolňované ze spotřebního materiálu, stacionárních fází SPE kolonek nebo chromatografických kolon [4][6].

Výše zmíněné látky a nečistoty mohou zvyšovat viskozitu a povrchové napětí kapiček, které jsou vytvářeny při ionizaci. Následkem toho dochází ke snížení schopnosti analyzované látky přecházet z těchto kapiček do plynné fáze, což způsobí potlačení ionizace [4][7]. Dalším navrhovaným mechanismem potlačení ionizace je soupeření o získání náboje, a to mezi stanovovaným analytem a ostatními látkami. Konkurenty v boji o náboj jsou látky s vysokou ionizační účinností a povrchovou aktivitou [8]. Svou roli hrají i netěkavé sloučeniny, které mohou zabránit přechodu analyzované látky do plynné fáze, a to prostřednictvím vzniku sraženin nebo změnou fyzikálních vlastností vytvářených kapiček. Bylo zjištěno, že velké netěkavé molekuly potlačují ionizaci látek s nižší molekulovou hmotností a také že látky středně až velmi polární jsou velice náchylné k potlačení ionizace [9]. V pozitivním módu elektrosprejové ionizace může docházet k neutralizaci iontu analyzované látky v plynné fázi, což je způsobeno neutrálními látkami, které se vyznačují vyšší protonovou afinitou, a které tedy odebírají analyzované látce náboj představovaný protonem [3][10]. Aditiva mobilní fáze a také některé složky matrice analyzovaného vzorku mohou vystupovat jako ion-párová činidla, jež způsobují tvorbu neutrálních komplexů [4][11].

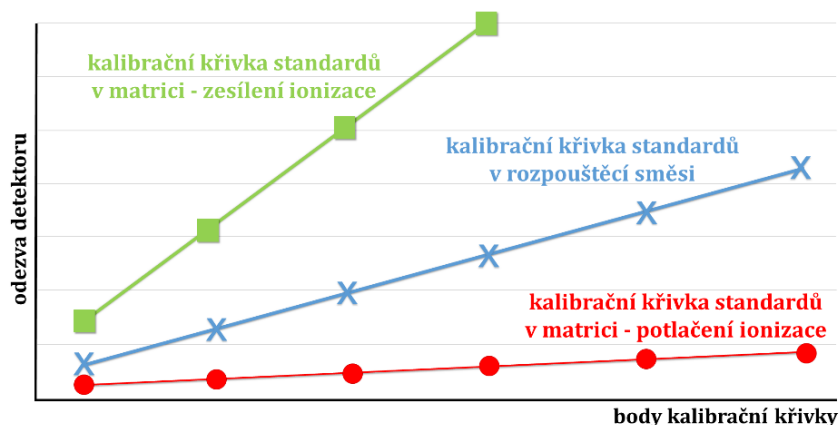
Analyt je náchylný ke snížení ionizace především v případech, kdy se vyskytuje v komplexní matrici ve stopovém množství nebo naopak ve vysokých koncentracích, kdy je stanovován větší počet látek a kdy je použita jednoduchá, neselektivní technika úpravy vzorku. Pravděpodobnost se také zvyšuje, když mobilní fáze chromatografické separace obsahuje ion-párová činidla, bazické nebo kyselé pufrů a také když je pro separaci použita rychlá, nedostatečně optimalizovaná chromatografická metoda s nedostatečnou selektivitou a rozlišením [3][10].

### 3.2 Hodnocení matricových efektů

Příčinu, která stojí za vznikem matricových efektů zatěžujících LC-MS analýzu, nelze vždy spolehlivě odhalit. Snížení nebo zesílení ionizace analyzované sloučeniny mohou způsobit i látky, které vlastní ionizaci vůbec nepodléhají a jsou tedy pro hmotnostní spektrometr neviditelné. Proto je nutné sledovat až jejich následné projevy, jež ovlivněním procesu ionizace sledovaného analytu sníží nebo zvýší jeho odezvu v MS detektoru. První postupy byly publikovány v pracích Buhrmana [12], Bonfiglia [13] a Matuszweskiho [14][15], a to ve druhé polovině devadesátých let minulého století. V praxi se přítomnost matricových efektů hodnotí třemi různými metodami, které poskytují kvalitativní nebo kvantitativní informace. Jedná se o metodu porovnání směrnic kalibračních křivek, metodu postextrakčního přidavku a metodu postkolonové infuze [16]. Hodnocení matricových efektů by mělo být zahrnuto ve validaci všech metod, které analyzují látky prostřednictvím LC-MS instrumentace, a to nejen v komplexních matricích.

#### 3.2.1 Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek

Tento přístup poskytuje kvantitativní informace o matricových efektech. Porovnávají se směrnice kalibrační křivky sestrojené v rozpouštěcí směsi a směrnice kalibrační křivky vzniklé přidáním standardu do frakce hodnocené matrice, která byla podrobena vybrané metodě pro úpravu vzorku. V případě potlačení ionizace je směrnice kalibrační křivky sestrojené v pozorované matici nižší než směrnice kalibrační křivky připravené v rozpouštěcí směsi. V případě zesílení ionizace je tomu naopak (**Obr. 2**). Tato metoda nachází uplatnění především v případech, kdy není k dispozici matrice, jež neobsahuje hodnocené látky. Jedná se tedy především o rostlinné nebo biologické vzorky s přirozeným výskytem sledovaných analytů [17].

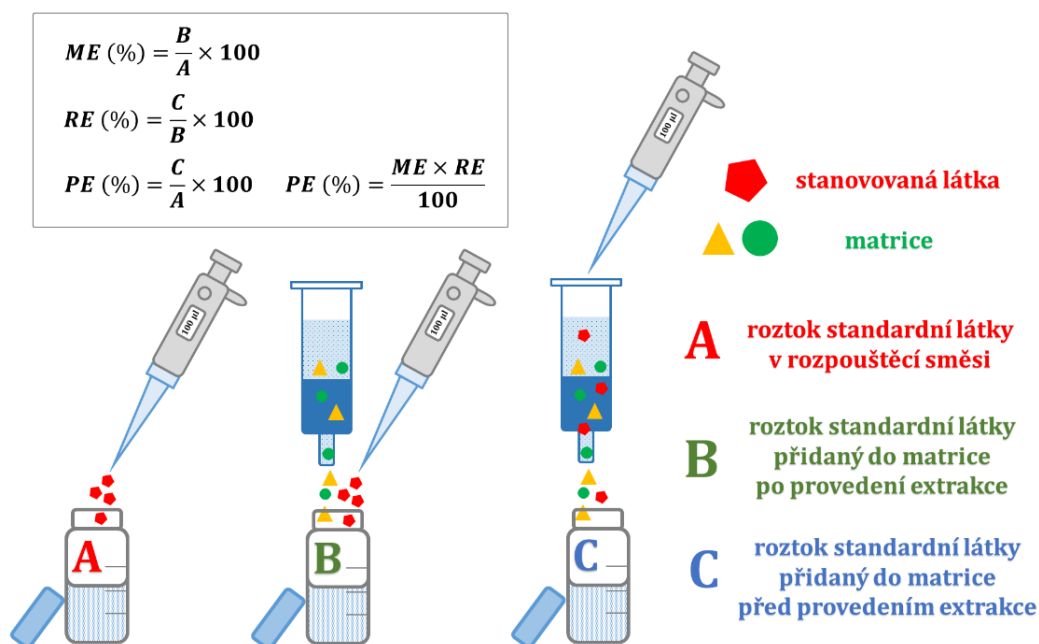


**Obr. 2: Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek – projevy matricových efektů**  
(upraveno podle [17])



### 3.2.2 Metoda postextrakčního přidavku

Metoda postextrakčního přidavku (**Obr. 3**) hodnotí matricové efekty z kvantitativního hlediska. Tento postup porovnává signál analytu v rozpouštěcí směsi (A) a signál analytu v pozorované matrici (B). Vzorek B je vytvořen přidáním sledovaného analytu do matrice, která byla zpracována vybranou metodou úpravy vzorku. V případě, kdy jsou matricové efekty  $ME (\%) > 100$ , došlo k zesílení ionizace analytu. Hodnota  $ME (\%) = 100$  potvrzuje nepřítomnost matricových efektů a  $ME (\%) < 100$  poukazuje na potlačení ionizace. RE (recovery) popisuje výtěžnost extrakční procedury, a to bez ohledu na příspěvky matrice. RE porovnává odezvu MS detektoru pro standard, jenž byl přidán do matrice a poté zpracován vybranou metodou pro úpravu vzorku (C), a odezvu pro standard, jenž byl přidán k matrici až po jejím zpracování (B). PE (process efficiency) posuzuje metodu jako celek, protože do hodnocení zahrnuje jak příspěvky matricových efektů, tak i výtěžnost extrakční procedury [2][4].

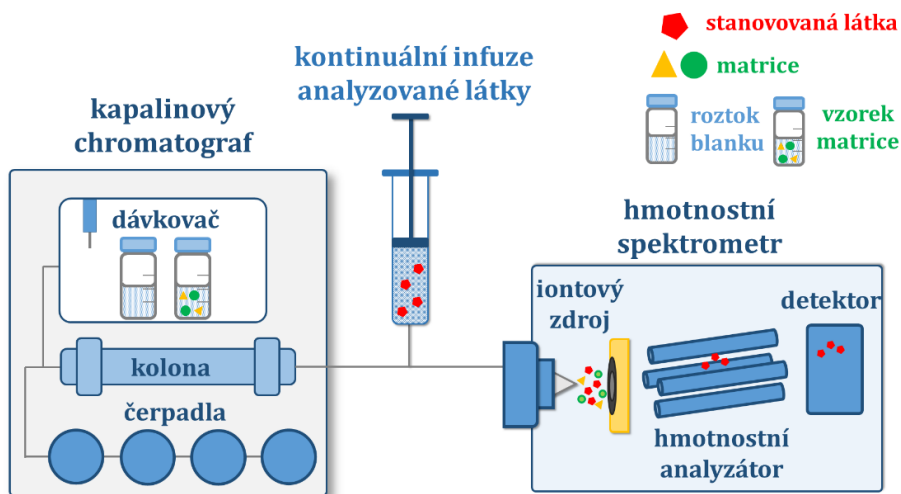


Obr. 3: Metoda postextrakčního přidavku – schéma  
(upraveno podle[4])

### 3.2.3 Metoda postkolonové infuze

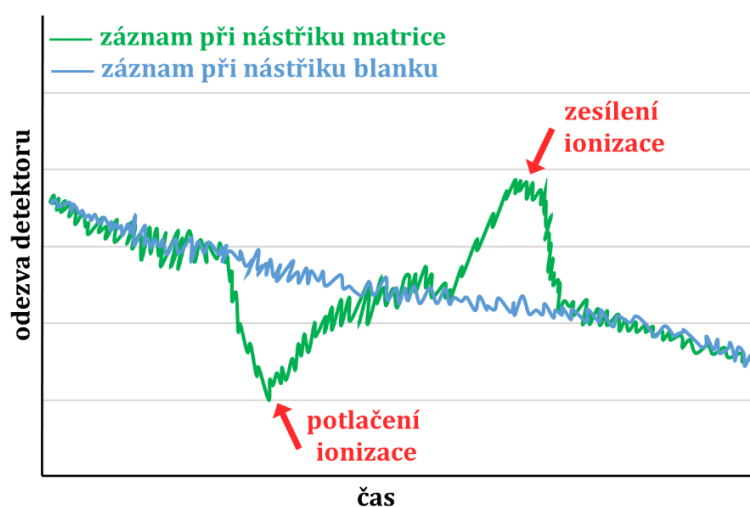
Metoda postkolonové infuze, poprvé představená Bonfigliem v roce 1999 [13], poukazuje na to, kde se v průběhu chromatografické separace matricové efekty projevují. Při hodnocení příspěvků matricových efektů se porovnává záznam získaný po nástřiku blanku, tedy rozpouštěcí směsi neobsahující analyzovanou látku a ani komponenty matrice, a nástřiku matrice, ve které se analyzovaná látka

stanovuje. Do toku těchto vzorků vycházejícího z chromatografického systému je kontinuálně přiváděno konstantní množství analyzované látky, a to do prostoru mezi kolonu a iontový zdroj hmotnostního spektrometru (**Obr. 4**) [18].



**Obr. 4: Metoda postkolonové infuze – schéma zapojení**  
(upraveno podle [3])

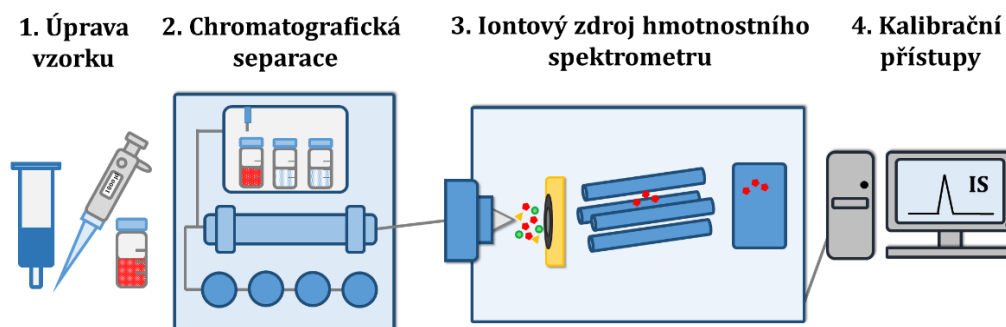
Případné matricové efekty způsobené interferujícími látkami se projeví pozitivními nebo negativními píky (**Obr. 5**) na LC-MS chromatogramu. Hmotnostní analyzátor při těchto experimentech operuje v módu SIM (selektivní záznam vybraného iontu) nebo SRM (selektivní záznam vybrané reakce) [3]. V případě hodnocení matricových efektů u dvou a více látek, které mají být stanovovány jednou LC-MS metodou současně, je nutné provést postkolonovou infuzi u každé z nich jednotlivě [4]. Doporučuje se také provést analýzu opakovaně, a to z důvodu odhalení možného vlivu později eluujících složek matrice na další analýzu.



**Obr. 5: Metoda postkolonové infuze – projevy matricových efektů**  
(upraveno podle [3])

### 3.3 Odstranění matricových efektů

Selektivity, kterou se spojení LC-MS vyznačuje, je dosaženo především prostřednictvím hmotnostního analyzátoru. Selektivita analýzy může být dále zvýšena pomocí dostatečně účinné chromatografické separace. Hmotnostní analyzátor je ale v uspořádání hmotnostního spektrometru zapojen až za iontovým zdrojem a na vznik nebo odstranění matricových efektů tedy primárně vliv nemá. Matricové efekty jsou způsobeny látkami, které doputují do iontového zdroje ve stejnou dobu jako látka analyzovaná. Tyto látky nebo jejich vliv lze odstranit na všech úrovních LC-MS analýzy (**Obr. 6**). V úvahu tedy připadají čtyři základní možnosti. První dvě odstraňují příčinu matricových efektů již před vstupem do iontového zdroje. To umožňují vybrané metody úpravy vzorku a také dostatečně účinná chromatografická separace. Třetí možností je ovlivnění procesu ionizace změnou určitých parametrů iontového zdroje hmotnostního spektrometru. A čtvrtou možnost představuje kompenzace již vzniklých projevů matricových efektů, a to pomocí vybraných kalibračních metod [3][19][20].



Obr. 6: Místa možného zásahu proti matricovým efektům

#### 3.3.1 Úprava vzorku

Látky ovlivňující ionizaci analytu lze odstranit pomocí kroku úpravy vzorku, jež předchází vlastní LC-MS analýze. Do této velké skupiny patří konvenční techniky, miniaturizované techniky a také selektivní přístupy. V některých případech lze zmírnit projevy matricových efektů také rychlým a jednoduchým krokem, jakým je prosté zředění analyzovaného vzorku. K tomu je ale samozřejmě nutné, aby byla daná LC-MS metoda dostatečně citlivá [3].

##### 3.3.1.1 Konvenční techniky úpravy vzorku

Do skupiny konvenčních technik pro úpravu vzorku patří proteinová precipitace, extrakce na tuhou fázi (SPE) a extrakce z kapaliny do kapaliny. Tyto velmi dobře zavedené techniky stále nacházejí uplatnění v analytických laboratořích, a to především z důvodu jednoduchosti provedení, robustnosti a

relativně nízkých nákladů. Poměrně vysoká spotřeba rozpouštědel, časová náročnost, relativně nízká selektivita a nutnost většího množství vzorku patří mezi nejzávažnější nedostatky těchto metod [21][22]. Z pohledu uplatnění při odstranění matricových efektů je relativně nízká selektivita těchto postupů kritická a v mnoha případech nedostačující. Výše zmíněné techniky musí být tedy velmi často doplněny o další postupy, mezi něž patří například korekce již naměřených výsledků prostřednictvím stabilních izotopicky značených vnitřních standardů.

### **a) Proteinová precipitace**

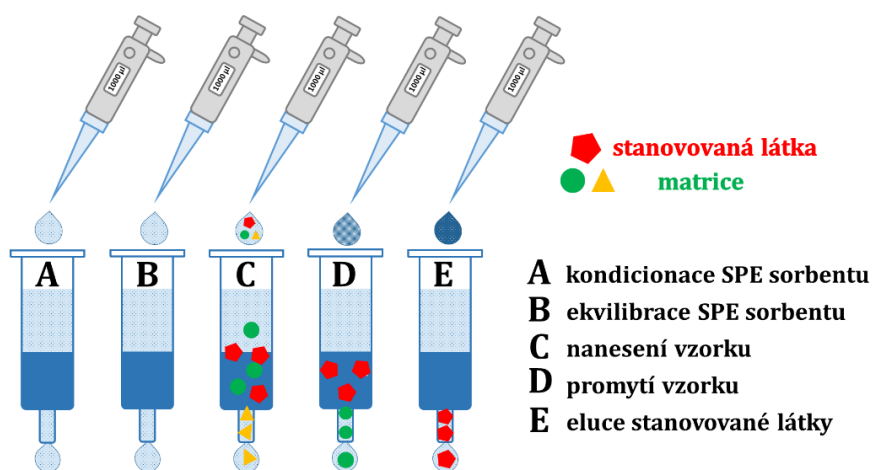
Úprava vzorku pomocí proteinové precipitace je oblíbená především z důvodu jednoduchosti, rychlosti a vysoké účinnosti vysrážení přítomných proteinů. Po přidání vybraného precipitačního činidla, zpravidla acetonitrilu nebo methanolu, je vzorek odstředěn a následně je z něho odebrán vytvořený supernatant. Proteinová precipitace se používá především při zpracování vzorků plazmy, a to jak pro hydrofilní, tak i lipofilní analyty. Tato metoda účinně odstraňuje přítomné proteiny, ale ostatní nečistoty, které mohou být hrozbou pro vznik matricových efektů, odstraněny nejsou. Kromě nevýhody v podobě nízké selektivity je dalším negativem nedostatečně přečištěný supernatant, obsahující nevysrážené komponenty matrice, a nutnost použití centrifugy. Nevysrážené látky, jako například lipidy, fosfolipidy a mastné kyseliny, promlouvají nejen do procesu ionizace sledovaného analytu, ale také zkracují životnost chromatografické kolony a způsobují zanášení iontového zdroje a iontové optiky hmotnostního spektrometru [23][24][25].

### **b) Extrakce na tuhou fázi**

Extrakce využívající SPE sorbenty je v současnosti nejpoužívanější metodou pro úpravu vzorku, a to nejen před LC-MS analýzou. Je to především z důvodu jednoduchosti, vysoké výtěžnosti, relativně účinného přečištění komplexních matric, možnosti použití menšího objemu vzorku, automatizace, on-line zapojení v LC systému a také možného zakoncentrování analyzované látky [24][26].

SPE metoda (**Obr. 7**) začíná kondicionací sorbentu, jež aktivuje jeho funkční skupiny. Poté následuje ekvilibrační krok, který připravuje daný sorbent pro nanesení vzorku. Po nanesení vzorku dochází k odstranění přítomných nečistot prostřednictvím promývacího kroku. Tento krok musí být dostatečně optimalizován z důvodu dosažení co největší účinnosti přečištění a zároveň zachování vysoké retence analyzované látky. Stanovovaný analyt je nakonec uvolněn ze sorbentu vhodným rozpouštědlem [27]. Materiál naplněný v SPE kolonkách je velmi podobný tomu, který se využívá v kolonách určených pro separaci v kapalinové

chromatografii. Princip retence látek tedy odpovídá interakcím, jež se uplatňují při LC separacích. Výběr materiálu je kritickým bodem SPE procedury. Vhodně zvolený sorbent zvýší selektivitu úpravy vzorku, což následně zvyšuje i pravděpodobnost odstranění matricových efektů. Nedostatkem této metody úpravy vzorku je časová náročnost celého procesu, potřeba vakuového manifoldu a také cena. Výrobce ve většině případů deklaruje účinnost SPE kolonek pouze pro jednorázovou aplikaci. Dalším problémem může být nižší opakovatelnost SPE metody u kolonek pocházejících z různých výrobních šarží [24][26][28][29].

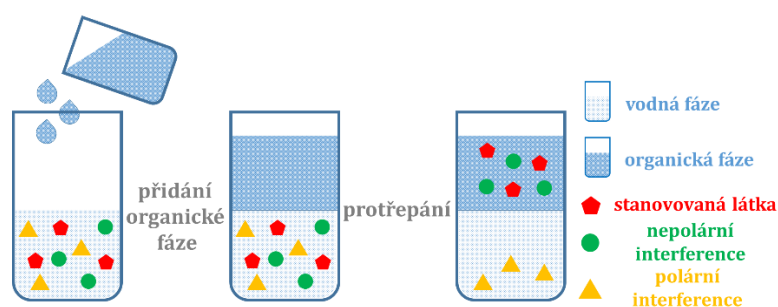


**Obr. 7: Extrakce na tuhou fázi – schéma postupu**  
(upraveno podle [27])

### c) Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny je založena na převedení analyzované látky z vodné do organické fáze, a to na principu rozdělovacího koeficientu oktanol/voda. Obě fáze nesmí být vzájemně mísitelné. Tato metoda se používá především z důvodu instrumentální nenáročnosti a také účinného odstranění interferujících látek, které nejsou rozpustné ve zvoleném organickém rozpouštědle. Ze vzorku jsou tedy účinně odstraněny nečistoty ve formě solí a polárních látek, jež jsou častou příčinou matricových efektů. A proto může být v některých případech extrakce z kapaliny do kapaliny účinným postupem pro odstranění zdroje matricových efektů. Nicméně ostatní látky, které jsou v použitém organickém rozpouštědle rozpustné a jež jsou také potenciálně nebezpečné z hlediska vzniku matricových efektů, ve vzorku zůstávají (**Obr. 8**). Důvodem jsou podobné fyzikálně-chemické vlastnosti interferujících látek a stanovovaných sloučenin, a tedy i podobná rozpustnost. Další nedostatky představuje relativně vysoká spotřeba organických rozpouštědel, obtížné uplatnění pro extrakci hydrofilních látek, nutnost většího množství vzorku, riziko tvorby emulzí a nekompatibilita použitých rozpouštědel pro LC-MS analýzu na reverzních fázích a z toho plynoucí potřeba odpařit výsledný extrakt. Některé z

výše zmíněných nedostatků odstraňují nové postupy, jako je miniaturizované provedení snižující spotřebu rozpouštědel, a také postupy využívající vhodné soli, které umožňují extrahovat i hydrofilní látky [22][30][31][32].



