

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**OPTIMALIZACE METABOLOMICKÉHO WORKFLOW:
KRITICKÝ POHLED NA KROK PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.
Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2019

Jakub Eduard Syřínek

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Jakub Eduard Syřínek

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

Název diplomové práce: Optimalizace metabolického workflow: kritický pohled na krok přečištění vzorku

Metabolické schéma (workflow) sestává z plánování experimentu, vzorkování, přípravy vzorku, samotné analýzy a následného zpracování získaných dat a jejich interpretace. Vzhledem k tomu, že v metabolice je zájem soustředěn na malé molekuly s hmotností menší než 1500 Da, je krok přípravy biologického vzorku kritický. Tato práce se zabývá optimalizací postupu pro eliminaci polyethylenglykolů (PEG) ve vzorku. PEG mohou interferovat s metabolity během ionizace v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Pro eliminaci PEG bylo využito mikroextrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček (μ SPE-PT) plněných sorbentem tvořeným porézním TiO_2 .

Vaginální stěry byly získány od pacientek trpících vulvovaginálním dyskomfortem způsobeným kmenem *Candida albicans*. Vzorky byly nejprve rozpuštěny v pufovaném fyziologickém roztoku. V rámci μ SPE-PT bylo optimalizováno 5 různých složení kondičního činidla, počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku, 5 různých složení promývacího činidla, elučního činidla a počet aspirací/vypuštění v obou těchto krocích. Počet aspirací/vypuštění v jednotlivých krocích se pohyboval mezi 1–50. Dále byla optimalizována 4 různá složení roztoku pro rekonstituci vzorku. Chromatografická separace byla provedena na koloně Acquity BEH C_{18} s mobilní fází 0,075% kyselinou mravenčí (FA) a 0,075% FA v acetonitrilu (ACN) při průtokové rychlosti 0,5 ml/min a gradientovou elucí od 2 % do 98 % organické složky během 13 minut. Hmotnostní detekce byla provedena na přístroji s vysokým rozlišením využívajícím spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu: Synapt G2-Si. Pro vyhodnocení počtu nalezených potenciálních markerů byl využit software MarkerLynx. Pro vyhodnocení míry eliminace PEG byl využit software Microsoft Excel.

Nejúčinnější μ SPE-PT postup pro eliminaci PEG využíval 0,1% FA jako kondiční činidlo s počtem 5 aspirací/vypuštění, 5 aspirací/vypuštění v kroku

nanesení vzorku, vodu jako promývací činidlo s počtem 50 aspirací/vypuštění, 50% methanol pro eluci s počtem 5 aspirací/vypuštění a 5mM FA v 2% ACN pro rekonstituci vzorku po odpaření. V eluátu bylo po provedení μ SPE-PT zaznamenáno jen 21,62 % PEG z celkového počtu PEG. Zároveň bylo zaznamenáno 5544 potenciálních markerů. Tento postup se jeví jako vhodný nástroj necílené metabolomiky pro eliminaci PEG ve vzorcích vaginálních stěrů.

Klíčová slova: necílená metabolomická analýza; polyethylenglykol; oxid titaničitý; mikroextrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček (μ SPE-PT); matricové efekty

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Jakub Eduard Syřínek

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

Title of Diploma Thesis: Optimization of metabolomics workflow: critical evaluation of sample clean-up step

Metabolomics workflow involves following steps: experiment planning, sampling, sample preparation, sample analysis and both data processing and data interpretation. Metabolomics is focused on small molecules with mass lower than 1500 Da. This is reason, why sample preparation of biological samples is critical. This work deals with the optimization of sample preparation method for polyethylene glycol (PEG) elimination from sample. PEG can interfere with metabolites during the ionization in the ion source of mass spectrometer. Solid phase microextraction in pipette tips (μ SPE-PT) was used in this work for PEG elimination. Porous titanium dioxide was employed as a sorbent.

Vaginal swabs were collected from patients suffering from vulvovaginal discomfort caused by *Candida albicans*. Samples were first dissolved in phosphate buffer saline solution. In μ SPE-PT method 5 different composition of binding solution, number of aspiration/expelling repeats in sample loading step, 5 different composition of washing buffer and elution agent and also number of aspiration/expelling repeats in each of these steps were optimized. As well 4 different composition of solution for reconstitution of sample were optimized. Number of aspirate/expel in each step of μ SPE-PT was 1–50. The liquid chromatography separation was carried out on Acquity BEH C₁₈ column using gradient elution with 0.075% formic acid (FA) and 0.075% FA in acetonitrile (ACN) at flow rate of 0.5 mL/min in 13 minutes. Quadrupole time-of-flight high resolution tandem mass spectrometer Synapt G2-Si was employed for the data acquisition. MarkerLynx software was utilized for finding of potential markers. Microsoft Excel software was used for PEG measure evaluation.

Using 0.1% FA as binding solution, water as wash buffer and 50% methanol for elution was found as the most effective workflow for PEG elimination. The best results

were obtained with 5 times aspirate/expel for sample loading, 50 times aspirate/expel for washing and 5 times aspirate/expel for elution. 5mM FA in 2% ACN was used for reconstitution after evaporation of sample. After μ SPE-PT 21.62 % of total number of PEG in sample was detected in the eluate. Moreover, 5544 potential markers were found in the eluate. These μ SPE-PT conditions appear as effective tool for PEG elimination in vaginal swabs in untargeted metabolomics experiment.

Keywords: untargeted metabolomics analysis; polyethylene glycol; titanium dioxide; solid phase microextraction pipette tips (μ SPE-PT); matrix effects

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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.“

V Hradci Králové dne 2. 9. 2019.

Jakub Eduard Syřínek

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a cenné rady poskytnuté při zpracování diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Pavlu Jakubcovi za věnovaný čas a rady poskytnuté při experimentální práci a vyhodnocování výsledků. Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. děkuji za poskytnutí vzorků pro tuto práci. V neposlední řadě patří mé obrovské díky za podporu během studia mé rodině a příteli.

Experimentální práce byla provedena za podpory projektu STARSS, reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465 spolufinancovaného ERDF, SVV 260 412/2019 a Ministerstvem zdravotnictví ČR grant č. 15-29225A. Poděkování patří také společnosti Pragolab za poskytnutí jednoho balení pipetovacích špiček plněných sorbentem.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....	11
1. ÚVOD.....	12
2. CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	13
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1. Metabolomika.....	14
3.1.1. Metabolomické schéma.....	15
3.1.2. Základní přístupy metabolomické analýzy.....	17
3.2. Příprava vzorku.....	20
3.2.1. Precipitace proteinů.....	21
3.2.2. Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	22
3.2.3. Extrakce na tuhou fázi.....	23
3.3. Chromatografické metody.....	26
3.3.1. Plynová chromatografie.....	27
3.3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	27
3.3.3. Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	31
3.3.4. Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie.....	32
3.3.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie při vysoké teplotě.....	32
3.3.6. Kapilární chromatografie.....	33
3.3.7. Monolitické kolony.....	33
3.3.8. Superkritická fluidní chromatografie.....	34
3.4. Hmotnostní detekce.....	34
3.4.1. Přímá MS analýza.....	35
3.4.2. Chromatografie spojená s MS.....	38
3.5. Práce s metabolomickými daty.....	41
3.6. Quorum sensing molekuly.....	42
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
4.1. Použité chemikálie.....	45
4.2. Použitá instrumentace a materiály.....	45
4.3. Analyzované vzorky.....	45
4.3.1. Směsný vzorek.....	45
4.3.2. Kontrolní vzorek.....	46
4.3.3. Použité roztoky.....	46
4.4. Postup přípravy vzorku pomocí μ SPE-PT.....	47
4.5. Optimalizace μ SPE-PT.....	50
4.6. UHPLC podmínky.....	52
4.7. HRMS podmínky.....	52
4.8. Vyhodnocení získaných dat.....	52
4.8.1. Necílená metabolomická analýza.....	52
4.8.2. Stabilita signálu HRMS systému.....	54
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	55

5.1.	Optimalizace metabolomického schématu	55
5.2.	Odchylka experimentální m/z od správné m/z v závislosti na čase	56
5.3.	Výběr metody přípravy vzorku	57
5.4.	Optimalizace parametrů provedení μ SPE-PT metody	57
5.4.1.	Složení kondičního činidla	65
5.4.2.	Počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku	65
5.4.3.	Složení promývacího činidla a počet aspirací/vypuštění v kroku promývání.....	67
5.4.4.	Složení elučního činidla a počet aspirací/vypuštění v kroku eluce	69
5.4.5.	Složení roztoku pro rekonstituci	73
5.5.	Necílená analýza – potenciální markery	74
5.6.	Opakovatelnost metody	80
5.7.	Výsledek analýzy kontrolních vzorků	84
6.	ZÁVĚR	88
7.	POUŽITÁ LITERATURA	91

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

μSPE-PT	mikroextrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček plněných sorbentem (<i>Pipette tips solid phase microextraction</i>)
2D-GC-MS	spojení dvoudimensionální plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
2D-LC	dvoudimensionální kapalinová chromatografie
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (<i>Atmospheric pressure photoionization</i>)
CE	kapilární elektroforéza (<i>Capillary electrophoresis</i>)
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem (<i>Desorption electrospray ionization</i>)
d ₆ F	d ₆ isotopicky značený farnesol
DI-MS	přímý nástřik do hmotnostního spektrometru (<i>Direct infusion Mass spectrometry</i>)
d ₄ T	d ₄ isotopicky značený tyrosol
EESI	extrakční ionizace elektrosprejem (<i>Extraction electrospray ionization</i>)
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>Electrospray ionization</i>)
FA	kyselina mravenčí
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (<i>Fourier transform Ion cyclotron resonance</i>)
GC	plynová chromatografie (<i>Gas chromatography</i>)
GC-MS	spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (<i>Hydrophilic interaction chromatography</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (<i>High resolution Mass spectrometry</i>)
HTLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě (<i>High-Temperature Liquid Chromatography</i>)
IEX-HPLC	iontově výměnná HPLC (<i>Ion exchange HPLC</i>)
IMS	iontově mobilní spektrometrie (<i>Ion Mobility Spectrometry</i>)
IP-HPLC	iontově párová HPLC (<i>Ion pair HPLC</i>)
IS	vnitřní standard (<i>Internal Standard</i>)
IT	iontová past (<i>Ion trap</i>)
LC	kapalinová chromatografie (<i>Liquid chromatography</i>)
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
MALDI	ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>)
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MIP	molekulárně vtištěný polymer (<i>Molecularly imprinted polymer</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>Mass spectrometry</i>)

MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEG	polyethylenglykol
PP	proteinová precipitace (<i>Protein precipitation</i>)
Q	kvadrupól
Q-TOF	spojení analyzátorů Q a TOF
QqQ	trojitý kvadrupól
QS	regulační mechanismus quorum sensing
QSM	quorum sensing molekuly (signální molekuly)
RP	reversní fáze (<i>Reversed phase</i>)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversních fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka (<i>Relative standard deviation</i>)
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie (<i>Supercritical fluid chromatography</i>)
SPE	extrakce na tuhou fázi (<i>Solid Phase Extraction</i>)
TFA	kyselina trifluoroctová
TOF	analyzátor doby letu (<i>Time of flight</i>)
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>)
UHPLC-HRMS	spojení ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (<i>Ultra-high performance liquid chromatography – High resolution Mass spectrometry</i>)
UHPSFC	ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (<i>Ultra-high performance supercritical fluid chromatography</i>)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

$N_{a/v}$	počet aspirací/vypuštění
N_f	počet PEG nalezených v dané extrakční frakci daného postupu μ SPE-PT
N_{fff}	počet PEG nalezených ve všech třech frakcích daného postupu μ SPE-PT (nevázaná frakce po nanesení vzorku, frakce po promývání, frakce eluátu)
N_f/N_{fff}	podíl počtu PEG nalezených v dané extrakční frakci a počtu PEG nalezených ve všech třech frakcích (nevázaná frakce po nanesení vzorku, frakce po promývání, frakce eluátu) daného postupu μ SPE-PT
N_{f-II}/N_{fff-II}	podíl počtu PEG nalezených v dané extrakční frakci a počtu PEG nalezených ve všech třech frakcích (nevázaná frakce po nanesení vzorku, frakce po promývání, frakce eluátu) daného postupu μ SPE-PT s druhou šarží pipetovacích špiček
m/z	poměr molekulové hmotnosti ku náboji
RP	rozlišovací schopnost (<i>Resolving power</i>)

1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací metabolomického schématu (tj. metabolomického workflow). Zabývá se konkrétně bioanalytickou částí metabolomického schématu, které zahrnuje přípravu vzorku a samotnou analýzu vzorku, která sestává nejčastěji z chromatografické separace ve spojení s hmotnostní detekcí. Předpokladem správného metabolomického hodnocení je odstranění interferujících kontaminantů z biologické matrice, zejména v oblasti hmotnosti do 1500 Da, která pokrývá metabolity zájmu. Nejsou-li kontaminanty odstraněny ze vzorku fyzicky, lze jejich signály odstranit během zpracování dat. Nelze však v takovém případě vyloučit přítomnost matricových efektů. Bylo zjištěno, že nejčastěji přítomnými interferujícími kontaminanty jsou polyethylenglykoly (PEG), ftaláty, polypropylenglykoly, případně další, které mohou vzorek kontaminovat již při odběru vzorku, dále při jeho skladování a následném zacházení s ním před analýzou. V této práci byly použity vzorky vaginálních stěrů pacientek trpících vulvovaginálním dyskomfortem způsobeným kmenem *Candida albicans*. Protože bylo zjištěna nejvyšší incidence kontaminace PEG, zabývá se tato práce jejich eliminací. Pro eliminaci PEG ze vzorku byla použita metoda mikroextrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček plněných sorbentem (μ SPE-PT) tvořeným TiO_2 .

Důvodem pro odstranění PEG ze vzorku před analýzou je vznik nežádoucích matricových efektů. Jedná se o potlačení ionizace v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. V mnoha případech mohou PEG potlačit signál analytu, což vede ke snížení meze detekce a nesprávné kvantifikaci.

μ SPE-PT je metodou extrakce na tuhou fázi, což je jeden ze tří základních postupů při úpravě biologických vzorků před vlastní analýzou. Jde o miniaturizovanou variantu extrakce na tuhou fázi (SPE), která na rozdíl od konvenční SPE nevyužívá kolonky či disky, coby nosič sorbentu, ale sorbent je umístěn přímo v pipetovací špičce. Vhodným nastavením podmínek provedení μ SPE-PT lze ze vzorku odstranit podstatnou část kontaminantů a balastů, které mohou rušit následnou analýzu metabolitů. V necílených metabolomických experimentech je vedle odstranění kontaminantů ze vzorku stěžejní zachovat co největší část metabolomu. Snahou je pak zaznamenané látky identifikovat a vybrat ty se vztahem k biologické interpretaci.

2. CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce je optimalizovat metabolomické schéma, s důrazem na bioanalytickou část zahrnující přípravu vzorku, analýzu využívající ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (UHPLC-HRMS) s hmotnostním spektrometrem typu kvadrupól-analyzátor doby letu (Q-TOF) a následné zpracování a analýzu získaných dat. Nejrozsáhlejší část experimentu byla zaměřena na eliminaci PEG ze vzorků vaginálních stěrů během fáze přípravy vzorku.

K odstranění kontaminantů byly využity komerčně dostupné pipetovací špičky s tuhým sorbentem na bázi oxidu titaničitého. Cílem je optimalizovat složení kondičionálního, promývacího a elučního činidla a počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku, v kroku promývání a eluce a optimalizovat složení roztoku pro rekonstituci vzorku po odpaření. Vedle eliminace PEG byl necílený metabolomický experiment prováděný v rámci této diplomové práce zaměřen na zjištění počtu potenciálních markerů nalezených ve vzorku po provedení μ SPE-PT postupu.

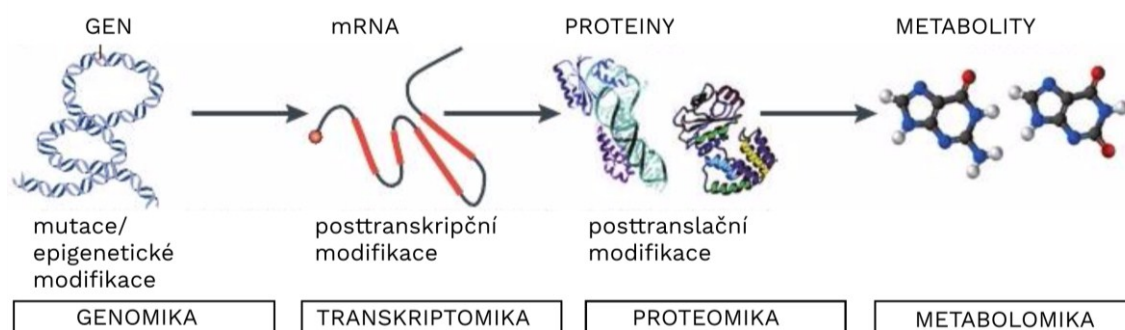
Dalším krokem je ověření vhodnosti navržených podmínek separace pomocí ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie (UHPLC) a hmotnostní detekce s vysokým rozlišením (HRMS) pro necílenou analýzu vzorků vaginálních stěrů. Součástí je ověření stability správné hmoty po korekci referenčním sprejem a potvrzení vhodnosti celkového nastavení při dlouhých mnohahodinových analýzách v necílených metabolomických experimentech.

Důležitým krokem je také vybrat vhodný způsob zpracování dat získaných UHPLC-HRMS analýzou. Vedle neeliminovaných PEG je nutno ve frakci eluátu μ SPE-PT postupu vyhodnotit též počet nalezených potenciálních markerů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Metabolomika

Metabolomika patří mezi nástroje individualizované léčby, což je nedílná součást trendů současné medicíny. Metabolomika zkoumá společně s dalšími „omickými“ vědami, což jsou genomika, transkriptomika a proteomika, interindividuální rozdíly mezi jedinci (fenotypy) a spolu s nimi je tedy jak cenným diagnostickým nástrojem, tak prostředkem individualizované medicíny. Na jejich základě se každému z nich snaží vhodně přizpůsobit obecný algoritmus pro terapii onemocnění, případně zvolit zcela alternativní postup léčby [1][2]. Vztah mezi „omickými“ vědami znázorňuje obrázek 1.



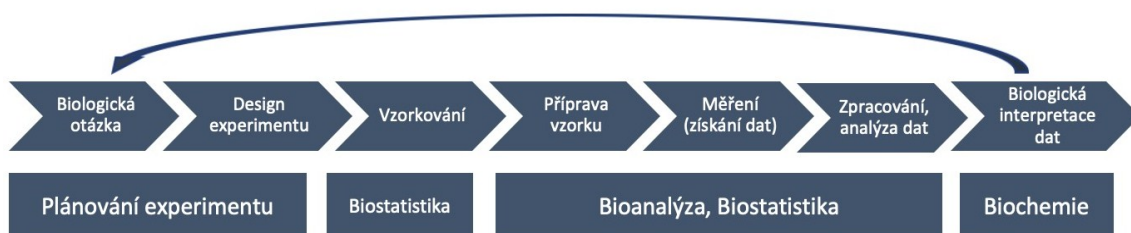
Obrázek 1: Základní biologické dogma a znázornění tzv. "omické" kaskády. Je zde naznačeno, že geny a proteiny podléhají epigenetickým, resp. posttranslačním modifikacím, zatímco metabolity jsou konečnými biochemickými produkty, které nejlépe charakterizují fenotyp. Upraveno dle [7].

Metabolomika, se zabývá studiem metabolitů, což jsou intermediáty a konečné produkty procesů látkové přeměny v těle, tedy malé molekuly s hmotností menší než 1500 Da. Metabolom, tedy souhrn všech metabolitů v buňce je odrazem v ní probíhajících biochemických dějů. Metabolomika je cenným nástrojem pro studium fenotypu a změn fenotypu způsobených vlivy vnějšího prostředí, nemocemi či změnami genotypu. Metabolomika využívá všech současných trendů v analytické chemii pro identifikaci těchto dysregulovaných molekul – potenciálních biomarkerů, které slouží k diagnóze onemocnění, úpravě farmakoterapie, zjištění prognózy či predikci rizik onemocnění. V současné době je známo, že existuje více než 110 000 endogenních metabolitů. Jedná se o látky diametrálně odlišné svou strukturou, a tedy i vlastnostmi, což zásadně komplikuje celkové vyšetření metabolomu. Fáze objevování metabolitů musí být schopna identifikovat jak látky vysoce polární, např. cukry, cukerné alkoholy či polyaminy, tak látky vysoce lipofilní jako jsou estery cholesterolu či triacylglyceroly.

Navíc je distribuce metabolitů vystavena vysoké časové variabilitě a dalším komplikujícím vnějším vlivům jako je biologická variabilita závislá na dietě, životním stylu, probíhajícím onemocněním aj. Metabolomika se však zabývá také látkami exogenními, které v organismu podléhají metabolismu v některé z biochemických drah [1][2][3][4][5].

3.1.1. Metabolomické schéma

Hlavním cílem metabolomiky je získat odpověď nebo vysvětlení na biologickou otázku. Metabolomickému hodnocení předchází sběr a uchování (skladování) vzorku. Následuje metabolomická analýza probíhající v laboratoři, zahrnující: přípravu vzorku, separaci, detekci a konečně analýzu získaných dat. Příprava vzorku využívá proteinovou precipitaci (PP), extrakci na tuhou fázi (SPE) či extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE), respektive mikroextrakční techniky odvozené od těchto konvenčních metod. Jako separační technika v následném kroku se využívá plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (LC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) či kapilární elektroforéza (CE). Detekce pak probíhá s využitím hmotnostní spektrometrie (MS) či nukleární magnetické resonance (NMR). NMR se však častěji využívá k přímé analýze bez využití separačních technik [3][4][5][6][7]. Přehledně jsou jednotlivé části metabolomického schématu znázorněny na obrázku 2. Základní pojmy týkající se metabolomického schématu jsou vysvětleny v Tab. 1.



Obrázek 2: Schéma základního metabolomického schématu. Upraveno, dle [5].

Velkou výhodou NMR jsou minimální požadavky na přípravu vzorku, potenciál pro specifické metabolické otisky prstů (*metabolic fingerprinting*, viz Tab. 1) a nedestruktivní charakter metody. Tato metoda je však poměrně málo citlivá. Citlivost lze zvýšit použitím sloučenin značených ^{13}C či ^{15}N . Další nevýhodou je náročnost identifikace jednotlivých metabolitů na základě signálů chemického posunu, které způsobují shlukování vzorků ve vícerozměrné analýze v komplexních směsích [2][4][6][8].

Tabulka 1: Základní pojmy v metabolomice [2][6].

Metabolom	Kompletní soubor malých molekul (metabolitů) produkovaných buňkou jako výsledek probíhajících metabolických drah.
Cílená metabolická analýza	Kvantitativní analýza jednoho nebo několika vybraných metabolitů v biologickém vzorku.
Metabolické profilování	Identifikace a semi-quantitativní hodnocení metabolitů náležejících do skupiny chemicky společných sloučenin nebo společně zapojených do specifické metabolické dráhy.
Metabolický otisk prstu (<i>metabolic fingerprinting</i>)	Rychlá a kompletní analýza vzorku bez nutnosti identifikace a kvantifikace jednotlivých intracelulárních metabolitů (endometabolom), umožňuje klasifikovat vzorky do skupin na základě celkového profilu.
Metabolická stopa (<i>metabolic footprinting</i>)	Obdoba metabolického otisku prstu, ovšem pro extracelulární metabolity (exometabolom).
Necílená metabolická analýza	Kompletní profil metabolitů v biologickém vzorku. Může sloužit jak k vzájemnému porovnávání profilů (metabolický otisk prstu), tak k dalšímu zkoumání a postupné identifikaci jednotlivých metabolitů.

Metabolomické kvantitativní analýzy využívající MS mají vysokou selektivitu a citlivost. Využití MS má také vysoký potenciál identifikace metabolitů. Kombinace se separační technikou snižuje složitost hmotnostních spekter separací metabolitů v časovém rozměru, zajišťuje separaci isobarů či isomerů a poskytuje další informace o fyzikálně-chemických vlastnostech analytů. Jsou-li pominuty ambientní ionizační techniky, pak je vyžadována příprava vzorku, což může způsobit ztráty metabolitů. Na základě použité ionizační techniky pak mohou být rovněž ovlivněny specifické třídy metabolitů. Proto je žádoucí paralelní aplikace několika technik, např. spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), aby byl metabolom komplexně prostudován. Komplementární je využití iontové mobility s MS, které je dnes komerčně dostupné. Při využití iontové mobility (IMS) je dosaženo separace iontů na základě jejich pohyblivosti v prostředí neutrálního plynu. Na elektrody letové trubice je vloženo napětí

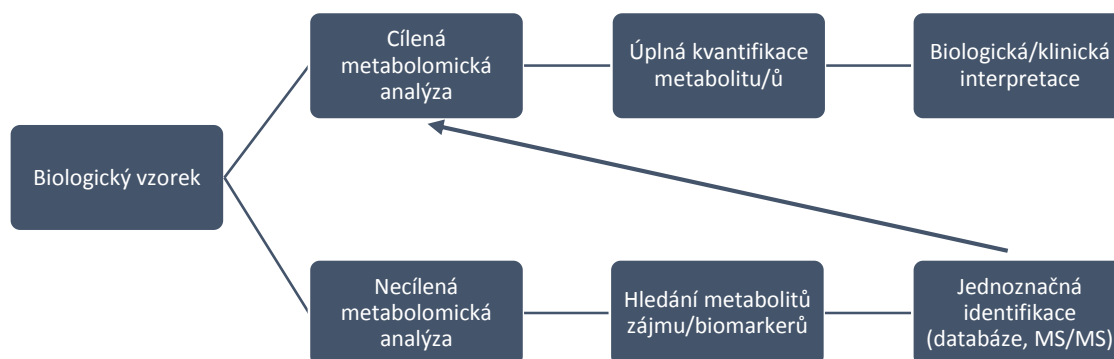
a je zde zaveden neutrální plyn proti směru letu iontů. Ionty se dělí na základě svých účinných průřezů (tvar a velikost), náboje a hmotnosti. IMS může více či méně účinně separovat strukturní isomery, polymerní konformery či chirální sloučeniny a je tak cenným nástrojem metabolomické analýzy [2][4][8][9].

Nicméně, nejen výběr analytických technik, ale celý metabolomický experiment vyžaduje pečlivé plánování, a měl by být proto plánován jako celek. V této souvislosti byl navržen tzv. MIAMET (*Minimum information about a metabolomics experiment*) s cílem usnadnit výměnu informací a vytváření databází. Jde o doporučení obsahující minimum informací, které je potřeba o prováděném metabolomickém experimentu znát, a tedy je již při jeho přípravě plánovat. Obecně platí, že při přípravě metabolomického experimentu s využitím MS a jeho validaci je potřeba řešit následující kroky:

- odběr vzorku,
- příprava vzorku,
- analýza vzorku zahrnující separaci metabolitů a detekci MS,
- export dat,
- analýza dat [2][10].

3.1.2. Základní přístupy metabolomické analýzy

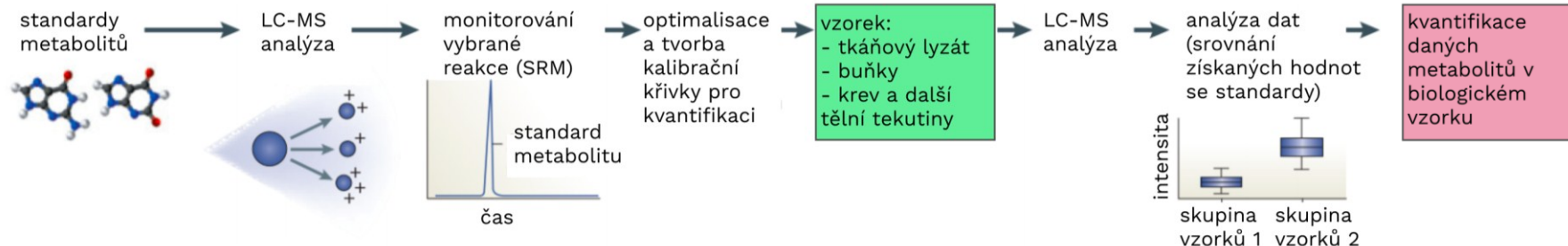
V metabolomice je nutno rozlišit dva základní přístupy: necílenou a cílenou analýzu. Schéma ukazující základní rozdíly mezi cílenou a necílenou metabolomickou analýzou ukazuje obrázek 3. Detailně je pak přístup cílené a necílené metabolomické analýzy ukázán na obrázku 4.



Obrázek 3: Schéma přibližující vzájemný vztah mezi cílenou a necílenou metabolomickou analýzou. Vytvořeno dle [4].

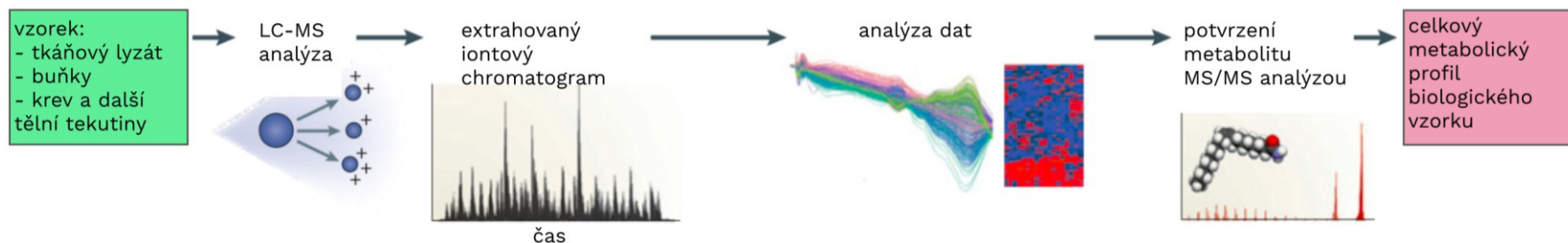
CÍLENÁ METABOLOMICKÁ ANALÝZA

Otázka:
Kolik je daného metabolitu ve vzorku?



NECÍLENÁ METABOLOMICKÁ ANALÝZA

Otázka:
Jaký je celkový metabolický profil vzorku?



Obrázek 4: Při cílené metabolomické analýze je nejprve standard metabolitu podroben měření pomocí selektivního záznamu vybrané reakce. Zde dochází k optimalizaci podmínek metody stanovení. Pro cílenou analýzu jsou dané metabolity nejprve extrahovány, následně analyzovány a konečně úplně kvantifikovány. V necílené metabolomické analýze jsou metabolity nejprve izolovány z biologických vzorků a následně analyzovány. Poté probíhá zpracování dat pomocí biostatistických a bioinformatických softwarů. Hodnota m/z sledovaných píků je dohledávána v databázích, aby byly identifikovány potenciální metabolity. K jednoznačné identifikaci metabolitů dochází až na základě srovnání MS/MS skenů a retenčních časů se standardy metabolitů. Upraveno dle [7].

