

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra chemie**

Metabolomická analýza biologických vzorků  
kapalinovou chromatografií a hmotnostní  
spektrometrií

Bakalářská práce

Autor: Markéta Otavová  
Studijní program: B1407 Chemie  
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin  
Vedoucí práce: Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ  
Přírodovědecká fakulta  
Akademický rok: 2017/2018

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Otavová**  
Osobní číslo: **S15CH103BP**  
Studijní program: **B1407 Chemie**  
Studijní obor: **Toxikologie a analýza škodlivin**  
Název tématu: **Metabolomická analýza biologických vzorků kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií**  
Zadávající katedra: **Katedra chemie**

**Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

Práce bude zpracována formou literární rešerše dostupné literatury v oblasti metabolomické analýzy. Metabolomická analýza se zabývá analýzou sloučenin, které vstupují do metabolických reakcí a jsou důležité pro růst a normální funkci buňky. Cílem této práce je vyhledat a zpracovat v literatuře dostupné analytické strategie a konkrétní metody pro cílenou i necílenou analýzu metabolitů biologických vzorků s pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Nalezené metody budou kriticky zhodnoceny.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Jako zdroj informací budou využity publikované vědecké práce, které budou vyhledávány v publikačních databázích typu Web of Science.**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.**  
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. září 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **18. července 2018**

doc. RNDr. PaedDr. Pavel Trojovský, Ph.D.  
děkan

L.S.

doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.  
vedoucí katedry

dne

**Prohlášení:**

*„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.“*

V Hradci Králové dne 18. července 2018

Markéta Otavová

**Poděkování:**

Bakalářská práce vznikla za podpory Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Především bych chtěla poděkovat Ing. Miroslavu Lísovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, hodnotné rady a připomínky při tvorbě.

## **Anotace**

OTAVOVÁ, M. *Metabolomická analýza biologických vzorků kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií*. Hradec Králové, 2018. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Ing. Miroslav Lísa, Ph.D. 49 s.

Bakalářská práce pojednává o metabolomické analýze biologických vzorků kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. V teoretické části je vysvětleno několik základních pojmů metabolomiky, stručné vysvětlení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, popis ionizačních technik a hmotnostních analyzátorů používaných v metabolomice a separace normálními a obrácenými fázemi kapalinové chromatografie. V rešeršní části je zpracována podrobná rešerše literatury na dané téma, která zahrnuje metabolomické přístupy, přípravu vzorku, metabolomickou analýzu LC/MS a zpracování dat metabolomické analýzy.

### **Klíčová slova**

metabolomická analýza, metabolity, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **Annotation**

OTAVOVÁ, M. *Metabolomics analysis of biological samples using liquid chromatography and mass spectrometry*. Hradec Králové, 2018. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Ing. Miroslav Lída, Ph.D. 49 p.

The bachelor thesis deals with metabolomic analysis of biological samples by liquid chromatography and mass spectrometry. The theoretical part explains several basic terms of metabolomics, brief explanation of liquid chromatography and mass spectrometry, the description of ionization techniques and mass analyzers used in metabolomics and separation by normal and reversed phases of liquid chromatography, In the research section, a detailed literary research on a given topic including metabolomic approaches, sample preparation, LC/MS metabolomic analysis and data processing of metabolomic analysis.

### **Keywords**

metabolomic analysis, metabolites, liquid chromatography, mass spectrometry



# Obsah

Úvod .....	9
1 Teoretická část .....	10
1.1 Metabolomika .....	10
1.1.1 Metabolity a metabolom .....	10
1.1.2 Metabolismus .....	12
1.2 Metabolomická analýza.....	14
1.3 Kapalinová chromatografie .....	14
1.3.1 Normální a obrácená fáze LC.....	15
1.4 Hmotnostní spektrometrie .....	17
1.4.1 Ionizační techniky.....	18
1.4.2 Hmotnostní analyzátory.....	21
2 Cíl práce.....	27
3 Rešeršní část.....	28
3.1 Metabolomické přístupy .....	28
3.2 Příprava vzorku.....	30
3.2.1 Zhášení buněčného metabolismu .....	30
3.2.2 Extrakce intracelulárních a extracelulárních metabolitů.....	32
3.2.3 Zakoncentrování vzorků .....	34
3.3 Metabolomická analýza LC/MS.....	34
3.4 Zpracování dat metabolomické analýzy .....	36
Závěr.....	39
Použitá literatura .....	40

## Seznam zkratk použitých v textu

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CE	kapilární elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
FT	fourierova transformace
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HILIC	kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MRM	monitorování iontových reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	normální fáze
PBS	(z angl. Phosphate Buffered Saline) fosfátový roztok s chloridem sodným
Q	kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól

QqTOF	kvadrupól s analyzátozem doby letu
RNA	ribonukleová kyselina
RP	obrácené fáze
SPE	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce pevnou fází
THF	tetrahydrofuran
TOF	analyzátozem doby letu
UHPLC	ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie

# Úvod

Jedním z nejdůležitějších procesů ve všech živých organismech je metabolismus. Složení všech metabolitů označuje metabolom [1]. Metabolomika se využívá pro analýzu a kvantifikaci celého souboru metabolitů obsažených v biologickém vzorku. Tato věda je poměrně mladá, rychle se rozšiřuje a její studium zajímá stále více vědců, což je patrné i z různých odborných databází, ve kterých se za posledních deset let objevuje stále více a více publikací z tohoto oboru [1]. Metabolomika nachází uplatnění v mnoha klinických, zemědělských a lékařských odvětvích a zejména také v systémové biologii [1].

Hmotnostní spektrometrie přináší mnoho výhod při analýze metabolomu. Umožňuje získat metabolomická data s vysokou účinností a především citlivostí. Avšak existují i nevýhody, které spočívají v ionizačním procesu. Hmotnostní spektrometrie nedokáže rozlišit látky se stejným poměrem  $m/z$ . Proto je výhodné spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií při metabolomické analýze, protože metabolity jsou odděleny před analýzou hmotnostním spektrometrem chromatografickou separací [2]. Při analýze metabolomu je kapalinová chromatografie upřednostňována před kapilární elektroforézou a plynovou chromatografií [2]. Obecným cílem metabolomiky založené na LC/MS analýze je identifikace všech metabolitů obsažených v biologickém vzorku a stanovení jejich koncentrace [1].

Cílem této bakalářské práce je zpracování literární rešerše na téma metabolomické analýzy biologických vzorků kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Metabolomika

Metabolomika je oblast studia, která se snaží identifikovat a kvantifikovat metabolity [3] v buňkách, tkáních a tělních tekutinách analytickými chemickými technikami [4]. Jedním z klíčových cílů metabolomiky je získat co nejvíce informací o hladinách metabolitů spojených s biologickým vzorkem [5]. Schopnost rychle odhalit a kvantifikovat stovky nebo dokonce tisíce metabolitů v jediném vzorku pomáhá vědcům určit mnohem komplexnější obraz metabolických a biologických procesů v celém systému. Metabolomika také umožňuje výzkumným pracovníkům zaměřit se na měření konečných produktů těžko rozpoznatelných genetických a epigenetických interakcí. V důsledku toho se metabolomika stává stále více populární „omikou“, která pomáhá s výraznou fenotypovou charakterizací lidí, rostlin a modelových organismů. V současné době se běžně využívá v biomedicínském, výživovém a rostlinném výzkumu [4].

### 1.1.1 Metabolity a metabolom

Metabolity jsou definovány jako malé molekuly, které jsou meziprodukty nebo produkty metabolických reakcí [3]. Označují se jako chemické sloučeniny podílející se na metabolismu. Chemické sloučeniny jsou energetické zdroje a stavební bloky buňky. Jsou používány k provádění obou základních biologických funkcí a k udržení struktury buňky. Když je chemická sloučenina oxidována nebo převáděna na jinou sloučeninu s nižší volnou energií, uvolňuje energii, která může být skladována a použita k provedení biologických procesů [5].

Metabolity jsou efektivní konečné produkty komplexních interakcí, které se dějí uvnitř buňky (genomu) a jevy, dějící se mimo buňku nebo organismus (prostředí). Komplexní měření metabolitů (pomocí metabolomiky) umožňuje určit interakce mezi geny a prostředím. Jinými slovy, metabolomika umožňuje výzkumníkům získat vysoce citlivý a úplný popis fenotypu. Tato metabolická hodnota fenotypu se často nazývá "metabotypem" [2]. Pro většinu analytických metod je typická snaha maximalizovat počet známých metabolitů, které lze kvantitativně měřit v jediné studii [4].