Obr. 8: Extrakce z kapaliny do kapaliny – schéma postupu

### 3.3.1.2 Selektivní přístupy v úpravě vzorku

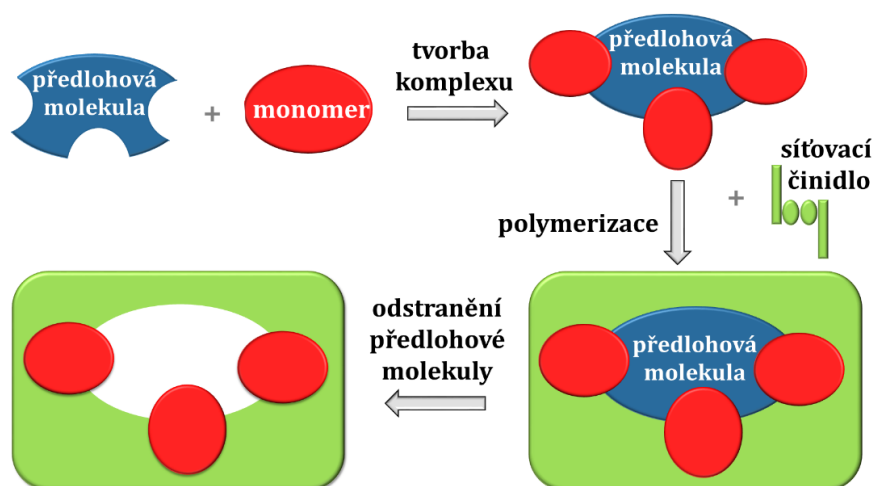
Ze skupiny postupů úpravy vzorku jsou pro odstranění matricových efektů nejvhodnější metody, které se vyznačují vysokou selektivitou retence sledovaného analytu. Do této skupiny patří techniky využívající molekulárně vtištěné polymery (MIP), aptamery a protilátky [33][34]. Co se týká přípravy, ve většině případů lze za laboratorních podmínek nejlevněji, nejrychleji a nejsnadněji připravit sorbenty využívající MIP materiál. Ten se také oproti ostatním technikám vyznačuje vysokou stabilitou, a tedy schopností zachovat kapacitu sorbentu, extrakční výtěžnost a také účinnost přečištění komplexní matrice i po provedení většího počtu extrakcí.

#### a) Molekulárně vtištěné polymery

Molekulárně vtištěné polymery jsou syntetickým materiálem, který ve své struktuře obsahuje specifická rozpoznávací místa neboli kavity. Ty jsou vytvořeny analyzované látky na míru. Analyt je v těchto kavitách vázán na základě mechanismu zámku a klíče, jenž byl původně použit v biochemii pro vysvětlení interakcí mezi enzymem a substrátem [35]. První zmínky o této technice se objevily v roce 1931, kdy Polyakovova skupina zjistila, že modifikátor přidaný do směsi pro vytvoření silikagelu je následně ve vzniklém materiálu zvýšeně zadržován [36]. Technika molekulárně vtištěných polymerů nachází uplatnění v různých oborech analytické chemie. Jedná se především o extrakci na tuhou fázi, senzory, chromatografickou a elektroforetickou separaci [37]. Nejpoužívanějším a zároveň nejpokročilejším odvětvím MIP techniky je právě její využití jako sorbentu pro SPE [38]. To dokazuje také fakt, že SPE kolonky naplněné MIP materiálem jsou již komerčně dostupné. Jejich nabídka je ale stále dosti omezená. Jelikož je příprava MIP materiálu levná, relativně jednoduchá a také rychlá, lze tento typ SPE sorbentů připravit analyzované

látce na míru i ve vlastní laboratoři. Existuje několik způsobů, jak MIP částice připravit [39].

Syntéza (**Obr. 9**) obvykle začíná tvorbou komplexu mezi předlohou a funkčním monomerem, a to ve vhodně zvoleném rozpouštědle. Přídavek síťovacího činidla způsobuje vytvoření zesíťované struktury, která zachycuje vzniklé komplexy funkčního monomeru a předlohy v prostoru. V případě použití MIP částic jako SPE sorbentu je po dokončení syntézy vzniklý blok polymeru rozbit, homogenizován a poté proset přes síta o určité velikosti, a to z důvodu dosažení opakovatelné velikosti MIP částic. To vede i ke zvýšení opakovatelnosti SPE metody. Výsledný materiál je nakonec umístěn do kolonky mezi dvě frity a po uvolnění kavit odstraněním předlohy molekuly je takto vytvořená SPE kolonka připravena k použití [37].



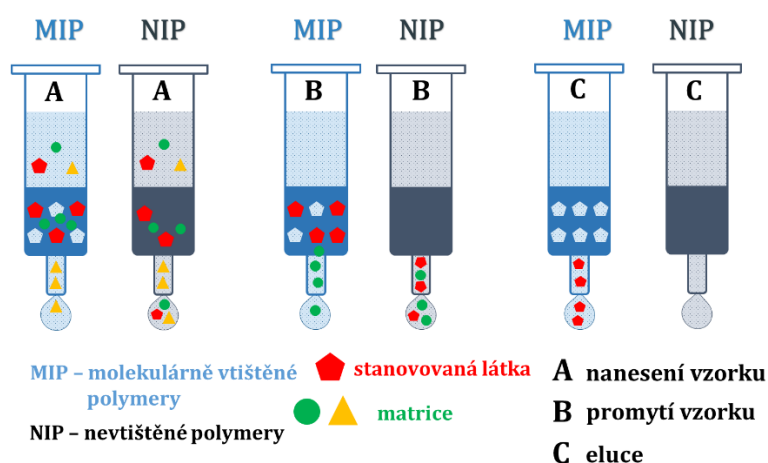
**Obr. 9: Molekulárně vtištěné polymery – schéma přípravy**  
(upraveno podle [35])

Sorbent tedy umožňuje selektivně zadržet sledovaný analyt, zatímco nečistoty a interferující látky podléhající se na vzniku matricových efektů jsou odstraněny prostřednictvím důkladně optimalizovaného promývacího kroku. Poměr zastoupení specifických interakcí, tedy vazby analytu v kavitách, a nesespecifických interakcí, vazby analytu mimo kavity, je nejčastěji hodnocen porovnáním elučních profilů (**Obr. 10**) získaných za použití jak MIP, tak i NIP (non-imprinted polymer; nevtištěný polymer) sorbentu. Kontrolní NIP materiál je připraven podle stejného postupu jako MIP až na to, že v průběhu syntézy není do reakční směsi přidána předloha molekula. Vzniklý NIP materiál tedy neobsahuje specifická rozpoznávací místa a při retenci se uplatňují pouze nesespecifické interakce [40].

MIP sorbenty jsou připravovány pro selektivní extrakci buď jedné molekuly, nebo skupiny látek, které jsou si navzájem strukturálně podobné. Jako předloha pro



vytvoření kavit se používá analyzovaná látka nebo sloučenina, jež je stanovovaná látce podobná, a to z hlediska struktury i fyzikálně-chemických vlastností. V případě použití analyzované látky je nutné zabezpečit její úplné odstranění. Nedokonalé odstranění předlohové struktury by poté mohlo způsobit její uvolnění během extrakční procedury, což by vyústilo ve falešně pozitivní a nesprávné výsledky při následné kvantifikaci. Výběr rozpouštědla, ve kterém syntéza MIP materiálu probíhá, je kritickým bodem pro předurčení interakcí, jež se budou uplatňovat v průběhu retence analyzované látky [41]. Běžně se používají nepolární a mírně polární rozpouštědla, jako je toluen, chloroform, dichloromethan nebo acetonitril. Tento typ rozpouštědel umožňuje preferenci polárních interakcí mezi předlohovou strukturou a funkčním monomerem. Jedná se o vodíkové můstky a elektrostatické interakce. Uplatnění také nacházejí polárnější rozpouštědla, a to ethanol a methanol. Byly připraveny i MIP sorbenty ve směsích methanolu a vody, a dokonce i v čisté vodě. MIP materiál uplatňující se jako SPE sorbent je nejčastěji vytvářen radikálovou polymerizací. Jako funkční monomer se používá methakrylová kyselina nebo vinyl-pyridin a jako síťovací činidlo ethylenglykol dimethakrylát. Tento postup byl uplatněn v naší práci, jež měla za úkol připravit MIP sorbent pro selektivní extrakci lovastatinu [42]. Alternativní způsob přípravy MIP materiálu představuje sol-gel technika, při které se používají činidla jako (3-aminopropyl)triethoxysilan (funkční monomer) a tetraethyl orthosilikát (síťovací činidlo). Tento postup byl také použit v naší práci, a to při přípravě SPE sorbentu pro selektivní extrakci neurotoxické aminokyseliny  $\beta$ -*N*-methylamino-L-alaninu ze sinicového extraktu [43].



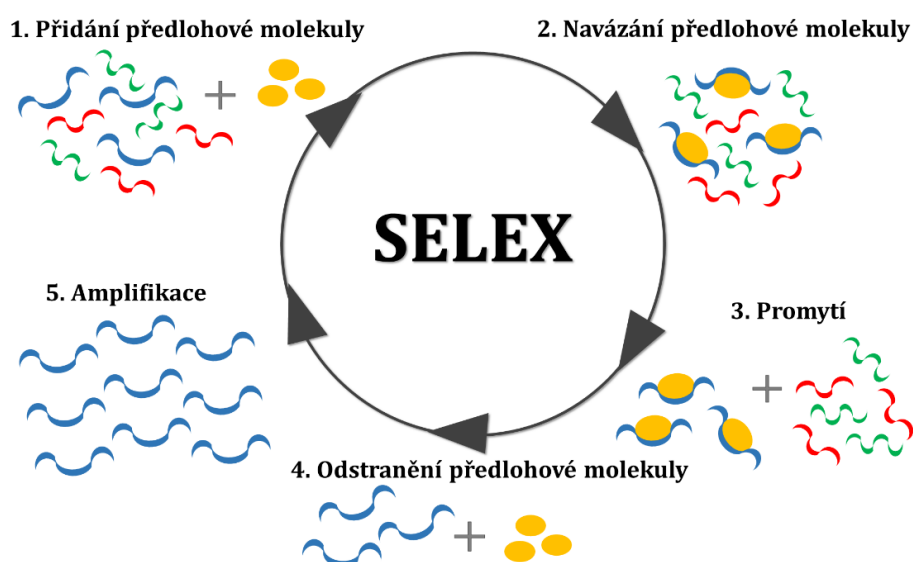
Obr. 10: Molekulárně vtištěné polymery – hodnocení selektivity

## b) Aptamery imobilizované na sorbentu

Aptamery jsou krátké oligonukleotidové řetězce (typicky 25-90 nukleotidových bází) deoxyribonukleové (DNA) nebo ribonukleové (RNA) kyseliny. Vyznačují se specifickou a komplexní trojrozměrnou strukturou, která je charakterizována



různými útvary, jako jsou smyčky, výdutě a vlásenky. Aptamery umožňují specificky navázat cílovou molekulu, a to od malých organických sloučenin, přes proteiny až po celé organismy, jako jsou viry a bakterie [44][45]. Aptamery specifické pro určitý analyt jsou připravovány pomocí procesu výběru a amplifikace označovaném zkratkou SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) (**Obr. 11**). K velkému počtu náhodně vybraných DNA nebo RNA oligonukleotidů je přidána předlohová molekula. Po inkubaci a navázání předlohové molekuly na komplementární vlákna oligonukleotidů jsou odstraněna ta vlákna, která nebyla schopna cílovou molekulu rozpoznat. Aptamery schopné specifické vazby jsou po odstranění předlohové molekuly nakopírovány pomocí polymerázové řetězové reakce [45][46]. Při specifickém rozpoznávání se uplatňuje prostorová komplementarita a přitažlivé síly mezi molekulami, jako jsou van der Waalovy, elektrostatické a hydrofobní interakce. Oproti protilátkám příprava aptamerů nevyžaduje zvířecího hostitele, probíhá zcela *in vitro*, je levnější, rychlejší a poskytuje větší stabilitu vzniklého materiálu.



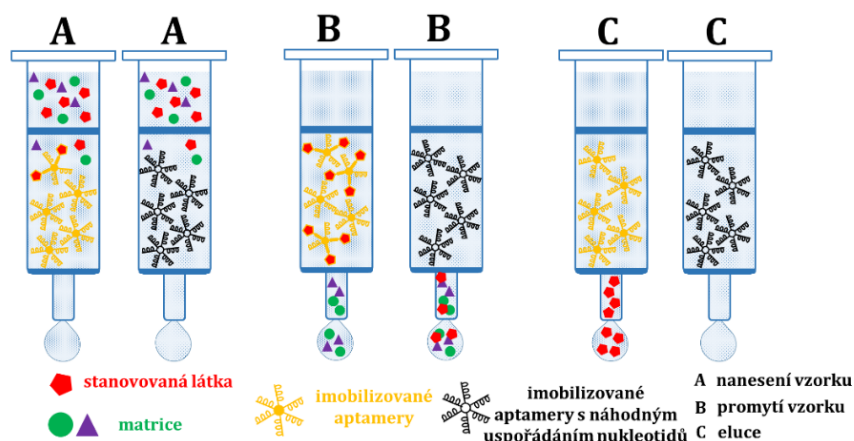
**Obr. 11:** Aptamery – schéma přípravy  
(upraveno podle [46])

Aptamery mohou být použity pro klasickou extrakci na tuhou fázi, a to po jejich ukotvení na vhodný nosič a následném naplnění do kolonky. Nosič by měl být chemicky a biochemicky inertní, mechanicky stabilní, uniformní a vhodně porézní. Oligonukleotidové řetězce je možno navázat na vybraný nosič až po modifikaci jejich 5' nebo 3' konce nebo zavedením určité funkční skupiny. Během imobilizace se uplatňují nekovalentní a kovalentní vazby. Ukotvení pomocí nekovalentních vazeb zprostředkovávají interakce biotin-streptavidin nebo biotin-avidin. Před vlastní imobilizací je proto nutné modifikovat konce oligonukleotidových řetězců molekulou biotinu. Ve srovnání s kovalentně ukotvenými aptamery tyto

nekovalentně navázané trpí kratší životností. V průběhu přípravy oligonukleotidů, jež jsou následně imobilizovány prostřednictvím kovalentních vazeb, je nutné zavést vhodné funkční skupiny (amino, thiol, karbonyl). Tyto funkční skupiny zprostředkovávají vlastní vazbu na nosič, jenž je představován aktivovanou sepharosou. Jako nosič aptamerů se také používají akrylátové polymery, oxid křemičitý, nanočástice zlata nebo magnetické kuličky [47].

Mezi parametry ovlivňující konformaci aptamerů patří teplota, obsah organických rozpouštědel, jejich iontová síla a také pH. Tyto parametry musí být brány v potaz při vývoji SPE metody. Povaha roztoku pro nanesení vzorku se velmi podobá tomu, který byl použit při procesu přípravy a výběru specifických oligonukleotidových řetězců (SELEX), a to z důvodu navození stejných interakcí. Pro eluci by měl být použit takový roztok, jenž umožní uvolnit pouze analyt a neovlivní aptamery a jejich vazbu na nosič. Kolonka obsahující sorbent je skladována při teplotě 4 °C a naplněna puftrem, jehož složení je velmi podobné roztoku použitému při procesu přípravy oligonukleotidových řetězců. Často je také přidáváno bakteriostatické činidlo v podobě azidu sodného [47].

Selektivita SPE metody je hodnocena porovnáním retence analytu na sorbentu obsahujícím imobilizované specifické aptamery se sorbentem, který obsahuje nespecifické aptamery. Pro porovnávání se také používají aptamery, jež ve své struktuře obsahují stejné nukleotidy, ale ty jsou v daném řetězci uspořádány nahodile (**Obr. 12**). Pro zhodnocení příspěvků vybraného nosiče na retenci cílové molekuly je vhodné také porovnat aptamery navázané a nenavázané na nosič [47].



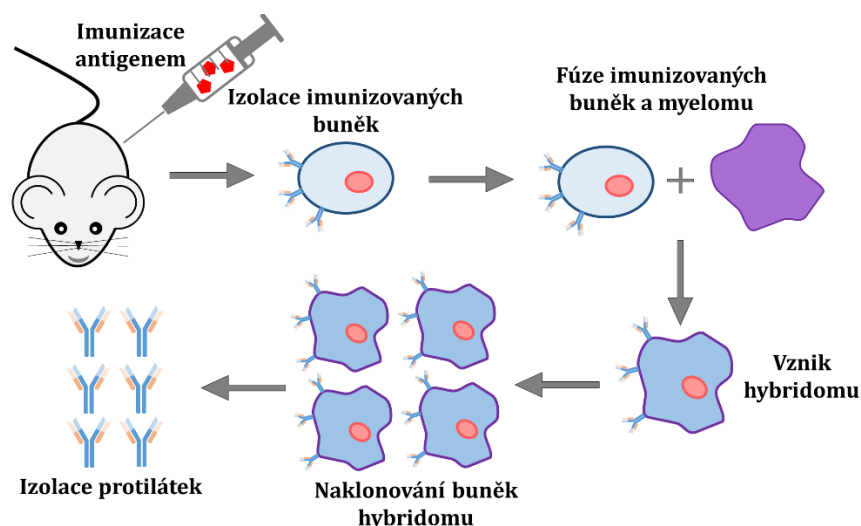
Obr. 12: Imobilizované aptamery – hodnocení selektivity

### c) Protilátky imobilizované na sorbentu

Selektivní rozpoznání analyzované látky je v případě této techniky založeno na interakcích mezi stanovovanou látkou představující antigen a imobilizovanými protilátkami. Uplatnění nacházejí jak monoklonální, tak i polyklonální protilátky. Ty

se od monoklonálních protilátek liší tím, že jsou schopny vazby na různé části antigenu. Sorbenty využívající monoklonální protilátky se vyznačují vyšší selektivitou a také vyšší opakovatelností celé procedury. Nevýhoda polyklonálních protilátek představovaná nižší selektivitou se může stát i výhodou, a to při použití pro extrakci vzorku obsahujícího různé strukturní deriváty předlokové molekuly. Tato přednost polyklonálních protilátek se projeví až v případě, kdy analyzované látky obsahují více funkčních skupin, a tím tedy i více specifických míst podléhajících selektivnímu rozpoznání [48].

Příprava monoklonálních protilátek (**Obr. 13**) začíná imunizací zvířecího organismu vybraným antigenem. Imunitní systém organismu reaguje na přítomnost antigenu aktivací B-lymfocytů a následně produkcí protilátek proti cizorodým molekulám. Samotné lymfocyty se dělí velmi pomalu a také rychle zanikají. Z tohoto důvodu jsou lymfocyty spojeny s nádorovými buňkami. Takto vzniklé buňky zvané hybridomy jsou schopné produkovat protilátky neomezeně, zároveň se dělí rychleji než lymfocyty a také se vyznačují výrazně delší životností [49].

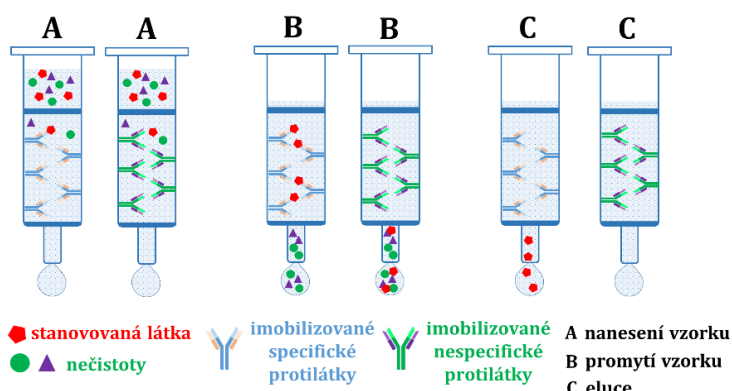


**Obr. 13: Produkce protilátek**

Většina látek, pro které je tento selektivní nástroj úpravy vzorku připravován, není schopna vyvolat reakci imunitního systému přímo. Příčinou jsou malé rozměry analyzovaných sloučenin. Proto je nutné navázat vybranou látku na proteinový nosič, čímž je vytvořena struktura zvaná haptén. Ten již reakci imunitního systému vyvolá. K těmto účelům se většinou používá hovězí sérový albumin. Vazbu předlokové molekuly na proteinový nosič je velmi často nutné realizovat prostřednictvím funkční skupiny, protože samotná molekula toho není schopna. Při výběru funkční skupiny umožňující vazbu je nutné zachovat totožnost a jedinečnost předlokové molekuly [50]. Dalším důležitým bodem přípravy sorbentu využívající protilátky je jejich imobilizace na vhodný nosič. Materiál vybraný k tomuto účelu

musí být chemicky i biochemicky inertní, mechanicky stálý a optimálně porézní. Materiál sloužící jako nosič by měl být hydrofilní, a to z důvodu omezení nespecifických interakcí. Nejběžnější přístup pro imobilizaci protilátek využívá kovalentní vazby, které jsou navozeny interakcemi mezi volnými aminoskupinami protilátek a aldehydovými nebo epoxidovými funkčními skupinami povrchu nosiče. Výše zmíněné požadavky splňuje agaróza, celulóza, oxid křemičitý a syntetické polymery. Nejčastěji se používá oxid křemičitý a agaróza. Ta může být zapojena pouze v off-line uspořádání, protože se vyznačuje nižší odolností vůči vyššímu tlaku, jenž se v on-line uspořádání uplatňuje. Oxid křemičitý lze použít jak v on-line, tak i v off-line zapojení. Protilátky mohou být navázány na povrch nosiče také pomocí nekovalentních vazeb. Tento druh vazeb zprostředkovávají proteiny A a G. Tyto bílkoviny vážou protilátky v oblasti Fc-fragmentů, a tím orientují místa schopná vázat antigen směrem od povrchu nosiče do středu pórů. Za fyziologických podmínek jsou tyto nekovalentní vazby relativně pevné, zatímco v prostředí o nízkém pH bývají přerušeny [51][52].

Před nanesením vzorku musí být vymyto činidlo použité pro uskladnění sorbentu. Při nanášení vzorku je nutné brát v potaz nižší kapacitu sorbentu, a to ve srovnání s MIP materiálem. Po promytí vzorku následuje eluce stanovovaného analytu, která by měla přerušit interakce pouze mezi ním a protilátkou a neměla by ovlivnit vazbu protilátky na nosič. Nejběžněji se používají ve vodě rozpustná organická rozpouštědla, chaotropická činidla (činidla rušící nekovalentní vazebné interakce, jako jsou vodíkové můstky, Van der Waalovy interakce a hydrofobní interakce), snížení pH nebo kombinace těchto přístupů. Selektivitu retence (**Obr. 14**) lze hodnotit například porovnáním elučních profilů získaných za použití specifických a nespecifických protilátek [52][53].



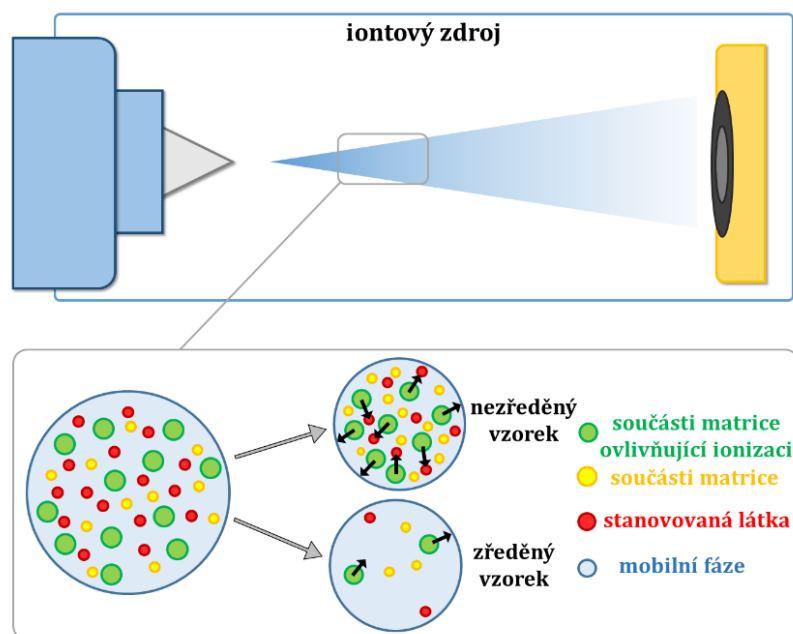
**Obr. 14: Imobilizované protilátky – hodnocení selektivity**

Pro opakované použití jsou sorbenty regenerovány promytím fosfátovým pufrům a následně skladovány naplněné tímto roztokem při teplotě 4 °C. Přidává se

malé množství bakteriostatického azidu sodného. S rostoucím počtem extrakčních procedur a dobou skladování dochází k poklesu kapacity sorbentu z důvodu snižování počtu imobilizovaných protilátek [53].