Při necílené analýze jsou profilovány tisíce neznámých molekul přítomných v daný čas ve vzorku. Tento přístup má své využití při výzkumu nových, dosud neznámých metabolitů nebo celých metabolických drah, dále také pro výzkum potenciálních biomarkerů onemocnění. Při necílené analýze není zpočátku záměrem identifikovat jednotlivé metabolity, ale srovnávat relativní rozdíly výsledků při různých podmínkách (např. změna v reakci na onemocnění, expozici toxinům, změny v životním prostředí či genetické změny) nebo napříč populací. Metabolické otisky prstů tak lze využít jako diagnostický nástroj v klinické praxi, např. vyhodnocením metabolického otisku daného pacienta ve srovnání se zdravými a nemocnými subjekty. Použití výhradně metody otisku prstů bez identifikace metabolitů však slouží pouze jako klasifikační nástroj a nepřispívá k prohloubení biochemických znalostí a pochopení základních mechanismů v organismu. Znalost identity metabolitů a jejich kvantitativních odchylek pro popis rozdílů mezi jednotlivými fenotypy poskytuje informace, které lze interpretovat ve světle biochemických cest. Proto je potřeba identifikovat metabolity, které segmentují jednotlivé skupiny při použití metody otisku prstu, a vyvinout metody pro jejich kvantitativní analýzu. Metodu otisku prstu lze použít pro intracelulární metabolity v systémech buněčných kultur k získání cenných informací o jejich fenotypu a fyziologickém stavu tak, že jsou analyzovány extracelulární metabolity vylučované do kultivačního média nebo zaznamenávána absence či pokles množství metabolitů z média buňkami odebraných. Takovýto přístup je pak označován jako metabolická stopa (*metabolic footprinting*, viz tabulku 1) [2][4][8][11].

Při cílené analýze se vychází z předpokladu kompletních znalostí o daném metabolitu, který je při měření absolutně kvantifikován. Na základě kladené biologické otázky, kterou je potřeba zodpovědět, je vybírán konkrétní jeden či několik metabolitů. Následně je pro jejich hodnocení vyvíjena specifická analytická metoda. Protože je předem známá struktura a vlastnosti analytu, jsou voleny takové podmínky, aby pro zkoumanou molekulu bylo dosaženo co nejvyšší selektivity a citlivosti, a to při analýze velmi komplexních biologických vzorků. Obrovské pokroky v technologii za posledních několik let umožňují neustálé rozšiřování počtu analytů, které jsou kvantifikovány současně při jedné analýze. Technologicky je analýza jednoho biomarkeru často tak složitá jako profilování všech souvisejících klíčových metabolitů jedné biochemické dráhy. Lze se pak setkat i s termínem částečně cílená analýza, při které je jednoznačně

identifikováno a kvantifikováno velké množství molekul, na což by jinak muselo být použito stovek samostatných biochemických testů. Výsledky metabolického profilování jsou kvantitativní a ideálně nezávislé na technologii použité pro získání dat. V důsledku toho mohou být data zařazována do databází, které mohou být integrovány s mapami biochemických cest či jinými daty z „omických“ metod, což vede ke zlepšení porozumění biologických procesů [2][4][8][11].

3.2. Příprava vzorku

Příprava vzorku před samotnou metabolickou analýzou s využitím instrumentálních technik je důležitým a často naprosto nezbytným krokem před samotnou analýzou, která má za cíl buď identifikaci či kvantifikaci konkrétní skupiny metabolitů obsažených ve vzorku vzhledem k biologické hypotéze [5][12].

Ve složité biologické matrici, která je běžně využívána pro metabolické hodnocení, jakou jsou typicky plná krev, plasma, sérum, moč či sliny a jiné další tělní tekutiny se nachází velké množství interferujících složek. Jsou to nejčastěji soli, fosfolipidy, proteiny či syntetické polymery, které mohou ztěžovat či znemožňovat detekci analytu a působit problémy s instrumentací. Proteiny se vyznačují často nevratnou adsorpcí na stacionární fázi (SF) v koloně, což vede ke ztrátě účinnosti kolony a zvýšení zpětného tlaku, případně až k ucpání celé kolony. Dále může dojít k ucpání frity či nástřikové jehly. Soli a fosfolipidy pak působí matricovými efekty. Může jít jak o potlačení, tak zesílení ionizace metabolitu. Volba techniky přípravy vzorku je tak rozhodující pro správné a přesné výsledky analýzy, protože markery onemocnění v biologických vzorcích, jsou často přítomny ve velmi nízkých koncentracích vzhledem k interferujícím složkám matrice [4][12][13][14].

V necílené metabolomice je obecným principem při přípravě vzorku zachovat co nejvíce původní složení vzorku zamezením enzymové aktivity a chemické reaktivity. Zbytková enzymatická aktivita může významně změnit množství metabolitů ve vzorku před analýzou, což má za následek nesprávnou korelaci mezi pozorovaným metabolomem a skutečným metabolomem v době odběru vzorku. Metabolické procesy ve vzorku lze zastavit rychlou změnou teploty či pH. Při chlazení se využívá zmrazení kapalným dusíkem či sprejování chladného vodného roztoku methanolu (MeOH) nebo podchlazeného fyziologického roztoku. Při okyselení se využívá na příklad

perchlorovaných kyselin. Výzvou je také extrémně rychlá zástava enzymové aktivity, v případě potřeby sledování hladin metabolitů, jejichž přeměny jsou nesmírně rychlé (např. adenosintrifosfát či glukosa-6-fosfát). Problémem je také vedlejší neúmyslná degradace některých metabolitů (acidolabilní, termolabilní) či nekompatibilita s následnými kroky analýzy. V necílených metabolomických experimentech u biologických tekutin se tak většinou provádí neselektivní příprava vzorku jako je ředění a PP, které jsou rychlé, jednoduché a málo pracné, odstraňují nebo snižují obsah interferujících látek ve vzorku, jsou použitelné pro mnohé biologické matrice a pro širokou škálu metabolitů [4][5][8][14][15][16].

Poněkud jinak se postupuje při cílené analýze, kdy se volí vysoce selektivní extrakční technika pro stanovení metabolit nebo skupinu metabolitů. Příprava vzorku tak zahrnuje oddělení metabolitů od proteinů, které je většinou následováno LLE a/nebo SPE pro selektivní izolaci a zakoncentrování daných metabolitů. LLE a SPE jsou v porovnání s PP a ředěním náročnější jak časově, tak počtem prováděných kroků. Účinněji však zbavují vzorek interferujících látek a eliminují tak přítomnost matricových efektů. Konečným krokem je pak často odpaření a rekonstituce za účelem zakoncentrování cílených metabolitů, případně kompatibility rozpouštědla s chromatografickou analytickou metodou [4][5][16].

3.2.1. Precipitace proteinů

PP je často metodou volby přípravy vzorku v metabolomice, zejména necílené, protože ze vzorku pouze odstraňuje proteiny, zatímco malé molekuly zůstávají. Jako deproteinační činidla se nejčastěji používají organická rozpouštědla (např. acetonitril, aceton, MeOH). Důvodem jejich použití je, že precipitace s využitím tepla nebo anorganických kyselin snižuje pokrytí metabolomu. Organická rozpouštědla navíc také narušují vazby mezi mnoha metabolity a proteiny. Techniku lze využít jak u hydrofilních, tak lipofilních analytů. Nevýhodou je naopak nízká specifita a nízká míra čistoty vzniklého extraktu, tj. supernatantu, příp. filtrátu, a také fakt, že dochází k naředění vzorku, na rozdíl od LLE a SPE. Nečistý extrakt snižuje selektivitu metody a může tak být příčinou následných interferencí či matricových efektů. Nevýhodou může být také koprecipitace některých metabolitů či jejich špatná rozpustnost ve vybraném

rozpouštědle. Ke snížení hladiny metabolitů může také dojít kvůli jejich navázání na precipitát [5][12][17][18][19].

Automatizace, jako požadavek moderní metabolomické laboratoře a jako předpoklad pro zpracovávání velkých sad vzorků, byla zavedena i u PP. Dnes je k dispozici, jak poloautomatizovaná, tak plně automatizovaná podoba PP. Komerčně dostupné jsou systémy se dvěma 96-jamkovými mikrotitračními deskami umístěnými na sobě. Na dně vrchní (precipitační, PP) desky je umístěn filtr s velikostí pórů typicky 0,2 μm . Dolní deska slouží jako sběrná, pro zachycení filtrátu. Nejprve je do každé jamky vrchní desky nanášeno deproteinační činidlo (nejčastěji acetonitril) a následně vzorek. Celý systém se protřepe. Pak je pomocí vakua či na centrifuze oddělen filtrát od precipitátu. S využitím laboratorní robotiky lze tento postup plně automatizovat [5][12][17][19][20].

3.2.2. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny je relativně selektivní technika, poskytuje velice čisté extrakty a má vysokou výtěžnost. Pomocí LLE lze oddělit polární a nepolární metabolity. Proto je LLE často využívána v metabolomice k odstranění lipidů ze vzorku pomocí chloroformu, dichlormethanu či methyl-*tert*-butyletheru. Ve srovnání s konvenční SPE a PP je její hlavní výhodou při přípravě biologických vzorků nejnižší míra potlačení signálu iontu při detekci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) s elektrosprejovou ionizací. Nevýhodou LLE byla zejména potřeba většího množství vzorku a vysoká spotřeba toxických organických rozpouštědel, což už dnes s využitím mikro-uspořádání nemusí zcela platit. Nevýhodou je též obtížná extrakce hydrofilních látek. LLE je ale technikou volby pro analyty, které se ireversibilně adsorbují na povrch tuhé fáze v SPE [5][12][17][18][21][22][23].

Dlouho byla nevýhodou LLE též nemožnost automatizace. Dnes již však je k dispozici jak poloautomatizovaná LLE, tak plně automatizovaná LLE, která odstraňuje tři nesouvislé kroky poloautomatizované LLE. Těmi jsou: třepání na vortexu, oddělení fází na centrifuze a odběr organické fáze pomocí zmrazení vodné fáze. Oba přístupy využívají 96-jamkovou mikrotitrační desku. Jamky extrakční desky při plně automatizované LLE jsou naplněny křemelinou. Po nanášení vzorku je tento imobilizován mezi částicemi křemeliny a následně je nanášeno organické

rozpouštědlo. Pomocí mírného vakua na manifoldu dochází k prostupu organického rozpouštědla do vrstvy křemeliny, kde dochází na rozhraní fází k přechodu analytu z vodné do organické fáze. Kvůli popsanému principu extrakce s využitím křemeliny se tato technika označuje jako podporovaná LLE [5][20][21][22].

K extrakčnímu rozpouštědlu se někdy může přidávat aditivum (např. kyselina) pro zachování stability některých sloučenin (např. acetyl-koenzym A). Nutno však mít na paměti, že tato aditiva stabilizující jednu skupinu látek mohou současně působit degradaci jiných typů metabolitů a mohou působit celkové snížení citlivosti experimentu vlivem potlačení signálu iontu [4][20].

3.2.3. Extrakce na tuhou fázi

SPE využívá tuhou fázi čili sorbent neboli sorpční materiál k odstranění interferujících látek ze vzorku a zakoncentrování metabolitů. Na rozdíl od LLE tato technika nevyžaduje oddělení fází, což nevede ke vzniku chyb na základě proměnlivých či nepřesně odměřených objemů extraktů. Ve vývoji SPE je trendem zavádění nových formátů, hlavně pokročilých sorpčních materiálů, které vedou ke zlepšení selektivity či specifičnosti vůči metabolitům, mají vyšší sorpční kapacitu, či lepší fyzikálně-chemické či mechanické vlastnosti [17][24][25].

3.2.3.1. Sorbenty pro SPE

Sorbenty SPE existují v mnoha podobách. Jejich volba závisí na tom, zda se jedná o necílenou analýzu, kdy se použijí relativně neselektivní sorbenty, či cílenou analýzu, pro kterou je vybrán dle fyzikálně-chemických vlastností metabolitů selektivní sorbent [2][5][14][17][18][25][26].

Nejvyužívanějším formátem je reversní mód. Pro extrakci relativně nepolárních metabolitů z biologických vzorků je nejběžnějším sorbentem oxid křemičitý (silikagel) modifikovaný navázáním oktadecylových (C₁₈) či oktylových (C₈) zbytků na silanolové skupiny. Existuje mnoho dalších variant SPE na reversních fázích, kdy je silikagel modifikován navázáním ethylových, cyklohexylových, fenylových či kyanopropylových funkčních skupin [2][12][17][18][25][26].

Dále jsou dostupné iontově-výměnné materiály. Kationické metabolity (např. aminy) jsou kladně nabitě a extrahují se na katexech, které mají záporný náboj.

Anionické metabolity (např. karboxylové kyseliny) se naopak extrahují na anexech s nábojem kladným. U obou druhů ionexů pak lze rozlišit silné, ty jsou ionizovány téměř v celém rozsahu pH a slabé, které jsou ionizovány jen v určitém pH intervalu. Silným katexem je alkylsulfonovou kyselinou modifikovaný silikagel či polymer. Slabým katexem je alkylkarboxylovou kyselinou modifikovaný silikagel či polymer. Silné anexy typicky obsahují kvarterní amoniovou skupinu (např. trimethylamoniumpropylem modifikovaný silikagel), slabé anexy pak sekundární či terciární amin (např. diethylamoninopropylem modifikovaný silikagel) [2][12][17][25][26].

Normální fáze jsou v porovnání s reversním módem málo časté. Jako SF lze využít nemodifikovaný silikagel, či silikagel modifikovaný navázáním např. aminopropylu, kyanopropylu či zbytku dvojsytného alkoholu (diolu) [17][24][25][26].

Vlastnosti polymerních fází se odvíjejí od obsažených monomerních jednotek. Častým polymerním komerčně dostupným materiálem je polystyren-divinylbenzen, který díky hydrofobním interakcím zadržuje nepolární metabolity. Vedle toho kopolymer tvořený monomery divinylbenzenu a N-vinylpyrrolidonu může díky hydrofobním interakcím divinylbenzenových jednotek zadržovat nepolární metabolity a díky jednotkám N-vinylpyrrolidonu i metabolity polární [2][12][17][24][26][27].

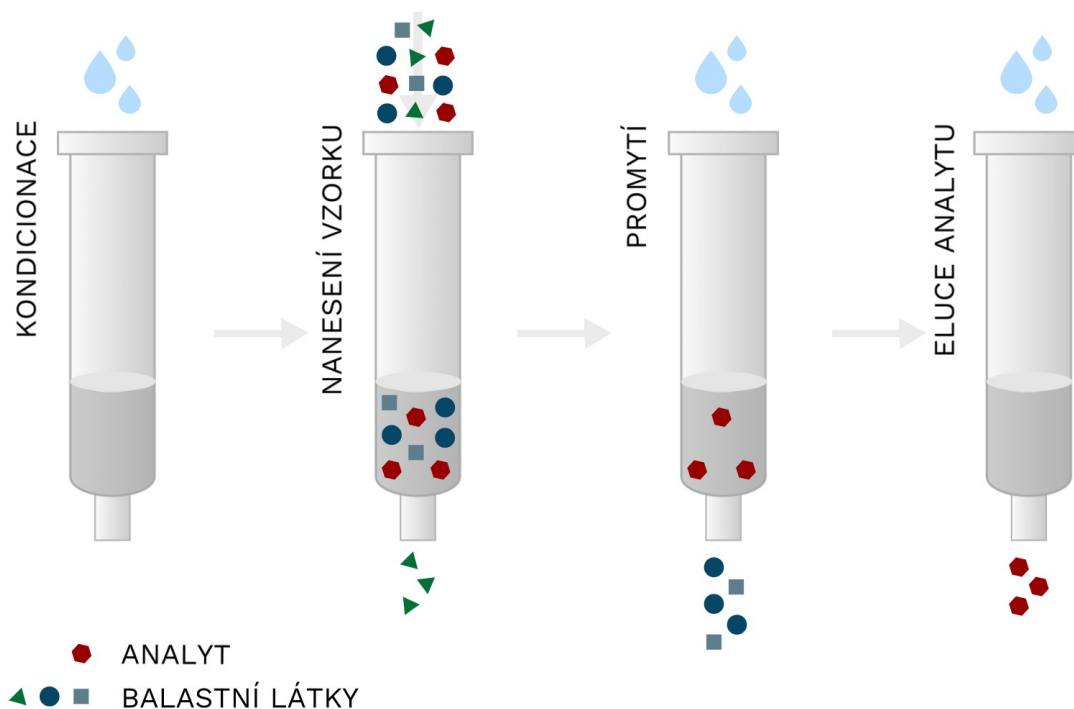
Novými trendy jsou tzv. vícemodální sorbenty, které obsahují jak RP, tak iontově-výměnnou skupinu (katex, anex, či oba) a pro široké pokrytí metabolomu mají potenciál využití zejména pro metabolický otisk prstu. Využití nacházejí také nové monolitické sorbenty či molekulárně vtištěné polymery (MIP). Dalším typem sorbentů jsou pak anorganické oxidy kovů jako je titan, zirkonium, cerium, germanium a hliník a jejich směsi [2][12][17][18][24][26][27].

3.2.3.2. Postup přípravy vzorku metodou SPE

Postup přípravy vzorku SPE technikou zahrnuje kroky 1.–6. a schematicky je znázorněn na obrázku 5:

1. **Aktivace sorbentu** neboli solvatace sorbentu, resp. funkčních skupin sorbentu je aktivace do podoby, ve které bude docházet k retenci analytu.
2. **Kondicionace SF** má za cíl vytvoření rovnováhy na fázovém rozhraní, aby odpovídala situaci při následném nanesení vzorku.
3. **Nanesení vzorku.**

4. **Promývání** je jeden či více procesů, kdy dochází pomocí jednoho či více promývacích systému k odstranění interferujících látek ze vzorku, které neinteragují, nebo jen minimálně interagují s funkčními skupinami sorbentu, na rozdíl od analytu.
5. **Sušení** je potřeba provést v případě, že budoucí eluční činidlo není kompatibilní s promývacím systémem.
6. **Eluce analytu** zahrnuje nanesení elučního činidla. Dochází k zániku interakcí analyt-funkční skupiny SF a uvolnění analytu ze sorbentu. Je-li zvolené eluční činidlo kompatibilní s finální analytickou metodou, lze eluát rovnou analyzovat. V opačném případě je potřeba rozpouštědlo odpařit a vzorek rekonstituovat ve vhodném rozpouštědle [17][20].



Obrázek 5: Základní schéma provedení SPE. Autor: Jakub Eduard Syřínek, 2019.

3.2.3.3. Formáty přípravy vzorku metodou SPE

V metabolomice se běžně užívají SPE kolony a SPE disky. Využity byly také SPE předkolony v rámci on-line spojení SPE s LC-MS. On-line systém spojení přípravy vzorku, separace i detekce je vhodný zejména pro metody cílené analýzy. Bylo popsáno, že tato platforma snižuje účinky potlačení signálu iontů a zvyšuje životnost kolon. Komerčně

dostupné jsou také 96-jamkové destičky pro SPE, které jsou schopny odstranit z biologického vzorku proteiny i fosfolipidy během jediného kroku. Tento design SPE vychází z požadavku na automatizaci při zpracovávání velkého počtu vzorků a je takto dosahováno vyšší přesnosti, správnosti a reprodukovatelnosti výsledků analýzy [2][5][24][28].

3.2.3.4. Mikroextrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček plněných sorbentem

Výsledkem miniaturizace v oblasti přípravy vzorků s cílem snížit množství rozpouštědel potřebných pro tento krok analýzy, a také potřeby nižšího množství vzorku, je zavedení mikroextrakce na tuhou fázi pomocí pipetovacích špiček plněných sorbentem (μ SPE-PT) [24][29].

Principiálně se jedná o klasickou SPE. Sorbent je umístěn přímo v plastové špičce, která se nasazuje na pipetor automatické pipety, a to ať už jednobáňové či vícebáňové. Dalším způsobem je postupné nanášení jednotlivých činidel do pipetovací špičky shora s následnou centrifugací v jednotlivých krocích. Tento design SPE si velice rychle získal oblibu nejen proto, že menší množství sorbentu vedlo ke snížení potřebných množství organických rozpouštědel během celého procesu přípravy vzorku a tím snížení nákladů, ale i spojení extrakce a purifikace do jednoho kroku, které vedlo ke snížení času potřebného v tomto kroku analýzy. Menší množství získaného eluátu vede k rychlejšímu odpaření pro následnou rekonstituci, což vede v tomto případě k další časové úspoře. Pokud není potřeba vzorek dále centrifugovat či provádět odpaření, lze tento přístup snadno automatizovat a eluát, přímo nastříkovat do LC či GC systému. V současné době existuje mnoho typů sorbentů v komerčně dostupných špičkách s objemem od 1 do 200 μ l. Protože je tento přístup vhodný pro extrakci velice malých množství a koncentrací analytů nachází uplatnění zejména v analýzách metabolomických, genomických a proteomických [24][29][30][31][32].

3.3. Chromatografické metody

Chromatografická separace vzorku často řeší mnohé zásadní nevýhody přímého nástřiku vzorku do systému hmotnostního spektrometru. Mezi ty nejdůležitější patří potlačení ionizace, isobarické interference a často lze také pomocí chromatografické

metody separovat isomery. Kromě toho analytická separace vede také ke zlepšení detekčních limitů a zvýšené kvalitě získaných dat v důsledku snížení šumu pozadí [2][33].

Jelikož se metabolomické studie soustředí na malé molekuly, které se však často diametrálně odlišují svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, zejména polaritou/hydrofobicitou a nábojem, neexistuje zatím žádná zcela univerzální chromatografická metoda pro separaci celé škály metabolitů [34].

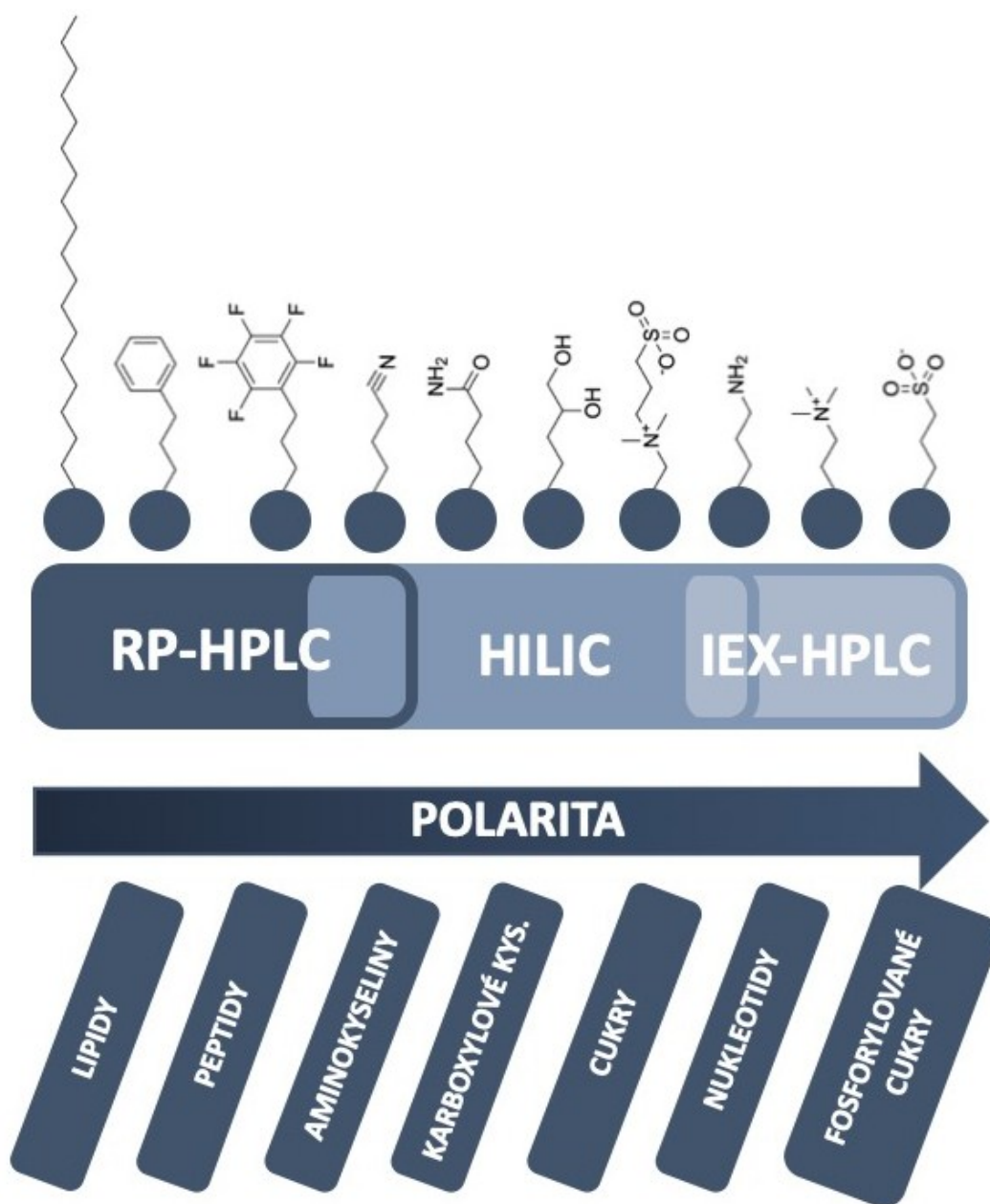
3.3.1. Plynová chromatografie

Podmínkou využití GC jsou tepelně stabilní a těkavé metabolity. Těkavé metabolity s nízkou molekulovou hmotností mohou být analyzovány přímo, většina metabolitů však vyžaduje chemickou derivatizaci, aby bylo dosaženo potřebné těkavosti a termostability. Derivatizace je u většiny metabolitů dvoustupňová. Nejdříve jsou karbonylové skupiny převedeny na oximy pomocí alkoxyaminů. V druhém kroku jsou aktivní vodíky v polárních funkčních skupinách ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) nahrazeny trimethylsilylovou skupinou pomocí N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamidu. Silylace snižuje polaritu a zvyšuje tepelnou stabilitu a těkavost širokého spektra metabolitů. Některé metabolity mohou tvořit řadu derivatizačních produktů. Nevýhodou silylace je citlivost k přítomnosti vody, která vede k hydrolýze derivátů, což ale lze výrazně omezit sušením. Na druhou stranu může extensivní sušení vést ke ztrátě značně těkavých metabolitů. V metabolomice byly použity i další derivatizační postupy, jako alkylace a esterifikace. Aplikace GC-MS (viz 3.4.2.1.) je značně rozšířená zejména v rostlinné metabolomice. Pomocí GC-MS lze po derivatizaci snadno analyzovat extrakty rostlinných tkání v chloroformu a methanolu a snadno tak identifikovat i stanovit mnohé rostlinné metabolity. Důležitým nástrojem je však i v metabolomických analýzách biologických tekutin či dechu. Do budoucna se také počítá s využitím dvourozměrné GC pro zvýšení kapacity separace a citlivosti metody. Ty jsou pro metabolity, jež jsou v komplexních biologických vzorcích přítomny ve velmi malém množství, při použití konvenční GC nedostatečné [2][3][35][36][37].

3.3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V metabolomice se dnes zcela běžně využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s velikostí částic náplňových kolon 3–5 μm . Ve spojení s MS detekcí se

běžně využívá kolonových formátů s vnitřním průměrem 2,1–4,6 mm a délkou 50–250 mm. Konvenční HPLC je často nedostatečná pro separaci komplexních biologických vzorků, což vede ke špatnému rozlišení metabolitů. Důvodem špatného rozlišení zejména blízkce příbuzných metabolitů je nízká kapacita separace. Jedním z přístupů ke zvýšení chromatografického rozlišení a kapacity separace je použití menších částic v náplňových kolonách, jako jsou částice o průměru 1,7 μm , využívané v UHPLC (viz 3.3.5.). Na obrázku 6 jsou pak přehledně shrnuty využívané chromatografické módy a příklady tříd metabolitů, které s jejich využitím lze separovat [33][38][39][40][41].



Obrázek 6: Srovnání využití jednotlivých typů chromatografických módů (RP-HPLC, HILIC, IEX-HPLC) pro různé typy metabolitů lišící se svou polaritou. Schematicky jsou znázorněny používané typy SF v příslušných módech a v závislosti na polaritě třídy metabolitů. Přepracováno dle [41].

3.3.2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reversních fázích

V metabolomice je často využívána HPLC na reversních fázích (RP-HPLC). Nejčastěji využívanými jsou SF C₁₈ a C₈. Většina aplikací RP-HPLC v metabolomice dnes využívá gradientové eluce s dobou analýzy od několika minut po několik hodin. RP-HPLC je standardním nástrojem pro separaci středně polárních a nepolárních metabolitů. Problém nastává u velmi polárních metabolitů, které se za takových podmínek z RP chromatografického systému eluují v mrtvém objemu. Široké rozpětí fyzikálně-chemických vlastností metabolitů neumožňuje zavedení jedné zcela obecné SF pro jejich separaci. Popsáno bylo například využití kombinace tří SF s RP na bázi modifikovaného silikagelu, a to C₁₈, amino a fenyl-hexyl [34][38][42][43][44].

3.3.2.2. Iontově párová HPLC

Dalším přístupem je v metabolomice RP-HPLC s využitím iontově párových činidel (protiiont). Nejčastěji využívanou SF pro iontově párovou HPLC (IP-HPLC) je C₁₈. Pro separaci širokého spektra záporně nabitých metabolitů (např. nukleotidů, karboxylových kyselin či fosforylovaných cukrů) lze využít aminová činidla pro tvorbu iontových párů. Tato metoda využívá například tributylamin či hexylamin, které tvoří iontové páry s negativně nabitými molekulami metabolitů, čímž se výrazně zlepšuje retence a potažmo separace na RP. Ve srovnání s HILIC poskytuje IP-HPLC na RP lepší separaci a vyšší signál pro negativně nabitě metabolity. Tato lepší citlivost může být z části způsobena lepší separací, která vede ke snížení možného potlačení signálu iontů koeluuujících látek. Při použití tributylaminu jako protiiontu není zcela vhodné použití ve spojení s pozitivním módem MS, z důvodu možnosti potlačení ionizace. Protože aminová iontově párová činidla fungují pouze u záporně nabitých metabolitů, je pro kladně nabitě metabolity potřeba jiných činidel. V separaci peptidů byly použity perfluorované kyseliny, jako kyselina trifluoroctová či kyselina heptafluormásečná či nonafluorvalerová. Poslední dvě jmenované perfluorované karboxylové kyseliny byly přidány do mobilní fáze (MF) pro zlepšení retence a separace při použití RP v kombinaci s chemickou ionizací za atmosférického tlaku v MS. Bohužel při použití elektrospreje jako ionizační techniky dochází při použití perfluorovaných kyselin k potlačení signálu iontu. Obecně nutno říci, že ač jsou iontově párová činidla účinným nástrojem pro chromatografickou separaci, jen některá je možno použít ve spojení s MS. Mnohá

iontově párová činidla kontaminují hmotnostní spektrometr, dochází k potlačení signálu, a to s přetrvávajícím efektem, a možné čištění systému je náročné [34][45][46][47].