Metabolity se dělí na primární a sekundární. Mezi primární metabolity patří například aminokyseliny, organické kyseliny nebo sacharidy. Mezi sekundární metabolity patří fenoly, alkaloidy, terpeny a steroidy. Sekundární metabolity mají obvykle pomalejší míru obratu a jsou více chemicky stabilní než primární metabolity [3].

Intracelulární metabolity jsou obsaženy v buněčné membráně nebo v buněčném obalu [5]. Přeměna intracelulárních metabolitů nebo jejich obrat jsou převážně prováděny za přítomnosti enzymů, tj. bílkovin, které jsou schopné snížit energii potřebnou pro modifikaci struktury specifické sloučeniny. Zda je enzym ve skutečnosti převede z jedné sloučeniny na jinou a jak rychle se to stane, závisí na řadě faktorů. Substráty a kofaktory požadované každým enzymem musí být k dispozici na specifických úrovních. Vysoká nebo nízká hladina určitých metabolitů může skutečně působit jako inhibitor některých enzymů. Mohou být také vyžadována aktivační činidla a faktory prostředí, jako je teplota a pH, které určují rychlost konverze provedenou enzymem. Metabolity mohou také spontánně vzájemně reagovat nebo být degradovány faktory, jako je teplota nebo světlo. Úroveň každého metabolitu uvnitř buňky je proto výsledkem rozdílu mezi jeho tvorbou a konverzí na jinou sloučeninu [5].

Metabolity přítomné v extracelulárním prostředí jsou naopak součástí média vylučovaného buňkami, produktem buněčných lýz v tělních tekutinách nebo výsledkem degradace polymeru. Enzymy se obecně vyskytují v mnohem nižším množství a ve značně zředěném extracelulárním médiu. Proto je míra obratu metabolitů přítomných mimo buňky značně nižší ve srovnání s mírou obratu uvnitř buňky. Teplota a světlo mohou měnit hladiny extracelulárních metabolitů, ale hlavním zdrojem proměnlivosti jsou živé buňky v médiu [5].

Jedna ze silných stránek metabolomiky spočívá v její užitečnosti objevení biomarkerů [4]. Biomarker je vlastnost, která je objektivně měřena a vyhodnocována jako indikátor normálních biologických procesů, patogenních procesů nebo farmakologických odpovědí na terapeutickou intervenci [6]. Protože metabolity mohou být snadněji, levněji a rutinně kvantifikovány než většina jiných biologických molekul, jsou ideální pro použití v biomarkerových panelech.

Metabolitové biomarkery jsou i nadále hledány a používány v klinických aplikacích mnohem rychleji než geny nebo proteiny [4].

Metabolom je konečný produkt navazující na genom a sestává z celkového počtu všech molekul (metabolitů) s nízkou molekulovou hmotností v buňce, tkáni nebo organismu [7].

### **1.1.2 Metabolismus**

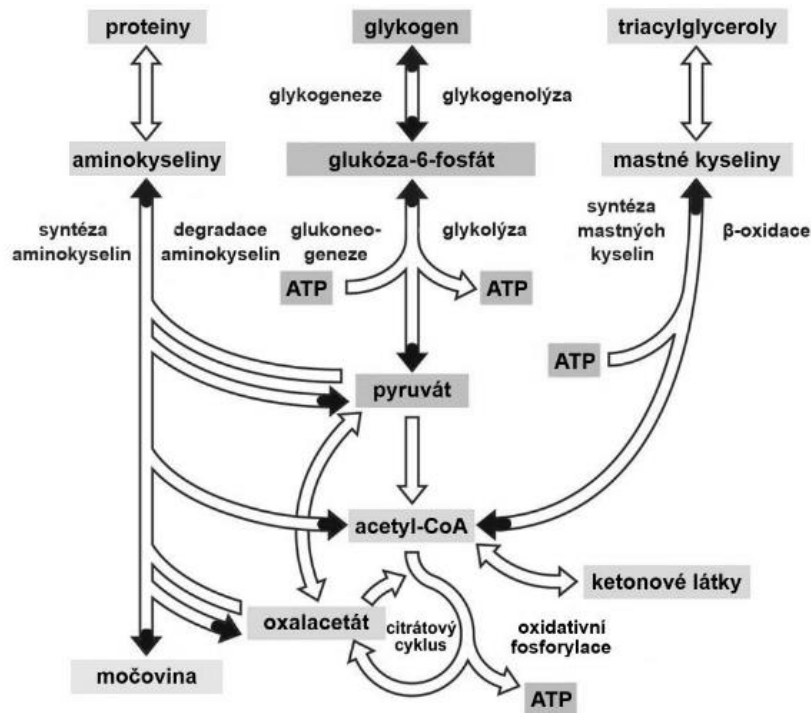
Metabolismus je komplexní síť chemických reakcí, které přeměňují zdroje energie a chemických prvků na biomasu a další molekuly [8]. Všechny živé organismy mají složitou síť metabolických cest pro biosyntézu aminokyselin, nukleových kyselin, lipidů a sacharidů a pro katabolismus různých sloučenin, které pohánějí buněčné procesy [9].

Metabolická síť je kompletní sada metabolických a fyzikálních procesů, které určují fyziologické a biochemické vlastnosti buňky. Tyto sítě zahrnují chemické reakce metabolismu, metabolické dráhy a regulační interakce, které tyto reakce vedou. Chemická reakce je proces, který vede k přeměně jedné skupiny chemických látek nebo metabolitů nazývaných substrát na jiné skupiny chemických látek (metabolitů) nazývaných produkt. Chemické reakce jsou katalyzovány enzymy, které zrychlují jejich rychlost [9].

Metabolická síť jakéhokoli organismu je kódována metabolickým genotypem definovaným jako skupinou genů kódujících enzymy, jejichž produkty katalyzují reakce sítě. Každý metabolický genotyp má metabolický fenotyp. Metabolický fenotyp je spektrem různých zdrojů nějakého chemického prvku, který může metabolismus použít k syntéze biomasy [10].

Metabolismus je rozdělen na metabolické dráhy: subsystémy metabolismu zabývající se specifickými funkcemi. Je však stále jasnější, že metabolismus funguje jako vysoce integrovaná síť [9]. V průběhu posledních deseti let byly metabolické dráhy (Obrázek 1) předmětem velkého výzkumu prováděného především dvěma druhy studií zaměřených buď na analýzu jednotlivých cest, nebo na srovnávací analýzu souboru cest. Studie, které analyzují a srovnávají metabolické dráhy různých druhů, mohou poskytnout zajímavé informace o jejich vývoji a mohou

pomocí pochopit metabolické funkce, které jsou důležité při studiu onemocnění a identifikaci farmakologických cílů [9].



**Obrázek 1:** Schéma hlavních metabolických drah [11]

Metabolické dráhy lze rozdělit do tří skupin:

- Katabolické dráhy, které se podílejí na rozpadu relativně velkých molekul a oxidaci substrátů až na oxid uhličitý a vodu.
- Anabolické dráhy, podílející se na syntéze sloučenin z jednodušších prekurzorů. Zahrnují především redukční reakce.
- Amfibolické dráhy, zahrnující katabolické i anabolické dráhy [12].

Shrnutí nejdůležitějších dějů při katabolismu a anabolismu ukazuje Tabulka 1.

**Tabulka 1:** Nejdůležitější děje při katabolismu a anabolismu

	Energie	Proces	Reakce	Vznik
<b>Katabolismus</b>	uvolňuje	štěpení látek	oxidační	nízký počet produktů
<b>Anabolismus</b>	spotřebovává	syntéza látek	redukční	vysoký počet produktů



Primární metabolismus souvisí s produkcí energie a buněčnou syntézou. Sekundární cesty metabolismu jsou naopak spjaty s nízkou rychlostí růstu, reakcí na stres a rozpadem buněčných komponent. Když je růst omezený, převažuje sekundární metabolismus [5].