### 3.3.1.3 Zředění vzorku

Jedním z nejjednodušších a nejrychlejších postupů úpravy vzorku před LC-MS analýzou umožňujícím snížit nebo zcela odstranit dopad matricových efektů je prosté zředění analyzovaného vzorku [54]. Zředění vzorku sníží obsah nejenom analyzované látky, ale také celkový obsah látek obsažených v hodnoceném vzorku. Tím se tedy sníží počet všech molekul podléhajících ionizaci a také počet látek potenciálně ovlivňujících ionizaci analytu (**Obr. 15**). Ionizační účinnost molekul hodnocené látky bude vyšší a zároveň se sníží boj o náboj mezi molekulami analytu a složkami matrice. Stupeň zředění potřebný pro odstranění matricových efektů závisí na typu matrice [55] a je omezen zejména citlivostí MS detekce [56]. V případě naší práce zabývající se stanovením katechinů v čajích ředění vytvořených čajových nálevů výrazně promlouvalo do vzniku matricových efektů a také vedlo k jejich potlačení [57]. Význam tohoto postupu pro odstranění matricových efektů se bude pravděpodobně zvyšovat, a to z důvodu neustálého zvyšování citlivosti nově představovaných hmotnostních spektrometrů.



**Obr. 15: Zředění vzorku – dopad na ionizaci analyzované látky**  
(upraveno podle [54])

### 3.3.2 Chromatografická separace

Dalším nástrojem, jenž snižuje nebo zcela odstraňuje dopad matricových efektů na LC-MS analýzu, je dostatečně optimalizovaná chromatografická separace. Ta umožňuje oddělit od sebe analyt a látky ovlivňující jeho ionizaci ještě před vstupem do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Uplatňuje se zvýšení separační účinnosti nebo změna selektivity separace [58]. Zvýšení separační účinnosti lze dosáhnout zmenšením velikosti částic stacionární fáze, zvýšením teploty, změnou průtokové rychlosti a prodloužením kolony nebo použitím dvourozměrné chromatografické separace (2D-LC). Selektivitu separace lze změnit vhodným nastavením gradientu, změnou teploty, průtokové rychlosti, složení mobilní fáze a změnou typu stacionární fáze [27].

Účinnost separačního procesu je popisována počtem teoretických pater. Patro představuje hypotetickou část kolony, kde dochází k ustalování rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Počet teoretických pater  $N$  se vypočítá jako druhá mocnina poměru retenčního času  $t_R$  a šířky píku  $w$  v jeho příslušné výšce a následným vynásobením odpovídající konstantou. Její hodnota závisí na tom, v jaké výšce je šířka píku odečítána. V případě, kdy se počítá se šířkou v polovině výšky daného píku ( $w_{50}$ ), je hodnota konstanty 5,54:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{50}} \right)^2$$

Tato bezrozměrná veličina  $N$  ale nebere v potaz délku analytické kolony, a proto byl pro porovnání kolon o různých délkách  $L$  zaveden výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  [59]:

$$H = \frac{L}{N}$$

Redukovaná výška teoretického patra  $h$  se používá pro porovnání výškového ekvivalentu teoretického patra kolon s odlišnou velikostí částic  $d_p$  [60]:

$$h = \frac{H}{d_p}$$

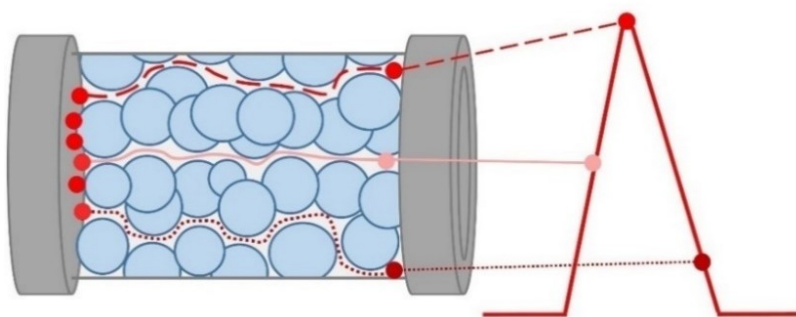
Rozšiřování elučních zón způsobuje snížení separační účinnosti, což ve výsledku vede ke snížení rozlišení, a tím tedy klesá i pravděpodobnosti oddělení látek podílejících se na vzniku matricových efektů od látek analyzovaných. K rozšiřování elučních zón přispívá podle teorie J. J. van Deemtera vířivá difuze

(člen A van Deemterovy rovnice), podélná difuze (člen B) a odpor proti převodu hmoty v mobilní a stacionární fázi (člen C) [61].

Vířivá difuze je způsobena nerovnoměrnou distribucí velikosti a tvaru částic naplněných v analytické koloně. To ovlivní průchod vzorku skrz stacionární fázi, kdy molekuly jednoho analytu putují různými kanálky a musí tedy urazit odlišnou vzdálenost na cestě přes kolonu směrem k detektoru (**Obr. 16**). Člen **A** lze vyjádřit rovnicí:

$$A = 2\lambda d_p$$

kde koeficient  $\lambda$  popisuje nerovnoměrnost plnění analytické kolony a  $d_p$  vyjadřuje průměrnou velikost částic naplněných v analytické koloně [60].



**Obr. 16: Vířivá difuze – člen A van Deemterovy rovnice**  
(upraveno podle [60])

Člen B je představován podélnou difuzí, jež hraje důležitější roli v plynové chromatografii a v kapalinové chromatografii bývá její vliv často zanedbatelný. V kapalinové chromatografii se výrazněji projevuje především při nízké rychlosti průtoku mobilní fáze. Příčinou podélné difuze je koncentrační gradient vytvořený uvnitř analytické kolony během separace (**Obr. 17**). Molekuly analyzované látky mají tendenci pohybovat se z místa o vyšší koncentraci do míst s nižší koncentrací, a to ve všech směrech. Tento proces je ovlivněn především difuzním koeficientem  $D_m$ , který je možné vypočítat pomocí Wilke-Changovy rovnice:

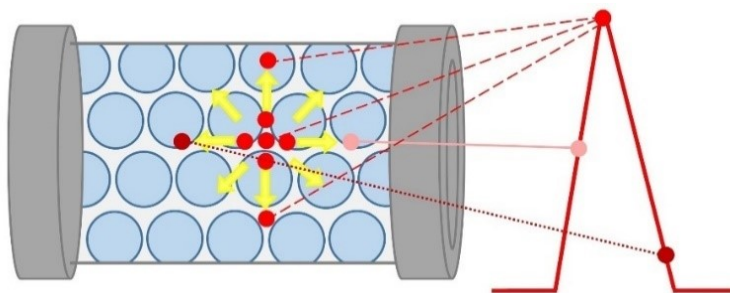
$$D_m = \frac{7,4 \times 10^{-8} T \sqrt{\psi_{sv} M_{sv}}}{\eta_{sv} \nu^{0.6}}$$

kde parametr  $T$  vyjadřuje teplotu (Kelvin),  $\psi_{sv}$  je asociační faktor použitého rozpouštědla,  $M_{sv}$  představuje relativní molekulovou hmotnost rozpouštědla,  $\eta_{sv}$  je dynamická viskozita rozpouštědla a  $\nu$  je molární objem analytu. Člen **B** může být následně popsán vztahem [60]:

$$B = 2\gamma D_m$$



kde  $D_m$  vyjadřuje difuzní koeficient a  $\gamma$  je korekční faktor, který zohledňuje tvar kanálků ve stacionární fázi [60].

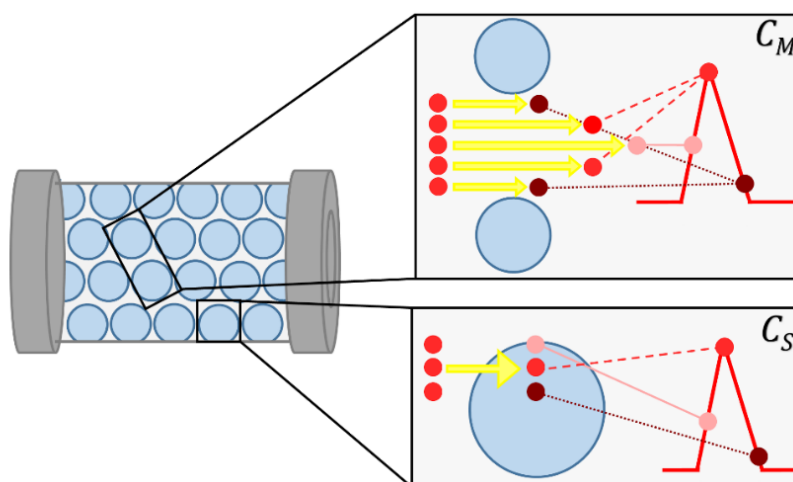


**Obr. 17: Podélná difuze – člen B van Deemterovy rovnice**  
(upraveno podle [60])

Odpor proti převodu hmoty (člen C) se vyskytuje jak v mobilní, tak i ve stacionární fázi. Odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi je důsledkem rozdílné rychlosti mobilní fáze nesoucí molekuly analytu ve stacionární fázi. Rychlost je vyšší v prostoru uprostřed vzdálenosti mezi částicemi, zatímco v blízkosti povrchu částic je rychlost nižší (**Obr. 18,  $C_M$** ). Odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi vzniká při interakci molekul analytu s částicemi stacionární fáze. Některé molekuly jsou zadrženy pouze na povrchu částic a některé vstupují i do vnitřního prostoru částic (**Obr. 18,  $C_S$** ). V plynové chromatografii tento parametr nehraje důležitou roli a lze ho zanedbat. Příspěvek odporu proti převodu hmoty lze popsat výrazem:

$$C = (C_M + C_S) = (\omega d_p^2 / D_m + \omega d_p^2 / D_{part})$$

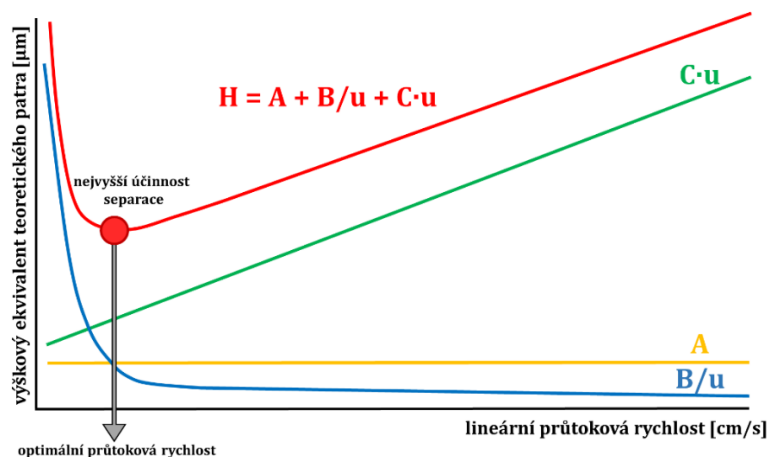
kde  $C_M$  představuje příspěvky odporu proti převodu hmoty v mobilní fázi a  $C_S$  ve stacionární fázi. Koeficient  $\omega$  je určen tvarem částic, distribucí velikosti částic a distribucí pórů,  $d_p$  vyjadřuje průměr částic a  $D_m$  je difuzní koeficient v mobilní fázi a  $D_{part}$  intračasticový difuzní koeficient [60].



**Obr. 18: Odpor proti převodu hmoty – člen C van Deemterovy rovnice**  
(upraveno podle [60])



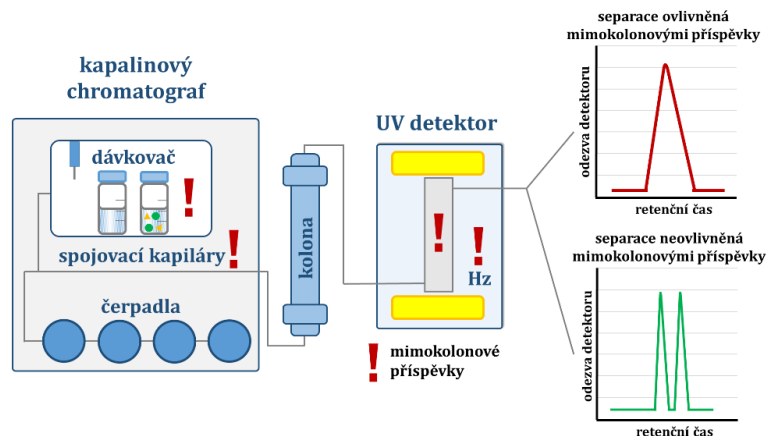
J. J. van Deemter [62] je také autorem křivky, jež popisuje závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární průtokové rychlosti a také na příspěvcích jednotlivých členů (**Obr. 19**). Vířivá difuze (člen A) není závislá na lineární průtokové rychlosti. Při vzrůstající lineární průtokové rychlosti se vliv podélné difuze (člen B) na rozšiřování elučních zón snižuje. Negativní dopad odporu proti převodu hmoty (člen C) na účinnost separace roste při zvyšující se průtokové rychlosti. Nejnižší bod křivky **H** představuje lineární průtokovou rychlost mobilní fáze zajišťující nejvyšší účinnost chromatografické separace [60].



**Obr. 19:** Grafické vyjádření van Deemterovy rovnice  
(upraveno podle [60])

### 3.3.2.1 Mimokolonové příspěvky

Mimokolonové příspěvky významně ovlivňují účinnost separace (**Obr. 20**) a také způsobují problémy při transferu metod, a to nejen mezi chromatografy různých dodavatelů, ale také mezi přístroji téhož výrobce. Mimokolonové příspěvky jsou součtem objemových a časově závislých příspěvků [63].



**Obr. 20:** Mimokolonové příspěvky – místo vzniku

Dávkový objem vzorku, objem průtokové cely použitého detektoru, objem kapilár zapojených v chromatografickém systému a také preciznost jejich zapojení

mají vliv na objemové příspěvky  $\sigma_v^2$  [63][64]. Tento typ příspěvků vyjádřený v jednotkách délky  $\sigma_{l,v}^2$  lze vypočítat pomocí následující rovnice:

$$\sigma_{l,v}^2 = \frac{\sigma_v^2}{\pi^2 \cdot r^4} \cdot \frac{1}{\varepsilon_t^2 \cdot (k' + 1)^2}$$

kde  $\pi \cdot r^2$  představuje průřez kolonou,  $\varepsilon_t$  vyjadřuje celkovou porozitu a  $k'$  je retenční faktor. V isokratickém módu chromatografické separace mimokolonové objemové příspěvky klesají se zvyšující se retencí analytu [63].

Druhým typem jsou časově závislé příspěvky  $\tau^2$ , na kterých se podílí časová konstanta detektoru a dávkovací frekvence. Tyto příspěvky vyjádřené v jednotkách délky  $\sigma_{l,\tau}^2$  lze vypočítat pomocí následující rovnice:

$$\sigma_{l,\tau}^2 = \frac{\tau^2 \cdot u^2}{(k' + 1)^2}$$

kde  $u$  je lineární průtoková rychlost a  $k'$  retenční faktor. Projevy těchto příspěvků tedy narůstají se zvyšující se lineární rychlostí  $u$  a naopak klesají s vyšší retencí analytu ( $k' + 1$ ) [63].

Výsledné příspěvky celého systému ( $\sigma_{total}^2$ ), které způsobují rozšiřování elučních zón a zahrnují jak mimokolonové, tak i kolonové příspěvky ( $\sigma_{col}^2$ ), lze vypočítat pomocí rovnice [63]:

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{l,v}^2 + \sigma_{l,\tau}^2 = \sigma_{col}^2 + \frac{\sigma_v^2}{\pi^2 \cdot r^4} \cdot \frac{1}{\varepsilon_t^2 \cdot (k' + 1)^2} + \frac{\tau^2 \cdot u^2}{(k' + 1)^2}$$

Po dosazení do rovnice J.J. van Deemtera, jež popisuje účinnost kolony v nepřítomnosti jakýchkoliv mimokolonových příspěvků, získáme vztah, který vyjadřuje výslednou účinnost chromatografického systému [63]:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u + \frac{1}{L} \cdot \frac{\sigma_v^2}{\pi^2 \cdot r^4} \cdot \frac{1}{\varepsilon_t^2 \cdot (k' + 1)^2} + \frac{1}{L} \cdot \frac{\tau^2 \cdot u^2}{(k' + 1)^2}$$

Z výše uvedených rovnic je patrné, že mimokolonové příspěvky se snižují, když se délka kolony  $L$ , retenční faktor  $k'$  a průměr kolony  $\pi \cdot r^2$  zvyšují. V případě analýzy molekul se střední nebo vysokou retencí za současného použití delší kolony s větším průměrem mají mimokolonové příspěvky prakticky zanedbatelný dopad na účinnost separace. Význam tohoto fenoménu ale roste při použití částic menších než 2  $\mu\text{m}$  naplněných do krátkých kolon s malým průměrem. Pro využití plného

potenciálu, jež kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  přináší, je nutné UHPLC systém důkladně optimalizovat a přizpůsobit [63][65].

Na základě velikosti mimokolonových příspěvků lze rozlišit tři skupiny LC systémů. Jsou to systémy optimalizované pro rychlou UHPLC separaci ( $\sigma_{ec}^2 < 10 \mu\text{L}^2$ ), hybridní systémy určené jak pro rychlou UHPLC, tak i konvenční HPLC separaci ( $\sigma_{ec}^2 < 10\text{--}50 \mu\text{L}^2$ ) a systémy vhodné pouze pro konvenční HPLC separace ( $\sigma_{ec}^2 > 50 \mu\text{L}^2$ ) [66].

Vliv průměru kolony na účinnost chromatografické separace byl experimentálně demonstrován ve studii Wu a kol. [67]. Kolony s délkou 50 mm a průměry 1,0; 2,1; 3,0 a 4,6 mm naplněné částicemi  $< 2 \mu\text{m}$  poskytly účinnost 3580, 9010, 11200 a 13500. Kolony s nižším průměrem se vyznačovaly nejen podstatně nižší separační účinností, ale také tvar pík sledovaných analytů byl značně zhoršen. Mimokolonové příspěvky lze minimalizovat optimalizací různých částí chromatografického systému. Zručný analytik toho může docílit i bez zásahu servisního technika, a to nejnáze v oblasti automatického dávkovače, spojovacích kapilár a detektoru. Systematické hodnocení vlivu jednotlivých částí a parametrů chromatografického systému přisoudilo největší význam objemu průtokové cely detektoru. Tato studie brala v potaz vliv rychlosti průtoku mobilní fáze, objemu dávkovaného vzorku, přítomnosti termostatu, objemu průtokové cely detektoru, průměru spojovacích kapilár a rozměrů sedla dávkovací jehly [68].

Význam mimokolonových příspěvků je často podceňován, nicméně jejich vliv na účinnost chromatografické separace je značný. Přestože lze jejich projevy snížit relativně jednoduchými zásahy v různých částech chromatografického systému, běžný uživatel LC přístrojů toho využívá pouze sporadicky.

### 3.3.2.2 Velikost částic stacionární fáze

V průběhu posledních padesáti let byla velikost částic snížena více než padesátinásobně [69]. Na základě teorií van Deemtera [62], Giddingse [70] a Knoxe [71][72] je výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  vyjadřující separační účinnost přímo úměrný čtverci velikosti částic. Nejtradičnější vyjádření van Deemterovy rovnice je následující:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{f(k)d_p^2 u}{D_M}$$

kde  $d_p$  vyjadřuje průměr částic,  $D_M$  představuje difuzní koeficient analytu,  $\lambda$  popisuje nerovnoměrnost plnění analytické kolony,  $\gamma$  je korekční faktor

zohledňující tvar kanálků ve stacionární fázi a  $u$  vyjadřuje lineární průtokovou rychlost.

Snížení velikosti částic přináší vyšší separační účinnost, ale také způsobuje podstatně vyšší zpětný tlak, který je nekompatibilní s konvenčními kapalinovými chromatografy. Závislost tlaku  $P$  na velikosti částic  $d_p$  vyjadřuje Darcyho zákon:

$$P = \frac{uL\eta\Phi}{d_p^2}$$

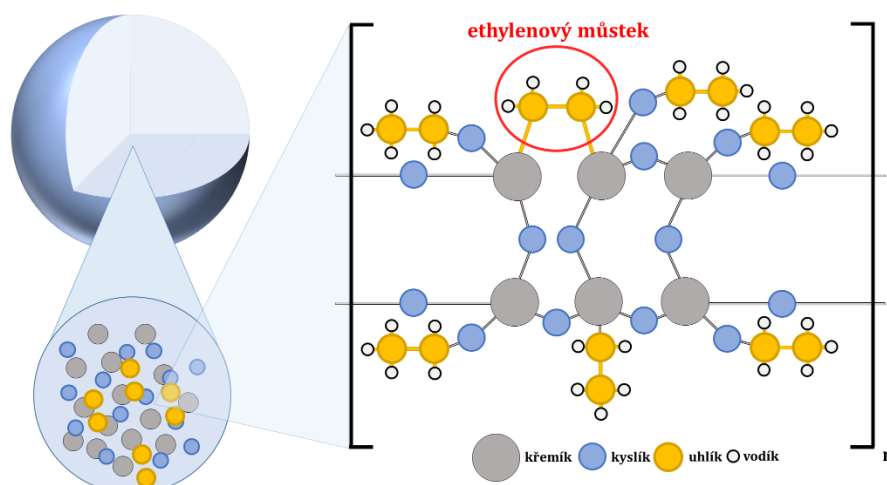
kde  $\Phi$  představuje faktor odporu kolony,  $\eta$  je viskozita mobilní fáze,  $u$  lineární průtoková rychlost a  $L$  délka kolony [69].

Přelomovým obdobím pro částice  $<2 \mu\text{m}$  se stal rok 2004, kdy firma Waters (Milford, MA, USA) uvedla na trh první kapalinový chromatograf (Acquity UPLC®) umožňující pracovat při tlaku 1000 bar. Spolu s tímto ultra-vysokoučinným kapalinovým chromatografem byly uvedeny i kolony naplněné hybridními částicemi, jež se vyznačují stabilitou i při vysokých tlacích [73].

### 3.3.2.3 Stacionárních fáze

S představením UHPLC technologie a částic s průměrem  $<2 \mu\text{m}$  úzce souvisí vývoj nových materiálů, jež dokáží odolat vysokým tlakům, které tyto částice generují. Silikagel, který je stále nejběžnějším materiálem plněným do chromatografických kolon, trpí určitými nedostatky. Tím nejzásadnějším je možnost pracovat pouze v úzkém rozmezí pH, nízká tepelná stabilita a také přítomnost volných silanolových skupin, jež jsou zodpovědné za asymetrický tvar píků bazických analytů. Stacionární fáze hybridní, polymerní a ty, které využívají oxidy kovů (oxid zirkoničitý, titaničitý a hliníkový), překonávají výše zmíněné nedostatky silikagelu [74][75].

První generace hybridních částic byla představena firmou Waters v roce 1999, a to pod názvem XTerra. Tento materiál je připravován reakcí methyltriethoxysilanu s tetraethoxysilanem. Hlavní předností těchto stacionárních fází je možnost pracovat v širokém rozmezí pH (1-12) a také zlepšení tvaru píků pro bazické analyty [76]. Druhá generace zvaná BEH (Ethylene Bridged Hybrid) byla uvedena na trh firmou Waters o pět let později (**Obr. 21**). Ethylenový můstek je inkorporován prostřednictvím polymerizace bis(triethoxysilyl)ethanu a tetraethoxysilanu. Jeho rovnoměrná distribuce uvnitř částic stacionární fáze přináší vysokou mechanickou stabilitu [77].



**Obr. 21: BEH částice**  
(upraveno podle [77])

Třetí generace, známá pod názvem CSH (Charged Surface Hybride), využívá také BEH technologii. V tomto případě je povrch BEH částic modifikován aminoskupinami, které tomuto typu stacionárních fází dodávají kombinované vlastnosti. Separace je tedy založena na vícemodálním mechanismu. Hlavní výhodou CSH částic je kompatibilita s mobilními fázemi běžně používanými při LC-MS analýzách, jež se vyznačují nízkou iontovou silou [78].