3.3.2.3. Hydrofilní interakční chromatografie

Zajímavou alternativou pro separaci velmi polárních a iontových metabolitů je využití hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). Jako stacionární fáze zde slouží silikagel, respektive derivatizovaný silikagel nesoucí volné aminoskupiny, amidoskupiny, dioly, polysulfoethyl-aspartamidové skupiny, polyhydroxyethyl-aspartamidové skupiny či sulfoalkylbetainové skupiny. V tomto ohledu HILIC připomíná chromatografii na normálních fázích. Jako mobilní fáze v HILIC však slouží systém rozpouštědel s nízkým obsahem vodné, a naopak vysokým obsahem organické složky. Díky určitému podílu vodného rozpouštědla dochází na povrchu stacionární fáze k interakcím mezi molekulami vody a polárními funkčními skupinami stacionární fáze, čímž se utváří stálá vrstva vodného rozpouštědla na povrchu stacionární fáze a umožňuje tak rozdělování a retenci polárních analytů [34][48][49].

Jak je naznačeno výše, HILIC je skvělým nástrojem pro separaci vzorků obsahujících převážně polární metabolity, jako je například moč. Je potvrzeno, že technika HILIC je komplementární k RP-HPLC, proto je výhodou využít kombinaci obou technik právě v metabolomice, např. v případě metabolického otisku prstu. V metabolomice bylo popsáno využití paralelních chromatografických metod. Na oddělených LC-MS systémech byla použita jednak HILIC v kombinaci s pozitivním ionizačním módem a jednak RP-HPLC s tributylaminem, coby iontovým párovým činidlem, v kombinaci s využitím negativního módu ionizace [34][50][38].

Vysoká rozsah pokrytí metabolomu (tj. počet nalezených rozličných metabolitů) byla dosažena též kombinací separace na RP-HPLC s využitím C₁₈ SF a HILIC s využitím sulfobetainových funkčních skupin [43].

3.3.2.4. Iontově výměnná HPLC

Pro separaci vysoce polárních metabolitů, jako jsou organické kyseliny, cukry, nukleotidy či fosforylované cukry, lze využít iontově výměnnou HPLC (IEX-HPLC). Součástí SF při využití IEX-HPLC jsou iontoměniče (anexy, katexy). Hlavní nevýhodou je

nutnost využití rozpouštědel s vysokým obsahem netěkavých anorganických solí, což významně komplikuje spojení s hmotnostní detekcí. V případě využití IEX-HPLC bylo v metabolomických experimentech využito fluorometrické či ultrafialové spektrofotometrické detekce. To je zřejmě hlavním důvodem marginálního využití tohoto chromatografického módu v metabolomice [48][51][52].

Popsáno bylo využití smíšeného módu využívajícího kombinace RP a slabého anexu. Tato kombinace poskytovala uspokojivou chromatografickou selektivitu pro strukturální isomery fosforylovaných sacharidů. Pro detekci byl využit aerosolový detektor nabitých částic [53].

3.3.3. Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

Reakcí na neustále rostoucí počet vzorků a požadavky na zrychlení doby analýzy při zachování či zvýšení separační účinnosti LC metody je využití UHPLC. Ve srovnání s monolity a vysokoučinnou kapalinovou chromatografií při vysoké teplotě (HTLC) (viz 3.3.7.) byly náplňové kolony s částicemi menšími než 2 μm vyhodnoceny z kvalitativního hlediska jako nejlepší řešení zkrácení doby analýzy při zachování separační účinnosti. Pro UHPLC jsou dostupné stejné typy SF jako pro HPLC (viz 3.3.2.1–3.3.2.3.). Jak vyplývá z van Deemterovy křivky pro částice menší než 2 μm je optimální separační účinnost (tj. nízká hodnota výškového ekvivalentu teoretického patra) dosahována v širokém rozsahu lineárních průtokových rychlostí. Proto mohou být plně porézní částice menší než 2 μm použity pro dosažení lepší účinnosti, lepšího rozlišení píků, zkrácení doby analýzy a snížení spotřeby organických rozpouštědel. Vhodné, v metabolomice dnes využívané zejména pro separace lipidů, je využití povrchově porézních částic. Díky lepší účinnosti UHPLC ve srovnání s HPLC lze také výrazně zkrátit délku kolony. Pro metabolomické hodnocení má využití UHPLC nespornou výhodu ve vyšším rozlišení oproti konvenční metodě HPLC, proto lze rozlišit i blízké příbuzné metabolity. UHPLC tak přináší možnost vysoké kapacity separace a vysoké citlivosti v kombinaci s krátkým časem (díky zkrácení délky kolony) analýzy, čímž se z ní v kombinaci s MS detekcí stává nepostradatelný nástroj pro mnoho metabolomických aplikací, včetně rychlého screeningu. I díky široké škále komerčně dostupných typů kolon je UHPLC-HRMS dnes v metabolomické analýze zlatým standardem [2][17][33][34][54][55][56][39].

3.3.4. Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie

Vedle paralelního použití několika chromatografických metod byly popsány také dvourozměrné chromatografické přístupy. V tomto případě jsou dva LC systémy, využívající různých podmínek separace (např. SF, MF, lineární průtoková rychlost) zapojeny tak, že nejdříve probíhá separace na jednom z nich a následně je eluát separován s využitím druhého systému. Oba chromatografické režimy by měly být ortogonální, tedy využívají separační mechanismy, které jsou na sobě zcela nezávislé. Dostupné jsou on-line 2D-LC systémy, kde jsou eluované frakce z první dimenze pomocí přepínacího ventilu přímo vedeny do druhé dimenze, přičemž současně stále probíhá separace v prvním LC systému. Dvoudimenzionální chromatografická metoda zlepšuje kapacitu separace. Na druhou stranu nevýhodou tohoto přístupu je dlouhá doba analýzy, protože každá frakce z první kolony je následně separovaná na koloně druhé. Jako příklad dvoudimenzionální separace lze uvést kombinaci IP-HPLC (kvarterní aminoskupina) a RP-HPLC (C₁₈), která byla využita pro analýzu metabolitů Langerhansových ostrůvků [34][57][58].

3.3.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie při vysoké teplotě

Zajímavou možností, jak při zachování účinnosti separace na koloně pro konvenční vysokoučinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) snížit čas analýzy je využití HTLC. Při vyšší teplotě dochází ke snížení viskosity MF, a tedy i poklesu zpětného tlaku. Dále také umožňuje snížit množství organických rozpouštědel v MF (tzv. „zelená chemie“). Vyšší teploty může být také využito jako separačního parametru pro zvýšení selektivity. Hlavní nevýhodou tohoto přístupu je poměrně vysoká teplota, při které přestává být klasický silikagel stabilní a pochopitelně nemožnost využití pro termolabilní analyty. HTLC také vyžaduje speciální instrumentaci k temperaci kolonového prostoru na potřebnou teplotu. Ukázalo se, že teplota je v mnoha případech flexibilnějším a snadněji nastavitelným parametrem než hodnota pH, čímž lze docílit velmi kvalitních a robustních separačních metod. V metabolomice byla HTLC použita například při metabolickém profilování moči. V případě analýzy vzorků plasmy se ale HTLC neosvědčila. S využitím vody i při vysoké teplotě (180°C) nebyly eluovány hydrofobnější metabolity. To je vedle nedostupnosti komerčních LC systémů pro separaci při vysoké teplotě důvodem minoritního využití HTLC v metabolomice [54][59][60][61][39].

3.3.6. Kapilární chromatografie

Kromě již zmíněné UHPLC a 2D-LC mohou být ke zvýšení pokrytí metabolomu použity kapilární kolony. S jejich využitím lze dosáhnout zvýšení citlivosti, zvýšení rozlišení a vyšší kapacity separace, jež vedou k vyššímu počtu detegovaných metabolitů. Tento přístup vede také ke zlepšení ionizační účinnosti elektrospreje, ke zlepšení tvaru píků a samozřejmě k menší spotřebě vzorku. Z těchto důvodů se kapilární kolony dnes běžně používají v proteomice. Důvodem pro to, že není běžně zavedena v metabolomice je zřejmě to, že metabolomické studie využívaly většinou vzorky, kterých byl relativní dostatek (rostliny, mikroby, tělesné tekutiny). Kapilární chromatografie má potenciál analyzovat zejména vzorky, které lze získat pouze v limitovaném množství včetně specifických tkání (např. embrya, neurony či buňky Langerhansových ostrůvků) [42][43][57].

3.3.7. Monolitické kolony

Další zajímavé trendy v LC zahrnují využití monolitických kolon. Takové kolony přinášejí výhody proti běžným náplňovým kolonám pro HPLC. Díky makropórum je umožněn vysoký průtok MF, což zrychluje převod hmoty mezi MF a SF. Díky mesopórum má monolit obrovský povrch, a tedy vysokou separační kapacitu. Tyto vlastnosti umožňují monolitickým kolonám vysokou rychlost průtoku MF, která ale na rozdíl od náplňových kolon není spojena s přílišným zvýšením tlaku ani ztrátou separační účinnosti. Navíc mohou být využity ve formátu kapilárních kolon, což přináší výše zmíněné výhody (viz 3.3.6.). Vzhledem k obrovskému počtu dostupných monomerů mohou být syntetizovány monolity s takřka neomezenými možnostmi funkčních skupin na povrchu SF. Byly popsány mnohé způsoby přípravy monolitu přímo v laboratoři, což umožňuje připravit SF přesně potřebnou pro danou analýzu. Monolity na bázi oxidu křemičitého byly použity například k separaci metabolitů léčiv. Pro metabolomiku je také významná možnost sériového spojení několika monolitických kolon, které tak generují vysokou separační účinnost (počet teoretických pater > 100 000) [42][54][59][62].

3.3.8. Superkritická fluidní chromatografie

SFC si získala a stále si drží své místo v metabolomice zejména pro svou schopnost separace jednotlivých tříd lipidů, která je při využití RP-HPLC problematická. V SFC je MF tvořena tekutinou, nejčastěji CO₂, v nadkritickém stavu. Za těchto podmínek má CO₂ viskozitu a difuzivitu jako plyn a hustotu a rozpouštěcí schopnosti jako kapalina. Protože CO₂ vykazuje nepolární vlastnosti provádí se separace obvykle s přidavkem polárnějšího organického rozpouštědla (většinou 2–50 % MeOH či ethanolu). To vede ke kontinuální změně vlastností MF na podmínky, které se označují jako podkritické. V metabolomických analýzách se jako SF nejčastěji využívá C₁₈, díky jednoduchému separačnímu mechanismu a širokému pokrytí separačních podmínek. Pro metabolomiku bylo důležité zavedení používání chromatografických kolon s částicemi menšími než 2 μm v SFC, což umožnilo výrazně zrychlit analýzu. Analogicky jako v LC pak tuto techniku označujeme jako ultra-vysokoúčinnou superkritickou fluidní chromatografii (UHPSFC). UHPSFC byla ve spojení s MS využita v metabolomice např. pro separaci 30 tříd lipidů v extraktech prasečího mozku či metabolickém profilování psí žluči. UHPSFC lze využít i pro analýzy středně až vysoce polárních látek. V takovém případě je nutné přidání polárních aditiv (např. amonných solí) do MF. Bylo tak již popsáno použití UHPSFC pro metabolické profilování lidské moči. Lze předpokládat, že se UHPSFC v budoucnu uplatní nejen v lipidomice, ale i mapování polárních metabolitů [39][63][64][65][66].

3.4. Hmotnostní detekce

Hmotnostní detekce se pro metabolomiku stala zcela nepostradatelným nástrojem. Pro kombinaci vynikající citlivosti a selektivity po chromatografické separaci se stala MS v metabolomice detekční metodou volby [36][38][39].

Detekční alternativou MS je laserem indukovaná fluorescence. Je jednou z nejcitlivějších technik, za to ale postrádá chemickou selektivitu, která je nezbytná pro strukturální identifikaci. Moderní MS poskytuje vysoce specifické chemické informace, které přímo souvisí se strukturou molekuly, jako je správná hmota, rozdělení isotopů pro stanovení elementárního složení, a také charakteristika fragmentových iontů pro objasnění struktury či potvrzení identity při shodě spekter s daty uvedenými v

knihovnách. Vysoká citlivost MS navíc umožňuje detekci a měření mnoha primárních a sekundárních metabolitů s limity detekce v řádech pikomolů (10^{-12} mol) a femtomolů (10^{-15} mol). MS dnes nabízí řadu technologií, které se liší v ionizační technice, typu hmotnostního analyzátoru, rozlišovací schopnosti a správnosti určení hodnoty m/z . Spojení MS se separací s vysokým rozlišením jako je GC, HPLC, UHPLC, SFC či CE nabízí podstatné zvýšení počtu detegovaných metabolitů, kterého nelze dosáhnout přímým použitím MS či NMR [36][38].

3.4.1. Přímá MS analýza

Při přímém nástřiku do hmotnostního spektrometru (DI-MS) je vzorek bez předchozí separace zaveden přímo do jeho systému. V porovnání s ostatními aplikacemi MS detekce tento přístup poskytuje nejméně informací, je však výkonným screeningovým nástrojem a citlivou metodou pro metabolický otisk prstu. Často je jedinou praktickou volbou pro obrovské počty vzorků, například během klinických testů. Využití DI-MS v metabolomice se rozšiřuje také se zavedením pokročilých přístrojů schopných měřit s vysokým rozlišením a vysoce správným určením hmoty, jako jsou iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a orbitální past. Nevýhodou DI-MS bez spojení se separační technikou je nemožnost rozlišit isomery, protože mají, jak vyplývá z jejich definice, stejnou molekulovou hmotnost. Jedinou možností rozlišení isomerů DI-MS je, že budou poskytovat odlišná fragmentační spektra. Nakonec je však velice náročná i interpretace dat z DI-MS analýzy, protože často lze stěží rozlišit ionty některých metabolitů od iontů aduktů či produktových iontů [36][38][67].

V přímé metabolické MS analýze si své místo nacházejí i ambientní ionizační techniky. Takové techniky lze využít k monitorování hladin léčiv a jejich metabolitů např. v suché kapce krve, ovšem s omezenou možností kvantifikace. Nově se takto začínají identifikovat a stanovovat i endogenní metabolity s cílem usnadnit klinickou diagnostiku komplexních onemocnění. Pro metabolické analýzy byly použity ionizace desorpce laserem za účasti matrice (MALDI), ionizace desorpce elektrosprejem (DESI) a extrakční ionizace elektrosprejem (EESI) [36][38][68].

3.4.1.1. Iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací

Společně s orbitální pastí se jedná o hmotnostní analyzátor, kde probíhá zároveň detekce iontů (není již přítomen fotonásobič). Vzorek je přímo nastříkovan do systému s elektrosprejovou ionizací (ESI). Nevýhodou je náchylnost k potlačení ionizace, která vzniká konkurencí při ionizaci s dalšími složkami matrice (iontové sloučeniny, nabitě organické sloučeniny, organické kyseliny/zásady, fosfolipidy a hydrofobní sloučeniny) [36][38].

Detekce je založena na měření proudu indukovaného ionty na detekčních deskách. Výsledkem je interferogram popisující superpozice frekvencí všech iontů v cele, který je Fourierovou transformací převeden na hmotnostní spektrum, tedy závislost intenzity signálu na m/z . FT-ICR je důležitým a výkonným nástrojem v přímých MS analýzách díky ultra-vysokému rozlišení ($RP > 1\,000\,000$) a správnosti určení hmoty (< 1 ppm), pročež byla také využita ve studiích metabolického otisku prstu. Vysoké hmotnostní rozlišení je užitečné při identifikaci sloučenin a umožňuje analýzu i poměrně složitých směsí. V cele pasti je také možno izolovat iont prekurzoru ze směsi a následně provést jeho fragmentaci. Nevýhodou této metody je vysoká pořizovací cena instrumentace, stejně jako její provoz, což znemožňuje její rutinní užití v mnoha metabolomických laboratořích [36][38][67][69][70].

3.4.1.2. Orbitální past

Orbitální past je relativně novější hmotnostní analyzátor, který využívá pro zachycení iontů elektrostatické pole. Hodnoty m/z jsou zaznamenávány na základě frekvence harmonických oscilací iontů podél osy elektrického pole orbitálně zachycených iontů. Vyznačuje se vysokou rozlišovací schopností (typicky RP kolem 150 000) a vynikající správností určení hmoty (1–5 ppm). Pro výrazně nižší pořizovací náklady v porovnání s FT-ICR je mnohem více používána. Proto je také popsáno jeho využití v přímé MS analýze lipidů, rostlinných metabolitů či metabolitů v antidopingovém screeningu [36][38][70][71].

3.4.1.3. Ionizace desorpcí laserem za účasti matrice

MALDI je velice oblíbenou analytickou metodou pro analýzu biopolymerů včetně proteinů a peptidů. V metabolomice se MALDI většinou omezuje na analýzu metabolitů

s vysokou molekulovou hmotností, a to v důsledku značných maticí generovaných signálů v pozadí v oblasti nízkých molekulových hmotností ($m/z < 1000$). Současné trendy ve využití laserových desorpčních technik zahrnují desorpční ionizaci ze silikonových čipů či matrice, které generují minimum signálů na pozadí v oblasti nízkých hodnot molekulových hmotností. Tyto nové přístupy přinášejí nové příležitosti pro využití MALDI ve screeningu metabolitů a metabolickém otisku prstu. Tuto metodu lze také využít k zobrazování prostorového rozložení výskytu vybraných metabolitů například v tkáňových řezech [36][38][68][72].

3.4.1.4. Ionizace desorpcí elektrosprejem

DESI je měkká ionizační technika, která kombinuje vlastnosti elektrospreje a desorpční ionizace. Pomocí elektrosprejového emitoru je generován sprej nabitých mikrokapiček, které směřují na povrch vzorku, kde dochází k desorpci iontů analytů, které jsou dále vedeny do MS analyzátoru. Výhodou je také, že DESI téměř nevyžaduje úpravu vzorku. DESI ionizuje jak malé molekuly, tak makromolekuly a obvykle dává vzniknout vícenásobně nabitým iontům. Zdá se, že při využití DESI nejsou v porovnání s ESI přítomny maticové efekty, avšak její kvantitativní přesnost je ve srovnání s ESI nižší. Podobně jako MALDI, také DESI lze využít pro zobrazování přítomnosti metabolitů v biologických tkáních. Slibným polem pro uplatnění DESI je *in vivo* metabolomika, což již bylo prokázáno přímým metabolickým profilováním rostlinných tkání [36][68][73].

3.4.1.5. Extrakční ionizace elektrosprejem

EESI je technikou, která využívá dva sprejové emitory. Jeden rozprašuje roztok vzorku a druhý – elektrosprej – nabitě mikrokapičky ionizačního činidla. Oba spreje se protínají, čímž dochází k přenosu náboje z mikrokapiček a ionizaci molekul analytů. Přesný mechanismus ionizace ještě nebyl objasněn, ale je zřejmé, že ionizační proces závisí na extrakci z kapaliny do kapaliny při srážkách mikrokapiček spreje vzorku a nabitými mikrokapičkami ionizačního činidla. Výhodou EESI je schopnost analyzovat složité biologické vzorky jako je sérum či moč zcela bez, případně s minimální úpravou vzorku. Dlouhodobá stabilita spreje EESI je velice slibná pro metabolomiku, kde je potřeba analyzovat velká množství vzorků, protože EESI významně snižuje počet

přerušení sběru dat z důvodu nutnosti častého čištění iontového zdroje. Další výhodou této metody je možnost využití k přímé analýze plynných vzorků [36][38][74].

3.4.2. Chromatografie spojená s MS

Hloubka pokrytí metabolomu a biologický kontext přímých MS technik jsou relativně nízké. Dále také MS sken nedokáže rozlišit isobarické molekuly, stejně jako strukturální isomery či enantiomery. Proto byly do strategie metabolomické analýzy zařazeny četné chromatografické metody pro zvýšení hloubky pokrytí metabolomu a poskytnutím dalšího kvalitativního parametru – retenčního času, pomocí něhož lze také charakterizovat a rozlišit velké množství metabolitů, včetně isomerů. Chromatografická separace současně snižuje množství a chemickou rozmanitost molekul vstupujících najednou do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Tím se významně snižují možnosti a účinky kompetitivní ionizace a potlačení ionizace [36][39].

3.4.2.1. Spojení plynové chromatografie s MS

GC-MS je jednou z nejrozšířenějších analytických technik v metabolomice. Kombinuje vysokou účinnost a rozlišení GC (viz 3.3.1), které jsou nezbytné pro komplexní metabolické profilování, s vysokou citlivostí hmotnostní detekce. Využívá se pro kvalitativní i kvantitativní metabolomickou analýzu s vysokou reprodukovatelností a nižšími náklady ve srovnání s LC-MS [36][38].

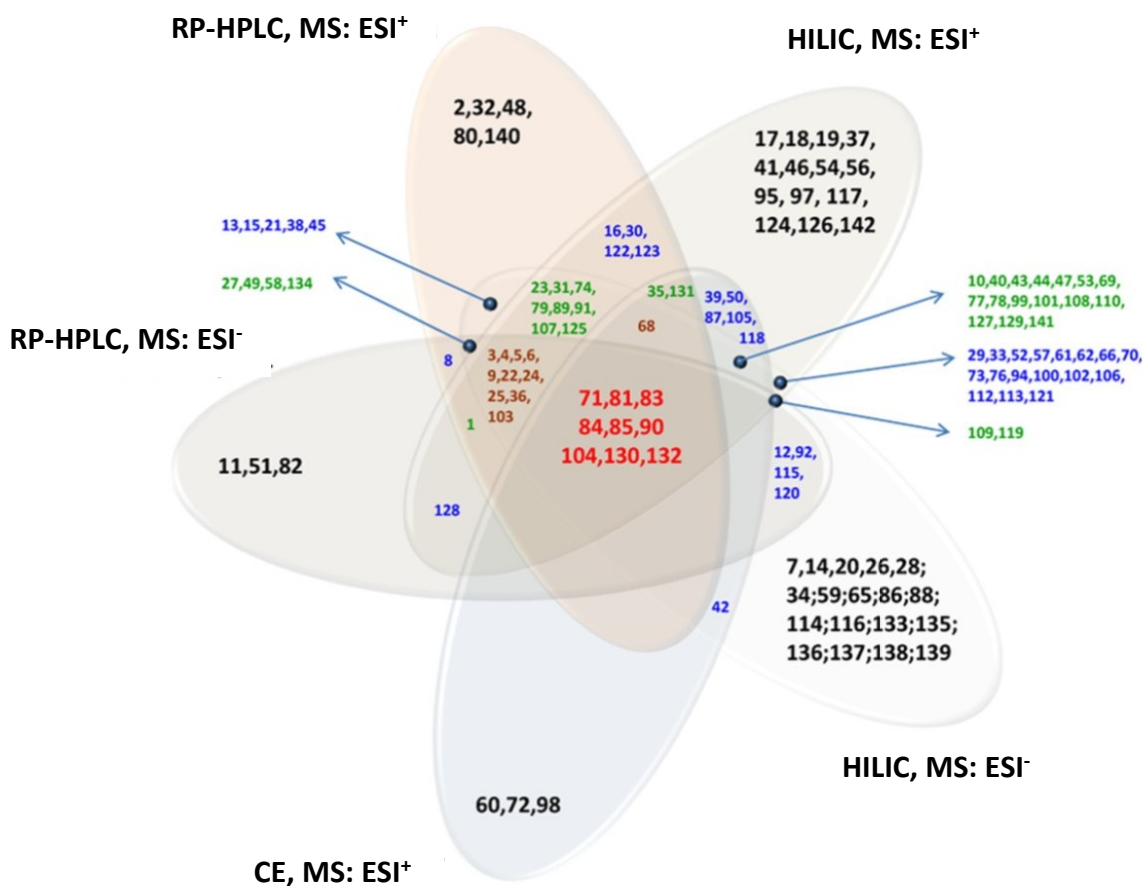
Nejběžnější ionizační technikou pro spojení GC-MS je elektronová ionizace, což je tvrdá ionizační technika, při které dochází k fragmentaci molekulárního iontu. Výhodou jsou podrobně popsána pravidla fragmentace pro jednotlivé třídy látek. GC se tradičně spojuje s kvadrupólem (Q), který poskytuje vysokou citlivost, široký dynamický rozsah a dobrou opakovatelnost. Nevýhodou je nízká správnost určení hmoty (nominální hmotnost) a nízká rychlost skenování. Detekční citlivost Q lze z řádu nanogramů zvýšit do řádu pikogramů selektivním záznamem jednoho nebo více iontů, což je výhodné pro cílenou kvantitativní analýzu. V poslední době je pro metabolické profilování běžné spojení GC s analyzátozem doby letu (TOF), díky vyšší správnosti určení hmoty a vyššímu rozlišení v porovnání s Q. TOF také nabízí vysokou rychlost skenování, která je nezbytná pro detekci chromatografických píků s vysokým rozlišením. Vysoká rychlost skenování také umožňuje výrazně zkrátit délku a zmenšit vnitřní průměr GC kolony, což vede ke

zrychlení analýzy. Rychlé skenování je také nezbytné pro získání kvalitních dat při využití dvoudimensionální GC, jejíž výstup je charakteristický velice úzkými píky. Spojení dvoudimensionální plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (2D-GC-MS) však generuje velké množství složitých dat. Další možností je také spojení GC s MS/MS technikami, jako například trojitým kvadrupólem (QqQ). Kvalitativní a kvantitativní zpracování dat, zvláště z rozsáhlých biologických experimentů, je velmi obtížné a časově náročné. 2D-GC-MS má potenciál stát se důležitým metabolickým nástrojem, budou-li překonány výzvy vysoce výkonného zpracování dat [2][8][36][38].

3.4.2.2. Spojení kapalinové chromatografie s MS

LC-MS je stejně jako GC-MS pro metabolomiku velice důležitým nástrojem, který lze využít pro cílené i necílené analýzy. Podobně jako GC-MS kombinuje výhody chromatografické separace a hmotnostní detekce [36][38].

Nejčastější ionizační technikou pro LC-MS je v metabolomice ESI, i když své důležité místo zde má i chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). ESI je vhodná pro analýzu polárních a iontových sloučenin, zatímco APCI a APPI pro méně polární a neutrální metabolity. ESI a APCI jsou tedy komplementárními ionizačními technikami, což je výhodou v necílené analýze. Analýza s využitím obou technik ionizace vedla k nárůstu počtu detegovaných metabolitů s lidským séru o 20 % [75]. Dnes jsou již běžné přístroje s duální technikou ionizace (ESI a APCI či ESI a APPI), což vede k vyššímu pokrytí metabolomu. MS analyzátoři umožňují rychlé přepínání mezi pozitivním a negativním módem ionizace během jednoho experimentu, což zvyšuje počet detegovaných metabolitů, avšak za cenu delšího času analýzy. Bylo popsáno, že více než 90 % iontů metabolitů vzorku lidské plasmy zaznamenaných v pozitivním ionizačním módu ESI nebylo zaznamenáno v módu negativním a naopak [75]. Příkladem z jiné práce jsou počty identifikovaných metabolitů při použití odlišných ESI módů ve spojení s různými separačními HPLC módy uvedené na obrázku 7. U APCI je možné použít průtok 0,1–2 ml/min, optimální citlivosti lze dosáhnout při průtoku 1 ml/min. U ESI lze použít průtok 10–500 µl/min, přičemž optimální citlivosti je dosahováno při průtoku okolo 200 µl/min [8][36][38][75][76][77][78].

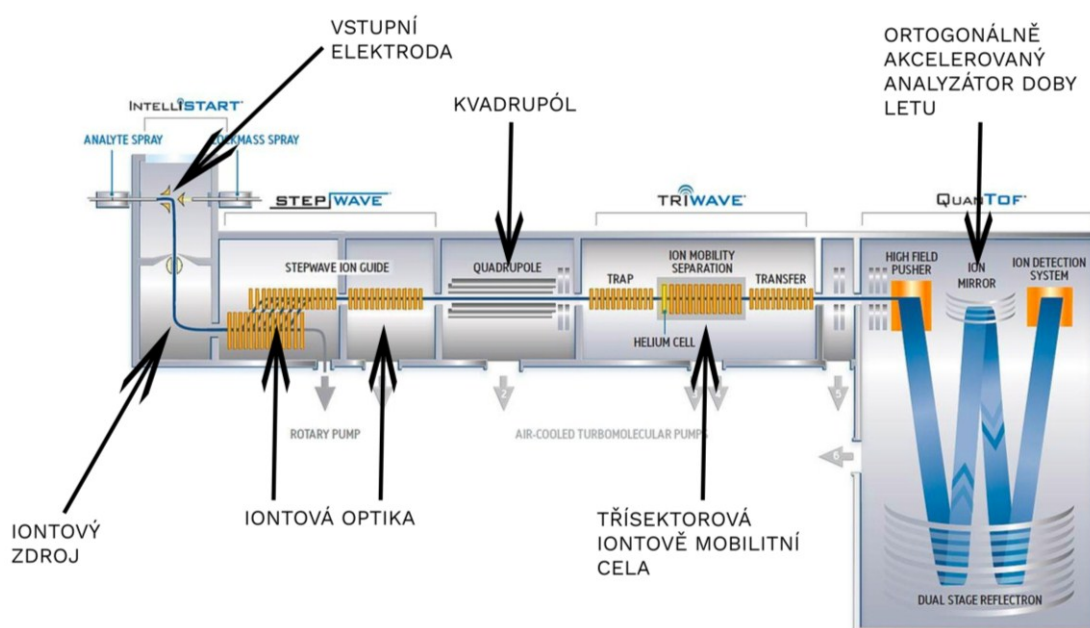


Obrázek 7: Vennův diagram znázorňující 142 (ozn. 1–142) metabolitů identifikovaných napříč různými separačními technikami ve spojení s hmotnostní detekcí s využitím pozitivního (ESI⁺) či negativního (ESI⁻) módu ESI. Z obrázku je patrné nakolik komplementární jsou jednak uvedené separační módy HPLC a jednak polarita ESI, je-li využito jako ionizační technika při hmotnostní detekci. Převzato ze zdroje [78] a upraveno.

Obecně výhodou LC je nižší pracovní teplota, a tedy možnost analyzovat termolabilní metabolity, které jsou při využití GC běžně degradovány. Největší nevýhodou LC-MS v metabolickém profilování je v porovnání s GC-MS nedostatek LC-MS knihoven pro identifikaci metabolitů [3][36][38].