## **1.2 Metabolomická analýza**

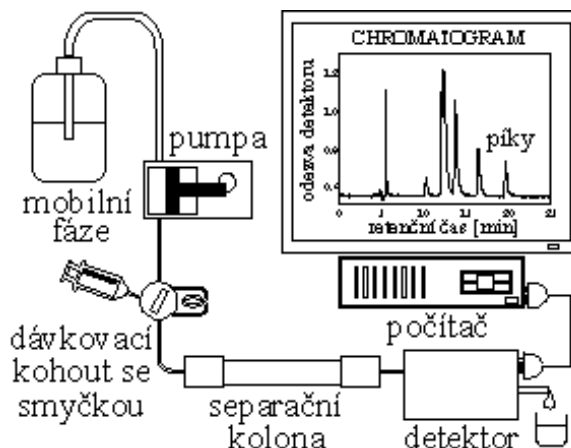
V metabolomice závisí identifikace, kvantifikace a charakterizace malých molekul (metabolitů) v buňce nebo organismu primárně na vysoce výkonných analytických technologiích. Nejčastěji používané techniky v metabolomické analýze jsou nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS). MS se často používá v kombinaci s chromatografickými technikami, jako jsou plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (LC) a kapilární elektroforéza (CE). Tyto čtyři analytické metody umožňují metabolomické profilování s vysokou účinností [13]. V této bakalářské práci se budu zabývat pouze metabolomickou analýzou pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie a jejich kombinací.

## **1.3 Kapalinová chromatografie**

LC je analytická metoda, umožňující separaci složek směsi pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Je založena na rozdělování molekul ve směsi mezi stacionární (stabilní) a mobilní (pohyblivou) fází. Některé složky směsi zůstávají ve stacionární fázi déle a pomalu se pohybují v chromatografickém systému, zatímco jiné se stacionární fází interagují méně a systém opouštějí rychleji. Děje se tomu na základě rozdílné afinity složek ke stacionární a mobilní fázi [14]. Mobilní fází je kapalina, která proudí stacionární fází. Stacionární fází může být pevná nebo kapalná látka nanesená na povrchu pevné látky [14].

Velice významná technika kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlaké pumpy, dávkovače, kolony a detektoru [15]. Princip separace pomocí HPLC (Obrázek 2) je takový, že mobilní fáze, která je předtím odplyněna, se dostává ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlaké pumpy přes filtr. Poté mobilní fáze pokračuje do dávkovacího zařízení a po nadávkování jsou vzorky vedeny do

kolony a dále do detektoru, který vysílá signál do počítače nebo jiného vyhodnocovacího zařízení. Výsledkem je chromatogram [15].



**Obrázek 2:** Kapalinový chromatograf s chromatogramem [16]

### 1.3.1 Normální a obrácená fáze LC

HPLC s normální fází (NP-HPLC) je technika, která se v současné době používá pouze tehdy, jsou-li výsledky získané u LC s obrácenou fází neuspokojivé [17]. Stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární nebo středně polární. Méně polární látky se pohybují rychleji a kolonu opouštějí dříve, zatímco s rostoucí polaritou se látky pohybují pomaleji [18]. Nejčastěji používanou stacionární fází je silikagel a dále oxid křemičitý nebo chemicky modifikovaný silikagel. Mobilní fází jsou většinou nepolární rozpouštědla (nebo jejich směsi), jako je hexan, heptan, dichlormethan, dichlorethan, diethylether nebo isopropylalkohol. NP-HPLC se používá především pro separaci polyaromatických uhlovodíků, sterolů, vitaminů, chlorofylu a ceramidů [17].

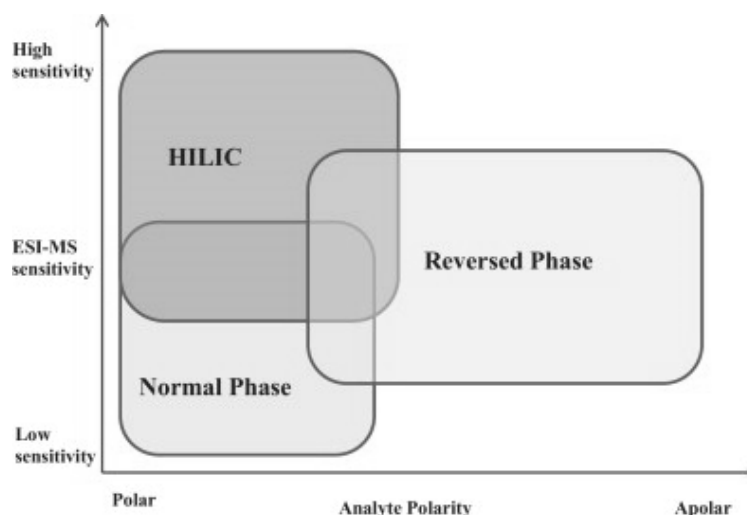
Výhodou NP-HPLC je lepší technika separace sloučenin, které se liší v počtu nebo charakteru funkčních skupin [18]. Nevýhodou je citlivost na vodu, která se může vázat na stacionární fází a snížit účinnost separace a dále je potřeba zajistit vhodné pH [17].

HPLC s obrácenou fází (RP-HPLC) využívá nepolární stacionární fází a polární mobilní fází k oddělení látek. Separace rozpuštěných látek ve směsi závisí na jejich hydrofobním charakteru, nikoliv na polaritě. Polárnější látky se pohybují rychleji oproti látkám s klesající polaritou [18]. Rozpuštěná směs se nejdříve aplikuje na

sorbent v přítomnosti vodných pufrů a látky se eluují přidáním organického rozpouštědla k mobilní fázi. Eluce může probíhat buď izokraticky, kdy koncentrace organického rozpouštědla zůstává konstantní, nebo gradientovou elucí, při které se množství organického rozpouštědla zvyšuje [19].

Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) je jiným přístupem HPLC pro separaci malých polárních sloučenin. HILIC využívá stejné polární stacionární fáze jako NP-LC, ale mobilní fáze je podobná mobilní fázi využitě v RP-LC [20]. Jestliže je vysoce polární stacionární fáze v souladu s podmínkami mobilní fáze, je schopna na své ploše vytvářet vrstvu bohatou na vodu. Hydrofilní rozpuštěné látky jsou zadržovány na základě jejich rozdělení mezi vrstvu mobilní fáze chudou na vodu a mezi vrstvu stacionární fáze bohatou na vodu [21].

HILIC vykazuje několik výhod v porovnání s NP-LC a RP-LC (Obrázek 13). HILIC je vhodná pro analýzu sloučenin v komplexních systémech. Ve vodné mobilní fázi používané v HILIC vykazují polární vzorky dobrou rozpustnost, oproti špatné rozpustnosti v mobilní fázi v NP-LC. Na rozdíl od RP-LC, gradientová eluce HILIC začíná organickým rozpouštědlem s nízkou polaritou a eluuje polární analyty díky vodnému obsahu. HILIC dokáže separovat různé neutrální i nabitě látky [20].



**Obrázek 13:** Porovnání citlivosti technik NP-LC, RP-LC a HILIC z hlediska polarity [22]

Typickými stacionárními fázemi HILIC jsou oxid křemičitý nebo křemičitý gel modifikovaný polárními funkčními skupinami. Mohou být také použity stacionární

fáze založené na polymeru [20]. Mobilní fáze zahrnuje polární organická rozpouštědla mísitelná s vodou, jako je acetonitril s malým množstvím vody. Dále se mohou použít aprotická rozpouštědla mísitelná s vodou, mezi která patří THF nebo dioxan [20].

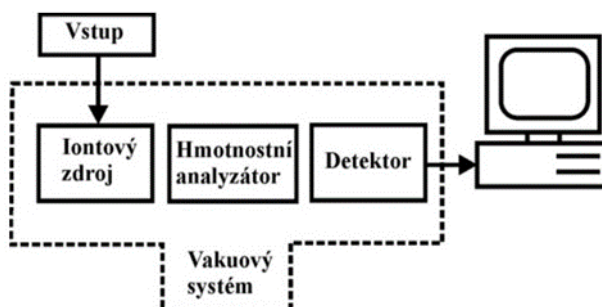
Separační mechanismus HILIC je založen na rozdělení molekul analytu mezi mobilní fázi bohatou na acetonitril (nebo jiné organické rozpouštědlo) a vodou obohacenou vrstvu vstřebanou na povrchu hydrofilní stacionární fáze. Dochází k separaci na základě polarit sloučenin a stupně solvatace. Čím více je analyt hydrofilní, tím více se rozdělovací rovnováha posune směrem k vodní vrstvě na stacionární fázi a tím se zachová více analytu [20].