Hybridní částice byly také představeny firmami Phenomenex (Torrance, CA, USA) a YMC (Kyoto, Japan). První (TWIN – two in one) ani druhá (TWIN NX) generace částic vyráběných firmou Phenomenex není ale dostupná ve velikosti  $<2 \mu\text{m}$ . Na rozdíl od částic firmy Waters se hybridní materiál v případě těchto částic nachází pouze ve vnější vrstvě. Materiál patentovaný firmou YMC je vyráběn mikroreaktorovou technologií, jež dává vzniku vícevrstevnému uspořádání. Tyto částice tedy obsahují vrstvy silikagelové a vrstvy s hybridními polymery [79][80]. Přestože jsou částice o rozměrech  $<2 \mu\text{m}$  využívající hybridní technologii vyráběny pouze dvěma firmami, jejich nabídka v současnosti pokrývá většinu chromatografických módů.

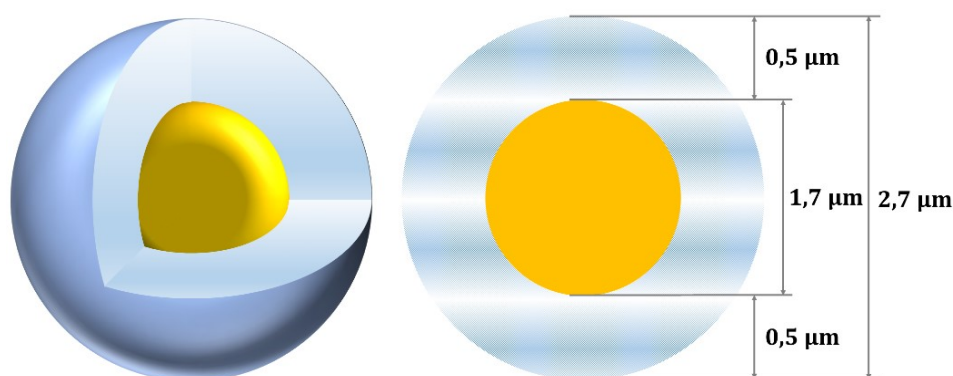
Polymerní stacionární fáze s částicemi  $<2 \mu\text{m}$  vyrábí firma Sepax (Newark, DE, USA). Použitým materiálem je polymer polystyren-divinylbenzen [81]. Ve srovnání se silikagelovými stacionárními fázemi se tento typ vyznačuje vysokou stabilitou v širokém rozmezí pH (1-14) a také odlišnou selektivitou, jež je způsobena přítomností fenylových skupin.

Vysokou chemickou stabilitou se také vyznačují stacionární fáze vytvořené z oxidů vybraných kovů. Pro tento účel se používá oxid zirkoničitý, oxid titaničitý a oxid hlinitý. Vysoká stabilita těchto stacionárních fází přináší prakticky neomezené

možnosti při vývoji chromatografických metod. Komplexnost povrchových interakcí přináší unikátní selektivitu, nicméně predikce retence analytu je z tohoto důvodu velmi složitá [82]. Největšího uplatnění dosáhly stacionární fáze vyrobené z oxidu zirkoničitého, a to firmou ZirChrom (Anoka, MN, USA). V současnosti jsou dostupné i ve velikosti  $<2\ \mu\text{m}$ .

### 3.3.2.4 Povrchově porézní částice

Povrchově porézní částice se skládají ze dvou odlišných částí, a to z vnitřního pevného jádra a vnější porézní vrstvy (**Obr. 22**). Velikost těchto částic se nejčastěji pohybuje v rozmezí od 1,3 do 5,0  $\mu\text{m}$ . Separační účinnost stacionárních fází s částicemi o velikosti  $<3\ \mu\text{m}$  je srovnatelná s účinností plně porézních částic o průměru  $<2\ \mu\text{m}$ . Povrchově porézní částice ale generují podstatně nižší zpětný tlak a z tohoto důvodu je možné zapojit tento typ kolony i do konvenčních kapalinových chromatografů [83].



**Obr. 22: Povrchově porézní částice**

Povrchově porézní částice byly poprvé připraveny pracovními skupinami Kirklanda [84] a Horvátha [85], a to na konci šedesátých let minulého století. Tento typ materiálu byl nejprve zamýšlen pro separaci makromolekul. Od sedmdesátých let minulého století byly již povrchově porézní částice dostupné i komerčně. Zasloužily se o to firmy DuPont de Nemours (Wilmington, DE, USA), Waters Associates (Milford, MA, USA) a Macherey-Nagel (Düren, Německo). V této době byla technika povrchově porézních materiálů zastíněna významnými pokroky na poli plně porézních částic a na dlouhou dobu upadla v zapomnění. K znovuobjevení této techniky došlo v roce 2006, kdy firma Advanced Material Technology (Wilmington, DE, USA) představila povrchově porézní částice o průměru 2,7  $\mu\text{m}$ . Jelikož průměr jádra dosahoval 1,7  $\mu\text{m}$ , vnější porézní vrstva zabírala téměř 75 % celkového objemu dané částice. Tyto rozměry umožnily překonat prvotní nedostatky v podobně nízké kapacity [86].

Přednosti povrchově porézních částic, jež přispívají k jejich vysoké separační účinnosti, shrnuje publikace González-Ruiz a kol. [87]:

a) Permeabilita kolon naplněných povrchově porézními částicemi je ve srovnání s plně porézními částicemi vyšší, a proto tento typ kolon generuje při stejných průtokových rychlostech nižší zpětný tlak.

b) Výroba povrchově porézních částic se vyznačuje vyšší homogenitou. Povrch vytvořených částic je navíc při porovnání s klasickými plně porézními částicemi výrazně drsnější. Tyto vlastnosti přispívají ke zlepšení procesu plnění částic do chromatografických kolon. To ve výsledku sníží rozmývání elučních zón, které způsobuje vysoký počet transportních kanálků vytvořených mezi částicemi.

c) Přítomnost pevného jádra a menší objem porézní vrstvy významně zmenšují prostor, do kterého mohou molekuly analytu difundovat. Rozšiřování elučních zón navozené difuzí a transportem molekul analytu uvnitř částic je tedy omezeno.

d) Vyšší tepelná vodivost zapříčiněná přítomností pevného jádra usnadňuje rozptýlení tepla, a tím snižuje pravděpodobnost vzniku radiálního teplotního gradientu [87].

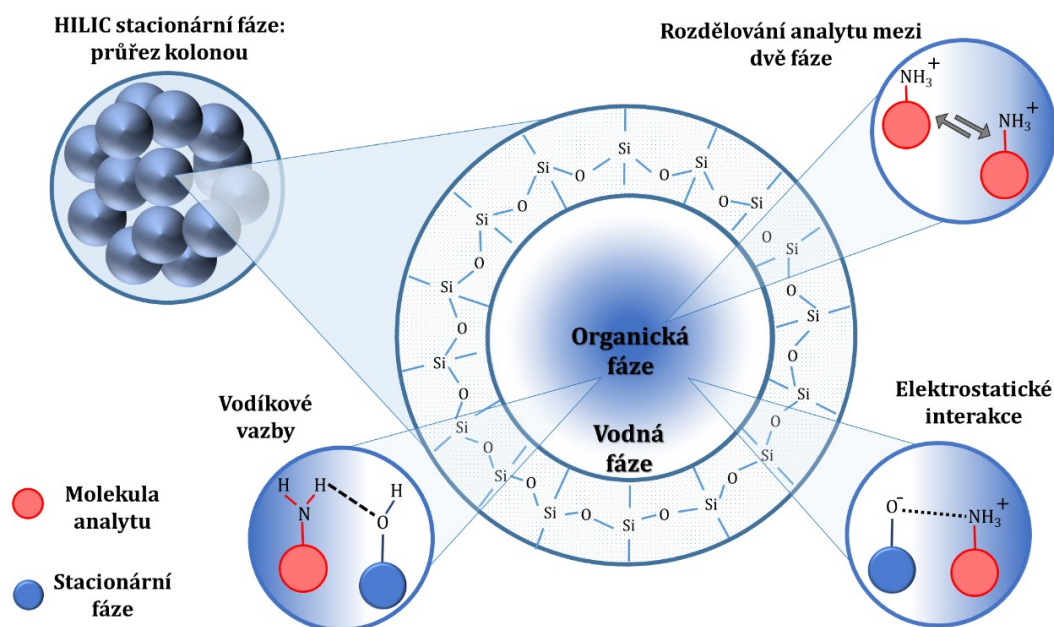
### 3.3.2.5 Složení mobilní fáze a nastavení gradientu

Aditiva a pufrý přídávané do mobilní fáze za účelem změny selektivity, zlepšení tvaru píku a opakovatelnosti chromatografické separace hrají důležitou roli při ionizaci odehrávající se v iontovém zdroji. Mnohé z nich nejsou vůbec vhodné pro spojení LC-MS, a to nejen kvůli nežádoucímu ovlivnění ionizace analytu, ale i z důvodu kontaminace iontového zdroje vedoucí ke snížení jak citlivosti MS detekce, tak i opakovatelnosti signálu [88]. Holčapek a kol. [11] porovnávali vliv ion-párových činidel (octany dialkylamonia a trialkylamonia, tetraalkylamoniové soli a octan amonný) na ionizaci polysulfonových kyselin. Ionizaci hodnocených látek nejvýrazněji potlačily tetraalkylamoniové ionty a jejich vliv narůstal se zvyšující se koncentrací. Gustavsson a kol. [89] sledovali vliv ion-párových činidel na odezvu vybraných aminosloučenin. Perfluorované karboxylové kyseliny přídávané do mobilní fáze způsobily snížení signálu u většiny pozorovaných látek o 30-80 %. Nezáleží pouze na typu aditiva, ale také na jeho koncentraci. To dokumentuje práce zabývající se vlivem vzrůstající koncentrace běžných aditiv na odezvu vybraných pesticidů [90] a látek narušujících endokrinní systém [91]. Předpokládá se, že přídavek látek snižujících povrchové napětí umožní odpaření vody a pufru ještě před dosažením Rayleighova limitu (povrchové napětí kapičky je stejné jako repulzní síly mezi náboji). To také vede ke zmenšení průměru kapiček

vznikajících při ionizaci elektrosprejem, což může pomoci při odstranění potlačení ionizace [92].

Místo, kde se matricové efekty v průběhu chromatografické separace projevují, lze snadno odhalit pomocí metody postkolonové infuze. V případě využití separace na reverzních fázích je nejčastěji zatíženou oblastí její začátek, kde jsou eluovány látky nezadržené (látky velmi polární), a také konec, kde jsou eluovány látky silně zadržené (látky nepolární). Doporučuje se nastavit podmínky chromatografické separace tím způsobem, aby byl analyt našeho zájmu eluován právě mezi těmito kritickými oblastmi [19]. Tento postup byl úspěšně uplatněn při analýze karbamátových insekticidů v mléce [93], při farmakokinetických studiích [94] a také při odstranění matricových efektů způsobených endogenními fosfolipidy [95].

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je považována za užitečnou techniku pro analýzu malých, polárních a ionizovatelných látek, které jsou velmi slabě zadržovány při separaci na reverzních fázích. Stacionární fáze má v HILIC módu polární charakter a mobilní fáze je nejčastěji tvořena acetonitrilem a vodnou složkou (5-40%). Retence polárních analytů je vysvětlována komplexním mechanismem, který zahrnuje rozdělování mezi vodnou vrstvu, vytvořenou na povrchu stacionární fáze, a mobilní fázi, elektrostatické interakce a vodíkové vazby (Obr. 23) [96][97].



Obr. 23: Retence analytu v HILIC módu – schéma  
(upraveno podle [96])

HILIC mód zároveň představuje vhodnou alternativu k chromatografii na normálních fázích, ion-párové a iontově výměnné chromatografii, a to ve spojení s



hmotnostní spektrometrií [98]. Vysoký obsah acetonitrilu v mobilní fázi poskytuje vhodné podmínky pro ionizaci elektrosprejem a zároveň zvyšuje citlivost MS detekce [99]. Ve srovnání s reverzními fázemi se HILIC chromatografie vyznačuje odlišným mechanismem retence, a tím tedy i odlišnou selektivou separace [58]. HILIC mód může zadržet látky typu fosfolipidů, proteinů a cukrů, které jsou považovány za jeden z nejčastějších zdrojů matricových efektů [6][100], a oddělit je od látek analyzovaných.

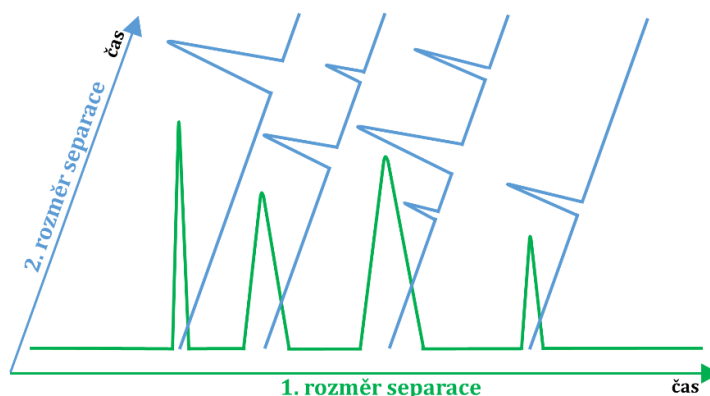
### 3.3.2.6 Objem mobilní fáze

Dalším navrhovaným postupem, jenž může být použit pro odstranění matricových efektů v LC-MS analýze, je snížení objemu, který vstupuje do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Tento postup sice neovlivní poměr iontů analyzované látky a molekul potenciálně ovlivňující její ionizaci, ale podstatně sníží velikost vznikajících kapiček. To urychlí odpaření kapalné mobilní fáze a usnadní ionizaci vzorku. Předpokládá se, že menší rozměry kapiček způsobí účinnější přesun analytu k povrchu a tím i zvýšení ionizační účinnosti [101]. Snížení matricových efektů v průměru o 45-60 % bylo pozorováno při snížení průtoku mobilní fáze u vzorků odpadních vod [102]. V případě snížení průtoku mobilní fáze při použití miniaturizovaného iontového zdroje typu nano-ESI bylo potlačení ionizace antagonisty muskarinových receptorů ve vzorku plazmy sníženo čtyřnásobně [103]. Studie hodnotící ionizaci dvou fyzikálně-chemicky odlišných látek (hydrofilní disacharid a povrchově aktivní n-oktyl-glukopyranosid) také potvrzuje významný vliv průtoku mobilní fáze [104].

### 3.3.2.7 Dvourozměrná kapalinová chromatografie

Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC) přináší podstatné zvýšení separační účinnosti. Toho je dosaženo uplatněním dvou různých separačních mechanismů [105]. 2D-LC separace probíhá buď v on-line nebo v off-line módu. V on-line módu je přenos vzorku, který byl rozdělen v první dimenzi, do druhé dimenze plně automatizován. V případě off-line módu jsou frakce získané po první separaci odebrány a následně nadávkovány k separaci ve druhé dimenzi. 2D-LC separaci lze realizovat v módu zvaném comprehensive (celostní) nebo heart-cutting (frakční). Celostní 2D-LC separace je dle Giddingse definována třemi kritérii [106]. První kritérium požaduje, aby byl vzorek podroben dvěma různými separacím (**Obr. 24**). Toho je dosaženo použitím dvou různých stacionárních fází nebo jedné stacionární fáze s dvěma odlišnými mobilními fázemi. Druhé kritérium vyžaduje, aby byla stejná část vzorku podrobena separaci v obou dimenzích, a to buď celý

vzorek, nebo pouze jeho určitý podíl. Třetí kritérium se vztahuje ke snížení rozlišení, které je způsobeno mimokolonovými příspěvky 2D-LC systému. Pro splnění třetího kritéria Giddingsovy definice nesmí být rozlišení separace v první dimenzi sníženo pod určitou hodnotu (10 %) [105][107]. V případě použití frakčního módu je ve druhé dimenzi podrobena separaci pouze vybraná část vzorku, která byla rozdělena v první dimenzi.



Obr. 24: Dvourozměrná LC separace – schéma

Při spojení hmotnostního spektrometru s 2D-LC systémem je nutné brát v potaz vybrané parametry chromatografické separace. Eluent vycházející z druhé dimenze musí být kompatibilní s MS detekcí, musí umožnit ionizaci analyzované látky. Separace ve druhé dimenzi bývá velmi rychlá a poskytuje píky se šířkou několika vteřin. Proto je nutné, aby byl použit hmotnostní analyzátor disponující vysokou skenovací frekvencí [108]. Průtokové rychlosti ve druhé dimenzi bývají vysoké a dosahují hodnot několika mililitrů za minutu. Doporučované průtokové rychlosti pro většinu iontových zdrojů jsou nižší, maximálně 1-2 mL/min. Z důvodu kompatibility je tedy nutné zapojit děliče toku, jejichž použití ale přináší nedostatky v podobě snížení citlivosti MS detekce a snížení separační účinnosti, za což zodpovídají mimokolonové příspěvky [105].

### 3.3.2.8 Superkritická fluidní chromatografie

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je vhodnou alternativou k separacím využívající HPLC a UHPLC instrumentaci, a to především z důvodu odlišného retenčního mechanismu. Ve srovnání s LC separacemi SFC tedy může ve vybraných aplikacích významně zvýšit separační účinnost. SFC byla představena již na počátku 70. let minulého století. Nicméně, z důvodu technických problémů a nízké robustnosti upadla na delší dobu v zapomnění. K znovuobjevení SFC došlo ve druhé dekádě 21. století, kdy byly představeny nové SFC systémy, u nichž byly překonány nedostatky zabraňující rutinnímu použití. V počátcích se pod pojmem SFC chápala

pouze separace, kde se uplatňuje oxid uhličitý za superkritických podmínek. Toto uspořádání umožnilo analýzu jen látek nepolárních, a to z důvodu nepolární povahy mobilní fáze. Pro využití SFC i v analýze polárních látek je nutné přidat k mobilní fázi tvořené oxidem uhličitým vhodný organický modifikátor. Používají se nižší alkoholy, jako jsou methanol, ethanol nebo isopropanol. Z důvodu odlišné selektivity lze použít i acetonitril. Separační účinnost, kterou acetonitril přináší, je ale velmi často nízká, a proto jsou výše zmíněné alkoholy upřednostňovány. Ty vystupují jako donory protonů, a tím pádem zabraňují vlivu volných silanolových skupin silikagelových stacionárních fází [109][110][111].

V rozsáhlé práci zabývající se vývojem UHPSFC-MS/MS metody pro stanovení skupiny 110 ve sportu zakázaných látek obsažených ve vzorcích moči (Nováková a kol. [112]) byl podrobně hodnocen vliv matricových efektů. V tomto ohledu byla UHPSFC-MS/MS metoda porovnávána s metodou UHPLC-MS/MS a vzorek byl před analýzou upraven pouze zředěním. Metoda využívající SFC separaci byla zatížena matricovými efekty významně méně a představuje tedy vhodnou platformu pro tento typ vzorků. Ovlivnění ionizace analytů obsažených ve vzorcích moči způsobují především polární komponenty. Ty jsou při LC separacích zadržovány na velmi populárních reverzních fázích méně a eluovány na začátku. V případě SFC je tomu naopak.

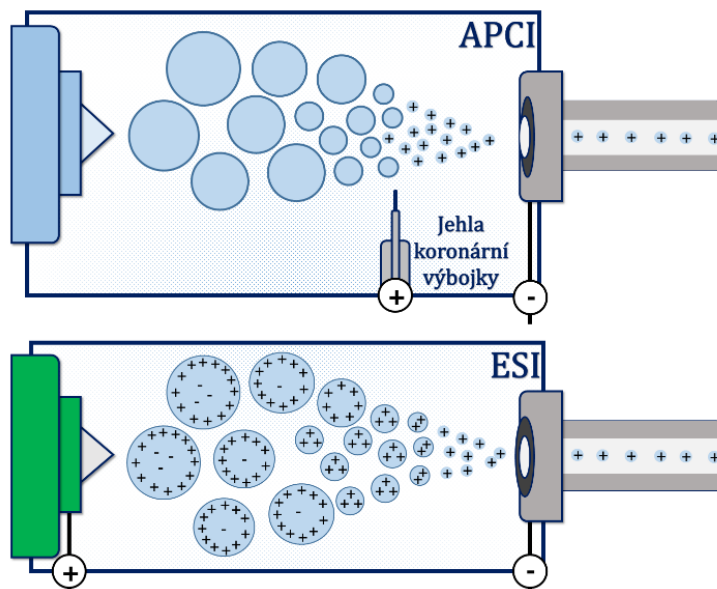
### 3.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Iontový zdroj hmotnostního spektrometru je primárním místem vzniku matricových efektů. Vhodným nastavením podmínek ionizace lze projevy matricových efektů snížit nebo zcela odstranit. Nejjednodušší možností zásahu je změna módu ionizace, a to pouze prostřednictvím dodaného softwaru. Relativně snadno lze také změnit typ ionizace. Geometrie i celkové uspořádání iontového zdroje, jež je vlastní každému výrobcí a modelu přístroje, ovlivňuje ionizaci a promlouvá tedy i do vzniku matricových efektů [17][19].

#### 3.4.3.1 Ionizační technika a mód ionizace

Ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) představují nejpoužívanější způsoby ionizace, a to ve spojení s kapalinovou i superkritickou fluidní chromatografií. Jak ESI, tak i APCI pracují za atmosférického tlaku a řadí se mezi měkké ionizační techniky. Ty preferenčně vytvářejí protonované  $[M+H]^+$  a deprotonované  $[M-H]^-$  molekuly. Přestože je APCI ve srovnání s ESI méně využívanou technikou a ačkoli bylo také provedeno a publikováno méně studií

zabývajících se ovlivněním ionizace, předpokládá se, že je odolnější vůči těmto nežádoucím jevům [3][5][113]. Tento fakt je vysvětlován odlišným mechanismem tvorby iontů. V případě ESI dochází k předání náboje v kapalně fázi, zatímco při APCI to je až v plynné fázi (**Obr. 25**) [4].



**Obr. 25: Porovnání ionizačních technik APCI a ESI**

Většina navrhovaných mechanismů vysvětlujících vznik matricových efektů diskutovaných v kapitole 3.1 přisuzuje vinu právě kroku, při kterém dochází k přechodu nabitých částic z kapalně do plynné fáze. Výše zmíněné předpoklady potvrzují následující studie. ESI ionizace byla v porovnání s APCI zatížena většími příspěvky matricových efektů při analýze morfinu v tělních tekutinách (plazma a sliny). Vzorky byly hodnoceny po přímém nástřiku a také po úpravě prostřednictvím zředění, proteinové precipitace a extrakce na tuhou fázi [114]. Výraznější projevy matricových efektů při ESI ionizaci (40 %) v porovnání s APCI ionizací (10 %) byly také pozorovány při vývoji metody pro stanovení klenbuterolu v moči [115]. ESI zdroj byl také shledán více náchylným k matricovým efektům ve studii zabývající se stanovením methadonu v lidské plazmě. Vzorek byl před LC-MS analýzou upraven různými metodami, a to jak off-line (LLE, SPE a proteinová precipitace), tak i on-line (SPE) [116]. Další studie vyvrací všeobecné předpoklady. Mei a kol. [117] pozoroval, že LC-MS metoda využívající ionizační techniku APCI byla zatížena matricovými efekty mnohem více než v případě použití ESI ionizace. Zároveň bylo pozorováno, že příspěvky matricových efektů se významně odlišují při porovnávání iontových zdrojů hmotnostních spektrometrů vyrobených třemi různými firmami. Porovnávány byly ESI zdroje od firem Sciex (Concord, Ontario, Kanada), Micromass/Waters (Manchester, UK) a Finnigan/Thermo (San Jose, CA, USA). Z výše uvedených výsledků tedy vyplývá, že i vlastní uspořádání iontového

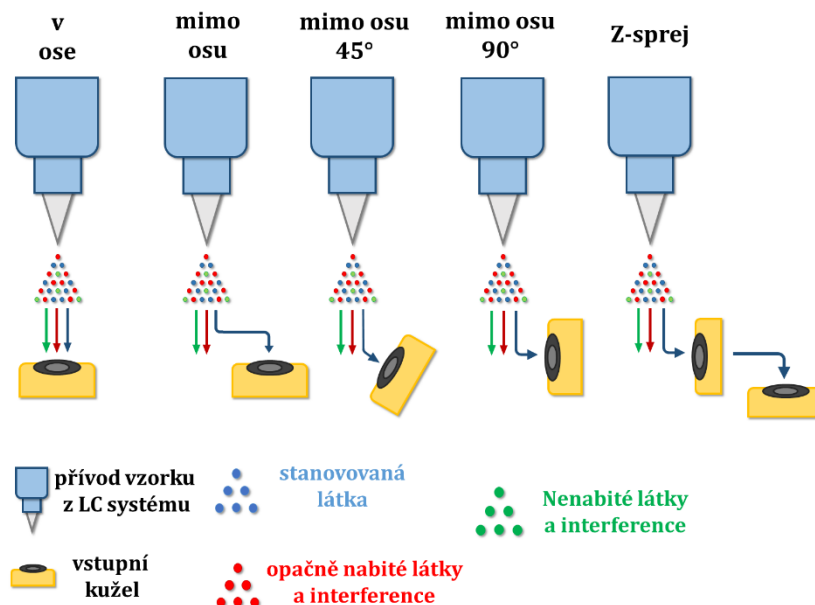
zdroje přispívá ke vzniku tohoto fenoménu. Hanold a kol. [118] studoval náchylnost fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) k matricovým efektům a porovnával tuto techniku s ESI a APCI. Iontový zdroj APPI byl zatížen matricovými efekty nejméně. Z důvodu nedostatečného počtu studií a rozporuplných a nejednoznačných výsledků nelze ale jednoznačně určit, která z ionizačních technik je nejvíce odolná vůči těmto nežádoucím jevům. Závěrem lze ale říci, že nejpoužívanější ionizační technika – ESI – je velmi náchylná ke vzniku matricových efektů.