V metabolickém profilování s využitím LC-MS je často využito TOF, protože zajišťuje dobrou citlivost, rychlý sběr dat a vysokou správnost určení hmoty. Identifikace metabolitů se v LC-MS provádí určením správné hmoty, tandemovou MS analýzou, případně spojením s NMR. Moderní hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením s hmotnostními analyzátoři jako FT-ICR, orbitální past a TOF umožňují velice správné určení hmoty, což usnadňuje identifikaci metabolitů a jejich přesnou kvantifikaci. Identifikace metabolitů založená na jejich fragmentaci vyžaduje tandemové MS analyzátoři. Mezi takové přístroje se řadí např. hmotnostní spektrometry s QqQ, Q-TOF,

kombinací Q a iontové pasti (IT), kombinací IT a TOF či kombinací Q a orbitální pasti. Komerčně dostupné jsou také přístroje kombinující Q-TOF s IMS (schéma přístroje s popisem základních částí je zobrazeno na obrázku 8). QqQ je často nástrojem volby pro cílenou analýzu, protože má široký dynamický rozsah v MS/MS režimu. Dnes jsou k dispozici rutinní analytické metody založené na selektivním záznamu vybrané reakce pro mnoho endogenních metabolitů ve fyziologických koncentracích. Potenciálem v LC-MS je miniaturizace. Zmenšením rozměrů kolony lze dosáhnout nižších průtoků, což zvyšuje citlivost ESI. Největším problémem LC-MS pro metabolomiku je obtížnost mezilaboratorního srovnání výsledků analýzy [3][8][11][36][38][76][79][80].



Obrázek 8: Základní schéma přístroje Synapt G2-Si využívajícího spojení Q, IMS a TOF. Jsou popsány základní části. Obrázek převzat ze zdroje [80] a upraven.

3.5. Práce s metabolomickými daty

Pro metabolomiku je charakteristické využití výše popsaných analytických technik produkujících značné množství dat, řádově v gigabytech. Způsob práce se získanými komplexními metabolickými datovými soubory je důležitým faktorem, jenž má vliv na rozsah a kvalitu, s jakými lze provést identifikaci i kvantifikaci metabolitů. Práci s daty lze rozdělit na zpracování dat a analýzu dat. Zpracování dat zahrnuje práci s daty získanými přímo některou analytickou technikou. Cílem tohoto kroku je transformace surových

dat do podoby a formátu, které lze využít při následné analýze dat. Analýza dat má za cíl hlouběji rozebrat a interpretovat zpracovaná data [81][82].

Při použití LC-MS jsou surovými daty záznamy nalezených m/z a jejich intenzit a záznamy chromatogramů s informací o t_R . Prvotní zpracování dat přiřazuje tyto charakteristiky k jednotlivým metabolitům. Kromě těchto základních parametrů lze ze surových dat získat i další informace, jako je například složení isotopové obálky iontu. Protože různí dodavatelé analytické instrumentace využívají pro své přístroje různé software, je nutno surová data konvertovat do formátu, se kterým pak lze dále pracovat. Příkladem formátu pro další zpracování dat je mzXML [81][83].

Běžné zpracování metabolomických dat zahrnuje filtrování, detekci metabolitů, zarovnání a normalizaci. Metody filtrace zpracovávají surová data s cílem odstranit efekty, jako je například šum pozadí. Během filtrace dochází také k odstranění isotopů signálů iontů. Detekce metabolitů má za cíl identifikovat získané signály a potvrdit či vyvrátit přítomnost vybraného metabolitu či více metabolitů ve vzorku. I přes využití moderních chromatografů existuje vždy určitá variabilita t_R metabolitů v různých sériích vzorků. Proto je nutné provést zarovnání čili korekci rozdílů t_R pro dané metabolity/nalezené markery/kontaminanty mezi vzorky analyzovanými v různou dobu. Posledním krokem zpracování dat je normalizace, jež odstraňuje nežádoucí systematické rozdíly mezi vzorky. Pro zpracování dat lze využít volné či komerčně dostupné software. Zástupci první skupiny jsou například XCMS a MZmine, zástupci druhé pak MarkerLynx, MarkerView, metAlign či Sieve [6][81][83][84].

Pro následnou analýzu metabolomických dat lze využít nejrůznějších statistických nástrojů. Časté využití nachází metody vícerozměrné statistické analýzy, například analýza hlavních komponent či projekce do latentní struktury metodou nejmenších čtverců, pomocí kterých lze dosáhnout rozdělení získaných výsledků do 2 či více skupin s charakteristickými vlastnostmi. Dalším způsobem analýzy dat je například korelační analýza, která dává do souvislosti zjištěné hladiny 2 či více metabolitů [6][84][85].

3.6. Quorum sensing molekuly

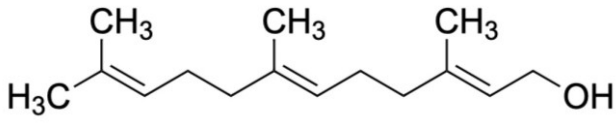
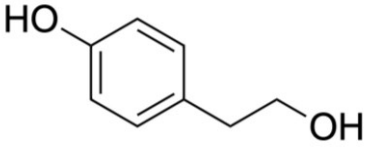
Regulační mechanismus quorum sensing (QS) je poměrně dobře popsán u bakterií, kde mohou regulovat důležité virulentní, morfologické či fyziologické vlastnosti. U eukaryotních systémů je QS spojen s morfologickými změnami přechodu kvasinkové

formy na vláknitou a naopak. Quorum sensing molekuly (QSM) jsou extracelulární chemické působky, které jsou produkovány nepřetržitě v reakci na zvyšující se hustotu mikrobiální populace. Fenomén ukazující přímou závislost možnosti přechodu mezi jednotlivými morfologickými formami na hustotě mikrobiální populace se označuje jako inokulační efekt. QSM pak pronikají až do jádra cílové buňky, kde působí aktivaci exprese příslušných genů. U kvasinek byl QS systém nejlépe prostudován u oportunního kmene *Candida albicans*, který je čtvrtou nejčastější příčinou nozokomiálních infekcí a může být jednou z příčin vulvovaginálního dyskomfortu. U *C. albicans* je přechod z kvasinkové na vláknitou formu důležitý pro její virulenci. Bylo popsáno, že pokud je houba „uzamčena“ v jedné ze svých forem, má omezenou virulenci [86][87][88][89].

Jedno ze signálních molekul *C. albicans* je seskviterpen farnesol (viz tabulku 2). Jeho vylučování je spojeno s potlačením přeměny kvasinkové formy na vláknitou. QSM, která má u kvasinek *C. albicans* produkujících farnesol jen velice nízkou aktivitu, je farnesolu příbuzná sloučenina – kyselina farnesová. Další signální molekulou je tyrosol (2-(4-hydroxyfenyl)ethanol), který je odvozen od aminokyseliny tyrosinu (viz tabulku 2). Na rozdíl od farnesolu však působí naopak, stimuluje tvorbu vláken. Zajímavé je zjištění, že je zřejmě regulace tyrosolem sekundární k regulaci farnesolem. To znamená, že rosteli hladina tyrosolu, přičemž hladina farnesolu zůstává konstantní, nemohou účinky tyrosolu překonat účinky farnesolu a houba zůstává v kvasinkové formě. Tyrosol je vedlejší QSM a jeho účinky se projeví pouze v případě omezené nebo nulové koncentrace farnesolu [86][87][88][89][90][91].

Analytické metody pro stanovení farnesolu a tyrosolu byly nejprve vyvíjeny samostatně. Byla například vyvinuta metoda pro stanovení farnesolu a jeho metabolitů využívající HPLC separaci ve spojení s MS detekcí s ESI ionizací v negativním módu [92][93]. Podobně bylo popsáno stanovení tyrosolu využívající HPLC ve spojení s MS [94][95]. Pro kvantifikaci bylo v popsáných případech využito selektivních záznamů vybrané reakce. Deprotonovaná molekula farnesolu a tyrosolu byla v prováděných experimentech využita jako iont prekurzoru [92][93][94][95]. Pro diagnostické a léčebné postupy však byla vyvinuta metoda využívající UHPLC separace ve spojení s MS/MS detekcí, která umožňuje současné stanovení farnesolu a tyrosolu ve vaginálních stěrech. Metoda přispěla dalšímu rozvoji využití metabolomiky v diagnóze a léčbě onemocnění způsobených kvasinkou *C. albicans* [87][96].

Tabulka 2: Charakteristika QSM produkovaných kvasinkou kmene *Candida albicans*. Vytvořeno dle [87].

QSM	Vzorec	t_R [min]	Molekulová hmotnost [Da]
Farnesol	 <chem>CC(C)=CC(C)=CC(C)=CCO</chem>	3,85	222,20
Tyrosol	 <chem>Oc1ccc(CCO)cc1</chem>	1,24	138,07

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie

- Acetonitril (ACN), $\geq 99,9\%$, HiPerSolv CHROMANORM® (VWR International S.A.S, Francie)
- Trifluoroctová kyselina (TFA), 99%, Reagent Plus® (Sigma Aldrich, Česká republika)
- Ultračistá voda, LC-MS grade, LiChroSolv® (Merck, Německo)
- Kyselina mravenčí (FA), 98%–100%, LiChropur® (Merck, Německo)
- Methanol (MeOH), $\geq 99,9\%$ (J. T. Baker, Nizozemí)
- Hydroxid amonný, 25%, LiChropur® (Merck, Německo)
- Dichlormethan, $\geq 99,8\%$, CHROMASOLV® (Sigma Aldrich, Česká republika)
- K práci byly využity isotopicky značené standardy látek:
 - farnesolu – značen 6 deuterii (d_6F),
 - tyrosolu – značen 4 deuterii (d_4T).

4.2. Použitá instrumentace a materiály

- Acquity UPLC systém (Waters, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem Synapt G2-Si (Waters, USA) využívajícího Q-TOF (viz obrázek 8)
- Analytická kolona ACQUITY UPLC BEH C_{18} 1,7 μm ; 2,1 mm x 100 mm (Waters, USA)
- Automatické pipety Eppendorf Reference® (Eppendorf, Česká republika)
- Pipetovací špičky plněné sorbentem – oxidem titaničitým HyperSep™, (Thermo Scientific, Česká republika) – dvě odlišné šarže
 - Šarže: 18216-09
 - Šarže: 03.29.2018
- Vakuová centrifuga Concentrator Plus (Eppendorf, Česká republika)
- Třepačka typu vortex (Ika, Německo)

4.3. Analyzované vzorky

4.3.1. Směsný vzorek

Pro měření v rámci optimalizace analytických podmínek byl připraven směsný vzorek. Bylo použito celkem 20 vzorků vaginálních stěrů rozpuštěných v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Tyto vzorky byly získány z Ústavu klinické mikrobiologie

Fakultní nemocnice v Hradci Králové. 10 vzorků bylo od pacientek s potvrzeným osídlením kvasinkou kmene *Candida albicans*. 10 vzorků bylo od pacientek, kde byla přítomnost kvasinky vyvrácena. Z každého vzorku bylo odebráno 30 μ l. Celkový objem směsného vzorku tak činil 600 μ l. Použité vzorky vaginálních stěrů rozpuštěných v PBS byly před použitím skladovány při teplotě -80 °C.

Pro směsný vzorek byl připraven vnitřní standard (IS) obsahující směs isotopicky značeného farnesolu (d_6F) a tyrosolu (d_4T). Roztoky d_6F a d_4T , oba o koncentraci 1 mg/ml byly naředěny roztokem 40% acetonitril (ACN) na koncentraci 10^{-5} g/ml. 10 μ l d_6F a 10 μ l d_4T tak bylo přidáno do 980 μ l 40% ACN a řádně promícháno na vortexu.

Do obou směsných vzorků byl IS přidán tak, aby koncentrace d_6F a d_4T byly 10^{-7} g/ml. Z 600 μ l obou směsných vzorků tak bylo odebráno 6 μ l a nahrazeno 6 μ l roztoku IS.

4.3.2. Kontrolní vzorek

Pro kontrolu účinnosti jednotlivých kroků přípravy vzorku během optimalizace přípravy vzorku pomocí μ SPE-PT byl připraven kontrolní roztok obsahující farnesol, tyrosol, isotopicky značený farnesol a isotopicky značený tyrosol, všechny v koncentraci 10^{-7} g/ml. Koncentrace d_6F a d_4T taky byla v tomto roztoku stejná, jako jejich koncentrace ve směsném vzorku. Všechny látky byly rozpuštěny v roztoku se složením: 2 % ACN a 98 % vody, což odpovídá poměru organické a vodné složky MF na počátku gradientu. Takto připravený kontrolní vzorek pak byl použit u 4 vybraných postupů přípravy vzorku během optimalizace v kroku nanesení vzorku, místo nanesení směsného vzorku.

4.3.3. Použité roztoky

Pro jednotlivé kroky přípravy vzorku pomocí plněných špiček včetně závěrečné rekonstituce byly připraveny následující roztoky, vždy v celkovém objemu 20 ml, resp. 25 ml, které byly skladovány při teplotě 2–8 °C po dobu maximálně 14 dní:

- 0,1% TFA v 80% ACN
- 50 mM FA v 80% ACN
- 0,1% FA

- 0,1% TFA
- 0,1% FA v MeOH
- 0,1% FA v 5% ACN
- 0,1% FA v 90% ACN
- 50% MeOH
- 100 mM NH₄OH
- 5 mM FA v ACN
- 5 mM FA ve 2% ACN
 - Roztok 2% ACN odpovídá poměru organické a vodné složky MF na počátku gradientu.
- 0,075% FA v ACN

Pro MF byly připraveny:

- 0,075% FA v ACN
- 0,075% FA

4.4. Postup přípravy vzorku pomocí μ SPE-PT

Při přípravě vzorku bylo postupováno dle obecného schématu přípravy vzorku využívající SPE (viz 3.2.3.2.). Postup přípravy je znázorněn na obrázku 9.

Pro kondicionaci sorbentu v plněných špičkách byl použit jeden z roztoků uvedených v tabulce 3. Sorbent byl vždy kondicionován roztokem o objemu 50 μ l a počet aspirací/vypuštění roztoku pomocí automatické pipety byl 5.

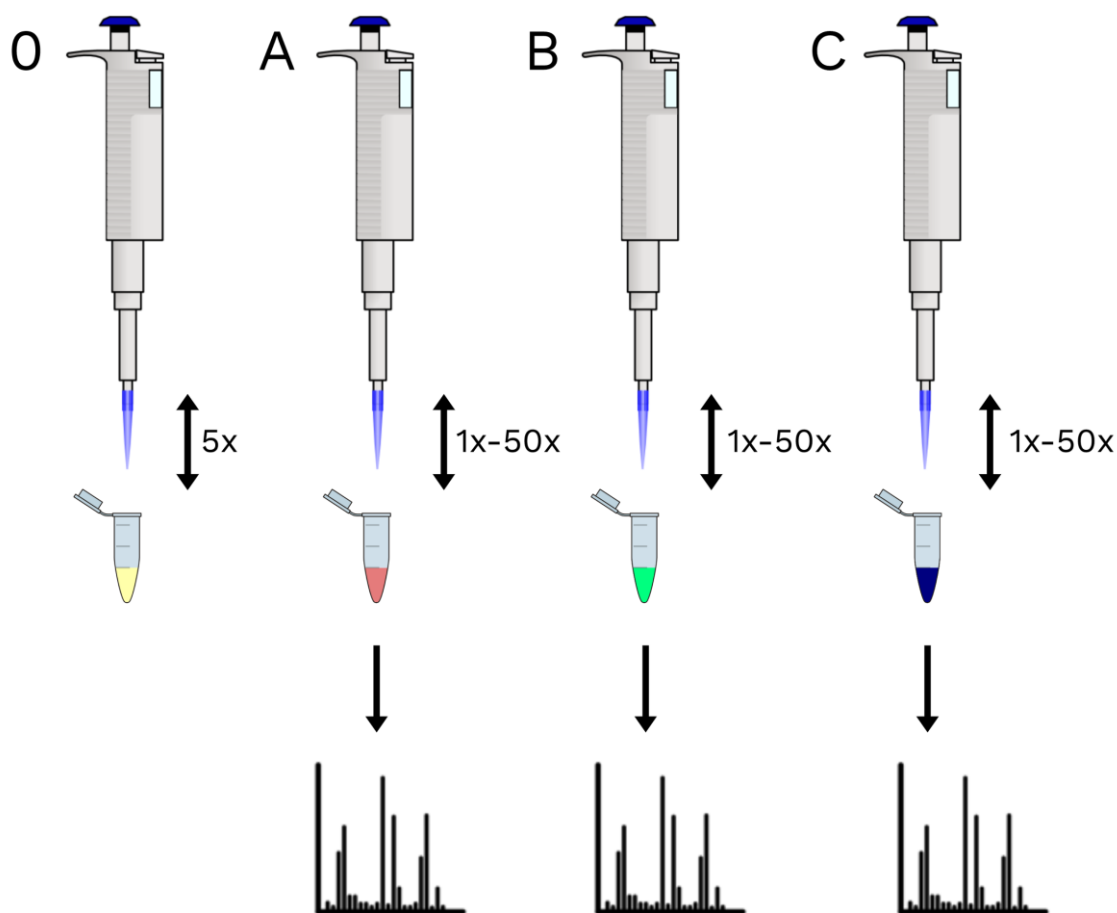
Následovalo nanesení vzorku. Nanášený objem vzorku byl 15 μ l. Optimalizované počty aspirací/vypuštění vzorku při jeho nanášení jsou uvedeny v tabulce 3.

V kroku promývání sorbentu bylo použito vždy 50 μ l jednoho z roztoků uvedených v tabulce 3. Optimalizované počty aspirací/vypuštění promývacího činidla jsou uvedeny v tabulce 3.

Eluce látek zadržovaných na sorbentu byla prováděna vždy 20 μ l jednoho z roztoků uvedených v tabulce 3. Optimalizované počty aspirací/vypuštění elučního činidla jsou uvedeny v tabulce 3.

Pro následující analýzu s využitím UHPLC-HRMS byly využity:

- frakce po nanesení vzorku, která obsahovala látky nenavázané na sorbent (A),



Obrázek 9: Schéma provedení přípravy vzorku metodou μ SPE-PT při optimalizaci metody. 0: kondicionace, A: nanesení vzorku, B: promývání sorbentu, C: eluce. Metodou UHPLC-HRMS byly analyzovány A: frakce po nanesení vzorku, B: frakce po promývání, C: frakce eluátu. Autor: Jakub Eduard Syřínek, 2019.

- frakce po promývání, která obsahovala látky vymyté ze sorbentu (B) a
- frakce eluátu (C), který obsahoval látky uvolněné ze sorbentu pomocí elučního činidla.

Při optimalizaci složení roztoků využitých v jednotlivých krocích přípravy vzorku a počtu jejich aspirací/vypuštění z pipetovací špičky tak byly získány od každého konkrétního postupu celkem 3 vzorky uvedených frakcí, které byly odpařeny do sucha na vakuové odparce po dobu 40 minut při teplotě 30 °C.

Po odpaření byly všechny vzorky rekonstituovány v 15 μ l jednom z roztoků uvedených v tabulce 3.

Z důvodu praktické proveditelnosti přípravy vzorku s využitím plněných špiček byla celá příprava prováděna v širokých insertech ve vialkách. Důvodem je rozšíření na konci plněné pipetovací špičky v místě kde se nachází sorbent. Z důvodu malého objemu

a zajištění bezproblémového dvojího nástřiku do UHPLC-HRMS systému byly vzorky po rekonstituci přepipetovány do úzkých insertů, které byly vloženy do původních označených vialk.

Tabulka 3: Optimalizované parametry μ SPE-PT postupu a jejich proměnné hodnoty.

Optimalizovaný parametr	Proměnné hodnoty parametru
složení kondicionačního činidla	0,1% TFA v 80% ACN
	50mM FA v 80% ACN
	0,1% FA
	0,1% TFA
	ACN
složení promývacího činidla	voda
	chloroform
	0,1% FA
	0,1% FA v MeOH
	0,1% FA v 5% ACN
složení elučního činidla	0,1% TFA v 80% ACN
	50mM FA v 80% ACN
	0,1% FA v 90% ACN
	50% MeOH
	100mM NH ₄ OH
počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku	1
	5
	10
	25
	50
počet aspirací/vypuštění v kroku promývání	1
	5
	10
	25
	50
počet aspirací/vypuštění v kroku eluce	1
	5
	10
	25
	50
složení rekonstitučního roztoku	ACN
	MF
	5mM FA v ACN
	5mM FA v 2% ACN

4.5. Optimalizace μ SPE-PT

Optimalizace přípravy vzorku byla provedena s využitím softwaru pro statistický design experimentu Modde Pro, vyvinutým německou společností Umetrics. Z pěti základních postupů pro provedení μ SPE-PT (uvedeny v tabulce 4, označeny A–E), jež byly převzaty od výrobce plněných pipetovacích špiček, případně z dříve provedených experimentů, byly vzájemně kombinovány parametry jednotlivých kroků provedení extrakce (viz tabulku 3) [97][98][99].

Při optimalizaci μ SPE-PT v tomto experimentu bylo posuzováno celkem 7 parametrů, přičemž pro 6 z nich zde bylo 5 proměnných, pro sedmý parametr proměnné 4 (viz tabulku 3). Měly by-li být provedeny postupy μ SPE-PT, které by vzájemně kombinovaly všechny proměnné všech optimalizovaných parametrů, muselo by být provedeno celkem 4×5^6 dílčích experimentů. Software Modde Pro po zadání všech parametrů s příslušnými proměnnými vytvořil návrh experimentu o celkem 25 postupech provedení μ SPE-PT, které byly navrženy z různých vzájemných kombinací všech proměnných hodnot optimalizovaných parametrů. Vedle navržených 25 postupů byly v experimentu v rámci této diplomové práce pro srovnání provedeny i převzaté μ SPE-PT postupy A–E.

Všechny postupy provedení μ SPE-PT s kombinacemi kondičního, promývacího a elučního činidla společně s počty aspirací/vypuštění činidla a počty aspirací/vypuštění vzorku ve fázi jeho nanášení, stejně jako volbu roztoku pro rekonstituci shrnuje tabulka 4.

Z důvodu eliminace náhodných chyb a korekce systematického efektu vzniklého během samotné přípravy vzorku, případně UHPLC-HRMS analýzy bylo randomizováno pořadí nástřiků získaných extrakčních frakcí jednotlivých μ SPE-PT postupů N1–N25. Vzorky získaných extrakčních frakcí jednotlivých μ SPE-PT postupů byly do UHPLC-HRMS systému zaváděny v náhodném pořadí, nikoliv v pořadí, jak byly připravovány.

Pro ověření opakovatelnosti metody byly tři náhodně zvolené μ SPE-PT postupy (N3, N7, N11) provedeny s odlišnou šarží pipetovacích špiček plněných sorbentem.

Pro kontrolu, zda ke kontaminaci PEG nedochází i jinde, než při odběru, skladování a rozpouštění vzorků vaginálních stěrů byly čtyři náhodně zvolené μ SPE-PT postupy (N3, N7, N11, N19) provedeny s kontrolním vzorkem namísto směsného vzorku.

Tabulka 4: Přehledné shrnutí základních 5 postupů provedení μ SPE-PT (tj. postupy A–E) a 25 postupů provedení μ SPE-PT navržených softwarem Modde Pro (tj. postupy N1–N25). $N_{a/v}$ v tabulce označuje počet aspirací/vypuštění v příslušném extrakčním kroku. MF v této tabulce znamená 0,075% FA ve vodě/0,075% FA v ACN (98:2, v/v).

Název postupu	Pořadí nástřiku	Kondicionační činidlo	$N_{a/v}$ – nanesení vzorku	Promývací činidlo	$N_{a/v}$ – promývání	Eluční činidlo	$N_{a/v}$ – eluce	Rekonstituční roztok
A	26	0,1% TFA v 80% ACN	10	voda	5	0,1% TFA v 80% ACN	10	MF
B	27	50mM FA v 80% ACN	10	chloroform	5	50mM FA v 80% ACN	10	MF
C	28	0,1% FA	10	0,1% FA	5	0,1% FA v 90% ACN	10	MF
D	29	0,1% TFA	10	0,1% FA v MeOH	5	50% MeOH	10	MF
E	30	100% ACN	10	0,1% TFA v 5% ACN	5	100mM NH ₄ OH	10	MF
N1	22	0,1% FA	1	0,1% TFA v 5% ACN	10	50mM FA v 80% ACN	1	5mM FA v ACN
N2	23	0,1% TFA v 80% ACN	1	0,1% FA	50	100mM NH ₄ OH	5	5mM FA v ACN
N3	13	50mM FA v 80% ACN	1	0,1% FA v MeOH	25	50% MeOH	10	ACN
N4	20	50mM FA v 80% ACN	1	chloroform	1	0,1% TFA v 80% ACN	25	5mM FA v 2% ACN
N5	7	100% ACN	1	voda	5	0,1% FA v 90% ACN	50	MF
N6	4	0,1% TFA v 80% ACN	5	0,1% TFA v 5% ACN	1	0,1% FA v 90% ACN	1	5mM FA v 2% ACN
N7	1	0,1% FA	5	voda	50	50% MeOH	5	5mM FA v 2% ACN
N8	25	0,1% TFA	5	chloroform	5	50mM FA v 80% ACN	10	MF
N9	17	100% ACN	5	0,1% FA v MeOH	10	100mM NH ₄ OH	25	MF
N10	9	50mM FA v 80% ACN	5	0,1% FA	5	0,1% TFA v 80% ACN	50	5mM FA v ACN
N11	6	100% ACN	10	chloroform	1	50% MeOH	1	5mM FA v ACN
N12	12	0,1% TFA	10	chloroform	10	0,1% FA v 90% ACN	5	ACN
N13	3	0,1% TFA v 80% ACN	10	voda	10	0,1% TFA v 80% ACN	10	5mM FA v ACN
N14	11	0,1% TFA	10	0,1% FA	25	50mM FA v 80% ACN	25	5mM FA v 2% ACN
N15	24	0,1% TFA v 80% ACN	25	0,1% FA v MeOH	50	50mM FA v 80% ACN	50	5mM FA v 2% ACN
N16	5	50mM FA v 80% ACN	25	voda	5	100mM NH ₄ OH	1	ACN
N17	19	100% ACN	25	0,1% TFA v 5% ACN	25	0,1% TFA v 80% ACN	5	MF
N18	15	0,1% FA	25	0,1% FA	1	0,1% FA v 90% ACN	10	ACN
N19	16	0,1% TFA v 80% ACN	50	0,1% TFA v 5% ACN	5	50% MeOH	25	ACN
N20	18	0,1% FA	50	chloroform	25	100mM NH ₄ OH	50	5mM FA v ACN
N21	10	0,1% TFA	50	0,1% FA v MeOH	50	0,1% TFA v 80% ACN	1	MF
N22	21	50mM FA v 80% ACN	50	voda	1	50mM FA v 80% ACN	5	MF
N23	2	0,1% FA	25	0,1% FA	1	0,1% FA v 90% ACN	10	ACN
N24	8	0,1% TFA v 80% ACN	50	0,1% TFA v 5% ACN	5	50% MeOH	25	ACN
N25	14	50mM FA v 80% ACN	5	0,1% FA	5	0,1% TFA v 80% ACN	50	5mM FA v ACN

4.6. UHPLC podmínky

Pro necílenou metabolomickou analýzu byla zvolena kolona s reversní fází C₁₈ o délce 100 mm a vnitřním průměru 2,1 mm, s částicemi o velikosti 1,7 μm (viz 4.2.). Bylo využito gradientové eluce, a to od 98 % složky A (0,075% FA) a 2 % složky B (0,075% FA v ACN) do 2 % složky A a 98 % složky B, během 13 minut. Průtoková rychlost byla 0,5 ml/min. Nastříkovaný objem vzorku byl 2 μl, přičemž každý jednotlivý vzorek byl nastříkován dvakrát [96].

4.7. HRMS podmínky

Pro HRMS detekci bylo využito výše popsané instrumentaci s ESI ionizační technikou (viz 4.2.). Bylo využito ionizace v pozitivním módu. Nastavení iontového zdroje bylo: napětí na kapiláře 2,5 kV, napětí na vstupním kuželu 10 V, tlak zmlžujícího plynu 6,0 bar, průtok desolvatačního plynu byl 1100 l/h, desolvatační teplota 600 °C a teplota ve zdroji 120 °C. Nastavení skenu bylo 12 bodů za sekundu, což odpovídá 0,085 s/ 1 sken. Rozsah skenovaných hmot byl 50–1200. Jako interní kalibrant byl použit referenční sprej: leucin-enkefalin (koncentrace: 200 pg/μl). Pro externí kalibraci byl využit roztok mravenčanu sodného o koncentraci 0,5 mmol/l [96].

4.8. Vyhodnocení získaných dat

4.8.1. Necílená metabolomická analýza

Vyhodnocení výsledků UHPLC-HRMS analýz bylo provedeno s pomocí statistického softwaru MarkerLynx. Parametry pro vyhodnocení jsou shrnuty v tabulce 5. Takto získaná data byla dále zpracovávána pomocí softwaru Microsoft Excel.

Tabulka 5: Parametry pro vyhodnocení – MarkerLynx.