Metabolomická analýza LC/MS vyžaduje vysoce selektivní a účinné chromatografické techniky [21]. Cílená i necílená metabolomika využívá různých chromatografických separací. Nevhodná volba separace může být důsledkem vyloučení, špatného uchování nebo neúplného oddělení zkoumaných analytů, což může prodloužit čas analýzy nebo způsobit nespolehlivost výsledků. V cílené metabolomické analýze LC/MS je právě nejvhodnější užití HILIC [21]. Užitím HILIC se v biologických vzorcích analyzují polární sloučeniny s nábojem i bez náboje, ačkoliv jsou vhodnější rozpuštěné látky, které náboj nemají [20]. Biologické vzorky používané při hledání metabolitů se pomocí této metody separují jednodušeji, protože metabolický proces vede k přírůstku polárních skupin ke zvýšení eliminace z buněčné tkáně. Separace HILIC se velmi snadno kombinuje s různými detekčními technikami, mezi které patří právě MS. LC/MS analýza touto metodou vede k rychlému odpaření organického rozpouštědla z mobilní fáze během elektrosprejové ionizace [20]. Mezi nejvíce analyzované polární molekuly patří sacharidy, aminokyseliny, proteiny, peptidy, nukleotidy a oligosacharidy [20].

## **1.4 Hmotnostní spektrometrie**

MS, ve své nejjednodušší definici, využívá tvorby a detekce iontů oddělených podle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Výsledkem detekce iontů je hmotnostní spektrum, což je závislost relativní intenzity iontů na jejich poměru  $m/z$  [23].

Obecně se hmotnostní spektrometry (Obrázek 3) skládají ze tří základních částí. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly na ionty plynné fáze. Hmotnostní analyzátor odděluje ionty podle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a detekční zařízení zaznamenává intenzitu iontů [24].



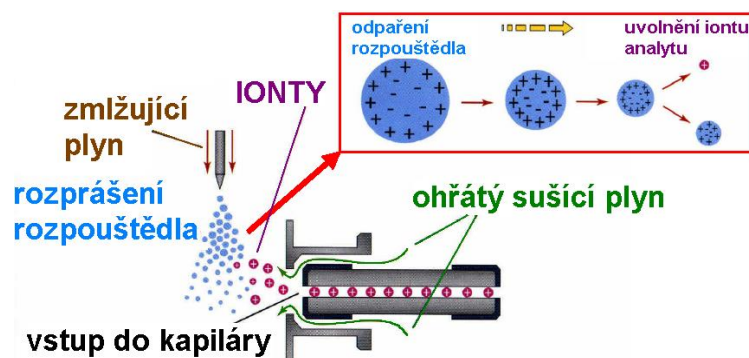
**Obrázek 3:** Schéma hmotnostního spektrometru [25]

#### 1.4.1 Ionizační techniky

První důležitou částí hmotnostního spektrometru je iontový zdroj. Existuje několik ionizačních technik, avšak nejvíce používané ionizační techniky při metabolomické analýze jsou především elektrosprejová ionizace (electrospray ionization, ESI) a ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI). Pro LC/MS analýzu obecně jsou vhodné navíc i tyto techniky: chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization, APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization, APPI).

ESI je nejrozšířenější ionizační technikou v chemické a biochemické analýze [26]. Jedná se o měkkou ionizační techniku pracující za atmosférického tlaku [27]. Ionizace je měkká v tom smyslu, že analyzované látky zůstávají malá zbytková energie a obecně při ionizaci nedochází k fragmentaci [27]. Protože elektrosprej ionizuje molekuly přímo z kapalně fáze, je kompatibilní s chromatografickými separačními technikami používanými v analytické chemii [26]. Při ESI se používá široká škála chemických látek, které mohou být ionizovány [26]. Nejlepší odezva ESI je pozorována u analytů s ionizovatelnými bazickými nebo kyselými polárními funkčními skupinami. HPLC spojená s ESI-MS (HPLC/ESI-MS) je velmi výkonnou technikou schopnou analyzovat malé i velké molekuly různých polarit v komplexní směsi biologických vzorků [27].

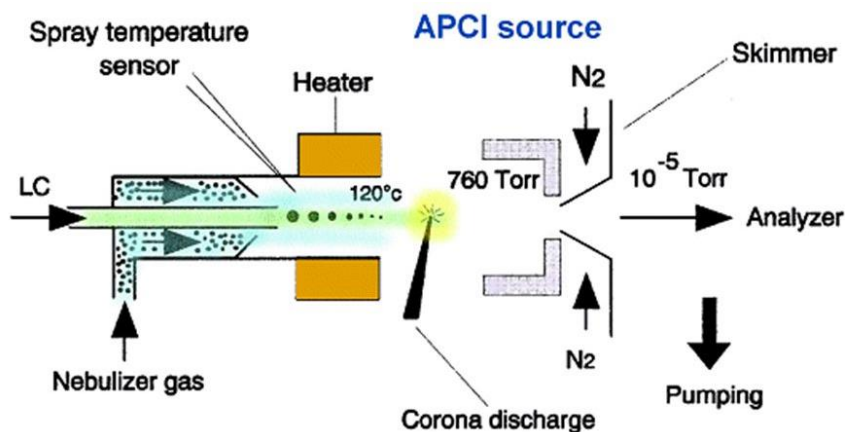
Mechanismus ESI je znázorněn na Obrázku 4. Při ionizaci vznikají nabitě kapičky na konci vodivé kapiláry obsahující roztok analytu. Rozpouštědlo z nabitých kapiček se odpařuje, dojde k opakovaným coulombickým explozím až vznikne ion plynné fáze [27].



**Obrázek 4:** Ionizace elektrosprejem (ESI) [28]

APCI je další měkkou ionizační technikou používanou v MS [29]. APCI využívá teplo a zmlžující plyn k vytvoření aerosolu elučního činidla z LC systému. Pro analýzu pomocí APCI by měly být analyty, které jsou předmětem zájmu, tepelně stabilní pro dosažení nejlepších výsledků [30].

Podrobnější popis mechanismu APCI je uveden na Obrázku 5. V APCI je vzorek smísen s rozpouštědlem a čerpán kapilárou uvnitř nenabitě křemenné trubice, ve které se vzorek převede na aerosol a poté se odpaří za pomoci plynného dusíku a je zahříván na velmi vysokou teplotu (350-550 °C). K ionizaci molekul dochází pomocí koronového výboje vložením napětí na koronou jehlu. Výsledné ionty analytu jsou vtaženy do hmotnostního spektrometru pro detekci [31].

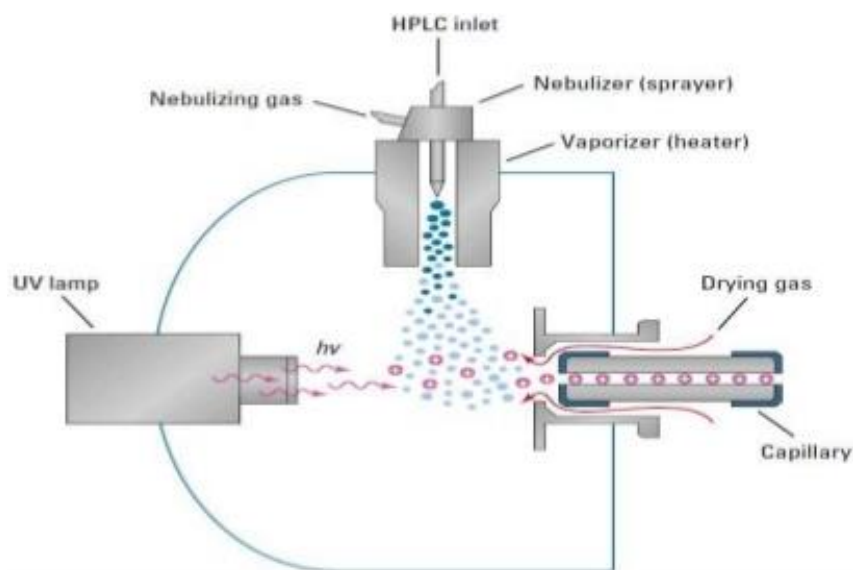


**Obrázek 5:** Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [32]

Technika APCI se používá k analýze menších, tepelně stabilních mírně polárních a nepolárních sloučenin, které neobsahují žádná kyselá nebo bazická místa [31].

APPI je jednou z nejnovějších technik měkké ionizace MS. APPI-MS je zvláště vhodná pro analýzu vysoce nepolárních nebo neutrálních sloučenin, které nemohou být ionizovány pomocí ESI nebo méně účinně pomocí APCI. Technika je univerzálnější, robustnější a citlivější než APCI vzhledem k vyšší toleranci na nepolární mobilní fázi a nízké průtokové rychlosti v aplikacích HPLC/MS [33].