Jedním z nejjednodušších postupů, jenž může snížit dopad matricových efektů na LC-MS analýzu, je změna polarity ionizace. Negativní mód ionizace je ve srovnání s pozitivním módem selektivnější, protože v pozitivním módu na rozdíl od módu negativního ionizuje většina látek. Pokud tedy analyzovaná látka ionizuje v negativním módu a zároveň poskytuje dostatečnou odezvu, je negativní mód první volbou [6][17][19].

### 3.4.3.2 Geometrie iontového zdroje

Geometrie iontového zdroje hraje důležitou roli při ionizaci, a proto i při vzniku matricových efektů [19][119]. Studie sledující příspěvky matricových efektů při analýze pesticidů v rostlinných vzorcích hodnotila vliv polohy přívodu vzorku z LC systému vůči vstupnímu kuželi iontového zdroje. Jednalo se o ortogonální (mimo osu 90°), dvojitě ortogonální (Z-sprej) a mimosové uspořádání. Žádné výrazné odlišnosti v projevech matricových efektů nebyly pozorovány. Studie také zahrnovala porovnání ortogonálního ESI zdroje pracujícího za standardních podmínek a v módu Jet Stream. Ten přináší vyšší citlivost a také robustnost MS detekce. To je způsobeno vytvořením zaostřené zóny iontů, která vzniká zavedením proudu přehřátého plynu do prostoru okolo sprejovací kapiláry. Při tomto experimentu byly již rozdíly mezi porovnávanými iontovými zdroji zřetelné. ESI zdroj pracující v módu Jet Stream byl zatížen výraznějším potlačením ionizace. Zaostření iontů tedy přináší vyšší citlivost, ale na druhou stranu i vyšší náchylnost k ovlivnění ionizace interferencemi [120]. Naopak studie sledující vliv geometrie iontového zdroje na ionizaci akamprosátu v biologickém materiálu došla k odlišným výsledkům. V případě použití Z-spreje bylo pozorováno téměř úplné potlačení ionizace, zatímco ortogonální uspořádání nebylo matricovými efekty zatíženo prakticky vůbec [121]. Porovnání dvou různých ESI zdrojů od jednoho výrobce při analýze nesteroidních antiflogistik ve zvířecí svalové tkáni nepřineslo jednoznačné výsledky [122]. Porovnávání třech různých geometrií iontového zdroje od čtyř výrobců dospělo k závěru, že nejméně je ovlivněna ionizace při použití Z-spreje, více

je zatížena v případě ortogonálního uspořádání a nejvíce při použití uspořádání v ose. Zároveň bylo pozorováno, že dva různé iontové zdroje od jednoho výrobce byly zatíženy potlačením ionizace prakticky ve stejné míře. V této studii byly hodnoceny příspěvky ion-párových činidel na ionizaci sulfonovaných barviv [11]. Z důvodu rozporuplných závěrů nelze jednoznačně zhodnotit, jak velký vliv uspořádání iontového zdroje má a která poloha přívodu vzorku z LC systému (**Obr. 26**) je nejméně náchylná.



**Obr. 26: Geometrie iontového zdroje – poloha přívodu vzorku z LC systému vůči vstupnímu kuželi**  
(upraveno podle [123])

Geometrie iontového zdroje promlouvá do odstranění matricových efektů i nepřímo. Vzájemná poloha přívodu vzorku z chromatografického systému a vstupního kuželu předurčuje náchylnost iontového zdroje a iontové optiky ke kontaminaci, a tím tedy i ovlivnění podílu signálu a šumu. Geometrie iontového zdroje tedy ve výsledku ovlivňuje citlivost MS detekce. Čím nižší je limit kvantifikace, tím nižší koncentrace analytu lze stanovovat. Pro analýzu lze tedy použít vyšší zředění vzorku nebo nižší objem nástřiku. To již významně ovlivňuje možnost redukce a eliminace matricových efektů. Problematika ředění vzorku a jeho vliv na matricové efekty jsou diskutovány v kapitole 3.3.1.3.

#### 3.4.4 Kalibrační přístupy

V případě, kdy nelze matricové efekty odstranit výše zmíněnými postupy, je nutné použít vybrané kalibrační metody. Ty velmi často umožňují již vzniklé projevy tohoto fenoménu kompenzovat. Uplatnění nacházejí stabilní izotopicky značené vnitřní standardy (SIL-IS), sestavení kalibrační křivky v analyzované matici a také

metoda echo-píku. Většina dnešních LC-MS metod využívá SIL-IS standardy, a to nejen kvůli kompenzaci matricových efektů, ale i z důvodu zvýšení správnosti a přesnosti celé analýzy, jež zahrnuje i proces úpravy vzorku.

#### 3.4.4.1 Stabilní izotopicky značené vnitřní standardy

Nejpoužívanější metodou kalibračních přístupů pro kompenzaci matricových efektů při LC-MS analýze je použití SIL-IS standardů. Před uvedením LC-MS instrumentace nacházely vnitřní standardy uplatnění především z důvodu kompenzace nepřesností plynoucích z technických nedokonalostí nebo omezení použitých přístrojů (například nutnost dávkování velmi malých objemů v plynové chromatografii). V případě LC-MS jsou vnitřní standardy používány především z důvodu kompenzace chyb plynoucích z MS detekce. Za účelem dosažení co nejpřesnější kompenzace je nutné, aby měl analyt a vnitřní standard stejné ionizační vlastnosti a také aby byly tyto látky eluovány ve stejný čas chromatografické separace. Následně je tedy ionizace analyzované látky i jejího vnitřního standardu zatížena matricovými efekty ve stejné míře. Požadované vlastnosti nejlépe splňují právě stabilní izotopicky značené vnitřní standardy, které se liší od stanovovaných sloučenin pouze nahrazením vybraných atomů za jejich stabilní izotopy. Používají se atomy  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  a  $^{17}\text{O}$ . Nejběžněji se ve strukturách těchto standardů vyskytují izotopy vodíku a uhlíku [124]. Aby se při kvantifikaci předešlo interferencím mezi přirozeně se vyskytujícími izotopy stanovované látky a izotopicky značenými vnitřními standardy, doporučuje se, aby byl rozdíl mezi analytem a jeho izotopicky značeným vnitřním standardem minimálně 3 hmotnostní jednotky [125][126].

Panuje všeobecná představa, že přidavek SIL-IS standardů umožní kompenzaci jakýchkoliv projevů matricových efektů. Nicméně záměna  $^2\text{H}$  za  $^1\text{H}$  ve vazbě s uhlíkem ovlivňuje lipofilitu značené molekuly [127][128][129]. Čím více  $^2\text{H}$  atomů vnitřní standard obsahuje, tím jsou změny významnější. Výsledkem může být odlišný retenční čas stanovované látky a jejího izotopicky značeného vnitřního standardu, což vede k rozdílnému zatížení matricovými efekty analytu a SIL-IS a následně k nesprávné kompenzaci. Záměny atomů u ostatních izotopů nevyvolávají takto významné změny. Z tohoto důvodu se předpokládá, že SIL-IS značené pomocí  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  a  $^{17}\text{O}$  jsou vhodnější [130]. Dalším důležitým parametrem, který musí být brán v potaz, je koncentrace SIL-IS standardů. Bylo pozorováno, že analyzované látky a jejich vnitřní standardy si vzájemně potlačovaly ionizaci, což bylo závislé na koncentraci přidávaných SIL-IS standardů [131]. V naší studii přidavek SIL-IS standardů při stanovení všech terapeuticky užívaných statinů a jejich metabolitů

v plazmě snížil příspěvky matricových efektů, ale nezpůsobil jejich úplné odstranění [132].

Zásadním nedostatkem izotopicky značených vnitřních standardů je jejich vysoká cena a také nedostupnost pro všechny potřebné analyty. Při analýze většího počtu látek navíc dochází ke snížení citlivosti LC-MS metody, a to z důvodu potřeby nastavit adekvátní počet SRM přechodů pro detekci všech analyzovaných látek.

#### 3.4.4.2 Kalibrační křivka sestrojena v analyzované matici

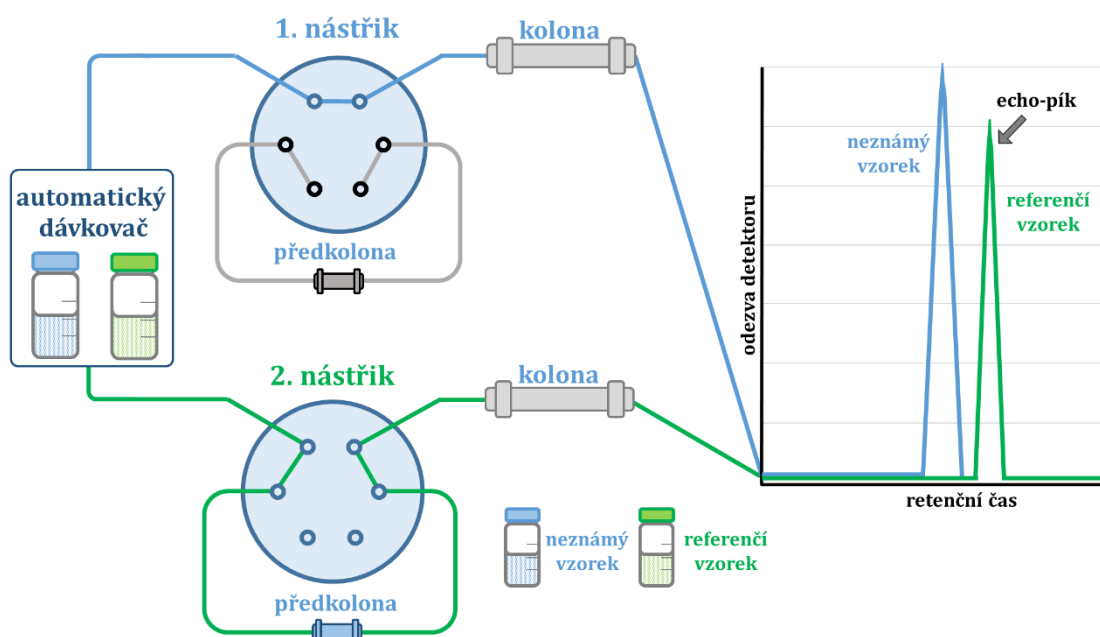
V případě, kdy je matrice analyzovaného vzorku totožná s matricí použitou pro přípravu kalibrační křivky, může být dosaženo plné kompenzace matricových efektů pouhým odečtením koncentrace z této kalibrační křivky. V tomto případě je ionizace analyzované látky i jejího standardu zatížena stejnými efekty. Nejdůležitější krokem této metody je tedy správný výběr matrice [3][17]. Tento požadavek ale naráží na jedinečnost každého vzorku [133]. Aby mohla být zaručena co nejpřesnější kompenzace matricových efektů, bylo by nutné sestrojít kalibrační křivku ke každému analyzovanému vzorku jednotlivě. To by ale mnohonásobně zvýšilo časové i finanční nároky celé analýzy, nemluvě o dostupnosti dostatečného množství matrice. Tento postup zajistil snížení příspěvků matricových efektů při analýze osmi fytoestrogenů ve vzorcích odpadních vod. Po přidání jednoho izotopicky značeného vnitřního standardu byly projevy matricových efektů prakticky zcela kompenzovány [134].

#### 3.4.4.3 Metoda echo-píku

Postup kompenzace matricových efektů prostřednictvím metody echo-píku předpokládá, že látky eluující v těsné blízkosti jsou zatíženy stejnými projevy matricových efektů. Metoda echo-píku nahrazující použití vnitřního standardu zahrnuje nástřiky dvou vzorků v krátkém časovém intervalu a vyžaduje, aby byl analyt od svého standardu kompletně odseparován, a to při co možná nejmenším rozdílu v retenčních časech [3]. Díky nízké eluční síle mobilní fáze použité při prvním nástřiku jsou analyty dostatečně zadrženy stacionární fází. Následně je nastříknut druhý vzorek, a to po přepnutí ventilu, který změni směr toku do předkolony (**Obr. 27**). Ta je naplněna stejnou stacionární fází jako hlavní kolona. Při tom je již spuštěno klasické nastavení chromatografické separace zahrnující vyšší eluční sílu mobilní fáze. Výsledkem je eluce analytu standardu a hodnoceného vzorku v těsné blízkosti [135][136]. Jelikož se projevy matricových efektů liší v různých částech chromatografické separace, je eluce analytu a standardu pouze v těsné blízkosti velmi často nedostatečná k účinné kompenzaci, a proto není



metoda echo-píku v současnosti rutinně používána pro odstraňování matricových efektů. Dalším záporem tohoto přístupu je časová náročnost vývoje metody při analýze většího počtu látek.



Obr. 27: Metoda echo-píku – schéma zapojení  
(upraveno podle [135])

## 4. Komentáře k publikovaným pracím

### 4.1 Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro stanovení osmi katechinů ve vzorcích čaje a vliv matricových efektů

Cílem této studie bylo vyvinout robustní, rychlou a citlivou UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení vybraných katechinů ve vzorcích zelených, bílých a černých čajů, a to s omezenými nebo zcela potlačenými příspěvky matricových efektů. Jejich projevy měly být odstraněny jednoduchým a rychlým krokem úpravy vzorku v podobě filtrace a následného ředění vytvořeného čajového nálevu. Z toho vyplývala potřeba vysoké citlivosti použité UHPLC-MS/MS metody. Té bylo dosaženo podrobnou optimalizací vybraných parametrů iontového zdroje, iontové optiky a hmotnostního analyzátoru hmotnostního spektrometru a také výběrem složení ředící směsi. Studie navíc zahrnovala hledání vhodných podmínek pro extrakci katechinů ze sušených lístků zeleného, bílého i černého čaje zajišťující nejvyšší výtěžnost. Pro tento účel byla použita voda namísto organických rozpouštědel z důvodu nastolení podmínek, které se přibližují běžné konzumaci čaje.

Katechiny patří do skupiny derivátů flavan-3-olu a jsou známé především pro svou antioxidační aktivitu. U těchto látek byly pozorovány i účinky protizánětlivé, antivirové, antimikrobiální nebo protinádorové [137][138]. Vysoký obsah katechinů se nachází v listech čajovníku čínského. Posklizňové zpracování čajových lístků předurčuje nejen typ čaje, ale také obsah katechinů i dalších fenolických látek. Při posklizňovém zpracování hraje nejdůležitější roli proces fermentace, jenž převádí monomerní katechiny na dimerní, oligomerní a polymerní theaflaviny a thearubiginy [139]. Katechiny tedy převažují v nefermentovaném zeleném čaji, zatímco v čaji černém je obsah katechinů nejnižší [140]. Katechiny jsou náchylné k degradaci, oxidaci, epimerizaci a polymerizaci. Za tyto chemické změny je zodpovědná především teplota, vlhkost, pH prostředí a přítomnost kyslíku a těžkých kovů [141]. Aby byla degradace katechinů během analýzy omezena, bylo nutné vyvinout rychlou chromatografickou separaci a zároveň i rychlou metodu úpravy vzorku předcházející vlastní UHPLC-MS/MS analýze.

Cílem chromatografické separace bylo v krátkém čase od sebe oddělit epimerní páry katechinů, a to z důvodu totožné molekulové hmotnosti jak prekurzorových, tak i produktových iontů. Jednalo se o katechin (C) a epikatechin (EC), galokatechin (GC) a epigalokatechin (EGC), galokatechin galát (GCG) a epigalokatechin galát (EGCG), katechin galát (CG) a epikatechin galát (ECG). Separace byla úspěšně provedena za použití hybridní stacionární fáze CSH C18 (100 mm x 2,1 mm; 1,7 μm)

a gradientové eluce, která zahrnovala 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě (složka A) a v metanolu (složka B). Celková doba analýzy byla 4 minuty, a to včetně ekvilibrace UHPLC systému. Kapalinový chromatograf byl spojen hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu, který využíval ionizaci elektrosprejem, a to v negativním ionizačním módu.

Při hledání podmínek zajišťujících nejvyšší extrakční výtěžnost katechinů při použití vody byla brána v potaz její teplota, objem a čas přípravy čajových nálevů. Nálev zeleného, bílého a černého čaje byl připravován podle stejného postupu, jedinou výjimkou byla teplota. 100 ml vody o teplotě 90 °C bylo použito pro přípravu nálevu z 1 gramu sušených lístků zeleného a bílého čaje. V případě přípravy nálevu černého čaje byla teplota vody 100 °C. Vzorky všech tří čajů byly louhovány po dobu 20 minut. Pro následné zpracování čajových nálevů bylo použito ředění, jemuž předcházela filtrace pomocí hydrofilního polytetrafluoroethylenového membránové filtru s velikostí pórů 0,22 µm. Zastoupení jednotlivých katechinů v čaji se významně liší, a proto bylo potřeba čajový nálev ředit minimálně dvěma způsoby z důvodu dosažení lineárního rozmezí UHPLC-MS/MS metody. Aby bylo možné uplatnit co možná nejvyšší zředění vzorků čajového nálevu, bylo nutné dosáhnout co možná nejvyšší citlivosti MS detektoru. Pro stanovení C, GC, CG a GCG byl nálev zeleného a bílého čaje ředěn padesátkrát. Obsah epiforem výše zmíněných katechinů je vyšší, a proto byly nálevy zeleného a bílého čaje ředěny pro kvantifikaci EC, EGC, ECG a EGCG pětsetkrát. Množství katechinů v černém čaji je podstatně nižší, z tohoto důvodu byl vytvořený nálev ředěn dvěstěkrát pro stanovení EGCG a ECG a pro stanovení ostatních katechinů (C, CG, GCG, GC, EC a EGC) bylo použito pouze desetinásobné zředění.

Po ověření opakovatelnosti retenčních časů a ploch píků na třech koncentračních hladinách byla UHPLC-MS/MS metoda validována, a to z hlediska správnosti a přesnosti, linearitu, limitu detekce, limitu kvantifikace, rozsahu metody a matricových efektů. Metoda byla validována v matrici čaje zeleného, bílého a černého. Matricové efekty byly hodnoceny porovnáním směrnice kalibračních křivek sestavených v rozpouštěcí směsi a v čajových nálevech, jež byly zředěny a zfiltrány. V případě neochuceného zeleného, bílého a černého čaje a ochuceného zeleného a bílého byly příspěvky matricových efektů nižší než 15 % (**Tab. 1**). Ochucený černý čaj byl ovlivněn příspěvky matricových efektů mnohem více. Tento fakt byl způsoben nižším ředěním, které muselo být použito pro úpravu těchto vzorků z důvodu výrazně nižšího obsahu stanovovaných látek. Klíčovou roli ředění potvrzuje experiment sledující matricové efekty v nálevu ochuceného černého čaje.

Porovnávány byly vzorky zředěné desetkrát a dvěstěkrát. Vyšší zředění vzorku snížilo projevy matricových efektů, a to z hodnot vyšších než 35 % pod 8 %.

**Tab. 1: Matricové efekty v nálevech neochucených a ochucených čajů**

Analyt	Matricové efekty [%]					
	Zelený čaj bez ochucovadel	Zelený čaj s ochucovadly	Bílý čaj bez ochucovadel	Bílý čaj s ochucovadly	Černý čaj bez ochucovadel	Černý čaj s ochucovadly
<b>GC</b>	+4.51	+7.32	-14.72	+11.21	-4.40	+9.44
<b>EGC</b>	-0.42	+2.51	-2.15	+8.05	+7.38	+43.72
<b>C</b>	+4.53	-1.41	+3.52	+5.05	+1.90	+12.40
<b>EC</b>	+4.64	-1.80	+1.35	+7.46	-10.03	+34.84
<b>EGCG</b>	+8.45	+4.90	+6.71	+10.50	+0.83	+10.68
<b>GCG</b>	+13.49	+10.39	+8.19	+12.74	+14.49	+45.75
<b>ECG</b>	-0.16	-2.17	-2.32	-0.83	-2.01	+2.76
<b>CG</b>	+8.97	-5.34	+4.36	+1.83	+4.30	+13.27

Validovaná UHPLC-MS/MS metoda byla použita pro stanovení osmi katechinů v celkově 70 čajových vzorcích. Jednalo se o 28 vzorků zeleného, 22 bílého a 20 černého čaje. Hodnoceny byly jak čaje ochucené a neochucené, tak i čaje sypané a sáčkové. Všechny sledované katechinů se při stanovení nacházelo v lineárním rozsahu použité UHPLC-MS/MS metody. Nejvyšší obsah katechinů byl nalezen v bílém neochuceném čaji Snow Buds a nejnižší v černém čaji Earl Grey. Průměrný obsah katechinů v zelených čajích dosáhl hodnoty 76,7 mg v 1 gramu sušených čajových lístků, v bílém čaji 66,1 mg a v čaji černém 22,7 mg.

Tato práce prezentuje rychlou a spolehlivou UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení osmi katechinů v černých, bílých a zelených čajích. Experimenty hodnotící přítomnost matricových efektů poukazují na možnost uplatnění rychlého a snadného postupu pro jejich zmírnění a odstranění. Výsledky stanovení katechinů v čajích potvrzují vliv posklizňového zpracování na obsah katechinů a shodují se s všeobecnými předpoklady. Cena, značka a forma hodnocených čajových vzorků neměly velký vliv na celkový obsah katechinů.