Parametry pro vyhodnocení – MarkerLynx
Retenční čas: 0,5–13 min; zarovnání retenčního času: s přesností 0,1 min
Funkce detekce píku s přesností extrahované hmoty na 0,005 Da a korekcí retenčního času na 0,2 minuty
Intenzita detekce nad 10E4 četnosti pro dané <i>m/z</i>
Odstranění isotopů

V Microsoft Excel byla nejprve nastavena funkce, pomocí které byly vybrány z nalezených potenciálních markerů ty *m/z*, které s odchylkou 20 ppm odpovídaly

správné hmotě PEG, respektive protonované molekule PEG ($[M+H]^+$), sodíkovému aduktu PEG ($[M+Na]^+$) či draslíkovému aduktu PEG ($[M+K]^+$). Během analýzy v MS dochází k fragmentaci PEG. Z polymerní molekuly PEG se odštěpují monomerní jednotky $[CH_2CH_2O]$, které mají teoretickou správnou hodnotu m/z 44,0262. Proto byly vyhodnocovací parametry nastaveny tak, že každá molekula, jejíž m/z byla dělitelná hodnotou 44,0262 s odchylkou 20 ppm byla považována za PEG. Respektive bylo toto pravidlo aplikováno pro výběr zmíněných aduktů PEG a jejich fragmentů. Pro zúžení a zpřesnění výběru markerů, byly vybrány jen ty m/z , kterým odpovídala vyšší intenzita než 0,0651. Tato hodnota byla získána interpretací dat pro oblast před mrtvým t_R s využitím softwaru MarkerLynx. Protože se jedná o oblast před mrtvým t_R , jde o chromatografický šum nikoliv signály potenciálních markerů. Takto vybrané m/z byly dále filtrovány dle jejich t_R . Bylo počítáno s průměrnou šířkou chromatografického píku 0,1 min. Jeden pík odpovídá vždy jednomu PEG či jeho fragmentu. Ze všech nalezených m/z , které odpovídaly PEG a zároveň se po vyfiltrování nacházely ve stejném píku (tj. jejich t_R byl $\pm 0,05$ min) byl vybrán vždy m/z s nejvyšší hodnotou. Bylo zde také zohledněno to, že stejný PEG eluující se ve stejném t_R může v iontovém zdroji tvořit jak $[M+H]^+$, tak $[M+Na]^+$ či $[M+K]^+$. Nastala-li tedy situace, že pro nejvyšší m/z v daném t_R bylo nalezeno více typů aduktů, byla dána přednost $[M+H]^+$ před $[M+Na]^+$ či $[M+K]^+$ a dále byla dána přednost $[M+Na]^+$ před $[M+K]^+$. Nejvyšší m/z v daném t_R lze s největší pravděpodobností považovat za mateřský PEG, v jehož chromatografickém píku se pak nacházejí m/z jeho fragmentů. Po provedení této procedury byl získán konečný počet m/z , které byly považovány za PEG, resp. jejich adukty. Protože byly provedeny 2 nástřiky každého vzorku, bylo do konečných výsledků uvedeno sjednocení množin nalezených m/z považovaných za PEG, získaných z dat z obou nástřiků.

Nalezené m/z odpovídající příslušným aduktům PEG byly sečteny vždy v rámci každé extrakční frakce (A, B, C). Tak byl získán počet PEG nalezených v jednotlivých frakcích (N_f). Součtem všech nalezených PEG ve všech třech frakcích byl získán celkový počet PEG (N_{fff}), který se teoreticky původně nacházel ve vzorku před provedením μ SPE-PT. Z těchto hodnot byl pro každou frakci vypočten podíl PEG nalezených v dané frakci a celkového počtu PEG nalezených ve všech třech frakcích daného postupu (N_f/N_{fff}). Tato hodnota byla vyjádřena procentuálně. Procentuální hodnota N_f/N_{fff} pro frakci A vyjadřuje podíl počtu PEG původního vzorku před extrakcí, který se během kroku

nanesení vzorku nenavázal na sorbent. Procentuální hodnota N_f/N_{fff} pro frakci B vyjadřuje podíl počtu PEG původního vzorku před extrakcí, který se během kroku nanesení vzorku navázal na sorbent a následně byl během kroku promývání ze sorbentu uvolněn. Procentuální hodnota N_f/N_{fff} pro frakci C pak vyjadřuje podíl počtu PEG původního vzorku před extrakcí, který se během kroku nanesení vzorku navázal na sorbent, zůstal na sorbent navázán i po kroku promývání a byl ze sorbentu uvolněn v kroku eluce.

Pomocí softwaru ModdePro bylo provedeno vyhodnocení vlivu jednotlivých optimalizovaných parametrů postupů μ SPE-PT (viz Tab. 3) jednak na počet nalezených PEG v jednotlivých frakcích A, B, C a jednak na počet nalezených potenciálních markerů. Dále bylo provedeno vyhodnocení vlivu počtu aspirací/vypuštění v kroku promývání a v kroku eluce pro nejúčinnější extrakční postupy.

4.8.2. Stabilita signálu HRMS systému

Vyhodnocení stability signálu pro několik desítek hodin trvajících UHPLC-HRMS analýzu bylo provedeno porovnáním experimentálních m/z a teoretických m/z pro známé PEG a jejich fragmenty. Získané chromatogramy byly procházeny v pořadí nástřiku příslušných vzorků do UHPLC-HRMS systému. V intervalu t_R 3,5–4 min bylo vybráno vždy 5 m/z PEG lišících se o 1 monomerní jednotku. Rozdíly těchto hmot odpovídající 1 monomerní jednotce byly porovnány s teoretickou hmotou monomerní jednotky PEG 44,0262. Z těchto hodnot byla vypočtena odchylka experimentální m/z od správné m/z .

Nejdříve byl vypočten průměr odchylek v jednotlivých nástřicích jednotlivých analyzovaných extrakčních frakcí. Následně byla z těchto hodnot vypočtena průměrná odchylka experimentální m/z od správné m/z pro všechny frakce daného postupu provedení μ SPE-PT (N1–N25, A–E).

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Optimalizace metabolomického schématu

Experiment prováděný v rámci této diplomové práce byl součástí širší metabolomické studie. Otázkou, která stojí na počátku metabolomického schématu je, zda existuje a pokud ano, jak lze odhadnout, z identifikovaných QSM ve vzorcích vaginálních stěrů přímý vztah mezi nalezenými QSM a vulvovaginálním dyskomfortem. Hodnoceny jsou QSM kmene *C. albicans*.

Na počátku metabolomického schématu, stál odběr vzorků od pacientek ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FNHK). Vaginální stěry získané od pacientek byly na pracovišti Ústavu klinické mikrobiologie FNHK rozpuštěny v PBS. Pro tuto práci je už samotný odběr a následné skladování vzorku velmi důležité, protože v průběhu těchto kroků může docházet k nežádoucí kontaminaci vzorků PEG. Ty jsou obsaženy v běžně používaném materiálu pro odběr a skladování vzorků a mohou být obsaženy v pufru využitém pro rozpouštění vzorků.

Získané vzorky byly následně upraveny metodou μ SPE-PT. Ta byla v rámci této práce optimalizována (viz 5.3.–5.10.). Pro následnou analýzu vzorků byla využita UHPLC-HRMS metoda, jejíž podmínky jsou uvedeny v kapitolách 4.6. a 4.7. Pro UHPLC separaci byla zvolená kolona s C_{18} SF vybrána proto, že se jedná o univerzální kolonu. Protože byla prováděna necílená metabolomická analýza je využití univerzální kolony s vysokým potenciálem separace širokého spektra metabolitů nejvhodnější. Stejná analytická kolona již byla použita pro separaci vzorků vaginálních stěrů v metabolomických analýzách [87][96]. Složení MF bylo také použito v metabolomických experimentech zabývajících se separací farnesolu a tyrosolu, stejně jako složení MF na počátku a na konci gradientu. Složení MF poskytovalo pro QSM kmene *C. albicans* dobrou odezvu [87][96]. Průběh gradientové eluce byl oproti dříve použité metodě prodloužen na 13 min. Důvodem bylo zvýšení kapacity separace, a tedy pokrytí širší škály metabolitů. Nastavení HRMS detekce bylo převzato z dříve provedeného experimentu pro detekci metabolitů ve vzorcích vaginálních stěrů [96].

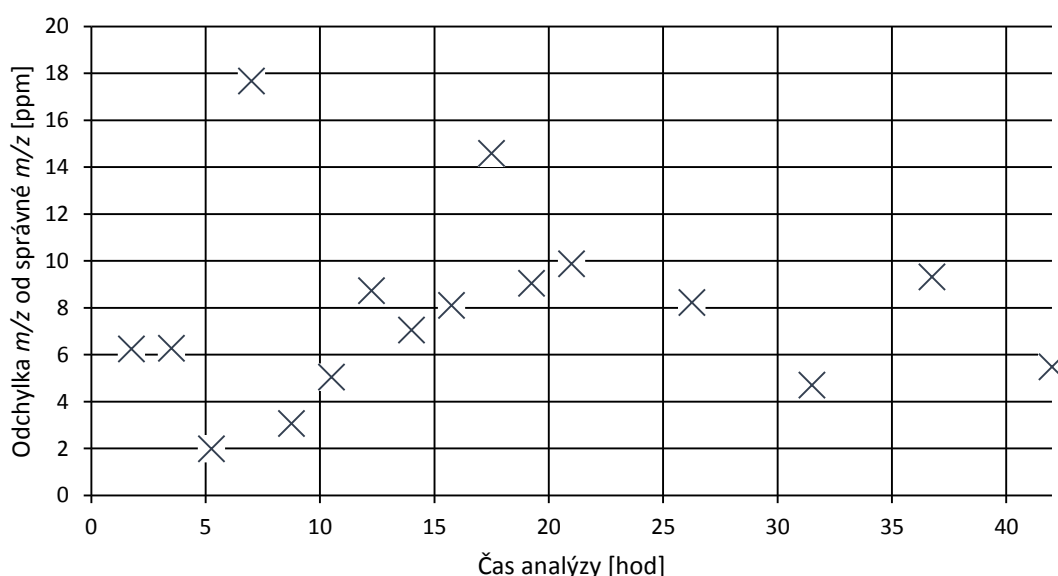
Součástí metabolomického schématu je i zpracování a interpretace analýzou získaných dat. Zpracování a interpretace dat byly v rámci této diplomové práce časově nejvíce náročnou částí metabolomického schématu.

5.2. Odchylka experimentální m/z od správné m/z v závislosti na čase

Vzhledem k využití analyzátoru TOF a k faktu, že doba analýzy u velkých souborů vzorků je často několik desítek až stovek hodin (v experimentu prováděném v rámci této práce více než 40 hodin), je důležité při vyhodnocování dat zohlednit parametr správnosti hmoty v průběhu provedení experimentu. Použitý analyzátor využívá pro korekci správné hmoty během měření interní kalibraci pomocí referenčního spreje standardu: leucin-enkefalin. Při takto dlouhých analýzách však při záznamu správné hmoty hrají roli i malé odchylky teploty, změna hodnoty vakua v TOF, které mají vliv na dobu letu iontů. Ke změnám teplot dochází i v klimatizované laboratoři v průběhu střídání dne (pohyb osob, otevírání a zavírání dveří) a noci.

Proto byla správnost měření ověřena pomocí porovnání hodnot správných m/z známých PEG a hodnot získaných měřením (viz 4.8.2.). V průběhu analýzy bylo využito interní kalibrace referenčním sprejem. Porovnání experimentálních a teoretických hmot PEG tak bylo vlastně již druhou korekcí správnosti určení hmoty.

Výsledkem je zjištění, že většina naměřených hodnot m/z má odchylku od teoretické hodnoty m/z do 10 ppm, avšak několik naměřených hodnot m/z má odchylku vyšší, až do 20 ppm. Proto bylo při vyhodnocování výsledků experimentu pracováno vždy s odchylkou 20 ppm hodnoty m/z . Závislost odchylky m/z od správné m/z na čase analýzy pro vzorky analyzované v experimentu prováděném v rámci této diplomové práce jsou znázorněny na obrázku 10.



Obrázek 10: Závislost odchylky experimentální m/z od správné m/z na čase analýzy pro experiment prováděný v rámci této práce.

5.3. Výběr metody přípravy vzorku

Pipetovací špičky plněné sorbentem porézním oxidem titaničitým byly zvoleny pro odstranění PEG ze vzorku na základě experimentu, který takový účinek porézního TiO_2 na vysoké množství PEG, coby kontaminantu, prokázal [100]. Studie ukázala, že po přidavku vysokého množství PEG ke vzorku proteinu dochází při hmotnostní detekci s elektrosprejovou ionizací k výraznému potlačení signálu pozorovaného proteinu. Použitím špiček pipet plněných TiO_2 během přípravy vzorku dochází k zadržení PEG na sorbentu, zatímco sledovaný protein je eluován. Při nástřiku eluátu po proceduře přípravy vzorku byly pozorovány signály proteinů bez negativního potlačení matricovými efekty. Kapacita pipetovacích špiček plněných sorbentem je dána množstvím sorbentu, jež je dle výrobce v použitých špičkách asi 125 μg , přičemž množství nanášeného roztoku má být v rozmezí 2–50 μl , případně vyšší. Během praktického provedení experimentu se však použití objemu nanášeného roztoku v objemu menším než 15 μl neosvědčil, protože množství roztoku pak neprocházelo celým obsahem sorbentu [97][100].

5.4. Optimalizace parametrů provedení $\mu\text{SPE-PT}$ metody

Počet aspirací/vypuštění daného roztoku z pipetovací špičky v jednotlivých krocích se v postupech navržených výrobcem pohyboval od 5 do 50. Minimální počet aspirací/vypuštění byl v experimentu prováděném v rámci této diplomové práce zvolen 1, maximální, i z důvodu praktické manuální proveditelnosti, byl nastaven na 50 [97].

Výsledky dat získaných UHPLC-HRMS analýzou jednotlivých extrakčních frakcí (A, B, C), byly vyhodnoceny dle procedury uvedené v kapitole 4.8. této práce. Přehledně jsou získané výsledky zachycující počty nalezených PEG v jednotlivých extrakčních frakcích (N_f) a jejich procentuálně vyjádřené podíly k celkovému počtu PEG nalezených ve všech třech frakcích daného postupu (N_f/N_{fff}) pro všechny provedené postupy $\mu\text{SPE-PT}$ (viz tabulku 4) uvedeny v tabulce 6.

Jako 3 nejúčinnější kroky nanesení vzorku byly označeny ty, během kterých se na sorbent navázal nejmenší podíl PEG a nejvyšší podíl jich tak zůstal v původním vzorku, tj. pro frakci A tři nejvyšší hodnoty N_f/N_{fff} . V tabulce 6 jsou tyto hodnoty pro frakci A znázorněny zeleně.

Jako 3 neúčinnější kroky promývání byly označeny ty, během kterých se ze sorbentu vymyl nejvyšší podíl PEG a nejmenší podíl jich tak zůstal dále vázán na sorbent, tj. pro frakci B tři nejvyšší hodnoty N_f/N_{fff} . V tabulce 6 jsou tyto hodnoty pro frakci B znázorněny zeleně.

Jako 3 neúčinnější kroky eluce byly označeny ty, během kterých se ze sorbentu uvolnil nejnižší podíl PEG, tj. pro frakci C tři nejnižší hodnoty N_f/N_{fff} . Protože bylo cílem, aby frakce eluátu obsahovala celkově nejmenší podíl PEG, byly 3 celé postupy provedení μ SPE-PT s nejnižšími hodnotami N_f/N_{fff} označeny zároveň jako postupy celkově neúčinnější. V tabulce 6 jsou tyto hodnoty pro frakci C znázorněny zeleně. Protože jsou zároveň celé postupy s nejnižším počtem PEG celkově neúčinnějšími postupy provedení μ SPE-PT, jsou tři nejnižší hodnoty N_f/N_{fff} pro frakci C podbarveny zeleně.

Analogicky jsou pak červeně označeny vždy 3 nejméně účinné dílčí kroky pro A, B. Tři celkově nejméně účinné postupy s červeně označenými hodnotami pro C jsou navíc zvýrazněny červeným podbarvením.

V některých případech byly mezi nalezenými PEG v rámci jedné extrakční frakce nalezeny m/z , které s odchylkou 20 ppm odpovídají stejnému PEG, liší se však v retenčním čase. Provedené chromatografické separace PEG s molekulovou hmotností do 1500 za vhodných podmínek poskytovaly charakteristické chromatogramy s píky jednotlivých oligomerů PEG lišících se vždy o 1 monomerní jednotku. S rostoucí molekulovou hmotností oligomeru se zvyšoval retenční čas na RP-HPLC. To ukazuje na možnost fragmentace vyšších oligomerů PEG v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru, iontové optice hmotnostního spektrometru či při průchodu Q přičemž byly zaznamenány vzniklé fragmenty s nižší molekulovou hmotností, avšak s retenčním časem odpovídajícím původním vyšším oligomerům. Samozřejmě zde pak zůstává také možnost, že se jedná o jiné kontaminanty, jejichž m/z s odchylkou 20 ppm odpovídá m/z PEG. Jelikož nelze rozlišit, zda se jedná o fragment vyššího oligomeru PEG, či zcela jinou molekulu než PEG, jsou ve výsledcích takové m/z s odlišným retenčním časem považovány za dva různé PEG [101][102][103].

Tabulka 6: Přehled výsledků vyhodnocení počtu přítomných PEG – postupy N1–N25 , A–E.

Název postupu	Extrakční frakce	Typ aduktu v MS	Počet aduktů PEG	Počet PEG v extrakční frakci (N_f)	Počet PEG ve všech 3 frakcích (N_{fff})	$\frac{N_f}{N_{fff}}$ [%]
N1	A	[M+H] ⁺	1	6	20	30,00%
		[M+Na] ⁺	5			
		[M+K] ⁺	0			
	B	[M+H] ⁺	2	14		70,00%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	1			
	C	[M+H] ⁺	2	13		65,00%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	0			
N2	A	[M+H] ⁺	4	18	28	64,29%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	3			
	B	[M+H] ⁺	2	12		42,86%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	2			
	C	[M+H] ⁺	3	12		42,86%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	0			
N3	A	[M+H] ⁺	1	6	19	31,58%
		[M+Na] ⁺	5			
		[M+K] ⁺	0			
	B	[M+H] ⁺	2	10		52,63%
		[M+Na] ⁺	6			
		[M+K] ⁺	2			
	C	[M+H] ⁺	1	9		47,37%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	0			
N4	A	[M+H] ⁺	4	27	52	51,92%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	16			
	B	[M+H] ⁺	6	25		48,08%
		[M+Na] ⁺	17			
		[M+K] ⁺	2			
	C	[M+H] ⁺	4	20		38,46%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	7			
N5	A	[M+H] ⁺	1	7	11	63,64%
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	2			
	B	[M+H] ⁺	0	4		36,36%
		[M+Na] ⁺	3			
		[M+K] ⁺	1			
	C	[M+H] ⁺	1	7		63,64%
		[M+Na] ⁺	6			
		[M+K] ⁺	0			

N6	A	[M+H] ⁺	6	27	42	64,29%
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	17			
	B	[M+H] ⁺	5	19		45,24%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	5			
	C	[M+H] ⁺	2	14		33,33%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	4			
N7	A	[M+H] ⁺	5	23	37	62,16%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	10			
	B	[M+H] ⁺	3	21		56,76%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	8			
	C	[M+H] ⁺	0	8		21,62%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	0			
N8	A	[M+H] ⁺	3	21	31	67,74%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	8			
	B	[M+H] ⁺	3	15		48,39%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	5			
	C	[M+H] ⁺	3	14		45,16%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	1			
N9	A	[M+H] ⁺	2	16	21	76,19%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	6			
	B	[M+H] ⁺	2	11		52,38%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	1			
	C	[M+H] ⁺	1	6		28,57%
		[M+Na] ⁺	5			
		[M+K] ⁺	0			
N10	A	[M+H] ⁺	3	20	29	68,97%
		[M+Na] ⁺	14			
		[M+K] ⁺	3			
	B	[M+H] ⁺	2	12		41,38%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	1			
	C	[M+H] ⁺	3	13		44,83%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	0			

N11	A	[M+H] ⁺	4	16	23	69,57%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	2			
	B	[M+H] ⁺	2	12		52,17%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	0			
	C	[M+H] ⁺	3	11		47,83%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	0			
N12	A	[M+H] ⁺	2	12	17	70,59%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	1			
	B	[M+H] ⁺	2	11		64,71%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	2			
	C	[M+H] ⁺	2	11		64,71%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	0			
N13	A	[M+H] ⁺	3	17	30	56,67%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	6			
	B	[M+H] ⁺	4	21		70,00%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	6			
	C	[M+H] ⁺	2	12		40,00%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	0			
N14	A	[M+H] ⁺	2	22	36	61,11%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	9			
	B	[M+H] ⁺	2	17		47,22%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	7			
	C	[M+H] ⁺	1	12		33,33%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	1			
N15	A	[M+H] ⁺	4	18	34	52,94%
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	10			
	B	[M+H] ⁺	4	16		47,06%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	5			
	C	[M+H] ⁺	1	10		29,41%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	1			

N16	A	[M+H] ⁺	4	18	31	58,06%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	4			
	B	[M+H] ⁺	4	16		51,61%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	3			
	C	[M+H] ⁺	2	8		25,81%
		[M+Na] ⁺	5			
		[M+K] ⁺	1			
N17	A	[M+H] ⁺	4	24	36	66,67%
		[M+Na] ⁺	12			
		[M+K] ⁺	8			
	B	[M+H] ⁺	4	25		69,44%
		[M+Na] ⁺	13			
		[M+K] ⁺	8			
	C	[M+H] ⁺	4	15		41,67%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	0			
N18	A	[M+H] ⁺	3	17	23	73,91%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	3			
	B	[M+H] ⁺	2	11		47,83%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	0			
	C	[M+H] ⁺	4	14		60,87%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	0			
N19	A	[M+H] ⁺	3	19	26	73,08%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	7			
	B	[M+H] ⁺	2	15		57,69%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	3			
	C	[M+H] ⁺	2	9		34,62%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	0			
N20	A	[M+H] ⁺	6	24	36	66,67%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	7			
	B	[M+H] ⁺	3	18		50,00%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	4			
	C	[M+H] ⁺	3	16		44,44%
		[M+Na] ⁺	12			
		[M+K] ⁺	1			

N21	A	[M+H] ⁺	2	18	28	64,29%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	5			
	B	[M+H] ⁺	3	13		46,43%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	3			
C	[M+H] ⁺	1	10	35,71%		
	[M+Na] ⁺	8				
	[M+K] ⁺	1				
N22	A	[M+H] ⁺	3	22	33	66,67%
		[M+Na] ⁺	12			
		[M+K] ⁺	7			
	B	[M+H] ⁺	2	11		33,33%
		[M+Na] ⁺	6			
		[M+K] ⁺	3			
C	[M+H] ⁺	2	15	45,45%		
	[M+Na] ⁺	12				
	[M+K] ⁺	1				
N23	A	[M+H] ⁺	3	18	27	66,67%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	4			
	B	[M+H] ⁺	1	10		37,04%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	1			
C	[M+H] ⁺	4	14	51,85%		
	[M+Na] ⁺	10				
	[M+K] ⁺	0				
N24	A	[M+H] ⁺	4	19	23	82,61%
		[M+Na] ⁺	12			
		[M+K] ⁺	3			
	B	[M+H] ⁺	2	14		60,87%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	2			
C	[M+H] ⁺	2	12	52,17%		
	[M+Na] ⁺	10				
	[M+K] ⁺	0				
N25	A	[M+H] ⁺	4	18	28	64,29%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	4			
	B	[M+H] ⁺	2	11		39,29%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	2			
C	[M+H] ⁺	4	15	53,57%		
	[M+Na] ⁺	11				
	[M+K] ⁺	0				

A	A	[M+H] ⁺	4	21	30	70,00%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	8			
	B	[M+H] ⁺	3	14		46,67%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	3			
	C	[M+H] ⁺	3	9		30,00%
		[M+Na] ⁺	6			
		[M+K] ⁺	0			
B	A	[M+H] ⁺	4	22	30	73,33%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	7			
	B	[M+H] ⁺	3	13		43,33%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	3			
	C	[M+H] ⁺	3	13		43,33%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	0			
C	A	[M+H] ⁺	3	15	22	68,18%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	4			
	B	[M+H] ⁺	3	13		59,09%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	0			
	C	[M+H] ⁺	4	13		59,09%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	0			
D	A	[M+H] ⁺	3	16	24	66,67%
		[M+Na] ⁺	10			
		[M+K] ⁺	3			
	B	[M+H] ⁺	3	19		79,17%
		[M+Na] ⁺	11			
		[M+K] ⁺	5			
	C	[M+H] ⁺	1	7		29,17%
		[M+Na] ⁺	6			
		[M+K] ⁺	0			
E	A	[M+H] ⁺	3	14	21	66,67%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	4			
	B	[M+H] ⁺	2	11		52,38%
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	2			
	C	[M+H] ⁺	1	5		23,81%
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	0			

5.4.1. Složení kondicionačního činidla

Počet aspirací/vypuštění v kroku kondicionace byl vždy 5. Tento počet aspirací/vypuštění byl rovněž doporučen výrobcem [97]. Počet aspirací/vypuštění tedy nebyl optimalizován, protože se předpokládalo, že nižší počet by mohl být nedostačující a počet vyšší než 5 by neměl vliv na extrakci v následujících fázích.

Pro tři celkově nejúčinnější postupy provedení μ SPE-PT (viz 5.4. a tabulku 6) byly využity jako kondicionační činidlo 0,1% FA, 100% ACN, resp. 50mM FA v 80% ACN. V kontrastu k tomu je nutno uvést, že pro tři nejméně účinné extrakční postupy byly využity 0,1% FA, 0,1% TFA a 100% ACN. Je důležité použít kondicionační činidlo, které spolehlivě solvuje funkční skupiny sorbentu. To je předpokladem úspěšné extrakce. Složení kondicionačního činidla však na další průběh extrakce významný vliv nemá.

5.4.2. Počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku

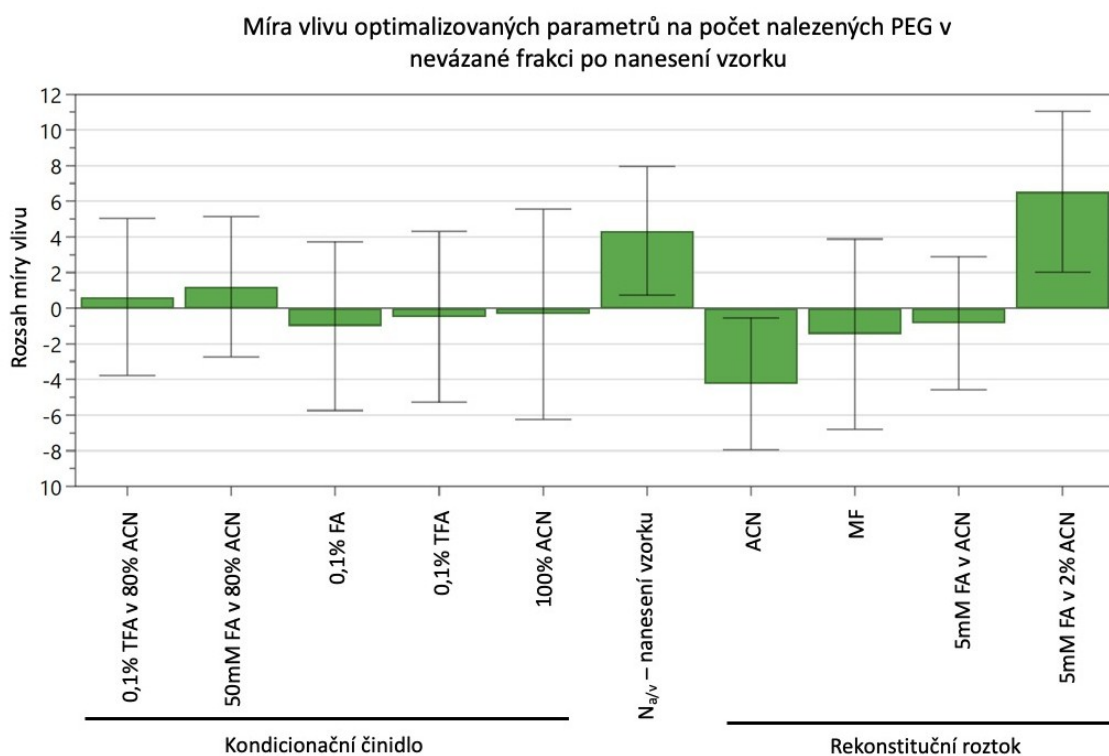
Počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku je rozhodující pro to, jaké látky obsažené ve vzorku a do jaké míry budou interagovat s funkčními skupinami sorbentu. Čím vyšší je počet aspirací/vypuštění, tím více příležitostí pro interakci se sorbentem mají jak v necílené analýze potenciální analyty, tak samozřejmě i kontaminanty, jako zde sledované PEG.

Nejdříve byl zvolen objem vzorku 10 μ l. Avšak pro problémy s praktickou proveditelností opakovaných aspirací/vypuštění tak malého objemu ze špičky bylo přistoupeno ke zvýšení objemu nanášeného vzorku na 15 μ l, které již bylo pro praktické provedení dostačující. Po kroku nanesení vzorku získaná extrakční frakce A byla odpařena, rekonstituována a nastříknuta do UHPLC-HRMS systému (viz 4.4.).

Pro tři celkově nejúčinnější postupy provedení μ SPE-PT (viz 5.4. a tabulku 6) byl využit počet 5, 10 a 25 aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku. Naopak pro tři celkově nejméně účinné postupy byl využit počet 1, 10 a opět 1 aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku. Z uvedeného jasně vyplývá, že počet 5 aspirací/vypuštění během nanášení vzorku je mezní. Lze říci, že počet méně než 5 aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku je nedostačující. Naopak počet aspirací/vypuštění vyšší než 5 lze použít s výhodou. Dříve provedené experimenty a návody od výrobce použily počet 10 aspirací/vypuštění, který se v kontextu výsledků tohoto experimentu jeví jako dostačující.

Bude-li hodnocen počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku čistě z hlediska toho, při kterém se na sorbent vázalo nejméně PEG, tj. nejvíce jich zůstalo nevázaných v původním vzorku, pak to byly postupy N24, N14 a N9. Ty využily počet 50, 10 a 1 aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku. Naopak tři postupy, během kterých se vázalo na sorbent nejvíce PEG, tj. N1, N3 a N4, využily vždy počet pouze 1 aspirace/vypuštění. Bylo potvrzeno, že počet méně než 5 aspirací/vypuštění není vhodné využít. U postupů, kde se na sorbent vázalo nejméně PEG je rozpětí počtu aspirací/vypuštění od 1 do 50. V kontextu ostatních výsledků však lze říci, že se optimum počtu aspirací/vypuštění bude pohybovat kolem 10, počet 1 není vhodné použít a počet 50 by ve srovnání s 10 příliš zvýšil náročnost provedení μ SPE-PT.

Pomocí softwaru ModdePro byla vyhodnocena míra vlivu počtu aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku a míra vlivu jednotlivých testovaných složení kondičionálního činidla na počet nalezených PEG v nevázané frakci po nanesení vzorku (frakce A). Výsledek vyhodnocení je uveden na obrázku 11.



Obrázek 11: Míra vlivu optimalizovaných parametrů na počet nalezených PEG v nevázané frakci po nanesení vzorku (frakce A). Kladná čísla znamenají zvýšení počtu nalezených PEG ve frakci A, tzn. že se PEG v kroku nanesení vzorku nevázaly na sorbent, ale zůstaly v původním vzorku.

Z optimalizovaných složení kondicionačního činidla má na počet nalezených PEG největší kladný vliv 50mM FA v 80% ACN. Složení kondicionačního činidla však má na počet nalezených PEG ve frakci A minimální vliv. Významný kladný vliv na počet nalezených PEG má počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku. 5mM FA v 2% ACN má na počet nalezených potenciálních markerů největší kladný vliv z testovaných složení rekonstitučních roztoků. Nutno zde však poznamenat, že vliv na zvýšení počtu nalezených PEG, potažmo všech látek ve vzorku má vedle složení rekonstitučního roztoku např. i stabilita daných látek či menší matricové efekty.