Na Obrázku 6 je vidět mechanismus APPI. Kapalným roztokem analytu a rozpouštědla se odpařuje pomocí rozprašovacího plynu, jako je dusík, a vstupuje do ionizační komory při atmosférickém tlaku. Zde je roztok vystaven ultrafialovému světlu z kryptonové lampy. Fotony emitované z této lampy mají specifickou úroveň energie (10 eV), která ionizuje pouze molekuly s nižší ionizační energií [34].

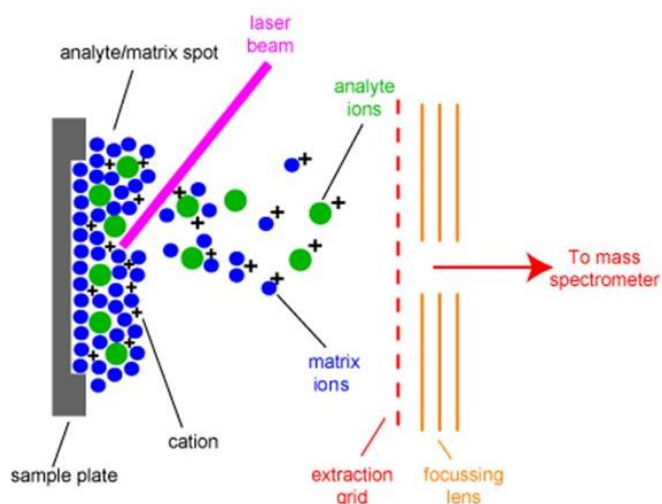


**Obrázek 6:** Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [35]

Protože rozpouštědlo spotřebovává fotony emitované z kryptonové lampy a k přímé ionizaci molekul analytu by došlo jen s malou pravděpodobností, zavádí se tzv. dopant. Dopant je látka, která zvyšuje počet iontů, ale jen v případě, je-li jeho ionizační energie nižší než energie fotonů z vyzařovaného světla. Přidává se ve větším množství, než je množství analytu, je ionizován a poté funguje jako mezičlánek mezi fotony a analytem. Jako dopant se používá například toluen [36].

MALDI je metoda měkké ionizace, která poskytuje hmotnostní spektrum analytů s minimálním množstvím fragmentace. MALDI-MS má řadu výhod oproti běžným metodám, zahrnující snadnou obsluhu, poskytnutí strukturální informace o molekulách s vysokou průchodností, rychlostí, citlivostí a přesností [37]. Využívá se pro analýzu různých biomolekul, včetně peptidů, proteinů, DNA, RNA, oligonukleotidů, oligosacharidů a polymerů [37].

Při ionizaci je vzorek rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle a smísen s nadbytkem vhodné matrice v podobě organické sloučeniny. Následně je roztok nanesen na destičku a sušen na vzduchu (nebo pod proudem plynného dusíku). Vzorek krystalizuje s matricí. Složky ve směsi jsou převedeny do plynné fáze laserovým paprskem, což vede k desorpci a ionizaci analytu a generují se protonované ionty ze vzorku, které jsou následně detekovány a měřeny hmotnostním analyzátozem [38]. Popis ionizace je uveden i na Obrázku 7.



**Obrázek 7:** Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) [39]

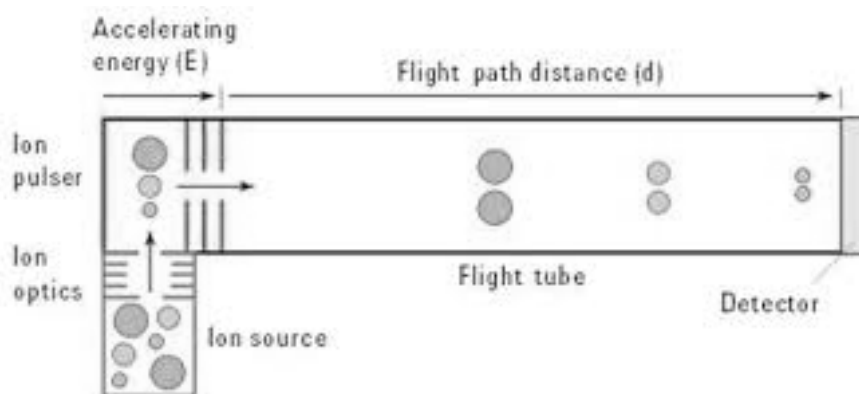
### 1.4.2 Hmotnostní analyzátozy

Hmotnostní analyzátoz je součástí přístroje, ve kterém jsou děleny ionty na základě jejich hodnot  $m/z$ . V hmotnostním spektrometru je izolace iontů obvykle řízena různými fyzikálními principy, ačkoliv tradiční analyzátozy, jmenovitě magnetické sektory, využívají magnetické pole, které ovlivňuje separaci iontů [38]. Mezi nejpoužívanější hmotnostní analyzátozy patří analyzátoz doby letu (time of flight, TOF), kvadrupólový analyzátoz (quadrupole, Q), iontová past (ion trap, IT), iontová



cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) a orbitrap. Avšak nejpoužívanější hmotnostní analyzátoři používané pro metabolomickou analýzu spojenou s kapalinovou chromatografií jsou trojitý kvadrupól (QqQ), hybridní analyzátoř QqTOF, iontová cyklotronová rezonance (ICR) a již zmiňovaný orbitrap.

TOF odděluje ionty různých  $m/z$  pomocí jejich odlišné doby letu [40]. Po počátečním urychlení v elektrickém poli se ionty z iontového zdroje pohybují letovou trubicí (Obrázek 8) v oblasti bez pole. V letové trubici dochází k oddělení iontů. Na druhém konci letové trubice se ionty dostávají do detektoru. Měří se čas potřebný k přesunu v oblasti mezi zdrojem a detektorem. Ionty s nižší hodnotou  $m/z$  se k detektoru dostávají rychleji [41].

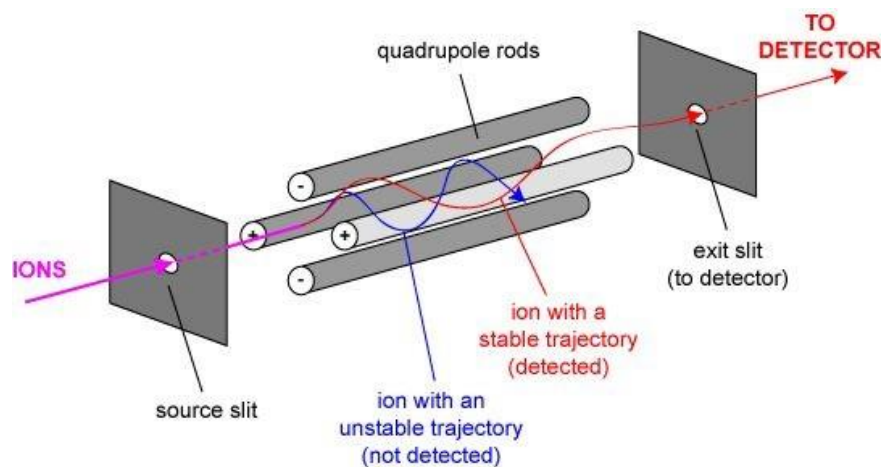


**Obrázek 8:** Pohyb iontů z iontového zdroje k detektoru v TOF analyzátoři [42]

Mezi výhody TOF patří rychlost, s jakou lze snadno získat spektrum. Kompletní spektrum může být získáno každých několik mikrosekund. Druhou výhodou je, že hmotnostní spektrum může být zaznamenáno pro každý pohybující se iont. Hlavní nevýhodou TOF analyzátoři je omezená rozlišovací schopnost [41].

Kvadrupól je zařízení, které využívá stabilitu trajektorie iontu v oscilujícím elektrickém poli k oddělení iontů podle jejich poměrů  $m/z$  [43]. Analyzátoř se skládá ze čtyř paralelních elektrických tyčí s kruhovým průřezem. Na dvě z těchto tyčí působí stejnosměrné napětí a na další dvě působí střídavé napětí. Ionty z iontového zdroje jsou pulzovány směrem ke kvadrupólu. Při průchodu mezi tyčemi (Obrázek 9) se pozitivně nabitě ionty pohybují ve směru záporně nabitě tyče, po změně polarity se změní jejich směr dráhy pohybu. Dojde k oscilaci a k detektoru

projdou pouze stabilní ionty o vhodném poměru  $m/z$ . Zbývající ionty narazí do jedné z tyčí [38].