#### 4.2 Syntéza molekulárně vtištěných polymerů pro selektivní SPE extrakci $\beta$ -*N*-metylamino-L-alaninu

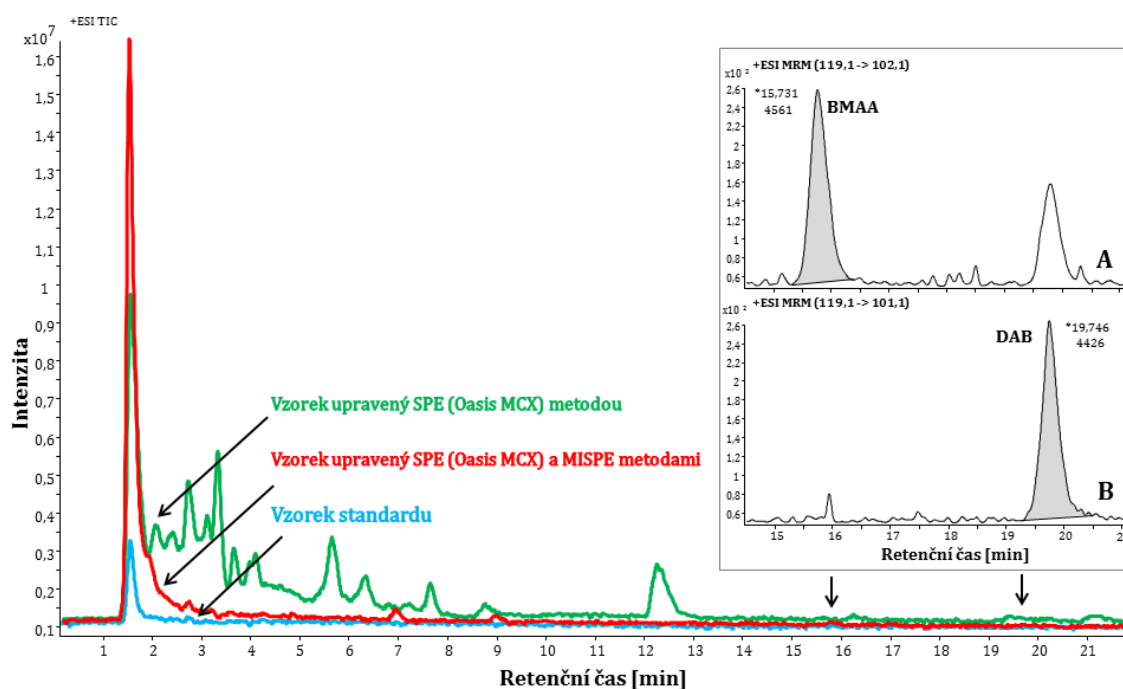
Tato studie byla vypracována na zahraničním pracovišti ESPCI ParisTech a byla součástí francouzského projektu, jenž se zabýval výskytem neurotoxické aminokyseliny  $\beta$ -*N*-metylamino-L-alaninu (BMAA) v životním prostředí. Cílem této práce bylo připravit SPE sorbent pro selektivní extrakci BMAA ze sinicových vzorků a odstranit matricové efekty zatěžující HPLC-MS/MS metodu, které předcházela úprava vzorku využívající mixed-mode SPE sorbent (Oasis-MCX). BMAA a dostupné předlohové struktury použitelné pro přípravu odpovídajícího SPE sorbentu jsou malé, polární a hydrofilní molekuly a tyto fyzikálně-chemické vlastnosti činí syntézu MIP materiálu velmi obtížnou.

BMAA je neurotoxická aminokyselina, která byla poprvé izolována ze semen rostliny *Cycas circinalis* [142]. Produkci této aminokyseliny zajišťují sinice rodu *nostoc*, které žijí v symbióze s korálovitými kořeny rostlin z čeledi cykasovitých (*Cycadaceae*). BMAA je vytvářena i dalšími druhy symbiotických i volně žijících sinic [143]. Předpokládá se, že tato aminokyselina je zodpovědná za neurodegenerativní onemocnění domorodého obyvatelstva tichomořského ostrova Guam [144][145]. Přestože je BMAA polární sloučeninou, některé studie navrhují její kumulaci v životním prostředí a v potravním řetězci, a to prostřednictvím vazby na proteiny [146]. Tradiční potrava obyvatelů ostrova Guam obsahuje zdroje BMAA ve formě semen cykasů a také v podobě kaloně mariánského (*Pteropus mariannus*), který se živí právě obalem těchto semen [147]. BMAA je zdravotní hrozbou i mimo tichomořský ostrov Guam, protože sinice produkující BMAA se vyskytují po celém světě. Neurotoxin BMAA byl navíc nalezen v nervové tkáni severoamerických pacientů trpících neurodegenerativními chorobami [148][149].

Kvantifikace této neurotoxické aminokyseliny v sinicích přináší rozporuplné výsledky. Některé studie našly relativně vysoké koncentrace [143][150][151][152], zatímco jiné nedetekovaly BMAA v sinicích vůbec [153][154]. Proto byl v naší studii vedle BMAA podroben analýze i jeho hepatotoxický izomer. Jednalo se o 2,4-diaminobutanovou kyselinu (DAB), která doprovází BMAA ve vzorcích sinic. V některých studiích byla právě molekula DAB pravděpodobně zaměněna za molekulu BMAA. Separace těchto polárních látek bylo dosaženo za použití hydrofilní interakční kapalinové chromatografie a stacionární fáze ZIC-HILIC. Chromatografický systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu, jenž využíval ESI<sup>+</sup> ionizaci.

Z důvodu nízké rozpustnosti předlohových molekul v rozpouštědlech běžně používaných pro syntézu MIP materiálu bylo nutné použít alternativní způsob v podobě sol-gel techniky. Tvorbu komplexu s předlohovou molekulou obstaral funkční monomer 3-aminopropyltriethoxysilan a zachycení tohoto komplexu v prostoru síťovací činidlo tetraethyl orthosilikát. Při hledání nejvýhodnějších podmínek pro syntézu SPE sorbentu byly zkoušeny různé předlohové molekuly ze skupiny aminokyselin. Nejvyšší selektivity retence BMAA molekuly bylo dosaženo při použití *N*-methyl- $\beta$ -alaninu. Syntéza proběhla v prostředí směsi ethanolu a vody v poměru 70:30 a byla započata přidavkem 0,01M kyseliny chlorovodíkové. Po syntéze trvajícím 24 hodin při teplotě 40 °C byl vzniklý sol-gel materiál umístěn do sušárny o teplotě 120 °C, a to po dobu 18 hodin z důvodu odstranění použitých rozpouštědel a vedlejších produktů syntézy. Tímto způsobem vysušený materiál byl přeset přes síta s velikostí ok 25 a 36  $\mu\text{m}$ . Získané částice byly následně podrobeny sedimentaci ve směsi methanolu a vody (80:20), a to z důvodu odstranění nejmenších částic, které vytvořily aglomeráty a nemohly tedy projít použitými síty. Po vysušení byly MIS (molekulárně vtištěné polymery připravené sol-gel metodou) částice umístěny do kolonky mezi dvě frity. Podle stejné procedury byl připraven NIS (nevtištěný polymer připravený sol-gel metodou) materiál, jedinou výjimkou byla nepřítomnost předlohové molekuly v reakční směsi. Z tohoto důvodu NIS neobsahuje ve své struktuře kavitu a při extrakci se uplatňují pouze nespecifické interakce. Tento kontrolní materiál byl použit pro hodnocení selektivity extrakce a potvrzení přítomnosti selektivně rozpoznávacích míst.

Výsledný sorbent byl kompletně charakterizován, a to hodnocením opakovatelnosti extrakční procedury, reprodukovatelnosti syntézy, kapacity, schopnosti dostatečně přečistit sinicové extrakty a také určením selektivity retence. Reprodukovatelnost syntézy byla hodnocena provedením dvou extrakčních procedur na každém z pěti MIS sorbentů, které byly připraveny podle stejného postupu v průběhu dvou měsíců. Výsledné hodnoty RSD (extrakční výtěžnost;  $n=10$ ) pro BMAA i DAB byly nižší než 10 %. Výsledná kapacita sorbentu pro BMAA, jež dosáhla hodnoty 1  $\mu\text{g}$  (25 mg), je dostatečná pro analýzu sledovaného neurotoxinu v běžných sinicových vzorcích. Schopnost sorbentu odstranit nečistoty a interferující látky obsažené ve vzorku byla hodnocena porovnáním MS-sken chromatogramů roztoků standardů rozpuštěných v ředící směsi a eluční frakci MISPE procedury. MIS materiál se vyznačoval vysokou účinností přečištění sinicových extraktů, protože získané MS-sken chromatogramy se téměř překrývaly (**Obr. 28**).



**Obr. 28: Porovnání MS-sken chromatogramů vzorku standardu a sinicových extraktů upravených a neupravených MISPE metodou**

Nejprůkaznějším hodnocením dokonalého odstranění nečistot, které mají vliv na LC-MS analýzu stanovovaných látek, je nepřítomnost matricových efektů. Příspěvky matricových efektů byly hodnoceny porovnáním směrnice kalibračních křivek sestavených v rozpouštěcí směsi a v eluční frakci získané prostřednictvím MISPE procedury. Směrnice vytvořených kalibračních křivek byly prakticky totožné, což vypovídá o účinném přečištění vzorku a nepřítomnosti matricových efektů.

Tato práce tedy potvrzuje proveditelnost syntézy MIP/MIS materiálu pro selektivní retenci i velmi malé a polární molekuly, kterou byla v našich experimentech neurotoxická aminokyselina  $\beta$ -*N*-methylamino-L-alanin. Pro polární molekuly, u kterých nelze z důvodu fyzikálně chemických vlastností použít akrylátové monomery a síťovací činidla, byla nalezena vhodná alternativa ve formě sol-gel techniky. Výsledná metoda zahrnující úpravu vzorku pomocí MISPE procedury a HPLC-MS/MS analýzu představuje spolehlivý postup pro kvantifikaci tohoto neurotoxinu v sinicových vzorcích.

#### 4.3 Vývoj MEPS-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení statinů

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení všech terapeuticky používaných statinů (atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin a simvastatin), jejich interkonverzních produktů a vybraných metabolitů (*p*-hydroxy atorvastatin, *o*-hydroxy atorvastatin a *N*-desmethyl rosuvastatin). Optimalizovaná chromatografická separace byla uplatněna ve spojení se třemi různými hmotnostními spektrometry, které shodně využívaly ionizaci elektrosprejem a hmotnostní analyzátor typu trojitého kvadrupólu. Vybrané parametry finálních UHPLC-MS/MS metod byly následně porovnávány. Jednalo se o citlivost, selektivitu, validační parametry a vzhled MS spekter. Hodnoceny byly tyto přístroje Quattro micro API (přístroj I), Xevo TQD (přístroj II) a Xevo TQ-S (přístroj III), jež se vzájemně lišily konstrukcí iontového zdroje a transportní optiky, technologií kolizní cely a také rychlostí skenování.

Statiny patří do skupiny inhibitorů 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy, jež představuje klíčový enzym biosyntézy cholesterolu [155]. Kromě snižování hladiny cholesterolu v krvi byly u statinů pozorovány i účinky extralipidové. Jedná se o zlepšení obnovy endoteliální funkce, zvýšení stability aterosklerotického plátu, snižování oxidativního stresu, protizánětlivé účinky, imunomodulační účinky, ovlivnění kostní tvorby a inhibice růstu nádorových buněk [156][157]. Statiny se vyskytují ve dvou strukturálních formách, a to v podobě laktonu (proléčivo) a kyseliny (aktivní forma). K interkonverzi mezi oběma formami dochází jak *in vivo*, tak *in vitro* podmínkách [158]. Z tohoto důvodu je nutné stanovovat obě formy každého statinu v průběhu téže analýzy. Procesu interkonverze lze zabránit udržováním pH mezi hodnotami 4 a 5.

Výběr stacionární a mobilní fáze byl proveden prostřednictvím systematického vývoje metody, který zahrnoval čtyři různé stacionární fáze BEH C18, BEH Shield RP 18, BEH Phenyl a HSS T3. Vodnou složku mobilní fáze o pH 3 a pH 9 doplnila organická rozpouštědla methanol a acetonitril. Nejvyšší separační účinnosti bylo dosaženo při použití stacionární fáze BEH C18, a to když mobilní fáze obsahovala acetonitril a vodnou složku o pH 9. Z důvodu nestability hodnocených analytů v bazických podmínkách bylo nutné změnit pH a složení vodné složky, ta nakonec obsahovala 0,5 mM octan amonný, pH 4. Tyto podmínky byly nastaveny na každém UHPLC-MS/MS systému. Odlišnosti v chromatografické separaci spočívaly v rychlosti průtoku mobilní fáze, a tedy i v nastavení gradientu. Přístroj I, nejstarší z testovaných trojitých kvadrupólů, je limitován skenovací rychlostí a citlivostí, a proto byl průtok nastaven na 0,3 ml/min. Vyšší skenovací rychlost a vylepšená konstrukce iontových zdrojů u novějších přístrojů II a III umožnily zvýšit průtok na



0,5 ml/min. Parametry iontových zdrojů i hmotnostních analyzátorů byly optimalizovány pro každý analyt i přístroj jednotlivě. Při tomto kroku bylo zjištěno, že přístroj III je náchylnější k tvorbě aduktů se sodíkem. Tento jev nelze jednoduše objasnit. Důležitou roli hraje pravděpodobně konstrukce transportní optiky, která je v případě přístroje III představována novou technologií StepWave. Tato součást transportní optiky zvyšuje citlivost MS detekce a také zabraňuje vstupu neutrálních látek, a tím předchází kontaminaci přístroje.

Úprava vzorku před vlastní UHPLC-MS/MS analýzou kombinovala proteinovou precipitaci a mikroextrakci plněným tuhým sorbentem (MEPS). Precipitace proteinů obsažených v matrici séra byla provedena přidáním acetonitrilu ke vzorku, a to v poměru 2:1 (acetonitril:vzorek). Následně musel být vzorek zředěn puřem, protože vysoký podíl organického rozpouštědla by znemožnil retenci statinů během nanášení vzorku. Výhoda mikroextrakčních technik spočívá především v nízkých požadavcích na množství vzorku a také v nižší spotřebě organických rozpouštědel. Dostatečná extrakční výtěžnost byla zajištěna pro všechny stanovované látky při použití sorbentu C8.

Všechny tři UHPLC-MS/MS metody byly kompletně validovány, a to z hlediska správnosti, přesnosti, linearity, matricových efektů, limitu detekce a limitu kvantifikace. UHPLC-MS/MS metoda přístroje I neposkytla dostatečnou citlivost, a proto nemůže být použita pro analýzu statinů v reálných vzorcích. Nejvyšší citlivostí se pro většinu analytů vyznačoval přístroj III. Výsledné metody využívající přístroje III i II lze použít pro analýzu reálných vzorků. Přítomnost matricových efektů byla hodnocena u všech tří testovaných hmotnostních spektrometrů, a to po úpravě vzorku pomocí proteinové precipitace a MEPS procedury. Naměřená data byla následně korigována prostřednictvím stabilních izotopicky značených vnitřních standardů (SIL-IS). I přes tuto kombinaci postupů nebyly matricové efekty odstraněny u všech analyzovaných látek.

Matricové efekty zatěžující UHPLC-MS/MS metodu přístroje III byly také hodnoceny bez přídatku SIL-IS standardů (**Tab. 2**). Získané výsledky poukazují na to, že látky eluované ve druhé polovině separace jsou zatíženy matricovými efekty výrazně více. Z toho vyplývá, že za ovlivnění ionizace stanovovaných statinů pravděpodobně zodpovídají lipofilní komponenty lidského séra. Tyto látky mohou být odstraněny během úpravy vzorku při zvýšení lipofility promývací směsi MEPS procedury. Nicméně vyšší procentuální zastoupení acetonitrilu v promývací směsi by způsobilo nižší extrakční výtěžnost pro polární analyty.

Tab. 2: Matricové efekty zatěžující přístroje I, II a III kompenzované pomocí stabilních izotopicky značených vnitřních standardů a bez kompenzace (Přístroj III)

		Matricové efekty [%]																
		ND RV	PV	PVL	<i>p</i> -OH AT	RV	PTV	RVL	<i>o</i> -OH AT	FV	AT	LVK	PTVL	ATL	SVK	FVL	LV	SV
Přístroj I	1000	-1.2	+1.0	+4.3	-3.1	-2.0	+1.5	-4.1	-0.7	+4.3	-5.6	+5.8	-1.7	-6.2	-1.4	-33.1	+11.2	+1.2
	100	0.0	+0.4	+5.0	-4.1	-0.1	+1.1	+13.1	-2.7	-1.5	+0.5	+10.8	+2.1	-1.1	+4.9	-18.4	+19.7	+1.8
	10	+5.3	+5.2	+46.8	-7.2	+4.4	+3.1	+31.6	-3.7	+8.6	-8.7	+6.1	+19.3	+25.0	+2.5	+1.4	+38.9	+3.7
Přístroj II	500	+3.9	-9.9	-0.1	-1.2	-1.4	+26.3	-3.5	+0.5	+3.8	0.0	-3.8	-13.0	+7.1	-4.7	-20.8	+20.7	-0.4
	50	+12.5	-3.5	+40.7	-7.5	-11.2	+32.6	-3.6	+25.7	+3.6	-2.8	-3.5	-16.9	+22.9	-3.7	-14.7	+14.2	-2.9
	5	+2.8	+0.8	+6.9	+1.9	-7.3	+0.3	-3.2	+0.1	-	+3.0	-5.6	-15.8	+34.1	+1.5	-2.8	-4.3	+7.5
	LOQ	-	-	-18.7	-	+3.0	-6.3	+13.7	+5.6	-	-14.2	-	+11.6	+14.5	-	-	-	-
Přístroj III	100	-2.7	-3.0	+4.2	-28.5	+4.7	-0.4	+5.1	+12.1	+8.1	+10.2	+14.4	-5.8	+13.7	-5.0	+11.7	+23.4	-5.0
	10	+2.5	+3.8	-2.1	-45.1	-0.2	-1.3	+3.4	-1.4	-56.2	-1.7	+11.8	-14.2	+3.4	-12.2	-0.3	+4.0	-20.0
	1	+11.2	+8.4	-3.4	-40.1	+1.5	+2.2	+5.0	-13.0	-	+7.6	-	-	+17.1	-	+17.9	+2.0	+14.8
	LOQ	-3.3	+12.2	+6.2	-	+16.1	+10.6	+5.2	-	-	-	-	-11.6	-	-	-	-	-
Přístroj III bez SIL-IS	100	-7.7	-6.0	+3.8	-30.0	+2.4	-6.0	+3.1	-32.7	-34.4	-33.3	-17.2	-12.1	-8.8	-67.8	-21.0	-5.5	-32.5
	10	+1.4	+4.9	+6.2	-41.2	+6.4	-6.2	+4.9	-37.1	-75.3	-37.8	-11.4	-13.4	-19.9	-86.1	-29.2	-18.6	-52.8
	1	+9.1	+12.3	+1.2	-37.5	+6.4	-2.9	+4.2	-40.7	-	-21.0	-	-	-10.5	-	-27.4	-28.1	-53.0
	LOQ	-13.0	+2.0	+9.0	-	+8.0	-10.0	-3.0	-	-	-	-	-21.6	-	-	-	-	-

AT: atorvastatin; ATL: atorvastatin lakton; FV: fluvastatin; FVL: fluvastatin lakton; LV: lovastatin; LVK: lovastatin kyselina; ND RV: *N*-desmethyl rosuvastatin; *o*-OH AT: *o*-hydroxy atorvastatin; *p*-OH AT: *p*-hydroxy atorvastatin; PTV: pitavastatin; PTVL: pitavastatin lakton; PV: pravastatin; PVL: pravastatin lakton; RV: rosuvastatin; RVL: rosuvastatin lakton; SV: simvastatin; SVK: simvastatin kyselina.

#### 4.4 Vývoj UHPSFC-MS metody pro stanovení derivátů tokoferolů a tokotrienolů v lidském séru

Cílem této studie bylo vyvinout rychlou, selektivní a citlivou metodu pro stanovení všech forem vitamínu E v lidském séru, a to za využití spojení ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie (UHPSFC-MS). Současně byly představeny dvě UHPSFC-MS metody. První se vyznačovala vysokým rozlišením a vyšší citlivostí. Předností té druhé byla krátká doba analýzy, což je výhodné pro rychlý screening většího počtu vzorků. V průběhu vývoje metody byl sledován vliv vybraných parametrů, a to jak na selektivitu a účinnost chromatografické separace, tak i na citlivost MS detekce. Byl tedy hodnocen vliv stacionární fáze, mobilní fáze, modifikátorů, aditiv a pomocné kapaliny pro spojení SFC a MS. Hodnocen byl také význam tlaku zpětného regulátoru tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty kolony.

Vitamín E patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích a vyznačuje se důležitou biologickou aktivitou, jež je esenciální pro lidské zdraví. Tento vitamín je řazen mezi nejúčinnější antioxidační látky a jsou mu také přisuzovány kardioprotektivní, neuroprotektivní a imunomodulační účinky [159]. Vitamín E se vyskytuje v osmi různých formách:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferol a  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokotrienol. Všechny formy vitamínu E mají společnou strukturu založenou na 2-methyl-6-chromanolovém kruhu. Ten je v případě tokoferolů napojen na nasycený uhlíkatý řetězec ( $C_{16}$ ), v případě tokotrienolů je tento uhlíkatý řetězec nenasyčený [160]. Vysoký obsah vitamínu E se nachází v rostlinných olejích, ořechách, listové zelenině a celozrnných produktech [161]. Nízké plazmatické hladiny vitamínu E poukazují na malabsorbční syndrom zahrnující biliární atrézii, cystickou fibrózu a abetalipoproteinémii [162]. Nedostatek vitamínu E se projevuje periferní neuropatií, jež je způsobena odumíráním senzoričkových axonů, které jsou postiženy oxidativním stresem. Na rozdíl od ostatních v tucích rozpustných vitamínů tento není akumulován v játrech a ostatních tkáních při zvýšených dávkách. Jediným projevem pozorovaným při předávkování je sklon ke krvácení [163][164].

Všechny stanovované látky si jsou strukturálně velmi podobné.  $\beta$ -tokoferol ( $\beta$ -T) a  $\gamma$ -tokoferol ( $\gamma$ -T) se od sebe odlišují pouze polohou methyl-substituentů, stejně tak jako  $\beta$ -tokotrienol ( $\beta$ -T<sub>3</sub>) a  $\gamma$ -tokotrienol ( $\gamma$ -T<sub>3</sub>). Vzájemné odseparování těchto strukturálních izomerů představovalo kritický bod vývoje chromatografické metody. Během hledání optimálních podmínek byly testovány čtyři různé stacionární fáze, a to BEH, BEH 2-EP (ethylpyridin), CSH PFP (fluorophenyl) a HSS C18. Všechny analyzované látky se vyznačují vysokou lipofilitou, a proto iniciální

složení mobilní fáze zahrnovalo vysoký podíl CO<sub>2</sub> (97 %) a nízký přídavek modifikátoru v podobě methanolu (3 %). Z důvodu nízké retence všech analytů a koeluce kritických izomerních párů ( $\beta$ -T a  $\gamma$ -T,  $\beta$ -T<sub>3</sub> a  $\gamma$ -T<sub>3</sub>) nebylo možné použít stacionární fáze typu CSH PFP, HSS C18 a BEH. Nejvyšší selektivity a rozlišení bylo dosaženo při použití BEH 2-EP, a proto byla tato stacionární fáze vybrána pro další optimalizaci metody. Oba kritické izomerní páry byly rozděleny, nicméně byla pozorována koeluce  $\beta$ -tokotrienolu a  $\delta$ -tokoferolu. Vývoj chromatografické metody byl proveden za použití PDA-detekce, jež ale byla při hodnocení citlivosti (LOQ = 40  $\mu$ g/ml) shledána jako nedostatečná pro analýzu reálných vzorků. Z tohoto důvodu byl pro detekci použit hmotnostní spektrometr typu jednoduchého kvadrupólu.

Po výběru stacionární fáze bylo hledáno optimální složení mobilní fáze, jež hraje stejně důležitou roli jako v případě kapalinové chromatografie. Ovlivňuje tedy tvar píků, retenční čas, selektivitu a citlivost MS detekce. Nejprve byl sledován vliv modifikátoru, a to methanolu a ethanolu. Následně byl také hodnocen význam aditiva, které bylo představováno vodou, mravenčanem a octanem amonným o koncentracích 1 mM, 5 mM, 10 mM a 20 mM. Finální složení mobilní fáze zahrnovalo CO<sub>2</sub>, methanol a 10 mM mravenčan amonný. Dále byla hledána nejvhodnější pomocná kapalina, jež se používá pro usnadnění spojení SFC-MS a zlepšení ionizace. Testovány byly methanol, ethanol, isopropylalkohol, voda (2 a 5%) a vybraná těkavá aditiva (10 mM mravenčan amonný, 0,1% kyselina mravenčí a 0,1% hydroxid amonný). Nejvyšší citlivosti MS detekce bylo dosaženo při použití metanolu s přídavkem vody (5 %). Chromatografická separace je dále ovlivněna teplotou kolony a tlakem, jenž určuje hustotu mobilní fáze. Výsledné podmínky UHPSFC metody o vysokém rozlišení zahrnovaly mobilní fázi skládající se z 98 % CO<sub>2</sub> a 2 % methanolu s přídavkem 10 mM mravenčanu amonného, průtokovou rychlost 1,5 ml/min, teplotu kolony 40 °C, BPR tlak 23,4 MPa a celkovou dobu analýzy 4,5 minuty. V případě rychlé metody byla mobilní fáze složena z CO<sub>2</sub> a methanolu s přídavkem 10 mM mravenčanu amonného v poměru 95:5 a průtoková rychlost byla 1,5 ml/min, teplota kolony 50 °C, BPR tlak 13,0 MPa a celková doba analýzy 2,5 minuty.

