

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 metabolomice 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 pufrovaném fyziologickém roztoku. V rámci μ SPE-PT bylo optimalizováno 5 různých složení kondicionálního 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 kondicionální 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