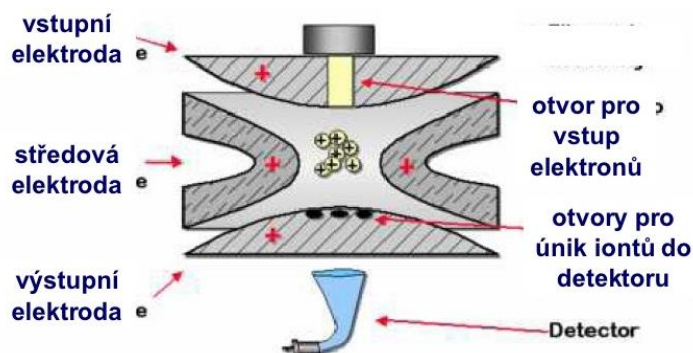


**Obrázek 9:** Průchod iontů kvadrupólovým analyzátozem [44]

Hlavní výhody kvadrupólových analyzátozů jsou relativně nízké náklady, malé rozměry, robustnost a snadná údržba. Nevýhodou je omezená možnost hmotnostního rozsahu [38].

IT je zařízení, které zadržuje ionty pomocí radiofrekvenčního elektrického pole. IT může být rozdělena na 3D iontovou past a 2D iontovou past [43].

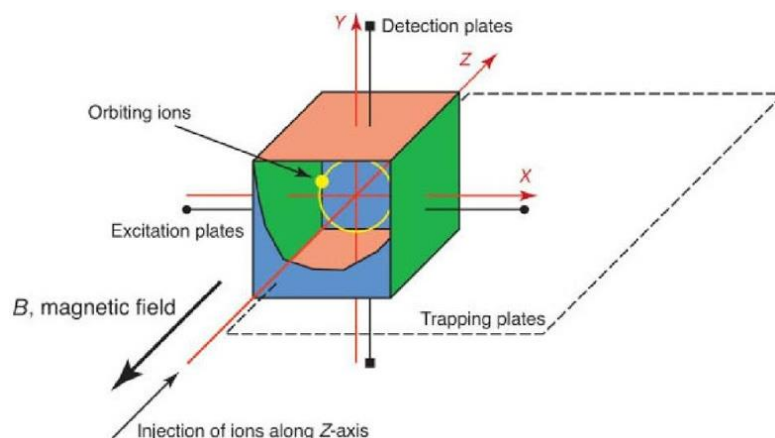
IT (Obrázek 10) je tvořena třemi elektrodami. Prstencová elektroda je umístěna symetricky mezi dvěma koncovými elektrodami. IT může být popsána jako malé zařízení pro uchovávání iontů, které jsou směřovány ke středu pasti, kde jsou zadržovány heliovým plynem [45]. Helium odstraňuje nadbytečnou energii z iontů, která vzniká při vypuzování iontů z pasti na základě různých poměrů  $m/z$ . Ionty jsou vypuzovány přes koncovou elektrodu k detektoru [43].



**Obrázek 10:** Schéma iontové pasti [46]

FTICR nabízí nejvyšší správnost měření a rozlišovací schopnost  $m/z$  ze všech stávajících technik MS [47]. Zatímco většina hmotnostních analyzátorů, jako je kvadrupól, IT nebo TOF vyžadují destruktivní detektory, ve Fourierově transformaci (FT) se používá nedestruktivní detekční režim [48].

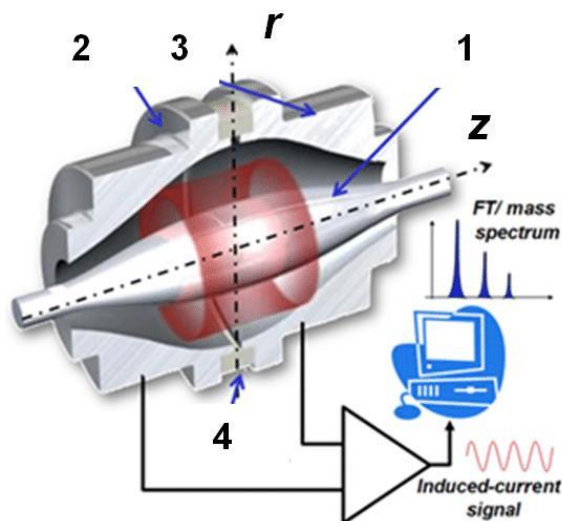
Ionty z iontového zdroje směřují k oblasti ultra vysokého vakua a do cely ICR (Obrázek 11), ve které se nachází homogenní magnetická oblast supravodivého magnetu [47]. Začínají se pohybovat po cykloidálních trajektoriích v homogenním magnetickém poli. Na koncové elektrody je aplikováno nízké elektrostatické pole, aby se minimalizovala ztráta iontů, které by mohly uniknout podél osy magnetického pole. Ionty jsou excitovány, mají větší poloměr a při přiblížení k detekční desce se na ně generuje střídavý proud. Proud z excitovaných iontů je detekován a výsledný signál je převeden pomocí FT na hmotnostní spektrum [48].



**Obrázek 11:** Schéma FTICR cely [49]

Orbitrap (Obrázek 12) je elektrostatická iontová past, která využívá FT k získání hmotnostního spektra [43]. Skládá se z centrální vřetenovité elektrody, nacházející se kolem osy. Elektroda je udržována pod vysokým napětím kvůli zachytávání iontů. V analyzátoru se dále nachází vnější elektroda rozdělená na dvě poloviny [48]. Elektrody vytvářejí elektrické pole, které je nehomogenní ve dvou směrech. Elektrostatické pole přitahuje ionty k centrální elektrodě, zároveň ale odstředivá síla kompenzuje sílu vytvořenou elektrostatickým polem, aby byla zajištěna tangenciální rychlost iontů [48]. Při pohybu iontů s vhodnou kinetickou energií se vytváří stabilní trajektorie tvořená rotací kolem centrální elektrody, oscilací kolem

osy a mající tvar spirály. Frekvence kmitů při oscilaci stanovuje poměr  $m/z$  [48]. Po zesílení indukovaného proudu z vnějších elektrod může být frekvence kmitů přímo detekována v detektoru. Po širokopásmové detekci se získá  $m/z$  spektrum pomocí FT [48].



**Obrázek 12:** Schéma Orbitrapu, centrální elektroda (1), dvě poloviny vnější elektrody (2, 3), zesílení indukovaného proudu k digitálnímu zpracování a získání hmotnostního spektra zachycených iontů (4) [50 s. 1]

QqQ patří mezi tandemový hmotnostní spektrometr. Velké Q značí kvadrupól a malé q značí kolizní cely. Jak již název vypovídá, obsahuje celkem tři kvadrupóly [38].

Konkrétní ionty jsou nejdříve filtrovány pomocí prvního kvadrupólu. Poté přechází do kolizní cely, kterou je druhý kvadrupól. V něm dochází ke kolizi s proudem inertního plynu (nejčastěji hélium, dusík, argon nebo xenon). Následkem kolize dojde k nárůstu energie a nastane fragmentace iontů [38]. Ve třetím kvadrupólu jsou ionty analyzovány a přechází do detektoru [43].

Pro analýzu předem stanovených souborů metabolitů je QqQ vhodným a široce používaným analyzátozem. Profilování metabolitů pomocí hmotnostního spektrometru QqQ může provést cílenou analýzu poměrně malého počtu sloučenin. Přestože profilování metabolitů pomocí QqQ poskytuje informace o pouze omezeném počtu sloučenin, hlavní výhodou tohoto přístupu je to, že identifikace metabolitů je vykonána efektivně [51]. Nejčastěji je cílená analýza prováděna v režimu monitorování iontových reakcí (MRM). MRM zvyšuje selektivitu a citlivost. Výsledné údaje jsou potom snadno interpretovány v porovnání s údaji z necílené

analýzy. Nevýhodou práce v režimu MRM je to, že poskytuje pouze úzké (cílené) pokrytí metabolomu [52]. QqQ je kromě vysoké citlivosti, kvantitativní spolehlivosti a odolnosti také levnější než ostatní hmotnostní spektrometry, které se používají pro necílenou metabolomiku [52].