Úprava vzorku před vlastní analýzou byla provedena prostřednictvím extrakce z kapaliny do kapaliny, které předcházela proteinová precipitace. Pro precipitaci byly zkoušeny acetonitril, methanol, ethanol a isopropylalkohol, a to o objemu 100 a 200  $\mu$ l. Hexan, hexan:dichloromethan (90:10) a hexan:dichloromethan (80:20) o objemu 200 a 400  $\mu$ l byly testovány pro následnou extrakci. Nejvyšší výtěžnosti bylo

dosaženo, když k 100  $\mu\text{l}$  séra bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  ethanolu jako precipitačního činidla a pro extrakci bylo použito 400  $\mu\text{l}$  směsi hexan:dichloromethan (80:20).

Validace obou metod zahrnovala hodnocení správnosti, přesnosti, linearity, pracovního rozsahu, limitu detekce, limitu kvantifikace a matricových efektů. Lidské sérum představuje velmi komplexní matici, jejíž komponenty často negativně promlouvají do ionizace při LC-MS analýze. Navzdory použití méně selektivní metody úpravy vzorku v podobě extrakce z kapaliny do kapaliny se obě metody vyznačovaly relativně nízkými projevy matricových efektů (**Tab. 3**), a to i přes odlišnou selektivitu separace.

**Tab. 3: Hodnocení matricových efektů tokoferolů (T) a tokotrienolů (T<sub>3</sub>) ve vzorcích lidského séra**

		$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	$\delta$ -T	$\alpha$ -T <sub>3</sub>	$\beta$ -T <sub>3</sub>	$\gamma$ -T <sub>3</sub>	$\delta$ -T <sub>3</sub>
<b>UHPSFC</b>	<b>1.0 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	137.0	83.7	129.0	121.6	129.9	125.6	89.8	142.9
<b>vyšší rozlišení</b>	<b>7.5 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	104.4	106.4	109.0	119.1	112.0	93.3	104.9	119.8
<b>UHPSFC</b>	<b>1.0 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	132.2	107.7	103.4	120.4	106.0	110.0	107.7	113.7
<b>vyšší rychlost</b>	<b>7.5 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	106.2	104.5	106.0	104.9	104.2	108.8	106.4	108.0

#### 4.5 Vývoj MISPE-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení lovastatinu v Pu-erh čaji, hlívě ústříčné a červené fermentované rýži.

Cílem této studie bylo vyvinout UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení lovastatinu, a to v hlívě ústříčné, červené fermentované rýži a v listech Pu-erh čaje. Pro úpravu extraktů těchto komplexních vzorků byla vybrána SPE metoda využívající materiál připravený technikou molekulárně vtištěných polymerů.

Lovastatin je první molekulou ze skupiny statinů, jež byla registrována a uvedena na trh, a to již v roce 1987 [165]. Jedná se také o jediný statin, který nachází uplatnění v klinické praxi a zároveň se vyskytuje v přírodě. Je produkován různými druhy plísní z rodu *Trichoderma*, *Monascus*, *Penicillium* a *Aspergillus* [166][167][168]. Výše zmíněné druhy plísní byly izolovány z tradičních čínských potravin, jako je Pu-erh čaj nebo červená fermentovaná rýže. Některé z těchto plísní byly také nalezeny v hlívě ústříčné.

Pu-erh je vyráběn z čajových lístků velkolistého druhu *Camellia sinensis* varianta *assamica*, Kitamura, jež pochází z jihočínské provincie Yunnan. Podle posklizňového zpracování se rozlišují dva druhy Pu-erh čaje, a to zelený a tmavý. Zelený Pu-erh je postupně přeměněn na tmavou variantu přírodním zráním zahrnující několikaleté skladování při určité teplotě a vlhkosti. Tmavý Pu-erh může být připraven také podstatně rychleji, a to mikrobiální fermentací za specifických podmínek. V jednom gramu sušených čajových lístků byly stanoveny desítky až stovky nanogramů lovastatinu [158][169][170]. Doplnky stravy obsahující červenou fermentovanou rýži jsou považovány za velmi účinná hypolipidemika. Za jejich aktivitu zodpovídají především polyketidické látky zvané monakoliny, jež jsou vytvářeny červenou plísní *Monascus purpureus*. Hlavní složkou je monakolin K, který je přírodní formou lovastatinu. V jednom gramu červené fermentované rýže lze nalézt až několik miligramů této látky. Desítky gramů tedy obsahují lovastatin v množství, které odpovídá jeho běžné terapeutické dávce. Z tohoto důvodu byl prodej doplňků stravy obsahujících červenou fermentovanou rýži v některých zemích zakázán [171][172][173]. Hlíva ústříčná patří mezi jedlé houby, které jsou pěstovány prakticky po celé planetě. Látky obsažené v této dřevokazné houbě se vyznačují antioxidační, imunomodulační a hypolipidemickou aktivitou. K posledně zmiňovaným účinkům přispívá přítomnost lovastatinu [174][175].

Chromatografická separace byla provedena na stacionární fázi BEH C18 a využívala gradientovou eluci obsahující 0,5 mM octan amonný (pH = 4) a acetonitril. Mezi stanovované látky byl zařazen nejen lovastatin, ale také i simvastatin a kyselinové formy obou statinů. Simvastatin byl stanovován při odstraňování

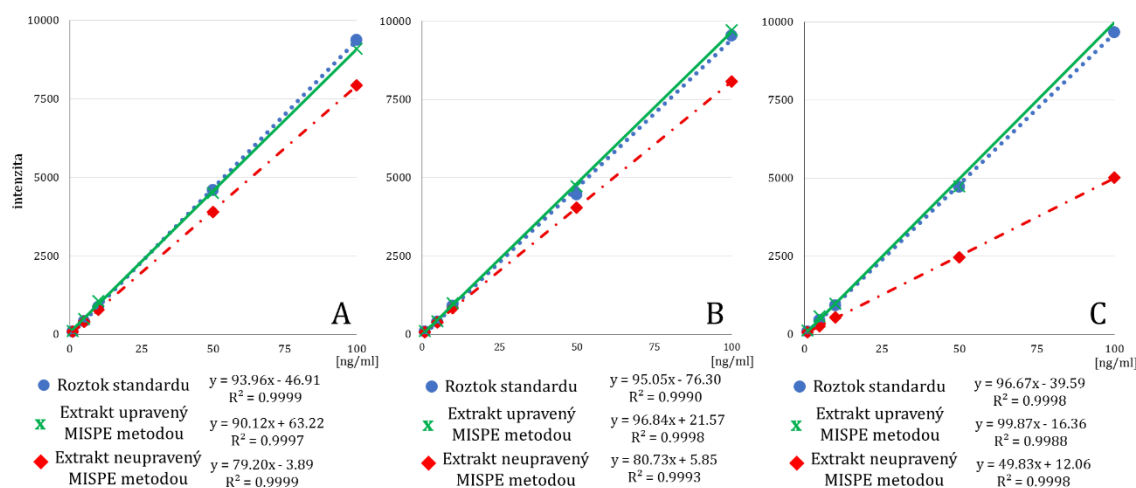
předlohou molekuly z připravených MIP sorbentů a kyselinové formy z důvodu nestability této skupiny sloučenin. Statiny se vyskytují ve formě laktonu a kyseliny. K vzájemné přeměně dochází jak *in vivo*, tak i *in vitro* podmínkách [158]. Pro detekci byl použit hmotnostní spektrometr typu trojitého kvadrupólu, který operoval v SRM módu.

MIP materiál byl připraven za použití simvastatinu jako předlohou molekuly. Od lovastatinu se liší pouze přítomností methylové skupiny, a to v C-2 poloze 2-methylbutanové kyseliny, která je navázána na hexahydronaftalenové jádro. Vlastní molekula lovastatinu nebyla použita pro tvorbu kavit kvůli problémům plynoucím z potenciálního neúplného odstranění předlohou molekuly. Jako funkční monomer byla použita methakrylová kyselina a jako síťovací činidlo ethylenglykol dimethakrylát. Polymerizace byla započata přidavkem N,N-azobisisobutyronitrilu. Postupně bylo připraveno 11 různých MIP sorbentů, které se lišily prostředním, ve kterém vlastní polymerizace probíhala. Nejvyšší retence sledované molekuly a největší selektivity mezi MIP a NIP materiálem bylo dosaženo u MIP sorbentu, jenž byl připraven v přítomnosti acetonitrilu s přidavkem kyseliny mravenčí (0,1%).

Aby bylo zabráněno přeměně laktonu lovastatinu na jeho kyselinovou formu, byl při vývoji a optimalizaci MISPE metody použit 0,5 mM octan amonný (pH 4) namísto vody. Směs pro nanesení vzorku na MIP sorbent obsahovala 0,5 mM octan amonný (pH 4) a acetonitril (90:10; v/v). Promývací směs (3 ml) obsahovala stejné složky, ale v jiném poměru (77:23; v/v). Pro eluci hodnocené látky byl použit čistý acetonitril (1 ml). Výše zmíněné podmínky zabránily přeměně lovastatinu v jeho kyselinovou formu, zajistily vysokou výtěžnost, prokázaly selektivitu extrakce a odstranily matricové efekty zatěžující UHPLC-MS/MS metodu.

Selektivita MISPE metody byla hodnocena porovnáním elučních profilů lovastatinu získaných pomocí MIP a NIP materiálu. Výtěžnost metody pro MIP sorbent byla 82 % (RSD = 4,6 %; n = 3), zatímco pro NIP pouze 32 % (17 %; n = 3), což prokazuje přítomnost specifických interakcí a selektivity metody. Ta byla navíc potvrzena dalšími experimenty, jež zahrnovaly sledování výtěžnosti sloučenin, které jsou lovastatinu blízké s ohledem na fyzikálně-chemické vlastnosti, ale liší se strukturou. Pro tento účel byly vybrány deriváty estrogenu, a to estriol,  $\beta$ -estradiol, estron a  $17\alpha$ -ethinylestradiol. V případě prvních tří derivátů byla výtěžnost MISPE metody menší než 15 % a pro  $17\alpha$ -ethinylestradiol dosáhla hodnot 44 % (RSD = 7,6 %; n = 3). Syntéza MIP materiálu se vyznačovala velmi dobrou opakovatelností. RSD odchylka výtěžnosti MISPE metod byla 7,7 % (n = 9; tři MISPE metody na třech MIP sorbentech).

Výsledná MISPE-UHPLC-MS/MS metoda byla validována, a to z hlediska správnosti, přesnosti, linearity, limitu detekce, limitu kvantifikace a matricových efektů. Všechny hodnocené parametry poskytly akceptovatelné výsledky. Matricové efekty byly hodnoceny metodou porovnání směrníc kalibračních křivek, které byly připraveny v ředící směsi a v matricích Pu-erh čaje, hlívy ústříčné a červené fermentované rýže. Matricové efekty byly hodnoceny jak v rostlinných extraktech zpracovaných pomocí MISPE metody, tak i v extraktech, které byly pouze zfiltrovány pomocí membránového filtru. Všechny tři druhy rostlinných vzorků, jež byly upraveny MISPE metodou, nebyly zatíženy prakticky žádnými projevy matricových efektů (ME <5 %). U vzorků pouze zfiltrovaných byl pozorován pokles odezvy MS detektoru, a to v rozmezí 11-49 % (**Obr. 29**).



**Obr. 29: Hodnocení matricových efektů v extraktech hlívy ústříčné (A), Pu-erh čaje (B) a červené fermentované rýže (C)**

Po validaci MISPE-UHPLC-MS/MS metody byl lovastatin stanovován ve třech vzorcích hlívy ústříčné, dvaceti vzorcích Pu-erh čaje a v jednom doplňku stravy obsahujícím červenou fermentovanou rýži. V testovaných vzorcích hlívy ústříčné nebyl lovastatin nalezen. Sledovaná látka byla detekována ve čtyřech vzorcích Pu-erh čaje a v jednom z těchto vzorků dosáhla hladina lovastatinu limitu kvantifikace, což odpovídá 10 ng v 1 g sušených čajových lístků. Deklarované množství lovastatinu (5 mg v jedné želatinové kapsli) bylo stanoveno v hodnoceném vzorku doplňku stravy.



## 5. Závěr

Matricové efekty lze odstranit nebo alespoň zmírnit zásahem prakticky v každém kroku LC-MS analýzy, jenž je představován úpravou vzorku, chromatografickou separací, MS detekcí a korekcí naměřených dat. Tento fakt byl popsán v teoretické části disertační práce a následně demonstrován vybranými příklady v experimentální části.

Matricové efekty zatěžující UHPLC-MS/MS metodu vyvinutou pro stanovení katechinů ve vzorcích zelených, bílých a černých čajů byly potlačeny pomocí vysokého ředění připravených čajových nálevů. Uplatnění vysokého ředění vzorků bylo umožněno vysokou citlivostí MS detekce, které bylo dosaženo podrobnou optimalizací vybraných parametrů iontového zdroje a hmotnostního analyzátoru. Potlačení ionizace neurotoxické aminokyseliny BMAA stanovené ve vzorcích sinic, jež bylo pozorováno při vývoji HPLC-MS/MS metody, bylo odstraněno SPE extrakcí, která využívala molekulárně vtištěné polymery připravené sol-gel technikou. Zde sehrála důležitou roli selektivita, kterou tento typ SPE sorbentu přináší. Molekulárně vtištěné polymery byly také použity pro přečištění extraktů Pu-erh čaje, hlívy ústřičné a doplňků stravy obsahujících červenou fermentovanou rýži. Výsledná UHPLC-MS/MS metoda nebyla zatížena žádnými příspěvky matricových efektů. Vzorky lidského séra obsahující statiny byly před vlastní UHPLC-MS/MS analýzou upraveny prostřednictvím proteinové precipitace a mikroextrakce plněným tuhým sorbentem. Následná korekce naměřených dat SIL-IS standardy snížila příspěvky matricových efektů, ale nevedla k úplnému odstranění u všech analytů. UHPSFC-MS/MS metody vyvinuté pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů v lidském séru, kterým předcházela úprava vzorku pomocí proteinové precipitace a extrakce z kapaliny do kapaliny, se v případě většiny analytů vyznačovala relativně nízkými projevy matricových efektů. Od kapalinové chromatografie využívající populární reverzní fáze se SFC odlišuje retenčním mechanismem, což je velmi výhodné z hlediska možného odseparování určitých látek, jež jsou zodpovědné za ovlivnění ionizace sledovaného analytu.

Za účelem úplného odstranění látek zodpovědných za vznik matricových efektů je nutné použít v případě cílené analýzy co možná nejselektivnější metodu v každém kroku celé LC-MS analýzy. Výběr metody úpravy vzorku se odvíjí především od druhu matrice, ve které je analyt stanovován. Podmínky chromatografické separace jsou, stejně jako parametry ionizace, závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech sledovaných analytů. Co se týká kompenzace naměřených dat, nejběžněji se uplatňují stabilní izotopicky značené vnitřní standardy.

## 6. Seznam použité literatury

- [1] L. Tang, P. Kebarle. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal. Chem.* 65 (1993) 3654 – 3668.
- [2] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019 – 3030.
- [3] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta* 115 (2013) 104 – 122.
- [4] A. Cappiello, G. Famiglioni, P. Palma, H. Trufelli. Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33 (2010) 1067 – 1081.
- [5] P. J. Taylor. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328 – 334.
- [6] J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 129 – 136.
- [7] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 942 – 950.
- [8] N. B. Cech, C. G. Enke. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. *Anal. Chem.* 72 (2000) 2717 – 2723.
- [9] T. M. Annesley. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041 – 1044.
- [10] N. B. Cech, C. G. Enke. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362 – 387.
- [11] M. Holčapek, K. Volná, P. Jandera, L. Kolářová, K. Lemr, M. Exner, A. Církva. Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates. *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 43 – 50.
- [12] D. L. Buhrman, P. I. Price, P. J. Rudewicz. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a study of ion suppression. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7 (1996) 1099 – 1105.
- [13] R. Bonfiglio, R. C. King, T. V. Olah, K. Merkle. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175 – 1185.
- [14] I. Fu, E. J. Woolf, B. K. Matuszewski. Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 347 – 357.

- [15] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal. Chem.* 70 (1998) 882 – 889.
- [16] L. Nováková. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry with emphasis on fast analysis. *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 25 – 37.
- [17] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M. C. Gennaro. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929 – 3937.
- [18] F. T. Peters, D. Remane. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology – a review. *Anal Bioanal Chem* 403 (2012) 2155 – 2172.
- [19] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491 – 509.
- [20] C. Côté, A. Bergeron, J. N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo. Matrix effect elimination during LC-MS/MS bioanalytical method development. *Bioanalysis* 7 (2009) 1243 – 1257.
- [21] M. Gilar, E. S. P. Bouvier, B. J. Compton. Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. *J. Chromatogr. A* 909 (2001) 111 – 135.
- [22] P. L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 199 – 217.
- [23] L. L. Jessome, D. A. Volmer. Ion Suppression: A major concern in mass spectrometry. *LCGC N. Am.* 24 (2006) 498 – 510.
- [24] L. Nováková, H. Vlčková. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8 – 35.
- [25] D. V. Yaroshenko, L. A. Kartsova. Matrix effects and methods for its elimination in bioanalytical methods using chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 69 (2014) 351 – 358.
- [26] N. Y. Ashri, M. Abdel-Rehim. Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis* 3 (2011) 2003 – 2018.
- [27] L. Nováková, M. Douša. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* Praha, Europrint, 2013. ISBN 9788026042440.
- [28] L. Nováková. Advances in sample preparation for biological fluids. *LCGC Europe* 29 (2016) 9 – 15.
- [29] M. C. Hennion. Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3 – 54.
- [30] R. E. Majors. Miniaturized approaches to conventional liquid-liquid extraction. *LCGC N. Am.* 24 (2006) 118 – 130.

- [31] Y. Q. Tang, N. Weng. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis* 5 (2013) 1583 – 1598.
- [32] C. Singleton. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. *Bioanalysis* 4 (2012) 1123 – 1140.
- [33] F. Augusto, L. W. Hantao, N. G. S. Mogollón, S. C. G. N. Braga. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 14 – 23.
- [34] A. Martín-Esteban. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 169 – 181.
- [35] J. O. Mahony, K. Nolan, M. R. Smyth, B. Mizaikoff. Molecularly imprinted polymers – potential and challenges in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 534 (2005) 31 – 39.
- [36] M. V. Polyakov. Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur. Fiz. Khim.* 2 (1931) 799 – 805.
- [37] V. Pichon, K. Haupt. Affinity separations on molecularly imprinted polymers with special emphasis on solid-phase extraction. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 989 – 1023.
- [38] C. Alexander, H. S. Andersson, L. I. Andersson, R. J. Ansell, N. Kirsch, I. A. Nicholls, J. O'Mahony, M. J. Whitcombe. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit.* 19 (2006) 106 – 180.
- [39] F. G. Tamayo, E. Turiel, A. Martín-Esteban. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 32 – 40.
- [40] V. Pichon. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 41 – 53.
- [41] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants – A review. *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 48 – 61.
- [42] P. Svoboda, D. Sander, K. Plachká, L. Nováková. Development of matrix effect-free MISPE-UHPLC-MS/MS method for determination of lovastatin in Pu-erh tea, oyster mushroom, and red yeast rice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 140 (2017) 367 – 376.
- [43] P. Svoboda, A. Combes, J. Petit, L. Nováková, V. Pichon, BMAALS group. Synthesis of a molecularly imprinted sorbent for selective solid-phase extraction of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine. *Talanta* 144 (2015) 1021 – 1029.
- [44] M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2011) 1316 – 1332.
- [45] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz. SELEX – A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* 24 (2007) 381 – 403.
- [46] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, J. Zhao. Aptamer-based biosensors. *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 108 – 117.

- [47] V. Pichon, F. Brothier, A. Combes. Aptamer-based-sorbents for sample treatment – A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 681 – 698.
- [48] N. Delaunay-Bertoncini, V. Pichon, M.-C. Hennion. Comparison of immunoextraction sorbents prepared from monoclonal and polyclonal anti-isoproturon antibodies and optimization of the appropriate monoclonal antibody-based sorbent for environmental and biological applications. *Chromatographia* 53 (2001) S224 – 230.
- [49] C. Moser, D. S. Hage. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications. *Bioanalysis* 2 (2010) 769 – 790.
- [50] D. Stevenson. Immuno-affinity solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 39 – 48.
- [51] M. C. Hennion, V. Pichon. Immuno-based sample preparation for trace analysis. *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 29 – 52.
- [52] N. Delaunay, V. Pichon, M.-C. Hennion. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 15 – 37.
- [53] N. Delaunay-Bertoncini, M.-C. Hennion. Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis-coupling with HPLC and CE-perspectives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 717 – 736.
- [54] C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A. J. Jimenez Girón, A. R. Fernández-Alba. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7634 – 7639.
- [55] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed. *Anal. Chem.* 84 (2012) 1474 – 1482.
- [56] A. Krueve, I. Leito, K. Herodes. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Anal. Chim. Acta* 651 (2009) 75 – 80.
- [57] P. Svoboda, H. Vlčková, L. Nováková. Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114 (2015) 62 – 70.
- [58] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2198 – 2207.
- [59] J. W. Dolan. Column plate number and system suitability. *LCGC N. Am.* 34 (2016) 190 – 197.
- [60] L. Nováková, M. Douša. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Praha, Europrint, 2013. ISBN 9788026042433.
- [61] R. Hahn, A. Jungbauer. Peak broadening in protein chromatography with monoliths at very fast separations. *Anal. Chem.* 72 (2000) 4853 – 4858.
- [62] J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271 – 289.

- [63] K. J. Fountain, U. D. Neue, E. S. Grumbach, D. M. Diehl. Effects of extra-column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2- $\mu$ m porous particles. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5979 – 5988.
- [64] J. W. Dolan. Extracolumn effects. *LCGC N. Am.* 26 (2008) 1092-1098.
- [65] J. K. Fountain, P. C. Iraneta. Chapter 2 – Instrumentation and columns for UHPLC separations. *UHPLC in Life Sciences*, editoři: D. Guillarme, J. L. Veuthey. Cambridge, The Royal Society of Chemistry 2012. ISBN 9781849733885. (s. 34 – 42).
- [66] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 105 – 119.
- [67] N. Wu, A. C. Bradley. Effect of column dimension on observed column efficiency in very high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 113 – 120.
- [68] F. Gritti, G. Guiochon. On the minimization of the band-broadening contributions of a modern, very high pressure liquid chromatograph. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4632 – 4648.
- [69] D. T. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836 – 1848.
- [70] J. C. Giddings. Comparison of theoretical limit of separating speed in gas and liquid chromatography. *Anal. Chem.* 37 (1965) 60 – 63.
- [71] J. H. Knox. Practical aspect of LC theory. *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 352 – 364.
- [72] J. H. Knox. Band dispersion in chromatography – a universal expression for the contribution from the mobile zone. *J. Chromatogr. A* 960 (2002) 7 – 18.
- [73] M. E. Swartz. UPLC™: An introduction and review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 1253 – 1263.
- [74] E. M. Borges. Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 580 – 597.
- [75] E. M. Borges. D. A. Volmer. Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. Part II: Chemical and thermal stability. *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 1107 – 1122.
- [76] U. D. Neue, T. H. Walter, B. A. Alden, Z. Jiang, R. P. Fisk, J. T. Cook, K. H. Glose, J. L. Carmody, J. M. Grassi, Y. F. Cheng, Z. Lu, R. J. Crowley. Use of high-performance LC packing from pH 1 to pH 12. *Am. Lab.* 31 (1999) 36 – 39.
- [77] K. D. Wyndham, T. H. Walter, P. C. Iraneta, U. D. Neue, P. D. McDonald, D. Morrison, M. Baynham. A review of Waters hybrid particle technology. Part 2. Ethylene-Bridged (BEH Technology™) Hybrids and Their Use in Liquid Chromatography.  
Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001159en.pdf>  
(staženo dne: 23.9.2016)
- [78] F. Gritti, G. Guiochon. Effect of the pH and the ionic strength on overloaded band profiles of weak bases onto neutral and charged surface hybrid stationary phases in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1282 (2013) 113 – 126.