5.4.3. Složení promývacího činidla a počet aspirací/vypuštění v kroku promývání

Během promývání je základním požadavkem zbavit se kontaminantů, zde PEG, z původního vzorku při zachování retence maximálního počtu potenciálních analytů na sorbentu. Analogicky jako při nanesení vzorku, jen inverzně, platí, že čím nižší je počet aspirací/vypuštění tím mají jak kontaminanty, tak potenciální analyty menší možnost se z interakce na sorbent uvolnit. Naopak čím je počet aspirací/vypuštění vyšší, tím více kontaminantů se může uvolnit, stejně se však lze připravit o více potenciálních analytů. Po kroku promývání získaná extrakční frakce B byla odpařena, rekonstituována a nastříknuta do UHPLC-HRMS systému (viz 4.4.).

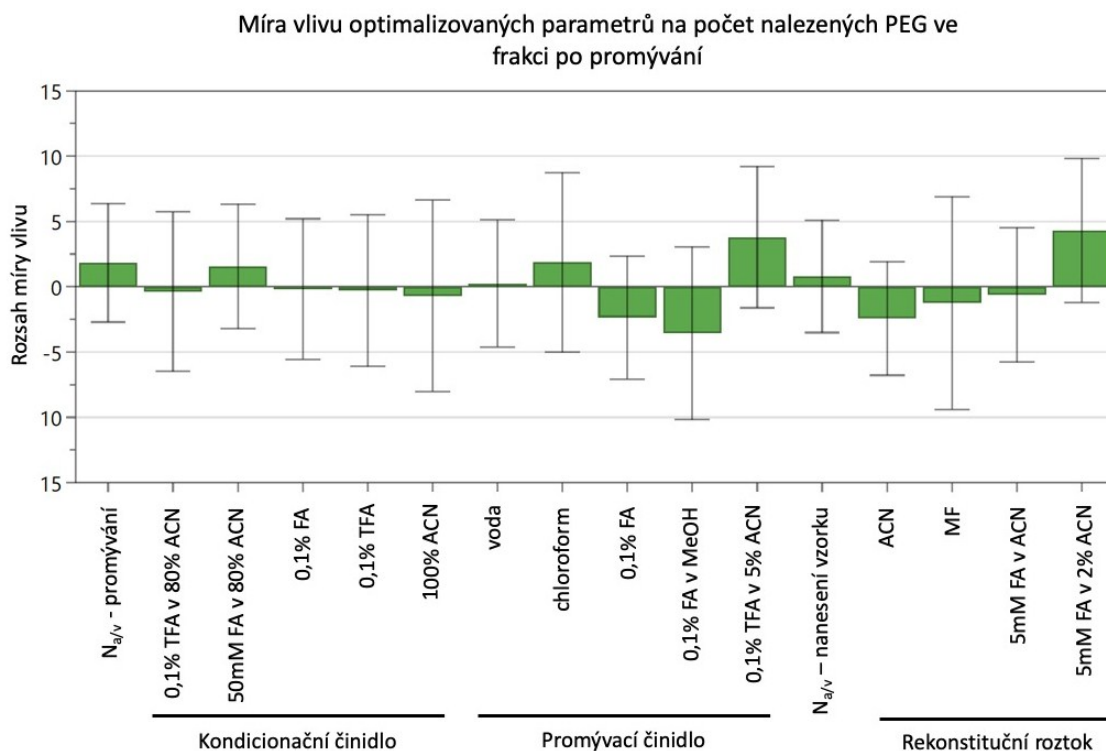
Pro tři celkově nejúčinnější postupy provedení μ SPE-PT (viz 5.4. a tabulku 6) byly využity jako promývací činidlo voda, 0,1% TFA v 5% ACN a voda v počtu 50, 5 a 5 aspirací/vypuštění. Naopak pro tři celkově nejméně účinné postupy byly využity 0,1% TFA v 5% ACN, chloroform a voda v počtu 10, 10 a 5 aspirací/vypuštění. Podle získaných výsledků lze říci, že dobrého vymytí PEG je dosaženo s použitím rozpouštědel s nízkou eluční silou jako je voda, avšak v dostatečném počtu aspirací/vypuštění. Vhodné je také okyselení promývacího činidla, např. TFA. U nejméně účinných postupů pak lze vidět, že bylo použito, až na chloroform, rovněž rozpouštědel s nízkou eluční silou, příp. s přísadkou kyselého aditiva. Celková účinnost extrakce však závisí také na následném kroku po promývání – eluci. Lze tedy říci, že v těchto případech bylo použito nevhodného elučního činidla. PEG neuvolněné během vymývání pak byly uvolněny při eluci.

Zmínit se zde přísluší o počtu 50 aspirací/vypuštění, který je prakticky manuálně proveditelný, ovšem při vyšším počtu vzorků již může být provedení značně náročné,

proto by v takovém případě bylo potřeba tento počet optimalizovat z hlediska vztahu náročnosti provedení a získaných výsledků, případně zvolit alternativní extrakční postup.

Bude-li hodnocena pouze účinnost samotného promývání, pak třemi postupy, kde bylo vymyto ze sorbentu nejvíce PEG jsou postupy D, N1 a N13, naopak ty, kde bylo PEG vymyto nejméně jsou N21, N22 a N5. Postupy s nejúčinnějším krokem promývání využily jako promývací rozpouštědlo 0,1% FA v MeOH, 0,1% TFA v 5% ACN a vodu v počtu 5, 10 a 10 aspirací/vypuštění. Postupy s nejméně účinným krokem promývání využily jako promývací rozpouštědlo 0,1% FA v MeOH, vodu a opět vodu v počtu 50, 1 a 5 aspirací/vypuštění. Zde lze opět vidět u nejúčinnějších postupů využití vody, coby rozpouštědla s malou eluční silou, resp. vody s 5 % ACN a okyselené TFA a v počtu 10 aspirací/vypuštění. Nejméně účinné bylo promývání s využitím vody. Neefektivnost je zde způsobena příliš nízkým počtem aspirací/vypuštění. Použití MeOH, rozpouštědla s vyšší eluční silou, než má voda, avšak stále výrazně nižší než má chloroform, v kombinaci s kyselým aditivem, je pro promývání sporné. 0,1% FA v MeOH totiž byla použita jak v případě nejúčinnějšího promývání, tak v jednom z případů nejméně účinného promývání.

Pomocí softwaru ModdePro byla vyhodnocena míra vlivu jednotlivých optimalizovaných parametrů v kroku promývání a optimalizovaných parametrů předcházejících kroků (kondicionace, nanesení vzorku) na počet nalezených PEG ve frakci po promývání (frakce B). Výsledek vyhodnocení je uveden na obrázku 12.



Obrázek 12: Míra vlivu optimalizovaných parametrů na počet nalezených PEG ve frakci po promývání (frakce B). Kladná čísla znamenají zvýšení počtu nalezených PEG ve frakci B, tzn. že se PEG v kroku promývání uvolnily ze sorbentu do frakce B.

Z optimalizovaných složení promývacího činidla má na počet nalezených PEG největší kladný vliv 0,1% TFA v 5% ACN. Složení kondicionačního činidla na počet nalezených PEG ve frakci B příliš velký vliv nemá. Významnější kladný vliv na počet nalezených PEG má počet aspirací/vypuštění v kroku promývání, což je logické. Počet aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku má malý vliv. Samozřejmě ale počet PEG nalezených ve frakci B ovlivňuje. Čím více PEG se totiž váže na sorbent při nanesení vzorku, tím více jich může být vymyto a naopak. 5mM FA v 2% ACN má na počet nalezených potenciálních markerů největší kladný vliv z testovaných složení rekonstitučních roztoků. Opět je zde nutno uvést, že kladný vliv na zvýšení počtu nalezených PEG mohou mít i další faktory.

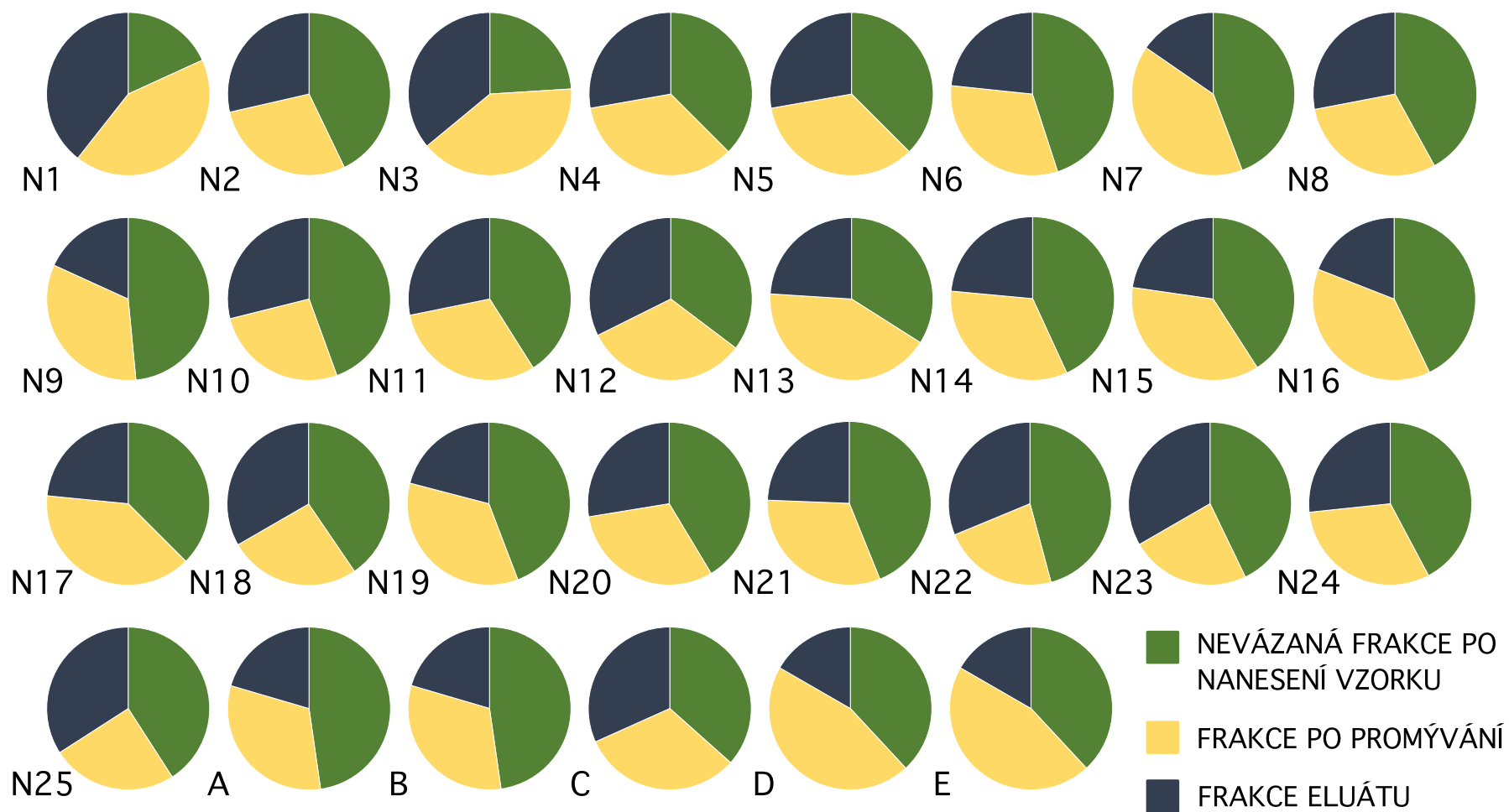
5.4.4. Složení elučního činidla a počet aspirací/vypuštění v kroku eluce

Posledním a stěžejním krokem μ SPE-PT je eluce potenciálních analytů, přičemž je potřeba docílit toho, aby se elovalo co nejméně kontaminantů včetně PEG. Po kroku

eluze získaná extrakční frakce C byla odpařena, rekonstituována a nastříknuta do UHPLC-HRMS systému (viz 4.4.).

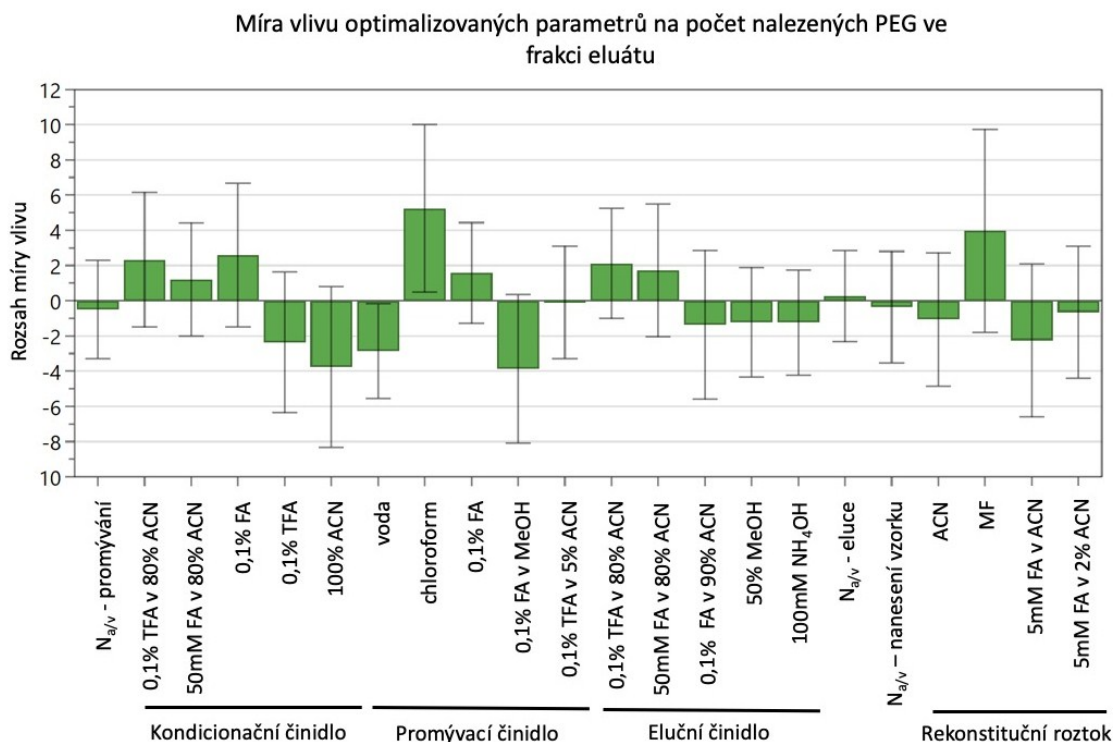
Jako celkově nejúčinnější byly tedy označeny postupy, kde se z celkového počtu PEG v původním vzorku před extrakcí eluoval nejmenší podíl PEG. Celkový počet PEG v původním vzorku před extrakcí odpovídá součtu PEG nevázaných na sorbent v prvním kroku, PEG vymytých v kroku následujícím i PEG uvolněných během eluce. Naopak jako nejméně účinné byly označeny postupy, kde se z celkového počtu PEG zaznamenaných ve všech 3 frakcích eluoval nejvyšší podíl PEG. Přehledně jsou podíly počtu PEG nalezených ve frakci eluátu jednotlivých postupů porovnány s ostatními dvěma analyzovanými frakcemi na koláčových grafech na obrázku 13.

Třemi celkově nejúčinnějšími postupy (viz 5.4. a tabulku 6) byly N7, E a N16. Zde byly jako eluční činidlo využity 50% MeOH, dále dvakrát shodně 100mM hydroxid amonný, a to v počtu 5, 10 a 1 aspirací/vypuštění. Tři celkově nejméně účinné postupy byly N1, N12 a N5. Zde byly jako eluční činidlo využity 50mM FA v 80% ACN, dále shodně 0,1% FA v 90% ACN v počtu 1, 5, 50 aspirací/vypuštění. Účinnější jsou postupy, které pro eluci využívají činidlo na vodné bázi, resp. ve směsi s MeOH 50:50 (v/v). Jako velice vhodné eluční činidlo se ukázal 100mM hydroxid amonný, který byl již dříve použit při μ SPE-PT s cílem eliminace PEG ve vzorku pro proteomickou analýzu. Naproti tomu eluční činidla s vysokým podílem organického rozpouštědla, zvláště ACN s přídavkem aditiva (zde FA) se pro eliminaci PEG ze vzorku neosvědčila. K počtu aspirací/vypuštění lze vzhledem k výsledkům dosaženým ve třech nejúčinnějších postupech pro odstranění PEG říci, že počet 5–10 je pro eluci optimální. [98]



Obrázek 13: Znázornění podílů počtu nalezených PEG v jednotlivých extrakčních frakcích k celkovému počtu PEG nalezených ve všech frakcích daného postupu provedení μ SPE-PT. Barevně jsou tak odlišeny výseče odpovídající hodnotám N_f/N_{ff} pro frakci A, B a C jednotlivých postupů. Jak vyplývá z údajů uvedených v Tab. 6, stejné PEG mohou být přítomny současně v různých frakcích (A, B, C). Proto jednotlivé výseče odpovídají součtu tří N_f/N_{ff} v jednotlivých frakcích korigovanému na 100 % plochy koláčového grafu.

Pomocí softwaru ModdePro byla vyhodnocena míra vlivu jednotlivých optimalizovaných parametrů na počet nalezených PEG ve frakci eluátu. Výsledek vyhodnocení je uveden na obrázku 14.



Obrázek 14: Míra vlivu optimalizovaných parametrů na počet nalezených PEG ve frakci eluátu (frakce C). Kladná čísla znamenají zvýšení počtu nalezených PEG ve frakci C, tzn. že se PEG během eluce uvolnily ze sorbentu společně s metabolity do frakce C. Kladný vliv (tj. účinnější eliminace) na počet PEG ve frakci C označují hodnoty záporné.

Z optimalizovaných složení kondicionačního činidla má na počet nalezených PEG největší kladný vliv 100% ACN. Největší kladný vliv na počet nalezených PEG má z testovaných složení promývacího činidla 0,1% TFA v 5% ACN a z testovaných složení elučního činidla 0,1% FA v 90% ACN. Při srovnání míry vlivu počtu aspirací/vypuštění v jednotlivých krocích má největší kladný vliv na počet nalezených PEG počet aspirací/vypuštění v kroku promývání. Příliš se však neliší od míry vlivu počtu aspirací/vypuštění v kroku nanesení vzorku a kroku eluce. Počty aspirací/vypuštění v jednotlivých krocích však v porovnání se složením extrakčních činidel mají na počet nalezených PEG ve frakci eluátu nízký vliv. 5mM FA v ACN má na počet nalezených potenciálních markerů největší kladný vliv z testovaných složení rekonstitučních roztoků.

Při srovnání těchto výsledků s parametry celkově nejúčinnějšího postupu N7 lze vidět nevhodnost využití 0,1% FA jako kondicionačního činidla. Protože bylo prokázáno, že složení kondicionačního činidla má obecně velmi malý vliv na počet nalezených PEG, jde v tomto případě o nepříliš významnou odchylku od uvedených výsledků. Jako promývací činidlo byla v postupu N7 použita voda. Ve srovnání s výsledky na obrázku 14 jde o vhodné promývací činidlo. Voda má hned po 0,1% FA v MeOH největší kladný vliv na počet nalezených PEG v eluátu. Pro eluci byl v postupu N7 použit 50% MeOH. Opět byla nalezena shoda s výsledky (viz obrázek 14), protože 50% MeOH má druhý největší kladný vliv na počet nalezených PEG v eluátu. Pro rekonstituci byla u postupu N7 použita 5mM FA v 2% ACN. Bylo ukázáno, že i ta má kladný vliv na počet nalezených PEG v eluátu, ačkoliv nižší.

5.4.5. Složení roztoku pro rekonstituci

Po eluci a odpaření byly vzorky před UHPLC-HRMS analýzou rekonstituovány. U tří celkově nejúčinnějších postupů μ SPE-PT byly pro rekonstituci zvoleny 5mM FA v 2% ACN, MF a ACN. U tří celkově nejméně účinných postupů byly pro rekonstituci použity 5mM FA v ACN, ACN a MF. Složení rekonstitučního roztoku může ovlivnit proces ionizace metabolitů, kontaminantů i dalších látek obsažených ve vzorku, v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Proto byl tento parametr v rámci experimentu pro tuto diplomovou práci též optimalizován.

Pomocí softwaru ModdePro byla vyhodnocena míra vlivu složení rekonstitučního roztoku na počet nalezených PEG ve všech třech analyzovaných frakcích (A, B, C) (viz 5.4.2–5.4.4.). Vyhodnocena byla i míra vlivu složení rekonstitučního roztoku na počet nalezených potenciálních markerů ve frakci eluátu (viz 5.5.).

Z optimalizovaných složení rekonstitučního roztoku má 5mM FA v 2% ACN na počet nalezených PEG ve frakci A, ve frakci B největší kladný vliv. Na počet nalezených PEG ve frakci C má největší kladný vliv 5mM FA v ACN. Na počet nalezených potenciálních markerů má největší kladný vliv 5mM FA v 2% ACN ještě větší, avšak záporný vliv na počet nalezených potenciálních markerů má 5mM FA v ACN.

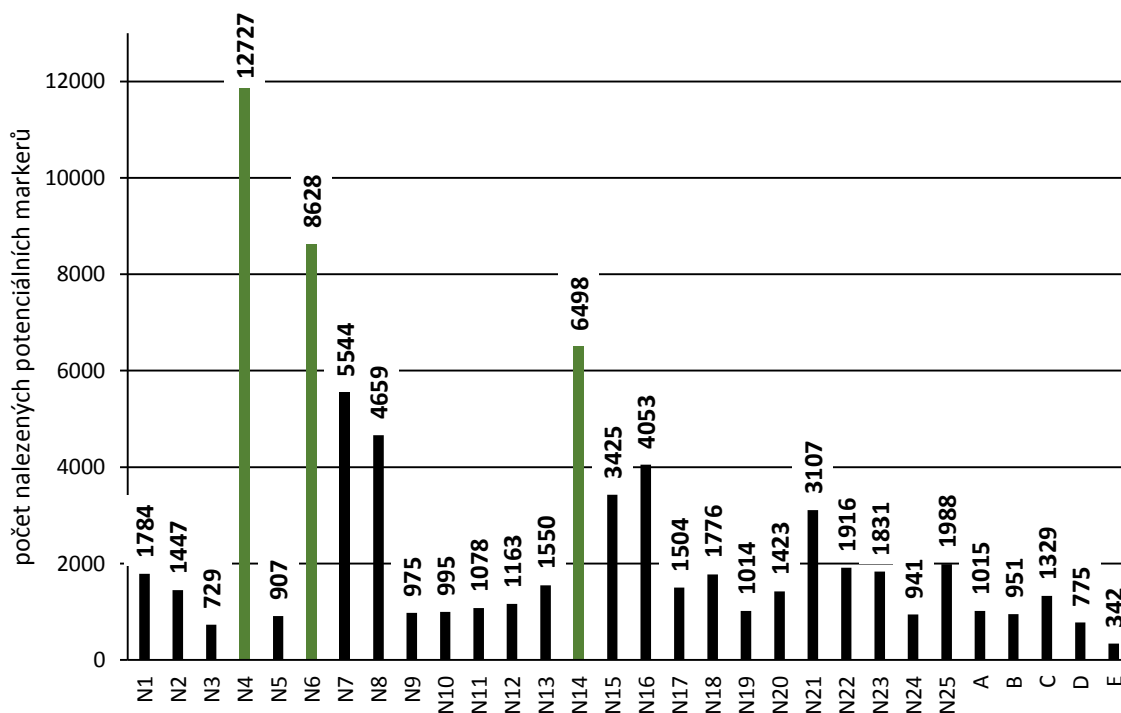
Pro rekonstituci vzorků pro necílenou metabolomickou analýzu je nejvhodnější využití 5mM FA v 2% ACN. Použití 5mM FA v ACN může být vhodné využít z hlediska eliminace PEG, jak tomu bylo u celkově nejúčinnějšího postupu N7. Byl zde nalezen i

poměrně vysoký počet potenciálních markerů. Nelze však vyloučit, že by při použití 5mM FA v 2% ACN byl počet nalezených potenciálních markerů ještě vyšší.

5.5. Necílená analýza – potenciální markery

Software MarkerLynx je vhodné využít pro vyhodnocení výsledků experimentů při necílených analýzách. Nutno však mít na paměti, že mezi potenciálními markery, které software dokáže vyhodnotit, budou přítomny i kontaminanty, jsou-li ve vzorku přítomny. Software je bude rovněž považovat za potenciální markery. Toho bylo využito k vyhodnocení počtu PEG v experimentu v rámci této diplomové práce.

Software vyhodnotil ve frakcích eluátu pro všechny vzorky potenciální markery, mezi nimiž jsou ve vzorcích kontaminovaných PEG právě i tyto (viz 4.8.1.). Počty potenciálních markerů vyhodnocených softwarem MarkerLynx s nenulovou intenzitou pro jednotlivé postupy jsou uvedeny na obrázku 15. Třemi postupy, ve kterých software našel nejvíce potenciálních markerů jsou N4, N6 a N14, jež jsou v grafu znázorněny zeleně. Z výše uvedeného vyplývá, že tyto vzorky mohou obsahovat vysoký počet molekul, které mohou mít vztah k biologické interpretaci, tedy molekuly, které se snaží necílená analýza identifikovat. Stejně je ale na druhou stranu možné, že je v těchto



Obrázek 15: Celkový počet nalezených potenciálních markerů v jednotlivých postupech provedení μ SPE-PT.

vzorcích zvýšená přítomnost kontaminantů, jako právě například PEG, které mohou samotné odhalení jiných látek znemožňovat.

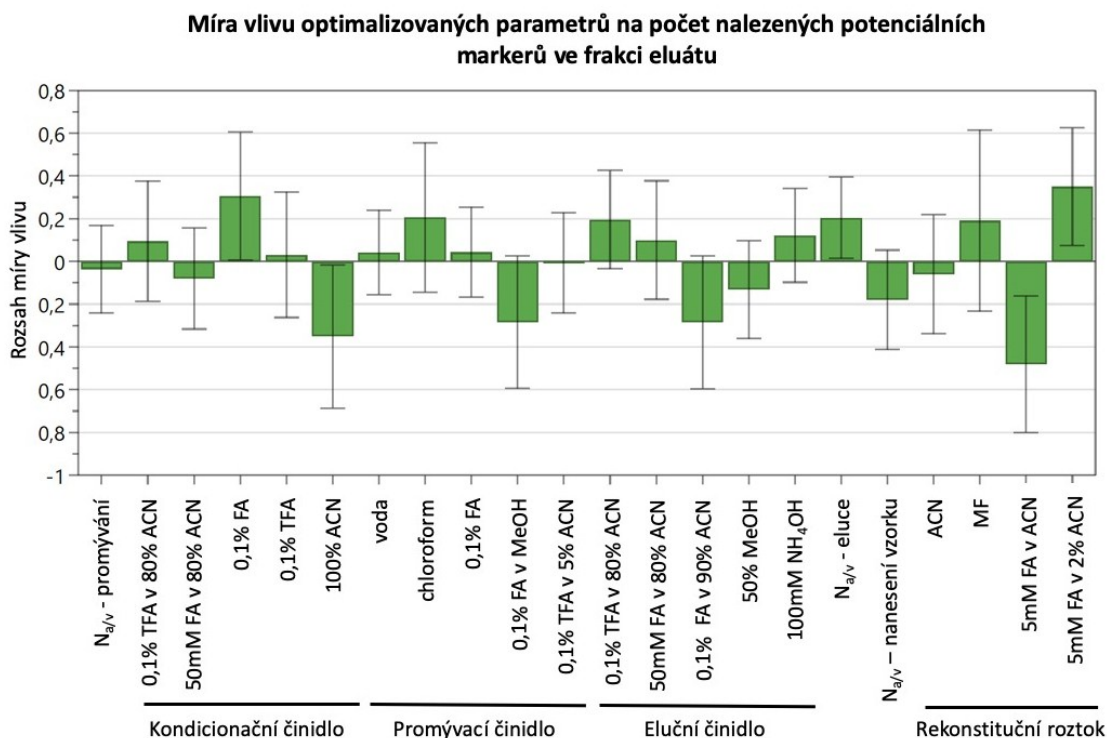
Pro celkově nejúčinnější μ SPE-PT postup N7 lze vidět poměrně vysoký počet potenciálních markerů. Postup N7 se jeví jak vysoce účinný z hlediska eliminace PEG, tak z počtu zachování potenciálních molekul zájmu ve frakci eluátu.

Pro další celkově nejúčinnější μ SPE-PT postup E lze naopak vidět zcela nejnižší počet nalezených potenciálních markerů ze všech prováděných postupů. Nutno však říci, že i takový počet potenciálních markerů by mohl být dostačující, pokud jsou v eluátu zachovány ty molekuly, které mají přímý vztah k biologické interpretaci. Molekuly, které mohou mít vztah k biologické interpretaci u pacientek s vulvovaginálním dyskomfortem způsobeným *C. albicans* již byly vybrány [96]. Potvrzení vhodnosti použití μ SPE-PT postupu E pro přípravu vzorku pro současnou eliminaci počtu PEG a zároveň zachování vybraných molekul zájmu ve frakci eluátu bude předmětem další práce.

Pro třetí celkově nejúčinnější μ SPE-PT postup N16 lze vidět podobný výsledek jako pro postup N7. Poměrně vysoký počet potenciálních markerů nalezených ve frakci eluátu je zde spojen s poměrně účinnou eliminací počtu PEG.