Některé hmotnostní spektrometry jsou kombinací několika typů analyzátorů. Přístroje se poté nazývají hybridní. Cílem hybridního přístroje je kombinace předností analyzátorů a zároveň vyvarování jejich slabých stránek, takže s hybridními analyzátory lze dosáhnout lepších výsledků než s izolovaným analyzátozem. Hybridní analyzátory jsou symbolizovány kombinací písemných zkratk podle pořadí, v jakém ionty procházejí analyzátozem [43].

QqTOF hybridní analyzátor lze popsat jako trojitý kvadrupól, u kterého je třetí kvadrupól nahrazen TOF analyzátozem nebo jako přídavek kvadrupólového analyzátoru s kolizí analyzátoru TOF [43]. Velké Q opět značí kvadrupól a malé q značí kolizní celu stejně jako u QqQ [38].

V prvním kvadrupólu jsou ionty filtrovány na konkrétní ionty, které jsou předmětem zájmu. Poté jsou urychleny a dostávají se do kolizní cely, kde se podrobí fragmentaci způsobenou kolizí s proudem neutrálního plynu (obvykle argonem nebo dusíkem). Výsledné fragmentové i zbývající ionty jsou i nadále vystaveny kolizi před TOF analýzou [43] za účelem generování dalších iontů k určení správného hmotnostního spektra. Tento proces zlepšuje strukturální objasnění a schopnost identifikovat molekuly [53].

Výhody hybridního QqTOF analyzátoru zahrnují snadné ovládání, vysokou přesnost měření a až 100násobné zvýšení citlivosti ve srovnání s QqQ [38].

## **2 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma metabolomická analýza biologických vzorků pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

## 3 Rešeršní část

Metabolomická analýza je kategorizována do dvou komplementárních metod: cílená a necílená analýza. Cílený přístup se zaměřuje na identifikaci a kvantifikaci vybraných metabolitů (nebo třídy metabolitů), jako například substráty enzymů přímé produkty bílkovin, konkrétní třídy sloučenin nebo metabolity určitých drah. V cíleném přístupu jsou chemické vlastnosti zkoumaných sloučenin známy. Zatímco cílený přístup je obvykle řízený hypotézou, necílená analýza může vytvořit novou hypotézu pro pokročilejší testy měřením (ideálně) všech metabolitů biologického systému. Pracovní postup metabolomické studie je zaměřen na porovnání několika biologických skupin k identifikaci metabolitů, které jsou významně pozměněny. Začíná se necílenou analýzou monitorováním potenciálních metabolitů, které jsou předmětem zájmu. Tyto metabolity se poté podrobí identifikaci metabolitu, kvantifikaci, funkčnímu objasnění a analýze cest [54].

Spojením separační techniky s MS lze získat hmotnostní spektrum izolovaného produktu [43].

LC/MS má rostoucí popularitu jako platforma pro metabolomické studie kvůli své vysoké výkonnosti, měkké ionizaci a dobrému pokrytí metabolitů. Úspěch metabolomické studie na bázi LC/MS často závisí na mnoha experimentálních, analytických a výpočetních krocích [54].

### 3.1 Metabolomické přístupy

Kvantitativní odhad kompletní sady buněčných metabolitů je zvláště vhodný pro zrcadlení buněčného metabolismu a jeho flexibilitu za různých podmínek. Tradičně jsou kvantifikovány malé skupiny metabolitů v cílených metabolomických přístupech. Vývoj separačních technologií spojených s identifikací molekul s nízkou molekulovou hmotností umožňuje v současné době profilovat stovky metabolitů různorodé chemické povahy [55].

Mezi metabolomické přístupy patří: cílená analýza, profilování, analýza otisku palce, analýza otisku stopy a metabonomická analýza [55].

Cílená analýza má za cíl měřit předem definovanou skupinu biochemicky charakterizovaných a interpretovaných metabolitů (podskupinu metabolomu). Toto snížené pokrytí metabolomu znamená, že cílená metabolomika závisí na znalosti metabolitů a jejich biochemických cestách, které brání objevu nových metabolických poruch [7].

Metabolická cílená analýza je zaměřena na analýzu metabolitů, které splňují běžné funkce nebo se podílejí na definovaných cílových procesech [55]. Cílená analýza je nejrozšířenější technikou s aplikací ve všech oblastech biologického výzkumu. Pro srovnávací analýzu ve studiích funkční genomiky má však cílená analýza pouze omezené použití, protože úrovně cílových analytů mohou být pozměněny neočekávanými účinky, které nelze pochopit bez komplexnějších přístupů. Proto je zapotřebí širší analýzy metabolických změn, aby se omezila nadměrná interpretace dat [56].

Metabolické profilování zahrnuje přístupy využívající spektra metabolitů pro diferenciaci druhů nebo fenotypů [55]. Nejčastěji se termín metabolické profilování vztahuje na katabolickou degradaci určité sloučeniny v organismu. Aby bylo možné podrobně studovat tyto degradační cesty, lze paralelně sledovat několik analytických přístupů. Nejčastěji se určují metabolické profily ve farmaceutickém výzkumu, kvůli sledování metabolického osudu podávaných léků [56].

Analýza otisku palce je rychlá, necílená a vysoce výkonná metoda pro kvantitativní stanovení (celého) spektra buněčného metabolitu, metabolomu. Tato technologie je v současné době většinou používána ke globální charakterizaci metabolických změn v různých kultivačních (environmentálních) podmínkách nebo genetických podmínkách [55]. Metoda je mimořádně užitečná pro rychlé sledování změn metabolismu za různých růstových podmínek nebo v různých genetických podmínkách. Růst a metabolické aktivity jsou určovány a ovlivněny různými faktory prostředí, jako je například světlo, teplota a dostupnost různých zdrojů uhlíku. Některé metabolické cesty budou pravděpodobně více či méně aktivní za určitých podmínek [55].

Analýza otisku stopy se často používá pro metabolomové analýzy extracelulárních sloučenin v růstových médiích. Kumulace sloučenin v okolním médiu může vyplývat



z jejich exsudace, tj. uvolnění látek přes definované transportéry nebo kanály nebo (částečnou) buněčnou lýzu [55]. Metabolická analýza otisku stopy může být v současné době prováděna ve vysoce výkonném režimu, který kombinuje stabilní značení izotopů s moderními analytickými nástroji, jako je například LC/MS [55].

Metabonomika je definována jako studie metabolické odezvy organismů na choroby, změny životního prostředí nebo genetickou modifikaci a ukázala se jako přední technologie v řadě oblastí, včetně biologie a medicíny, přičemž se objevují nové oblasti, jako je farmakometabonomika uzpůsobená medicíně [57] (schopnost předpovědět reakci léků před tím, než dojde k dávkování) a oblast prediktivní metabonomiky, která vznikla nedávno [58].

Metabonomické studie se obvykle provádějí buď NMR, nebo technikou MS, jako je LC/MS, s cílem získat informace o identitách a množstvích metabolitů v konkrétním vzorku. Studie se provádějí buď cíleně, kde se měří předem definovaná sada metabolitů, nebo necíleným způsobem, kde nejsou uvedeny žádné předem definované metabolity. Výběr použité analytické technologie často závisí na konkrétních požadavcích studia [57].

## **3.2 Příprava vzorku**

Postup přípravy vzorku je zásadní pro detekci metabolitů, které se přirozeně vyskytují v biologickém vzorku. Volba metody přípravy vzorku ovlivňuje jak sledovaný profil metabolitu, tak i kvalitu údajů. Z tohoto důvodu by měl být ideální protokol pro přípravu vzorku co nejvíce neselektivní, aby bylo zajištěno přiměřené pokrytí metabolitů. Příprava vzorku by měla být jednoduchá a rychlá, aby umožňovala vysoký výkon a byla zajištěna stabilita většiny sloučenin. Příprava metabolitů silně závisí na typu biologického média a také na chemických strukturách a typech metabolitů, které mají být přednostně detekovány [59].

Obecný popis přípravy vzorku je následující: zhášení buněčného metabolismu, extrakce intracelulárních a extracelulárních metabolitů a zakoncentrování vzorku.