- [79] E. M. Borges, M. R. Euerby. An appraisal of the chemical and thermal stability of silica based reversed-phase liquid chromatographic stationary phases employed within the pharmaceutical environment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 77 (2013) 100 – 115.
- [80] YMC-Triart C18: Versatile hybrid silica based HPLC column.  
Dostupné z: <http://www.ymc.co.jp/uploads/286/39.pdf>  
(staženo dne: 24.9.2016)
- [81] Sepax Technologies: Chromatography products for small molecule separations.  
Dostupné z: [https://www.sepax-tech.com/catalog/Catalog\\_Small\\_Molecule.pdf](https://www.sepax-tech.com/catalog/Catalog_Small_Molecule.pdf)  
(staženo dne: 24.9.2016)
- [82] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P. W. Carr. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1 – 30.
- [83] E. M. Borges, M. A. Rostagno, M. A. A. Meireles. Sub-2  $\mu\text{m}$  fully porous and partially porous (core-shell) stationary phases for reversed phase liquid chromatography. *RSC Adv.* 4 (2014) 22875 – 22887.
- [84] J. J. Kirkland. Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography. *Anal. Chem.* 41 (1969) 218 – 220.
- [85] C. G. Horváth, B. A. Preiss, S. R. Lipsky. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal. Chem.* 39 (1967) 1422 – 1428.
- [86] G. Guiochon, F. Gritti. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1915 – 1938.
- [87] V. González-Ruiz, I. Olives, M. A. Martín. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 17 – 28.
- [88] R. Kostianen, T. J. Kauppila. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 685 – 699.
- [89] S. A. Gustavsson, J. Samskog, K. E. Markides, B. Langström. Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 41 – 47.
- [90] B. K. Choi, D. M. Hercules, A. I. Gusev. LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 370 – 377.
- [91] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153 – 159.
- [92] J. Yamaguchi, M. Ohmichi, S. Jingu, N. Ogawa, S. Higuchi. Utility of post-column addition of 2-(2-methoxyethoxy)ethanol, a signal-enhancing modifier, for metabolite screening with liquid chromatography and negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71 (1999) 5386 – 5390.

- [93] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganà, M. Nazzari, M. Tonci. Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 351 – 357.
- [94] R. Weaver, R. J. Riley. Identification and reduction of ion suppression effects on pharmacokinetic parameters by polyethylene glycol 400. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2559 – 2564.
- [95] E. Chambers, D. M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J. R. Mazzeo. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 22 – 34.
- [96] Thermo Scientific. HILIC Separations: A practical guide to HILIC mechanisms, method development and troubleshooting.  
Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TG-21003-HILIC-Separations-TG21003-EN.pdf>  
(staženo dne: 25.5.2017)
- [97] D. V. McCalley. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3408 – 3417.
- [98] L. Nováková, L. Havlíková, H. Vlčková. Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC. *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 55 – 64.
- [99] W. Naidong. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 209 – 224.
- [100] W. Jian, R. W. Edom, Y. Xu, N. Weng. Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis. *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 681 – 697.
- [101] E. T. Gangl, M. Annan, N. Spooner, P. Vouros. Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device. *Anal. Chem.* 73 (2001) 5635 – 5644.
- [102] A. Kloepper, J. B. Quintana, T. Reemtsma. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 153 – 160.
- [103] J. Chen, L. Yang, J. T. Kapron, L. Ma, E. Pace, C. K. Van Pelt, P. J. Rudewicz. Determination of SCH 211803 by nanoelectrospray infusion mass spectrometry: evaluation of matrix effect and comparison with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 205 – 210.
- [104] A. Schmidt, M. Karas, T. Dülcks. Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in Nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 492 – 500.
- [105] J. Pól, T. Hyötyläinen. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 21 – 31.



- [106] R. A. Shellie, P. R. Haddad. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 405 – 415.
- [107] P. Schoenmakers, P. Marriott, J. Beens. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. *LCGC Europe* 16 (2003) 266 – 275.
- [108] D. R. Stoll, X. Li, X. Wang, P. W. Carr, S. E. Poorter, S. C. Rutan. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 3 – 43.
- [109] M. Saito. History of supercritical fluid chromatography: instrumental development. *J. Biosci. Bioeng.* 115 (2013) 590-599.
- [110] V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Nováková. Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 56 – 71.
- [111] L. Nováková, A. G. Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillarme. Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2  $\mu\text{m}$  particles: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 824 (2014) 18 – 35.
- [112] L. Nováková, M. Rentsch, A. Grand-Guillaume Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J. L. Veuthey, D. Guillarme. Ultra-high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: Analysis of biological samples. *Anal. Chim Acta* (2015) 647 – 659.
- [113] W. M. A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 881 – 899.
- [114] R. Dams, M. A. Huestis, W.E. Lambert, C. M. Murphy. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 14 (2003) 1290 – 1294.
- [115] C. H. P. Bruins, C. M. Jeronimus-Stratingh, K. Ensing, W. D. van Dongen, G. J. de Jong. On-line coupling of solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis of biological samples: I. Determination of clenbuterol in urine. *J. Chromatogr. A* 863 (1999) 115 – 122.
- [116] S. Souverain, S. Rudaz, J. L. Veuthey. Matrix effects in LC-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 61 – 66.
- [117] H. Mei, Y. Hsieh, C. Nardo, X. Xu, S. Wang, K. Ng, W. A. Korfmacher. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 97 – 103.
- [118] K. A. Hanold, S. M. Fischer, P. H. Cormia, Ch. E. Miller, J. A. Syage. Atmospheric pressure photoionization. 1. general properties of for LC/MS. *Anal. Chem.* 76 (2004) 2842 – 2851.
- [119] I. Manisali, D. D. Y. Chen, B. B. Schneider. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 243 – 256.
- [120] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, C. Hemmerling, L. Adler. The influence of electrospray ion source design on matrix effects. *J. Mass Spectrom.* 45 (2012) 875 – 884.
- [121] C. Ghosh, C. P. Shinde, B. S. Chakraborty. Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. *J. Chromatogr. B* 893-894 (2012) 193 – 200.

- [122] M. Olejnik, P. Jedziniak, T. Szprengier-Juszkiewicz, J. Żmudzki. Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 437 – 442.
- [123] M. Holčapek. Ionizační techniky. Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni\\_techniky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf) (staženo dne: 25.5.2017)
- [124] E. Stokvis, H. Rosing, J. H. Beijnen. Stable isotopically labelled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 401 – 407.
- [125] A. González-Antuna, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J. I. G. Alonso. Evaluation of minimal <sup>13</sup>C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis. *Analyst* 135 (2010) 953 – 964.
- [126] N. C. van de Merbel. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 924 – 933.
- [127] J. Wieling. LC-MS-MS Experiences with Internal Standards. *Chromatographia* 55 (2002) S107 – 113.
- [128] K. Kato, S. Jingu, N. Ogawa, S. Higuchi. Determination of pibutidine metabolites in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 237 – 249.
- [129] S. Wang, M. Cyronak, E. Yang. Does a stable isotopically labelled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 43 (2007) 701 – 707.
- [130] C. Bylda, R. Thiele, U. Kobold, D. A. Volmer. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst* 139 (2014) 2265 – 2276.
- [131] H. R. Liang, R. L. Foltz, M. Meng, P. Bennett. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2815 – 2821.
- [132] H. Vlčková, P. Svoboda, O. Novák, P. Solich, L. Nováková. Development of MEPS-UHPLC-MS/MS multistatin methods for clinical analysis. *Bioanalysis* 8 (2016) 333-349.
- [133] A.K. Hewavitharana. Matrix matching in liquid chromatography–mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards – Is it necessary? *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 359 – 361.
- [134] J. Kang, L. A. Hick, W. E. Price. Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4065 – 4072.
- [135] J. Zrostlíková, J. Hajšlová, J. Poustka, P. Begany. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-

- electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *J. Chromatogr. A* 973 (2002) 13 – 26.
- [136] L. Alder, S. Lüderitz, K. Lindtner, H.-J. Stan. The ECHO technique – the more effective way of data evaluation in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 67 – 79.
- [137] M. G. Sajilata, P. R. Bajaj, R. S. Singhal. Tea polyphenols as nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7 (2008) 229 – 254.
- [138] P. Bhardwaj, D. Khanna. Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. *Chin. J. Nat. Med.* 11 (2013) 345 – 353.
- [139] R. S. S. Kumar, S. Murugesan, G. Kottur, D. Gyamfi. Chapter 4 – Black Tea: The plants, processing/manufacturing and production. *Tea in Health and Disease Prevention*, editor: V. R. Preedy. Academic Press 2012. ISBN 9780123849373. (s. 41 – 57).
- [140] N. Khan, H. Mukhtar. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* 81 (2007) 519 – 533.
- [141] V. K. Ananingsih, A. Sharma, W. Zhou. Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection. *Food Res. Int.* 50 (2013) 469 – 479.
- [142] A. Vega, E. A. Bell.  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 6 (1967) 759 – 762.
- [143] P. A. Cox, S. A. Banack, S. J. Murch, U. Rasmussen, G. Tien, R. R. Bidigare, J. S. Metcalf, L. F. Morrison, G. A. Codd, B. Bergman. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 5074 – 5078.
- [144] A. Caller, N. C. Field, J. W. Chipman, X. Shi, B. T. Harris, E. W. Stommel. Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA. *Amyotroph. Lateral Scler.* 13 (2012) 25 – 32.
- [145] P. S. Spencer, J. Hugon, A. Ludolph, P. B. Nunn, S. M. Ross, D. N. Roy, H. H. Schaumburg. Discovery and partial characterization of primate motor-system toxins. *Ciba Found Symp.* 126 (1987) 221 – 238.
- [146] S. J. Murch, P. A. Cox, S. A. Banack. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12228 – 12231.
- [147] S. A. Banack, P. A. Cox. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 61 (2003) 387 – 389.
- [148] J. Pablo, S. A. Banack, P. A. Cox, T. E. Johnson, S. Papapetropoulos, W. G. Bradley, A. Buck, D. C. Mash. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 120 (2009) 216 – 225.
- [149] S. J. Murch, P. A. Cox, S. A. Banack, J. C. Steele, O. W. Sacks. Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* 110 (2004) 267 – 269.

- [150] H. E. Johnson, S. R. King, S. A. Banack, C. Webster, W. J. Callanaupa, P. A. Cox. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J. Ethnopharmacol.* 118 (2008) 159 – 165.
- [151] M. Esterhuizen, T. G. Downing. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71 (2008) 309 – 313.
- [152] J. S. Metcalf, S. A. Banack, J. Lindsay, L. F. Morrison, P. A. Cox, G. A. Codd. Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environ. Microbiol.* 10 (2008) 702 – 708.
- [153] T. Krüger, B. Mönch, S. Oppenhäuser, B. Luckas. LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA ( $\beta$ -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. *Toxicon* 55 (2010) 547 – 557.
- [154] J. Rosén, K.-E. Hellenäs. Determination of the neurotoxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst* 133 (2008) 1785 – 1789.
- [155] Y. Shitara, Y. Sugiyama. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 71 – 105.
- [156] S. Pisanti, P. Picardi, E. Ciaglia, A. D'Alessandro, M. Bifulco. Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacol. Res.* 88 (2014) 84 – 98.
- [157] S. Bellosta, N. Ferri, F. Bernini, R. Paoletti, A. Corsini. Non-lipid-related effects of statins. *Ann. Med.* 32 (2000) 164 – 176.
- [158] D. J. Yang, L. S. Hwang. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 277 – 284.
- [159] C. K. Sen, S. Khanna, S. Roy. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. *Mol. Aspects Med.* 28 (2007) 692 – 728.
- [160] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, S. Prasad, R. Kannappan. Tocotrienols, the vitamin E of the 21<sup>st</sup> century: its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1613 – 1631.
- [161] M. L. Colombo. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol – perspectives. *Molecules* 15 (2010) 2103 – 2113.
- [162] R. J. Sokol. Vitamin E deficiency and neurological disorders. *Vitamin E in health and disease: biochemistry and clinical applications*, editoři: L. Packer, J. Fuchs. New York, Marcel Dekker Inc., 1992. ISBN 9780824786922. (s. 815 – 850).
- [163] M. G. Traber, J. Atkinson. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Rad. Biol. Med.* 43 (2007) 4 – 15.

- [164] M. G. Traber. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J. Lipid Res.* 54 (2013) 2295 – 2306.
- [165] T. P. Stossel. The discovery of statins. *Cell* 134 (2008) 903 – 905.
- [166] S. M. Samiee, N. Moazami, S. Haghighi, F. A. Mohseni, S. Mirdamadi, M. R. Bakhtiari. Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iran. Biomed. J.* 7 (2003) 29 – 33.
- [167] S. Goswami, A. S. Vidyarthi, B. Bhunia, T. Mandal. A review on lovastatin and its production. *J. Biochem. Technol.* 4 (2012) 581 – 587.
- [168] R. S. Upendra, P. Khandelwal, Z. R. Amiri, L. Shwetha, M. S. Ausim. Screening and molecular characterization of natural fungal isolates. *J. Microb. Biochem. Technol.* 5 (2013) 25 – 30.
- [169] Z.-J. Zhao, Y.-Z. Pan, Q.-J. Liu, X.-H. Li. Exposure assessment of lovastatin in Pu-erh tea. *Int. J. Food Microbiol.* 164 (2013) 26 – 31.
- [170] H.-P. Lv, Y.-J. Zhang, Z. Lin, Y.-R. Liang. Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: a review. *Food Res. Int.* 53 (2013) 608 – 618.
- [171] J. Ma, Y. Li, Q. Ye, J. Li, Y. Hua, D. Ju, D. Zhang, R. Cooper, M. Chang. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5220 – 5225.
- [172] M. Journoud, P. J. H. Jones. Red yeast rice: a new hypolipidemic drug. *Life Sci.* 74 (2004) 2675 – 2683.
- [173] H.-N. Huang, Y.-Y. Hua, G.-R. Bao, L.-H. Xie. The quantification of monacolin K in some red yeast rice from Fujian province and the comparison of the other product. *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 687 – 689.
- [174] K. Deepalakshmi, S. Mirunalini. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J. Biochem. Technol.* 5 (2014) 718 – 726.
- [175] Y. Patel, R. Naraian, V. K. Singh. Medicinal properties of *pleurotus* species (Oyster mushroom): A review. *World J. Fungal Plant Biol.* 3 (2012) 1 – 12.

## 7. Seznam publikací a abstraktů

### 7.1 Publikace zahrnuté v disertační práci

1. **Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects**

**Svoboda Pavel**, Vlčková Hana, Nováková Lucie

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 114 (2015) 62-70.

Počet citací k 28. 6. 2017 podle Web of Science: 12 (Impakt faktor<sub>2014</sub>: 2.979)

2. **Synthesis of a molecularly imprinted sorbent for selective solid-phase extraction of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine**

**Svoboda Pavel**, Combes Audrey, Petit Julia, Nováková Lucie, Pichon Valérie, BMAALS group

*Talanta* 144 (2015) 1021-1029.

Počet citací k 28. 6. 2017 podle Web of Science: 3 (Impakt faktor<sub>2014</sub>: 3.545)

3. **Development of MEPS-UHPLC-MS/MS multistatin methods for clinical analysis**

Vlčková Hana, **Svoboda Pavel**, Novák Ondřej, Solich Petr, Nováková Lucie

*Bioanalysis* 8 (2016) 333-349.

Počet citací k 28. 6. 2017 podle Web of Science: 2 (Impakt faktor<sub>2015</sub>: 2.813)

4. **Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum**

Pilařová Veronika, Gottvald Tomáš, **Svoboda Pavel**, Novák Ondřej, Benešová Karolína, Běláková Sylvie, Nováková Lucie

*Analytica Chimica Acta* 934 (2016) 252-265.

Počet citací k 28. 6. 2017 podle Web of Science: 2 (Impakt faktor<sub>2015</sub>: 4.712)

5. **Development of matrix effect-free MISPE-UHPLC-MS/MS method for determination of lovastatin in Pu-erh tea, oyster mushroom, and red yeast rice**

**Svoboda Pavel**, Sander Daniel, Plachká Kateřina, Nováková Lucie

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 140 (2017) 367-376.

Počet citací k 28. 6. 2017 podle Web of Science: 0 (Impakt faktor<sub>2015/2016</sub>: 3.169)

## 7.2 Kapitola uvedená v monografii

### **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation**

**Editoři: Salvatore Fanali, Paul R. Haddad, Colin F. Poole, Marja-Liisa Riekkola**

Elsevier Inc. 2017, ISBN: 978-0-12-805393-5.

### **Kapitola 29: Ultrahigh-performance liquid chromatography**

Autoři: Nováková Lucie, **Svoboda Pavel**, Pavlík Jakub

První UHPLC přístroj byl představen v roce 2004. V současnosti je UHPLC velmi dobře etablovanou separační technikou, a to na poli mnoha různých aplikací. Vysoká účinnost, rozlišení, rychlost analýzy, robustnost, spolehlivost a také komerční dostupnost různých UHPLC přístrojů a stacionárních fází naplněných plně porézními částicemi o velikosti <2 μm a povrchově porézními částicemi o velikosti <3 μm představují nejdůležitější přednosti, které jsou v praxi požadovány. Spojení UHPLC s hmotnostní spektrometrií přináší další výhody, a to především selektivitu a citlivost. Spojení UHPLC s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu představuje zlatý standard na poli cílené kvantitativní analýzy. Spojení s vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometrem nachází uplatnění především při necílené analýze.

Kapitola se podrobně zabývá teoretickými aspekty UHPLC separací, parametry UHPLC přístrojů, stacionárními fázemi a možnostmi uplatnění. V teoretické části byl kladen důraz na hodnocení separační účinnosti a popisu pravidel pro přenos metod z HPLC systému na UHPLC. Další část se věnuje detekci v UHPLC analýze a také popisuje rozdíly mezi komerčně dostupnými UHPLC přístroji a jejich nedostatky v podobě mimokolonových příspěvků. Třetí sekce je věnována stacionárním fázím, a to jak plně porézním, tak i povrchově porézním, jež jsou známy pod označením Core-shell. Poslední část popisuje široké možnosti uplatnění UHPLC instrumentace, a to na poli metabolomiky a v analýze farmaceutik, biologických vzorků, potravin, krmiv a enviromentálních vzorků.

### 7.3 Přednášky uvedené v konferenčních sbornících

#### a) Prvoautorské práce

1. Svoboda Pavel, Combes Audrey, Petit Julia, Nováková Lucie, Valerie Pichon, BMAALS group

**Synthesis of molecularly imprinted material for solid-phase extraction of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine from cyanobacterial extract**

*5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, 3. 2. – 4. 2. 2015.*

2. Svoboda Pavel, Combes Audrey, Petit Julia, Nováková Lucie, Valerie Pichon, BMAALS group

**Synthesis of molecularly imprinted silica sorbent for solid-phase extraction of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine from cyanobacterial extract**

*Česká chromatografická škola – HPLC 2015, Rožnov pod Radhoštěm, 3. 5. – 6. 5. 2015*

3. Svoboda Pavel, Sander Daniel, Nováková Lucie

**Molecularly imprinted polymers for selective extraction of lovastatin from food samples and elimination of matrix effects**

*6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, 9. 2. – 10. 2. 2016*

#### B) Spoluautorské práce

1. Pavlík Jakub, Svoboda Pavel, Nováková Lucie

**UHPLC-MS/MS method for Evaluation of the effect of flavouring additives on the content of catechins in tea samples and on matrix effects**

*7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, 7. 2. – 8. 2. 2017.*

2. Zelená Lucie, Svoboda Pavel, Nováková Lucie, Sklenářová Hana

**Lovastatin determination in dietary supplements by a fully automated MIP-SPE procedure**

*7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, Hradec Králové, 7. 2. – 8. 2. 2017.*



## 7.4 Postery uvedené v konferenčních sbornících

### a) Prvoautorské práce

1. Svoboda Pavel, Combes Audrey, Petit Julia, Nováková Lucie, Valerie Pichon, BMAALS group  
**Synthesis of molecularly imprinted silica for solid-phase extraction of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine from cyanobacterial extracts**  
*International Symposium on Chromatography 2014, Salzburg, Rakousko, 14. 9. – 18. 9. 2014*
2. Svoboda Pavel, Sander Daniel, Nováková Lucie  
**Synthesis of molecularly imprinted polymers for selective solid phase extraction of lovastatin from mushroom samples**  
*EuroAnalysis 2015, Bordeaux, Francie, 6. 9. – 10. 9. 2015*
3. Svoboda Pavel, Vlčková Hana, Nováková Lucie  
**Development of UHPLC-MS/MS method for determination of eight catechin derivatives in tea samples and the role of matrix effects**  
*Syntéza a analýza léčiv 2016, Hradec Králové, Česká republika, 22. 6. – 24. 6. 2016*
4. Svoboda Pavel, Zelená Lucie, Matysová Ludmila, Nováková Lucie  
**Development of matrix effect-free MISPE-UHPLC-MS/MS method for determination of lovastatin in food samples**  
*International Symposium on Chromatography 2016, Cork, Irsko, 28. 8. – 1.9. 2016*
5. Svoboda Pavel, Zelená Lucie, Plachká Kateřina, Sklenářová Hana, Nováková Lucie  
**Determination of lovastatin in food samples using UHPLC-MS/MS method and automated molecularly imprinted solid phase extraction**  
*International Symposium on Separation Sciences 2017, Vídeň, Rakousko, 19. 9. – 22. 9. 2017*

## B) Spoluautorské práce

1. Pavlík Jakub, Svoboda Pavel, Nováková Lucie  
**Evaluation of the effect of flavouring additives on the content of catechins in tea samples and matrix effects using UHPLC-MS/MS method**  
*Chiranal 2016, Olomouc, Česká republika, 6. 6. – 9. 6. 2016*
2. Pilařová Veronika, Gottvald Tomáš, Svoboda Pavel, Novák Ondřej, Nováková Lucie  
**Development and optimization of UHPSFC-MS method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum**  
*Chiranal 2016, Olomouc, Česká republika, 6. 6. – 9. 6. 2016*
3. Pavlík Jakub, Svoboda Pavel, Nováková Lucie  
**Využití UHPLC-MS/MS metody pro hodnocení vlivu ochucovadel na obsah katechinů v čajích a na matricové efekty**  
*Syntéza a analýza léčiv 2016, Hradec Králové, Česká republika, 22. 6. – 24. 6. 2016*
4. Chocholouš Petr, Zelená Lucie, Svoboda Pavel, Šatínský Dalibor, Sklenářová Hana, Solich Petr  
**Sequential injection chromatography as a tool for automation of On-line hyphenated extraction and chromatographic methods**  
*International Symposium on Chromatography 2016, Cork, Irsko, 28. 8. – 1.9. 2016*
5. Zelená Lucie, Svoboda Pavel, Sklenářová Hana, Nováková Lucie  
**Automated SPE procedure for lovastatin determination using laboratory-made molecularly imprinted polymer as a sorbent**  
*ICFIA 2016, Palma de Mallorca, Španělsko, 2. 10. – 7. 10. 2016*
6. Pilařová Veronika, Gottvald Tomáš, Svoboda Pavel, Novák Ondřej, Nováková Lucie  
**Development and optimization of UHPSFC-MS method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum**  
*SFC 2016, Vídeň, Rakousko, 5. 10. – 7. 10. 2016*

7. Plachká Kateřina, Zelená Lucie, Svoboda Pavel, Sklenářová Hana, Nováková Lucie

**Determination of lovastatin using UHPLC-MS/MS method and automated SPE procedure with laboratory-made molecularly imprinted polymer sorbent**

*HPLC 2017, Praha, Česká republika, 18. 06. - 22. 06. 2017*

8. Zelená Lucie, Svoboda Pavel, Plachká Kateřina, Nováková Lucie, Sklenářová Hana

**Mispe Procedure For Lovastatin Determination - Comparison Of On-Line And Off-Line Approaches**

*ExTech 2017, Santiago de Compostela, Španělsko, 27. 6. – 30. 6. 2017*