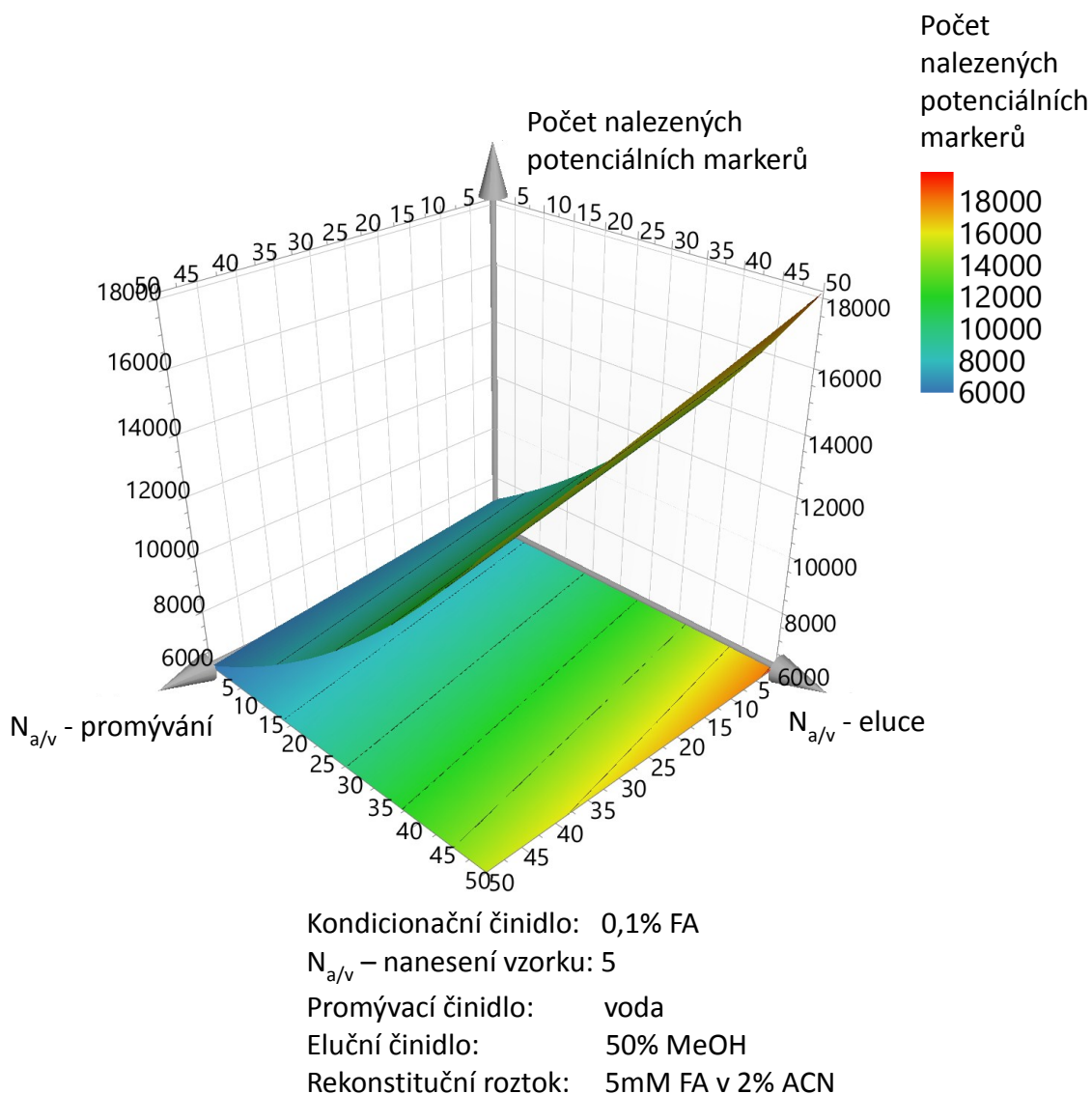
Pomocí softwaru ModdePro byla vyhodnocena míra vlivu jednotlivých optimalizovaných parametrů na počet nalezených potenciálních markerů ve frakci eluátu. Výsledek vyhodnocení je uveden na obrázku 16.

Z optimalizovaných složení kondičního činidla má na počet nalezených potenciálních markerů největší kladný vliv 0,1% FA. Největší kladný vliv na počet nalezených potenciálních markerů má z testovaných složení promývacího činidla chloroform a z testovaných složení elučního činidla 0,1% TFA v 80% ACN. Při srovnání míry vlivu počtu aspirací/vypuštění v jednotlivých krocích má největší kladný vliv počet aspirací/vypuštění v kroku eluce. 5mM FA v 2% ACN má na počet nalezených potenciálních markerů největší kladný vliv z testovaných složení rekonstitučních roztoků.



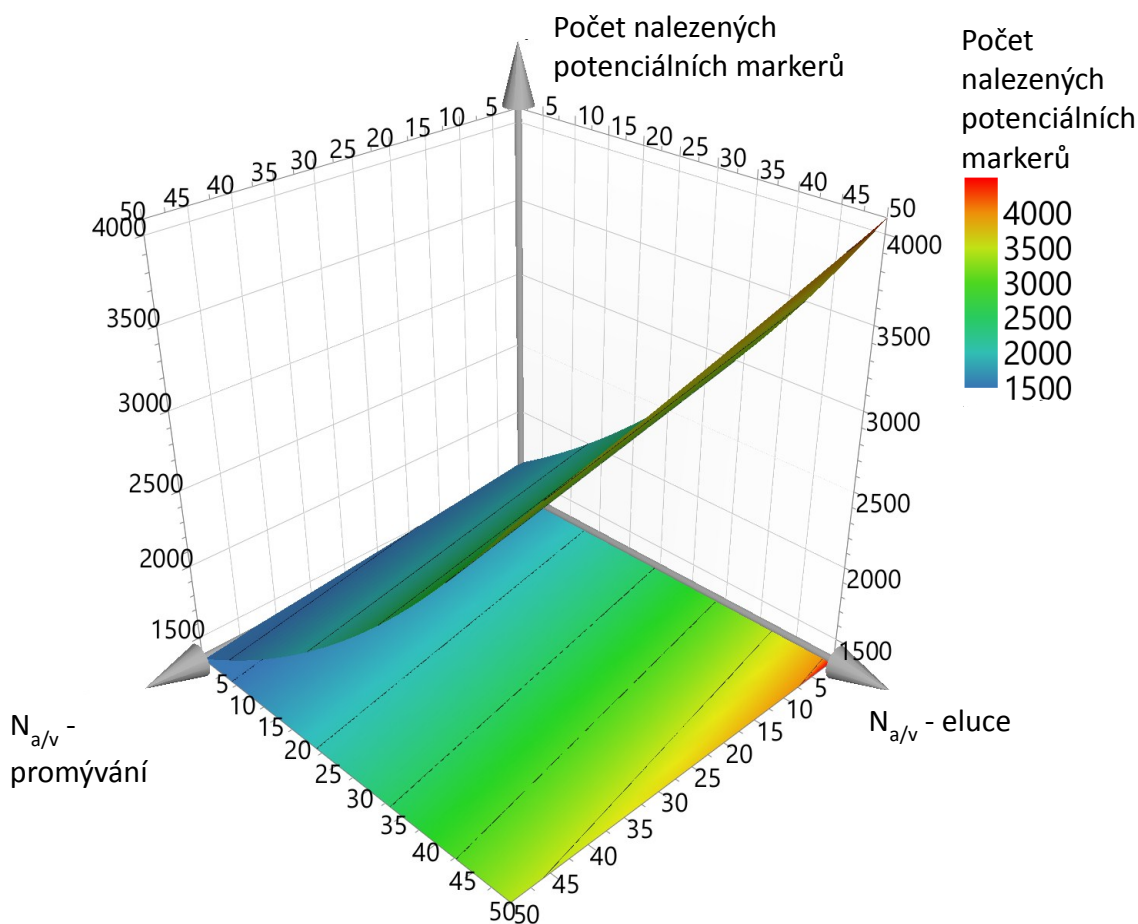
Obrázek 16: Míra vlivu optimalizovaných parametrů na počet nalezených potenciálních markerů ve frakci eluátu (frakce C). Kladná čísla znamenají zvýšení počtu nalezených potenciálních markerů ve frakci C.

Pro celkově nejúčinnější postup provedení μ SPE-PT – N7 byl s využitím softwaru Modde Pro vytvořen 3D graf (obrázek 17) závislosti počtu aspirací/vypuštění v kroku promývání a v kroku eluce na počtu nalezených potenciálních markerů (viz též 5.5.). Na škále barevného přechodu lze vidět, že nejvyššího počtu nalezených potenciálních markerů lze dosáhnout kombinací počtu 5–10 aspirací/vypuštění v kroku promývání a počtu 50 aspirací/vypuštění v kroku eluce. Pro tuto kombinaci lze dosáhnout počtu až 18 000 nalezených potenciálních markerů. V experimentu provedeném v rámci této práce byl proveden pouze v návrhu experimentu uvedený postup N7 s využitím 50 aspirací/vypuštění v kroku promývání a 5 aspirací/vypuštění v kroku eluce. Tyto podmínky odpovídají modrým hodnotám na škále na obrázku 17, což znamená, že byl nalezen počet potenciálních markerů do 6 000. μ SPE-PT postup využívající podmínky vyhodnocené jako nejideálnější z hlediska počtu nalezených markerů nebyl v této práci testován.



Obrázek 17: Míra vlivu počtu aspirací/vypuštění v kroku promývání a v kroku eluce na počet nalezených potenciálních markerů pro postup N7.

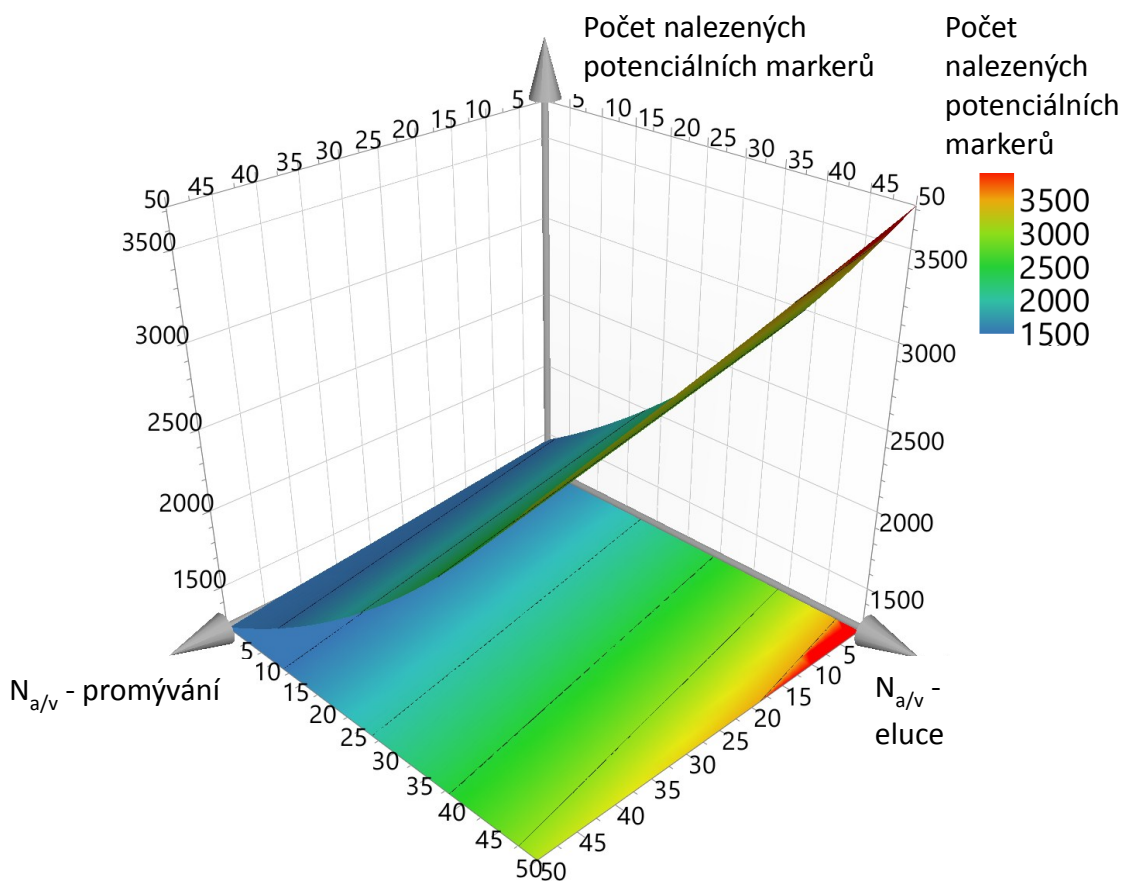
Stejný 3D graf (obrázek 18) byl vytvořen i pro druhý celkově nejúčinnější postup provedení μ SPE-PT – E. Na škále barevného přechodu lze vidět, že nejvyššího počtu nalezených potenciálních markerů lze dosáhnout kombinací počtu 5 aspirací/vypuštění v kroku promývání a počtu 50 aspirací/vypuštění v kroku eluce. V porovnání s postupem N7 lze dosáhnout při popsaných podmínkách počtu 4 000 nalezených potenciálních markerů. To je v porovnání s postupem N7 4,5krát méně. Je zde tedy riziko, že na úkor účinné eliminace PEG, při využití tohoto postupu, nebudou zaznamenány látky, které mohou mít vztah k biologické interpretaci.



Kondičnační činidlo: 100% ACN
 $N_{a/v}$ – nanesení vzorku: 10
 Promývací činidlo: 0,1% TFA v 5% ACN
 Eluční činidlo: 100mM NH_4OH
 Rekonstituční roztok: MF

Obrázek 18: Míra vlivu počtu aspirací/vypuštění v kroku promývání a v kroku eluce na počet nalezených potenciálních markerů pro postup E.

Dále byl 3D graf (obrázek 19) vytvořen i pro třetí celkově nejúčinnější postup provedení $\mu\text{SPE-PT} - \text{N16}$. Na škále barevného přechodu lze vidět, že nejvyššího počtu nalezených potenciálních markerů lze podobně jako v předešlém případě dosáhnout kombinací počtu 5–10 aspirací/vypuštění v kroku promývání a počtu 50 aspirací/vypuštění v kroku eluce. Za těchto podmínek lze dosáhnout počtu více než 3 500 nalezených potenciálních markerů. Podobně jako v předešlém případě i zde je počet nalezených markerů v porovnání s postupem N7 výrazně nižší.



Kondičnační činidlo: 50mM FA v 80% ACN

$N_{a/v}$ – nanesení vzorku: 25

Promývací činidlo: voda

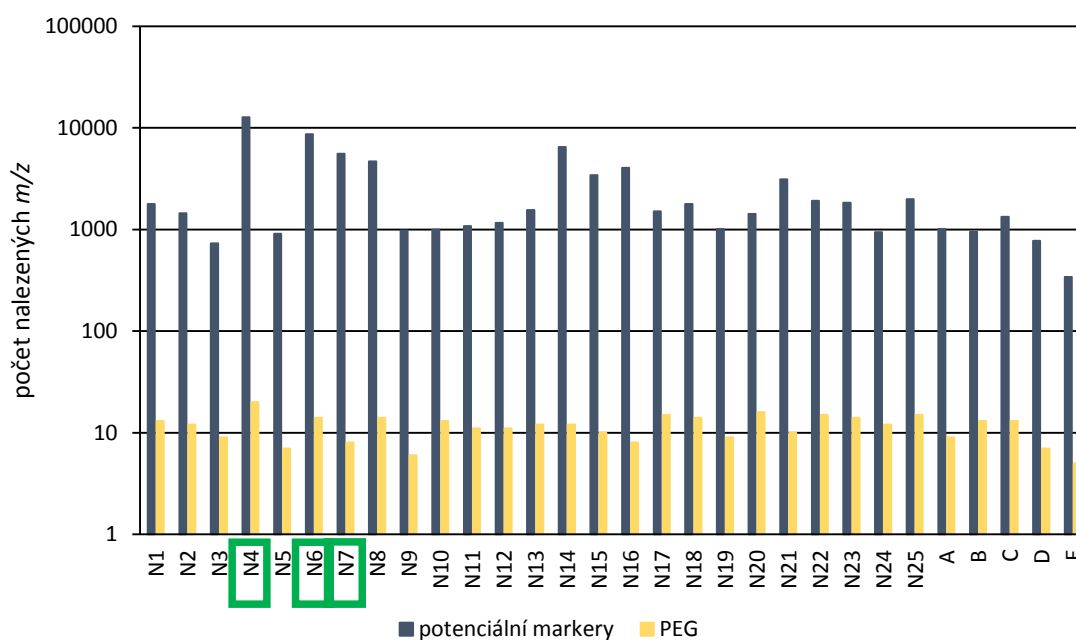
Eluční činidlo: 100mM NH_4OH

Rekonstituční roztok: ACN

Obrázek 19: Míra vlivu počtu aspirací/vypuštění v kroku promývání a v kroku eluce na počet nalezených potenciálních markerů pro postup N16.

Souhrnné srovnání počtu nalezených PEG a počtu nalezených potenciálních markerů ve frakci eluátu (C) je znázorněno v logaritmickém měřítku na obrázku 20. Snahou necíleného metabolického experimentu je dosáhnout co největšího rozdílu mezi těmito hodnotami: nalézt co nejvyšší počet potenciálních markerů při co nejnižší kontaminaci PEG, případně dalšími kontaminanty. Nejvhodnější poměr mezi počtem eliminovaných PEG a počtem nalezených potenciálních markerů byl zjištěn u postupů N4, N6 a N7. Opět se zde potvrzuje vhodnost využití postupu N7. Ač jsou postupy N4 a N6 méně účinné z hlediska eliminace PEG (viz tabulku 6) mohou být účinně využity pro přípravu vzorku v necíleném metabolickém experimentu. Naopak pro eliminaci PEG

poměrně účinný postup E má ve srovnání s předešle jmenovanými postupy nízký poměr mezi počtem nalezených potenciálních markerů a neeliminovaných PEG.



Obrázek 20: Srovnání počtu nalezených PEG a nalezených potenciálních markerů ve frakci eluátu pro jednotlivé provedené μ SPE-PT postupy. Pro necílenou metabolickou analýzu je vhodné dosáhnout co největšího rozdílu mezi počtem neeliminovaných PEG a nalezených potenciálních markerů. V zeleném rámečku jsou označeny tři postupy (N4, N6, N7) u nichž byl zaznamenán nejlepší poměr mezi počtem eliminovaných PEG a zaznamenaných potenciálních markerů.

5.6. Opakovatelnost metody

V experimentu optimalizace μ SPE-PT byly provedeny 3 náhodně vybrané dílčí postupy: N3, N7 a N11 také s využitím pipetovacích špiček odlišné šarže, zcela identicky, pro ověření výsledku opakovatelnosti celé metody. Tyto 3 provedené postupy jsou označeny II/N3, II/N7 a II/N11. Přehled výsledků vyhodnocení počtu nalezených PEG získaných provedením μ SPE-PT s odlišnou šarží pipetovacích špiček shrnuje tabulka 7.

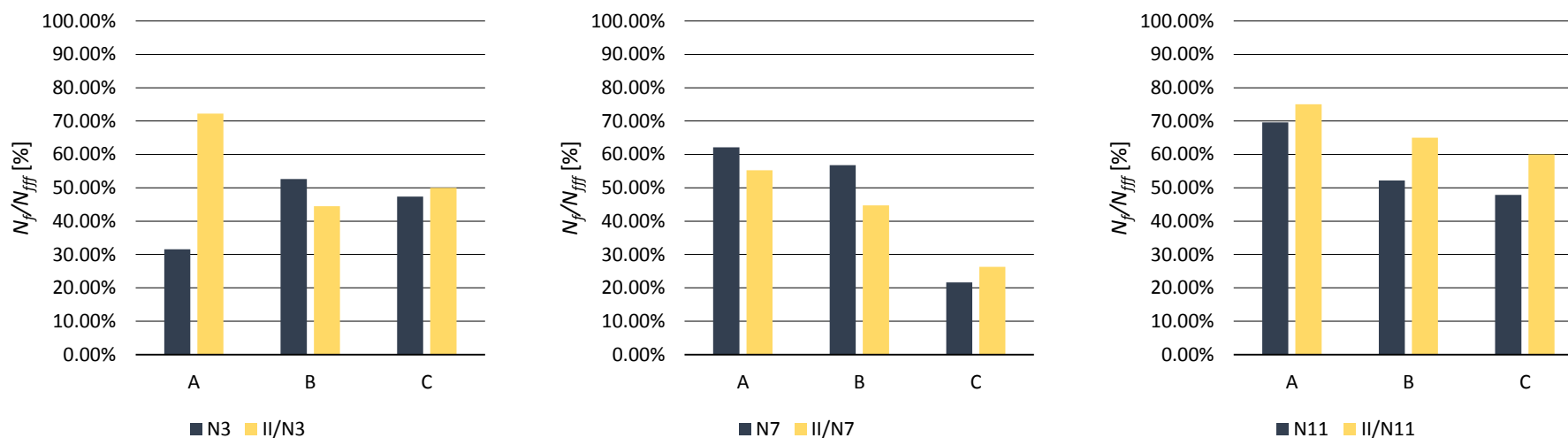
Tabulka 7: Přehled výsledků vyhodnocení počtu přítomných PEG – druhá šarže pipetovacích špiček.

Název postupu	Extrakční frakce	Typ aduktu v MS	Počet aduktů PEG	Počet PEG v extrakční frakci (N_f)	Počet PEG ve všech 3 frakcích (N_{fff})	$\frac{N_f}{N_{fff}}$ [%]
II/N3	A	[M+H] ⁺	3	13	18	72,22%
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	2			
	B	[M+H] ⁺	1	8		
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	0			
	C	[M+H] ⁺	1	9		
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	0			
II/N7	A	[M+H] ⁺	4	21	38	55,26%
		[M+Na] ⁺	6			
		[M+K] ⁺	11			
	B	[M+H] ⁺	7	17		
		[M+Na] ⁺	6			
		[M+K] ⁺	4			
	C	[M+H] ⁺	1	10		
		[M+Na] ⁺	8			
		[M+K] ⁺	1			
II/N11	A	[M+H] ⁺	3	15	20	75,00%
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	3			
	B	[M+H] ⁺	3	13		
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	1			
	C	[M+H] ⁺	3	12		
		[M+Na] ⁺	9			
		[M+K] ⁺	0			

Z výsledků získaných UHPLC-HRMS analýzou tří extrakčních frakcí (A, B, C) pro každý postup pak byly vypočteny relativní směrodatné odchylky (RSD) procentuálně vyjádřených podílů počtu PEG nalezených v dané frakci k celkovému počtu PEG nalezených ve všech třech frakcích (N_f/N_{fff}) odpovídajících postupů. Přehledné srovnání výsledků vyhodnocení počtu nalezených PEG s vypočtenými RSD odpovídajících μ SPE-PT postupů je uvedeno v tabulce 8. Srovnání procentuálně vyjádřených hodnot N_f/N_{fff} v odpovídajících μ SPE-PT postupech s využitím odlišných šarží pipetovacích špiček lze vidět na grafech na obrázku 21.

Tabulka 8: Přehled srovnání výsledků vyhodnocení počtu nalezených PEG mezi odpovídajícími μ SPE-PT postupy provedenými s odlišnými šaržemi pipetovacích špiček.

Název postupu	Extrakční frakce	Počet PEG v extrakční frakci (N_f)	Počet PEG ve všech 3 frakcích (N_{fff})	$\frac{N_f}{N_{fff}}$ [%]	Název postupu	Extrakční frakce	Počet PEG v extrakční frakci (N_{f-II})	Počet PEG ve všech 3 frakcích (N_{fff-II})	$\frac{N_{f-II}}{N_{fff-II}}$ [%]	RSD hodnot $\frac{N_f/N_{fff}}{N_{f-II}/N_{fff-II}}$ [%]
N3	A	6	19	31,58%	II/N3	A	13	18	72,22%	39,2%
	B	10		52,63%		B	8		44,44%	8,4%
	C	9		47,37%		C	9		50,00%	2,7%
N7	A	23	37	62,16%	II/N7	A	21	38	55,26%	5,9%
	B	21		56,76%		B	17		44,74%	11,8%
	C	8		21,62%		C	10		26,32%	9,8%
N11	A	16	23	69,57%	II/N11	A	15	20	75,00%	3,8%
	B	12		52,17%		B	13		65,00%	11,0%
	C	11		47,83%		C	12		60,00%	11,3%



Obrázek 21: Srovnání procentuálně vyjádřených hodnot N_f/N_{fff} v odpovídajících μ SPE-PT postupech s využitím odlišných šarží pipetovacích špiček. A: nevázaná frakce po nanesení vzorku, B: frakce po promývání, C: frakce eluátu. Pro II/N3, II/N7, II/N11 je N_{f-II}/N_{fff-II} označeno v tabulce 8: N_{f-II}/N_{fff-II} .

Nejvíce se lišily hodnoty N_f/N_{fff} pro A: nevázaná frakce po nanesení vzorku mezi postupy N3 a II/N3. Vypočtená RSD byla 39,2 %. S využitím Deanova-Dixonova testu však byla tato hodnota vyloučena jako hrubá chyba. Vyhodnocení Deanova-Dixonova testu bylo provedeno následně. Nejprve byly všechny hodnoty RSD seřazeny sestupně. Hodnoty byly příslušně označeny rsd_1 (nejnižší hodnota) až rsd_9 (nejvyšší hodnota). Následně byla vypočtena dle následující rovnice hodnota R:

$$R = rsd_1 - rsd_9$$

Poté byla vypočtena dle následující rovnice hodnota Q_{min} :

$$Q_{min} = \frac{rsd_2 - rsd_1}{R}$$

Následně byla vypočtena dle následující rovnice hodnota Q_{max} :

$$Q_{max} = \frac{rsd_9 - rsd_8}{R}$$

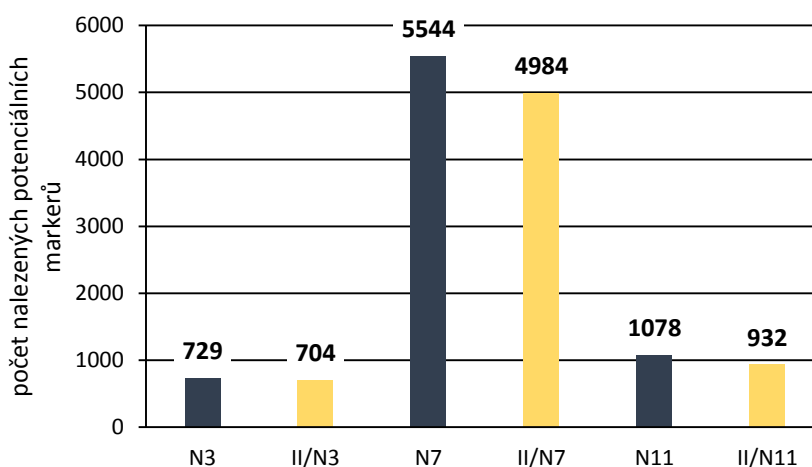
Byly tak získány hodnoty: $Q_{min} = 0,029$, $Q_{max} = 0,749$. Podstatou Deanova-Dixonova testu je srovnání obou hodnot s tabelovanou kritickou hodnotou Q. Ta se liší pro počet posuzovaných hodnot. Pro 9 hodnot odpovídá hodnota $Q = 0,437$. Jelikož byla hodnota $Q_{max} \geq Q$, byla vyřazena nejvyšší hodnota, tj. 39,2 %. Následně se celý test opakoval bez použití této hodnoty. Byly získány hodnoty $Q_{min} = 0,116$, $Q_{max} = 0,060$. Kritická hodnota Q pro 8 hodnot je 0,468. Ani Q_{min} , ani Q_{max} nebyly rovny nebo vyšší než kritická hodnota. Proto lze říci, že v souboru již není hodnota s hrubou chybou.

Následně se tak nejvíce odlišoval výsledek pro B: frakci po promývání mezi postupy N7 (N_f/N_{fff} pro frakci eluátu 56,76 %) a II/N7 (N_f/N_{fff} pro frakci eluátu 44,74 %) s RSD 11,8 %. Můžeme tedy říci, že opakovatelnost optimalizované μ SPE-PT metody je uspokojivá.

Nejméně se odlišoval výsledek pro C: frakci eluátu mezi postupy N3 (N_f/N_{fff} pro frakci eluátu 47,37 %) a II/N3 (N_f/N_{fff} pro frakci eluátu 50,00 %), s RSD 2,7 %.

Počet potenciálních markerů nalezených softwarem MarkerLynx ve třech extrakčních postupech provedených s odlišnými šaržemi pipetovacích špiček ukazuje graf na obrázku 22. Počty nalezených potenciálních markerů v eluátu pro postup II/N3 a

odpovídající postup N3 mají RSD 1,7 %, pro postup II/N7 a postupu N7 mají RSD 5,3 % a konečně postup II/N11 a odpovídající postup N11 mají RSD 7,3 %.



Obrázek 22: Srovnání počtů nalezených potenciálních markerů softwarem MarkerLynx u tří postupů provedených s odlišnými šaržemi pipetovacích špiček s odpovídajícími postupy.

5.7. Výsledek analýzy kontrolních vzorků

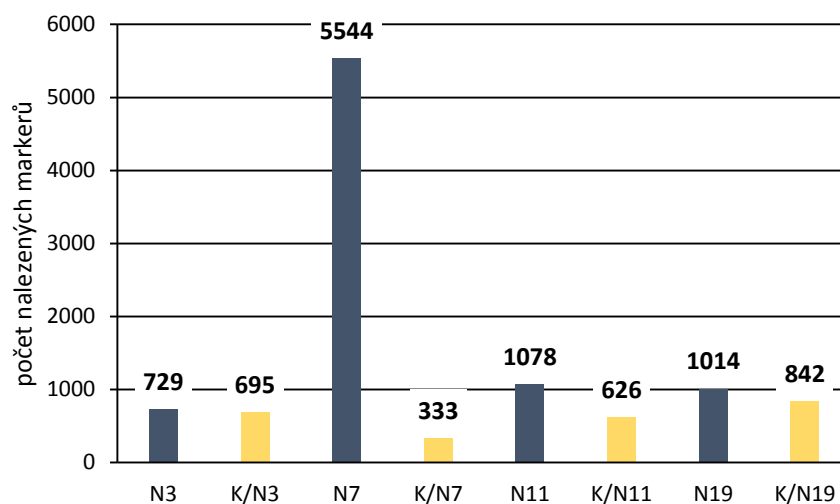
Pro 4 náhodně zvolené postupy provedení μ SPE-PT byl použit kontrolní vzorek (viz 4.3.2.). Byly analyzovány 3 frakce označené jako A: nevázaná frakce po nanesení vzorku, B: frakce po promývání, C: frakce eluátu. Extrakční postupy odpovídaly postupům N3, N7, N11 a N19 a byly označeny jako K/N3, K/N7, K/N11, K/N19. Přehled všech nalezených m/z odpovídajících PEG s přesností 20 ppm (viz 5.9.2.) je uveden v tabulce 9. Celkový počet PEG nalezených ve všech 3 frakcích uvedených postupů se pohyboval mezi 7 a 10. Podíly počtu PEG nalezených v dané frakci a celkového počtu PEG nalezených ve všech 3 frakcích vůbec nekorelovaly s hodnotami výsledků odpovídajících postupů. Tuto kontaminaci PEG napříč extrakčními frakcemi lze vysvětlit např. přítomností kontaminace PEG v použitých rozpouštědlech, nebo přítomností PEG přímo v materiálu, z něhož jsou vyrobeny použité pipetovací špičky, ať už ty použité při přípravě roztoků a extrakčních činidel či samotné pipetovací špičky plněné sorbentem, případně je také možné, že je PEG kontaminován přímo UHPLC-HRMS systémem.

Tabulka 9: Přehled výsledků vyhodnocení počtu přítomných PEG – kontrolní vzorky.

Název postupu	Extrakční frakce	Typ aduktu v MS	Počet aduktů PEG	Počet PEG v extrakční frakci (N_f)	Počet PEG ve všech 3 frakcích (N_{fff})	$\frac{N_f}{N_{fff}}$ [%]
K/N3	A	[M+H] ⁺	1	6	10	60,00%
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	1			
	B	[M+H] ⁺	1	9		
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	1			
	C	[M+H] ⁺	1	6		
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	1			
K/N7	A	[M+H] ⁺	0	8	8	100,00%
		[M+Na] ⁺	5			
		[M+K] ⁺	3			
	B	[M+H] ⁺	0	8		
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	4			
	C	[M+H] ⁺	0	7		
		[M+Na] ⁺	3			
		[M+K] ⁺	4			
K/N11	A	[M+H] ⁺	1	6	10	60,00%
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	1			
	B	[M+H] ⁺	1	9		
		[M+Na] ⁺	7			
		[M+K] ⁺	1			
	C	[M+H] ⁺	1	7		
		[M+Na] ⁺	5			
		[M+K] ⁺	1			
K/N19	A	[M+H] ⁺	1	6	7	85,71%
		[M+Na] ⁺	5			
		[M+K] ⁺	0			
	B	[M+H] ⁺	1	5		
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	0			
	C	[M+H] ⁺	1	5		
		[M+Na] ⁺	4			
		[M+K] ⁺	0			

Potenciální markery nalezené softwarem MarkerLynx ve frakcích eluátů kontrolních vzorků z dat získaných jejich UHPLC-HRMS analýzou lze považovat za falešně pozitivní. Počty nalezených potenciálních markerů ve frakcích eluátů kontrolních vzorků jsou uvedeny na obrázku 23. Přítomnost nalezených potenciálních markerů lze opět vysvětlit kontaminací použitých rozpouštědel, kontaminací vzniklou použitím pipetovacích špiček či kontaminací hmotnostního spektrometru. Signifikantní rozdíl mezi počtem potenciálních markerů nalezeném při použití směsného vzorku oproti použití kontrolního vzorku lze z hodnocených pozorovat jen u postupu N7. Nejvyšší počet potenciálních markerů nalezený při použití kontrolního vzorku byl 842. Naopak nejnižší počet potenciálních markerů nalezený při použití kontrolního vzorku byl 333. Lze říci, že počet 842 s RSD 29,69 % nalezených potenciálních markerů je mezní pro falešnou pozitivitu získaného počtu potenciálních markerů. Všechny postupy μ SPE-PT v jejichž frakci eluátu je nalezen tento, nebo nižší počet potenciálních markerů může znamenat, že nalezené potenciální markery jsou jen falešně pozitivní signály. Takto však nelze získané počty potenciálních markerů na a pod hranici falešné positivity jednoznačně vyloučit. Počet nalezených potenciálních markerů ve frakci eluátu totiž ovlivňuje celý postup provedení μ SPE-PT. To znamená, že i při počtu nalezených potenciálních markerů pod mezí falešné positivity lze v eluátu identifikovat molekuly se vztahem k biologické interpretaci.

Poměrně vysoká hodnota RSD pro počty nalezených potenciálních markerů je způsobena výraznějším odchýlením nejnižší hodnoty od ostatních hodnot. Provedením Deanova-Dixonova testu pro 4 hodnoty však nebyla nejnižší hodnota shledána hrubou chybou, proto byla pro výpočet RSD použita.



Obrázek 23: Počty nalezených potenciálních markerů ve frakcích eluátů provedených μ SPE-PT postupů s využitím kontrolního vzorku. Pro porovnání jsou uvedeny celkové počty nalezených potenciálních markerů v eluátech shodně provedených postupů μ SPE-PT s využitím směsného vzorku.

6. ZÁVĚR

V souladu s cílem této diplomové práce bylo optimalizováno metabolomické schéma pro biologické vzorky vaginálních stěrů pacientek trpících vulvovaginálním dyskomfortem. Byl optimalizován postup provedení μ SPE-PT s využitím komerčně dostupných pipetovacích špiček HyperSep™ s tuhým sorbentem na bázi oxidu titaničitého. Byly sledovány počty PEG nalezených v jednotlivých extrakčních frakcích (A, B, C). Ty byly dávány do kontextu s použitými parametry μ SPE-PT postupu, z čehož byly vyvozeny závěry o vhodnosti či nevhodnosti extrakčních podmínek. Ve frakcích eluátů provedených μ SPE-PT postupů byl také sledován počet nalezených potenciálních markerů. Protože smyslem necílené metabolomické analýzy je najít a následně identifikovat co největší počet potenciálních biomarkerů byly v rámci provedených μ SPE-PT postupů považovány za nejvhodnější ty, kde bylo nalezeno největší množství potenciálních markerů. Problematika je však složitá a ani při vysokém počtu nalezených potenciálních markerů mezi nimi nemusí být nalezeny molekuly se vztahem k biologické interpretaci onemocnění. Proto musí být provedeny další experimenty, které identifikují tyto molekuly a potvrdí či vyvrátí vhodnost využití mikroextrakčních postupů, které účinně eliminují počet PEG v biologickém vzorku a byly optimalizovány v rámci této diplomové práce. S využitím softwaru Modde Pro byla také sledována míra vlivu jednotlivých parametrů μ SPE-PT postupů na počty nalezených PEG v jednotlivých extrakčních frakcích. Vedle eliminace PEG ve frakci eluátu byl sledován též vliv zvolených parametrů μ SPE-PT na počet nalezených potenciálních markerů.

Z hlediska eliminace PEG tři nejúčinnější (v tomto pořadí: N7, E, N16) postupy provedení μ SPE-PT shrnuje přehledně tabulka 10.

Tabulka 10: Shrnutí optimalizovaných parametrů v postupech nejúčinnějších pro eliminaci PEG ve vzorcích vaginálních stěrů.

Název postupu	N7	E	N16
Kondičionální činidlo	0,1% FA	100% ACN	50mM FA v 80% ACN
$N_{a/v}$ – nanosení vzorku	5	10	25
Promývací činidlo	voda	0,1% TFA v 5% ACN	voda
$N_{a/v}$ – promývání	50	5	5
Eluční činidlo	50% MeOH	100mM NH ₄ OH	100mM NH ₄ OH
$N_{a/v}$ – eluce	5	10	1
Rekonstituční roztok	5mM FA v 2% ACN	ACN	MF

Postup N7 byl vyhodnocen jako neúčinnější z pohledu odstranění PEG ze vzorků vaginálních stěrů. Z důvodu možné vysoké náročnosti vlastního provedení tohoto postupu kvůli vysokému počtu aspirací/vypuštění v kroku promývání byly ukázány i alternativní postupy E a N16, které nemají tak manuálně i časově náročný žádný z extrakčních kroků. Počty nalezených PEG v jednotlivých extrakčních frakcích jsou shrnuty v tabulce 11. Pro hodnocení účinnosti μ SPE-PT postupu z pohledu eliminace PEG byla použita získaná hodnota N_f/N_{fff} pro frakci eluátu daného postupu.

Postup N7 byl shledán vysoce účinným z hlediska zachování potenciálních markerů ve frakci eluátu. Z tohoto pohledu je poměrně účinný i postup N16. Naproti tomu při provedení μ SPE-PT postupu E byl zaznamenán nejnižší počet nalezených potenciálních markerů ve frakci eluátu ze všech prováděných postupů vůbec. Nutno však dodat, že i když je počet nalezených potenciálních markerů pro postup E pod hranicí falešné positivity, přesto mohou být ve frakci eluátu zachovány molekuly se vztahem k biologické interpretaci. To však musí být předmětem další práce. Počty nalezených potenciálních markerů jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Shrnutí počtu nalezených PEG a počtu nalezených potenciálních markerů pro μ SPE-PT postupy: N7, E, N16.

Název postupu	Extrakční frakce	Počet PEG v extrakční frakci (N_f)	Počet PEG ve všech 3 frakcích (N_{fff})	$\frac{N_f}{N_{fff}}$ [%]	Počet nalezených potenciálních markerů
N7	A	23	37	62,16%	xxx
	B	21		56,76%	xxx
	C	8		21,62%	5544
E	A	14	21	66,67%	xxx
	B	11		52,38%	xxx
	C	5		23,81%	342
N16	A	18	31	58,06%	xxx
	B	16		51,61%	xxx
	C	8		25,81%	4053

Opakovatelnost metody byla ověřena provedením 3 postupů μ SPE-PT, a to se dvěma odlišnými šaržemi pipetovacích špiček plněných sorbentem. Po vyřazení jedné z hodnot, která se výrazně odlišovala od ostatních měly výsledky získané provedením μ SPE-PT se špičkami odlišné šarže nejvyšší RSD 11,8 %. Nejmenší zjištěná RSD mezi výsledky získanými s použitím odlišných šarží špiček byla 2,7 %. Opakovatelnost optimalizované μ SPE-PT metody lze považovat za uspokojivou.

Jednotlivé extrakční frakce byly po odpaření rekonstituovány. Složení rekonstitučního roztoku bylo též optimalizováno. Jako nejvhodnější byla shledána 5mM FA v 2% ACN, což se shoduje s roztokem použitým pro rekonstituci u jednotlivých extrakčních frakcí postupu N7.

Po rekonstituci byly vzorky dávkovány do UHPLC-HRMS systému a analyzovány. U UHPLC podmínek byl z důvodu pokrytí širší škály metabolitů oproti dříve použité metodě prodloužen gradient.

Jak bylo uvedeno v zadání, v této práci měla být také zhodnocena stabilita záznamu správné hmoty po korekci referenčním sprejem použitého hmotnostního spektrometru typu Q-TOF při dlouhých metabolomických analýzách. Hodnocena byla závislost odchylky experimentální m/z od teoretické m/z na čase. Bylo zjištěno, že ač byla většina hodnot odchylky pod hranicí 10 ppm, některé hodnoty odchylky kolísaly v závislosti na čase až do 20 ppm. Bylo tedy zjištěno že při dlouhých, několik desítek hodin trvajících analýzách s využitím přístroje Synapt G2-Si je potřeba při vyhodnocování výsledků počítat s odchylkou naměřené hmoty od správné hmoty 20 ppm.

Závěrem lze říci, že cíl a zadání této diplomové práce byly splněny.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] D. Raftery, H.R. Eghbalnia, R. Powers, R. Brüschweiler, J.L. Markley, A.S. Edison, D.S. Wishart, The future of NMR-based metabolomics, *Curr. Opin. Biotechnol.* 43 (2016) 34–40. doi:10.1016/j.copbio.2016.08.001.
- [2] K. Dettmer, P.A. Aronov, B.D. Hammock, MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLOMICS, (2007) 51–78. doi:10.1002/mas.
- [3] W.B. Dunn, D.I. Ellis, Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 285–294. doi:10.1016/j.trac.2004.11.021.
- [4] X. Liu, J.W. Locasale, Metabolomics: A Primer, *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017) 274–284. doi:10.1016/j.tibs.2017.01.004.
- [5] R. Raterink, P.W. Lindenburg, R.J. Vreeken, R. Ramautar, T. Hankemeier, Trends in Analytical Chemistry Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics, 61 (2014) 157–167.
- [6] S.P. Putri, S. Yamamoto, H. Tsugawa, E. Fukusaki, Current metabolomics: Technological advances, *J. Biosci. Bioeng.* 116 (2013) 9–16. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.004.
- [7] T. Bamba, N. Shimonishi, A. Matsubara, K. Hirata, Y. Nakazawa, A. Kobayashi, E. Fukusaki, High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 460–469. doi:10.1263/jbb.105.460.
- [8] S.G. Villas-Bôas, S. Mas, M. Åkesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen, Mass spectrometry in metabolome analysis, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 613–646. doi:10.1002/mas.20032.
- [9] E. Gelp, SPECIAL FEATURE : From large analogical instruments to small digital black boxes : 40 years of progress in mass spectrometry and its role in proteomics . Part I 1965 – 1984, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 419–435. doi:10.1002/jms.
- [10] R.J. Bino, R.D. Hall, O. Fiehn, J. Kopka, K. Saito, J. Draper, B.J. Nikolau, P. Mendes, U. Roessner-Tunali, M.H. Beale, R.N. Trethewey, B.M. Lange, E.S. Wurtele, L.W. Sumner, Potential of metabolomics as a functional genomics tool, *Trends Plant Sci.* 9 (2004) 418–425. doi:10.1016/j.tplants.2004.07.004.
- [11] G. Siuzdak, G.J. Patti, O. Yanes, Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 263–269.
- [12] 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. doi:10.1016/j.aca.2009.10.004.
- [13] L. Novakova, Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis, *J Chromatogr A.* 1292 (2013) 25–37. doi:S0021-9673(12)01338-6 [pii]\r10.1016/j.chroma.2012.08.087 [doi].
- [14] D. Dudzik, C. Barbas-Bernardos, A. García, C. Barbas, Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 149–173. doi:10.1016/j.jpba.2017.07.044.
- [15] D. Vuckovic, Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1523–1548. doi:10.1007/s00216-012-6039-y.

- [16] N. Drouin, S. Rudaz, J. Schappler, Sample preparation for polar metabolites in bioanalysis, *Analyst*. 143 (2018) 16–20. doi:10.1039/c7an01333g.
- [17] L. Nováková, M. Douša, a. kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, 1. vydání, Europrint a.s., Praha, 2013.
- [18] 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. doi:10.1002/bmc.1560.
- [19] J. Ma, J. Shi, H. Le, R. Cho, J.C. Jou Huang, S. Miao, B.K. Wong, A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 862 (2008) 219–226. doi:10.1016/j.jchromb.2007.12.012.
- [20] S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis of Pharmaceuticals*, 2015.
- [21] S.X. Peng, T.M. Branch, S.L. King, Fully automated 96-well liquid-liquid extraction for analysis of biological samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 708–714. doi:10.1021/ac001036c.
- [22] S.X. Peng, C. Henson, M.J. Strojnowski, A. Golebiowski, S.R. Klopfenstein, Automated high-throughput liquid-liquid extraction for initial purification of combinatorial libraries, *Anal. Chem.* 72 (2000) 261–266. doi:10.1021/ac990946v.
- [23] R.J. Flanagan, P.E. Morgan, E.P. Spencer, R. Whelpton, Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 530–538. doi:10.1002/bmc.671.
- [24] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 77 (2016) 23–43. doi:10.1016/j.trac.2015.10.010.
- [25] H. Kataoka, New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 232–244. doi:10.1016/S0165-9936(03)00402-3.
- [26] V. Pérez-Fernández, L. Mainero Rocca, P. Tomai, S. Fanali, A. Gentili, Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 983 (2017) 9–41. doi:10.1016/j.aca.2017.06.029.
- [27] H. Barchanska, M. Danek, M. Sajdak, M. Turek, Review of Sample Preparation Techniques for the Analysis of Selected Classes of Pesticides in Plant Matrices, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 48 (2018) 467–491. doi:10.1080/10408347.2018.1451297.
- [28] D. Neville, R. Houghton, S. Garrett, Efficacy of plasma phospholipid removal during sample preparation and subsequent retention under typical UHPLC conditions, *Bioanalysis*. 4 (2012) 795–807. doi:10.4155/bio.12.38.
- [29] C. Hasegawa, T. Kumazawa, X.P. Lee, A. Marumo, N. Shinmen, H. Seno, K. Sato, Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography - Mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 563–570. doi:10.1007/s00216-007-1460-3.
- [30] D.C.M. Bordin, M.N.R. Alves, E.G. De Campos, B.S. De Martinis, Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 1168–1172. doi:10.1002/jssc.201500932.

- [31] J. Svačinová, O. Novák, L. Plačková, R. Lenobel, J. Holík, M. Strnad, K. Doležal, A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction, *Plant Methods*. 8 (2012) 1–15. doi:10.1186/1746-4811-8-17.
- [32] T. Kumazawa, C. Hasegawa, S. Uchigasaki, X.P. Lee, O. Suzuki, K. Sato, Quantitative determination of phenothiazine derivatives in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 2521–2527. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.070.
- [33] J.W. Allwood, R. Goodacre, An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses, *Phytochem. Anal.* 21 (2010) 33–47. doi:10.1002/pca.1187.
- [34] W. Lu, B.D. Bennett, J.D. Rabinowitz, Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 871 (2008) 236–242. doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.031.
- [35] A. Guttman, M. Varoglu, J. Khandurina, Multidimensional separations in the pharmaceutical arena, *Drug Discov. Today*. 9 (2004) 136–144. doi:10.1016/S1359-6446(03)02972-6.
- [36] M. Bedair, L.W. Sumner, Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 238–250. doi:10.1016/j.trac.2008.01.006.
- [37] U. Roessner, L. Willmitzer, A.R. Fernie, Metabolic profiling and biochemical phenotyping of plant systems, *Plant Cell Rep.* 21 (2002) 189–196. doi:10.1007/s00299-002-0510-8.
- [38] Z. Lei, D. V. Huhman, L.W. Sumner, Mass spectrometry strategies in metabolomics, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 25435–25442. doi:10.1074/jbc.R111.238691.
- [39] I. Kohler, M. Giera, Recent advances in liquid-phase separations for clinical metabolomics, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 93–108. doi:10.1002/jssc.201600981.
- [40] H.H. Maurer, What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening?, *J. Chromatogr. A*. 1292 (2013) 19–24. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.069.
- [41] <https://shodexhplc.com/product-tag/hilic/>, online 31. 8. 2019.
- [42] V. V. Tolstikov, A. Lommen, K. Nakanishi, N. Tanaka, O. Fiehn, Monolithic Silica-Based Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry for Plant Metabolomics, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6737–6740. doi:10.1021/ac034716z.
- [43] G. Theodoridis, H.G. Gika, I.D. Wilson, LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 251–260. doi:10.1016/j.trac.2008.01.008.
- [44] R. Plumb, J. Granger, C. Stumpf, I.D. Wilson, J.A. Evans, E.M. Lenz, Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): Detection of strain, diurnal and gender differences, *Analyst*. 128 (2003) 819–823. doi:10.1039/b304296k.
- [45] M. Shibue, C.T. Mant, R.S. Hodges, Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid

- chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1080 (2005) 68–75.
doi:10.1016/j.chroma.2005.03.035.
- [46] Y. Hsieh, C.J.G. Duncan, An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of cytarabine in mouse plasma, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 573–578. doi:10.1002/rcm.2877.
- [47] S.Å. Gustavsson, J. Samskog, K.E. Markides, B. Långström, Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents, *J. Chromatogr. A.* 937 (2001) 41–47. doi:10.1016/S0021-9673(01)01328-0.
- [48] V. V. Tolstikov, O. Fiehn, Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 301 (2002) 298–307.
doi:10.1006/abio.2001.5513.
- [49] H. Idborg, L. Zamani, P.O. Edlund, I. Schuppe-Koistinen, S.P. Jacobsson, Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 828 (2005) 9–13.
doi:10.1016/j.jchromb.2005.07.031.
- [50] M.R. Gama, R.G. da Costa Silva, C.H. Collins, C.B.G. Bottoli, Hydrophilic interaction chromatography, 2012. doi:10.1016/j.trac.2012.03.009.
- [51] R.R. Swezey, High-performance liquid chromatographic system for separating sugar phosphates and other intermediary metabolites, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 669 (1995) 171–176. doi:10.1016/0378-4347(95)00117-2.
- [52] S. Sawada, R. Ono, T. Sato, S. Suzuki, O. Arakawa, M. Kasai, Determination of sugar phosphates and nucleotides related to photosynthetic metabolism by high-performance anion-exchange liquid chromatography with fluorometric and ultraviolet detection, *Anal. Biochem.* 314 (2003) 63–69. doi:10.1016/S0003-2697(02)00644-9.
- [53] H. Hinterwirth, M. Lämmerhofer, B. Preinerstorfer, A. Gargano, R. Reischl, W. Bicker, O. Trapp, L. Brecker, W. Lindner, Selectivity issues in targeted metabolomics: Separation of phosphorylated carbohydrate isomers by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion exchange chromatography, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3273–3282. doi:10.1002/jssc.201000412.
- [54] D. Guillarme, D.T.T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Recent developments in liquid chromatography-Impact on qualitative and quantitative performance, *J. Chromatogr. A.* 1149 (2007) 20–29. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.014.
- [55] K.A. Johnson, R. Plumb, Investigating the human metabolism of acetaminophen using UPLC and exact mass oa-TOF MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 805–810. doi:10.1016/j.jpba.2005.04.048.
- [56] R.S. Plumb, J.H. Granger, C.L. Stumpf, K.A. Johnson, B.W. Smith, S. Gaultz, I.D. Wilson, J. Castro-Perez, A rapid screening approach to metabonomics using UPLC and oa-TOF mass spectrometry: Application to age, gender and diurnal variation in normal/Zucker obese rats and black, white and nude mice, *Analyst.* 130 (2005) 844–849. doi:10.1039/b501767j.
- [57] J.L. Edwards, R.L. Edwards, K.R. Reid, R.T. Kennedy, Effect of decreasing column inner diameter and use of off-line two-dimensional chromatography on metabolite detection in complex mixtures, *J. Chromatogr. A.* 1172 (2007) 127–

134. doi:10.1016/j.chroma.2007.09.075.
- [58] C.R. Evans, J.W. Jorgenson, Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1952–1961. doi:10.1007/s00216-004-2516-2.
- [59] 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. doi:10.1002/jssc.200600189.
- [60] D. Guillarme, S. Heinisch, J.L. Rocca, Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1052 (2004) 39–51. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.052.
- [61] S. Heinisch, G. Puy, M.P. Barrioulet, J.L. Rocca, Effect of temperature on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: Application to method development, *J. Chromatogr. A.* 1118 (2006) 234–243. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.112.
- [62] A. Maruška, O. Kornyšova, Application of monolithic (continuous bed) chromatographic columns in phytochemical analysis, *J. Chromatogr. A.* 1112 (2006) 319–330. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.099.
- [63] T. Bamba, J.W. Lee, A. Matsubara, E. Fukusaki, Metabolic profiling of lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1250 (2012) 212–219. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.068.
- [64] Y. Yang, Y. Liang, J. Yang, F. Ye, T. Zhou, L. Gongke, Advances of supercritical fluid chromatography in lipid profiling, *J. Pharm. Anal.* 9 (2019) 1–8. doi:10.1016/j.jpha.2018.11.003.
- [65] A. Sen, C. Knappy, M.R. Lewis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, N.W. Smith, Analysis of polar urinary metabolites for metabolic phenotyping using supercritical fluid chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1449 (2016) 141–155. doi:10.1016/j.chroma.2016.04.040.
- [66] M.D. Jones, P.D. Rainville, G. Isaac, I.D. Wilson, N.W. Smith, R.S. Plumb, Ultra high resolution SFC-MS as a high throughput platform for metabolic phenotyping: Application to metabolic profiling of rat and dog bile, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 966 (2014) 200–207. doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.017.
- [67] L.W. Sumner, P. Mendes, R.A. Dixon, Plant metabolomics: Large-scale phytochemistry in the functional genomics era, *Phytochemistry.* 62 (2003) 817–836. doi:10.1016/S0031-9422(02)00708-2.
- [68] J. He, Z. Luo, L. Huang, J. He, Y. Chen, X. Rong, S. Jia, F. Tang, X. Wang, R. Zhang, J. Zhang, J. Shi, Z. Abliz, Ambient mass spectrometry imaging metabolomics method provides novel insights into the action mechanism of drug candidates, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5372–5379. doi:10.1021/acs.analchem.5b00680.
- [69] S.C. Brown, G. Kruppa, J.L. Dasseux, Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 223–231. doi:10.1002/mas.20011.
- [70] M. Ghaste, R. Mistrik, V. Shulaev, Applications of fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) and orbitrap based high resolution mass spectrometry in metabolomics and lipidomics, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). doi:10.3390/ijms17060816.
- [71] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks, The Orbitrap: A new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430–443. doi:10.1002/jms.856.

- [72] S.S. Rubakhin, J.C. Jurchen, E.B. Monroe, J. V Sweedler, S. Rubakhin, J. Sweedler, Keynote review : Imaging mass spectrometry : fundamentals and applications to drug discovery, *D.D.T.* 10 (2005).
- [73] J.M. Wiseman, S.M. Puolitaival, Z. Takáts, R.G. Cooks, R.M. Caprioli, Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44 (2005) 7094–7097. doi:10.1002/anie.200502362.
- [74] H. Chen, S. Yang, A. Wortmann, R. Zenobi, Neutral Desorption Sampling of Living Objects for Rapid Analysis by Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 7591–7594. doi:10.1002/anie.200702200.
- [75] A. Nordström, E. Want, T. Northen, J. Lehtiö, G. Siuzdak, Multiple Ionization Mass Spectrometry Strategy Used To Reveal the Complexity of Metabolomics, *Anal. Chem.* 80 (2008) 421–429. doi:10.1021/ac701982e.
- [76] B. Zhou, J.F. Xiao, L. Tuli, H.W. Ransom, LC-MS-based metabolomics, *Mol. Biosyst.* (2012) 470–481. doi:10.1039/c1mb05350g.
- [77] E. Klapková, R. Uřinová, R. Průša, Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, *Klin. Biochem. a Metab.* 19 (2011) 5–8.
- [78] J. Saric, E.J. Want, U. Duthaler, M. Lewis, J. Keiser, J.P. Shockcor, G.A. Ross, J.K. Nicholson, E. Holmes, M.F.M. Tavares, Systematic evaluation of extraction methods for multiplatform-based metabolotyping: Application to the fasciola hepatica metabolome, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6963–6972. doi:10.1021/ac300586m.
- [79] H.G. Gika, G.A. Theodoridis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 12–25. doi:10.1016/j.jpba.2013.06.032.
- [80] <http://proteomique.ipbs.fr/front-page/waters-synapt-g2-si/>, on-line 5. 9. 2019.
- [81] M. Katajamaa, M. Orešič, Data processing for mass spectrometry-based metabolomics, *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 318–328. doi:10.1016/j.chroma.2007.04.021.
- [82] J. Listgarten, A. Emili, Statistical and computational methods for comparative proteomic profiling using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics.* 4 (2005) 419–434. doi:10.1074/mcp.R500005-MCP200.
- [83] M. Katajamaa, J. Miettinen, M. Orešič, MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data, *Bioinformatics.* 22 (2006) 634–636. doi:10.1093/bioinformatics/btk039.
- [84] J. Xia, R. Mandal, I. V. Sinelnikov, D. Broadhurst, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 127–133. doi:10.1093/nar/gks374.
- [85] R. Goodacre, D. Broadhurst, A.K. Smilde, B.S. Kristal, J.D. Baker, R. Beger, C. Bessant, S. Connor, G. Capuani, A. Craig, T. Ebbels, D.B. Kell, C. Manetti, J. Newton, G. Paternostro, R. Somorjai, M. Sjöström, J. Trygg, F. Wulfert, Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics, *Metabolomics.* 3 (2007) 231–241. doi:10.1007/s11306-007-0081-3.
- [86] M. Paldrychová, E. Kvasničková, O. Mařátková, J. Masák, Quorum sensing ve vztahu k virulenci mikroorganismů, *Chem. List.* 111 (2017) 637–643.

- [87] P. Greguš, H. Vlčková, V. Buchta, J. Kestřanek, L. Křivčíková, L. Nováková, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 674–681. doi:10.1016/j.jpba.2010.05.029.
- [88] M. Kruppa, Quorum sensing and *Candida albicans*, *Mycoses*. 52 (2009) 1–10. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01626.x.
- [89] J.M. Hornby, E.C. Jensen, A.D. Lisec, J.J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault, K.W. Nickerson, Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 2982–2992. doi:10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001.
- [90] H. Chen, M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy, G.R. Fink, Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 5048–5052. doi:10.1073/pnas.0401416101.
- [91] G. Ramage, S.P. Saville, B.L. Wickes, J.L. Lopez-Ribot, Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 5459–5463. doi:10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002.
- [92] A.G. Staines, P. Sindelar, M.W.H. Coughtrie, B. Burchell, Farnesol is glucuronidated in human liver, kidney and intestine in vitro, and is a novel substrate for UGT2B7 and UGT1A1, *Biochem. J.* 384 (2004) 637–645. doi:10.1042/BJ20040997.
- [93] K. Teshima, T. Kondo, Analytical method for determination of allylic isoprenols in rat tissues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry following chemical derivatization with 3-nitroptalic anhydride, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 560–566. doi:10.1016/j.jpba.2008.01.032.
- [94] K. de la Torre-Carbot, J.L. Chávez-Servín, O. Jaúregui, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventós, M. Fitó, M.I. Covas, D. Muñoz-Aguayo, M.C. López-Sabater, Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 583 (2007) 402–410. doi:10.1016/j.aca.2006.10.029.
- [95] F.N. Bazoti, E. Gikas, A.L. Skaltsounis, A. Tsarbopoulos, Development of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters, *Anal. Chim. Acta.* 573–574 (2006) 258–266. doi:10.1016/j.aca.2006.03.075.
- [96] P. Jakubec, H. Vlčková, V. Pilařová, V. Buchta, L. Nováková, Determination of Quorum Sensing Molecules And Other *Candida Albicans* Metabolites In Human Vaginal Lavage Using Tandem Mass Spectrometry [poster], in: *Metabolomic Bio Data*, 20.-23. září 2017, Vorau, Austria, 2017.
- [97] Thermo Scientific, HyperSep™ Tip Instruction for Porous Titanium Dioxide (Part Number 60109-216), 2018.
- [98] C.J. Chen, C.C. Lai, M.C. Tseng, Y.C. Liu, Y.H. Liu, L.W. Chiou, F.J. Tsai, A novel titanium dioxide-polydimethylsiloxane plate for phosphopeptide enrichment and mass spectrometry analysis, *Anal. Chim. Acta.* 812 (2014) 105–113. doi:10.1016/j.aca.2014.01.010.
- [99] H.C. Hsieh, C. Sheu, F.K. Shi, D.T. Li, Development of a titanium dioxide

- nanoparticle pipette-tip for the selective enrichment of phosphorylated peptides, *J. Chromatogr. A.* 1165 (2007) 128–135. doi:10.1016/j.chroma.2007.08.012.
- [100] C. Zhao, P.B. O'Connor, Removal of polyethylene glycols from protein samples using titanium dioxide, *Anal. Biochem.* 365 (2007) 283–285. doi:10.1016/j.ab.2007.03.024.
- [101] K. Rissler, Improved separation of polyethylene glycols widely differing in molecular weight range by reversed-phase high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection, *Chromatographia.* 49 (1999) 615–620. doi:10.1007/BF02466902.
- [102] A.M. V. Schou-Pedersen, J. Østergaard, M. Johansson, S. Dubant, R.B. Frederiksen, S.H. Hansen, Evaluation of supercritical fluid chromatography for testing of PEG adducts in pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 256–261. doi:10.1016/j.jpba.2013.08.039.
- [103] D. Brinz, U. Holzgrabe, Analysis of the molecular size distribution of polyethylene glycols by CE-UV versus HPLC with evaporative light scattering detection, *Electrophoresis.* 29 (2008) 3605–3611. doi:10.1002/elps.200800066.