### **3.2.1 Zhášení buněčného metabolismu**

V době odběru vzorků se metabolity mohou rychle měnit, pokud nejsou vzorky okamžitě zhášeny. Obvyklým prostředkem pro metabolické zhášení biologických

vzorků je zmrazení suchým ledem nebo kapalným dusíkem. Zmrazování tekutým dusíkem je účinnější díky jeho výrazně nižší teplotě (-196 °C) v porovnání se suchým ledem (-78,5 °C). Pomalé zmrazování (dokonce i v rozmezí 10 sekund) může vést ke změnám nestálých metabolitů. Tento aspekt musí být považován za minimální při vzorkování, zejména u metabolicky aktivních silných vzorků. Pro zhášení objemných tkání je zmrazení kapalným dusíkem metodou, při které dojde během několika sekund k zastavení metabolismu [60].

Metabolické zhášení rychlou homogenizací objemných tkání v ledově chladné kyselině chloristé 0,6 M ukázalo, že poskytuje profily metabolitů srovnatelné se zhášením v tekutém dusíku. I když je to vhodná metoda, vylučuje se možnost sdílení tkání pro extrakci RNA nebo DNA pro transkriptomovou nebo genomovou analýzu, protože extrémně nízké pH kyseliny chloristé odbourává některé metabolity jako například askorbát nebo vysoce energetické fosfátové metabolity. Postup odstraňování kyseliny chloristé titrací pomocí hydroxidu draselného nebo uhličitanu draselného je také časově náročný [60].

Pro adherentní buňky savců na kultivačních plotnách je zhášení přímým zmrazením nepraktické. Buňky je třeba vyjmout z komponenty média před zhášením, čehož lze dosáhnout rychlým propláchnutím buněk v ledově chladném PBS (fosfátový roztok s chloridem sodným), následným rozpouštěním v chladném acetonitrilu (např. -20 °C) nebo methanolu (např. -80 °C). Avšak tato metoda buněčného zhášení není vhodná pro potlačení rychle rostoucích mikrobů, což vyžaduje mnohem rychlejší manipulaci před zmrazením. Celé médium se zháší studeným nebo horkým rozpouštědlem (např. studený 60 % methanol nebo horký 90 % ethanol) před separací buněk rychlými filtračními metodami. Přímé ochlazování média je rychlé, má však nevýhodu, že kontaminuje nízkou hladinu buněčných metabolitů se střední hladinou. Zhášení methanolem spojené se separací buněk může tento problém obejít, ale dojde k významné ztrátě (> 60 %) buněčných metabolitů v důsledku nespecifického úniku. Použitím pufrovaných uhlovodíkových rozpouštědel nebo izotonického promývacího roztoku spojeného s rychlou filtrací bylo zjištěno, že se obnoví relativně vysoké hladiny buněčných metabolitů [60].

Teplota a pH jsou také důležitými faktory při potlačení biologické aktivity před extrakcí metabolitů [61].

### 3.2.2 Extrakce intracelulárních a extracelulárních metabolitů

Úspěšná extrakce metabolitů je kritickým krokem v profilování metabolitů. Optimalizací extrakce metabolitů lze zlepšit rozsah a kvantitativní kapacitu metabolomických studií [61]. Různé metody extrakce metabolitů mají za následek různé výtěžky metabolitů. Jednoduché modifikace, jako je změna teploty nebo složení extrakčního rozpouštědla, budou mít vliv na metabolity, které mohou být detekovány a studovány, zatímco speciální extrakční metody jsou vyžadovány pro studium specifických metabolitů, jako jsou lipidy a metabolity podílející se na metabolismu uhlíku. Protokol pro extrakci metabolitů proto hraje mimořádně důležitou roli při určování rozsahu metabolitů, které lze studovat. Lepší pochopení extrakčních parametrů umožní optimalizaci protokolů extrakce metabolitů, což vede k robustnějším metabolomickým studiím [61].

Aby bylo možné identifikovat a kvantifikovat intracelulární metabolity, je nezbytné extrahovat metabolity z intracelulárního oddílu. Toho se obvykle dosahuje použitím extrakčních rozpouštědel (organických, anorganických nevodných nebo směsí těchto dvou), které činí obal buňky porézní nebo propustný, což umožňuje pronikání těchto rozpouštědel do intracelulárního média a lepší extrakci intracelulárních metabolitů. Tento proces také pomáhá oddělit "malé" metabolity od makromolekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Úplné přerušení buněčné stěny je zbytečné a ve většině případů je nežádoucí, protože by vedlo k uvolnění jak malých, tak velkých molekul do extrakčního roztoku a metabolomika je zaměřena pouze na analýzu malých molekul [5].

Pro přípravu intracelulárních vzorků mohou být použity různé enzymatické, mechanické a chemické látky. Aplikace enzymových i fyzikálních činidel je v metabolomice poměrně omezená kvůli jejich schopnosti degradovat polymerní složky buněčného obalu a způsobit únik velkých molekul. Některé z těchto enzymaticko-fyzikálních metod mohou být kombinovány s chemickými metodami pro zlepšení extrakčního procesu [5].

Nejrozšířenější metody extrakce intracelulárních metabolitů jsou založeny na aplikaci chemických látek. Metabolity jsou obecně rozděleny mezi dvě fáze podle jejich rozdělovacích koeficientů, rozpustnosti, teploty rozpouštědla a relativních

objemů fází. Cílem je koncentrace metabolitů v jedné fázi, kterou lze dosáhnout použitím chemických činidel [5].

Při výběru vhodného chemického činidla je třeba vzít v úvahu míru extrakce metabolitů spojenou s touto specifickou chemikálií. Míry extrakce se mohou měnit v závislosti na rychlosti difúze ve dvou fázích, které by umožnily, aby se rozpouštědlo dostalo do buněčného obalu pro extrakci intracelulárních metabolitů. Výsledkem je, že rychlost extrakce chemického činidla je také přímo spojena se stupněm permeabilizace buněk. Proto výběr chemických látek a podmínek extrakce závisí na typu cílených buněk a na sledovaných skupinách metabolitů [5].

Mnoho chemických metod extrakce jednoduše směřuje k extrakci několika metabolitů (např. mastných kyselin, aminokyselin). Nicméně ideální metabolomická analýza je zaměřena na extrakci co nejvíce tříd a druhů metabolitů. Proto metabolomická komunita zdůraznila nutnost případně použít více metod extrakce, aby se získal co možná nejkomplexnější profil intracelulárního metabolitu [5]. Pro extrakci intracelulárních metabolitů se široce používají jak polární (např. methanol nebo ethanol), tak nepolární (např. ethylacetát, hexan a chloroform) organická rozpouštědla. Organická rozpouštědla mají schopnost oslabovat buněčnou stěnu, proteiny a lipidy buněčné membrány, proto mohou vytvářet póry v buněčném obalu. Intracelulární metabolity se potom uvolní přes póry a extrahují do organického rozpouštědla [5].

Dále se pro extrakci metabolitů z rostlinných a živočišných buněk často používají mechanické metody jako např. ultrasonikace, mikrovlnná trouba, French press nebo ruční mletí [5].

Extracelulární metabolity mohou být rozděleny nesmíselnými rozpouštědly, avšak použití rozpouštědel při extrakci metabolitů z extracelulárních médií mezi kapalinou a kapalinou je velmi namáhavé a časově náročné, což je nepopulární pro profilování metabolitů. Také je známo, že tento přístup má za následek neúplné oddělení fází a nižší míru obnovy. Kromě toho tento typ separace také vyžaduje použití velkého množství skleněného nádobí a organických rozpouštědel [62].

Lepší extrakce metabolitů se dosahuje extrakcí na pevné fázi (SPE) s použitím kolony k zachycení metabolitů, které jsou předmětem zájmu. Selektivní solubilizace

je také široce používaná metoda pro analýzu extracelulárních metabolitů v roztoku. Existují však dvě běžně používané metody pro separaci cílených metabolitů, které jsou přítomny v roztoku, a to SPE a mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [62].

### **3.2.3 Zakoncentrování vzorků**

Vzorky získané během extrakce intracelulárních metabolitů a některých extracelulárních metabolitů jsou typicky zředěné. Předtím, než dojde k analýze vzorků, musí být rozpouštědlo nebo rozpouštědla částečně nebo zcela odstraněny ze vzorku [63].

Sušení mrazem neboli lyofilizace se běžně používá k odstranění vody, aby se zabránilo tepelné degradaci. Proces lyofilizace sestává ze zmrazení vzorku a následného odstranění rozpouštědla sublimací. Tato metoda kombinuje výhodu hlubokého zmrazení a dehydratace. Metabolity jsou stabilizovány neagresivní technologií, aby se zabránilo úniku tepla. Sušení mrazem je relativně časově náročné. Mechanismy jsou komplexní, díky nim se dosáhne lyofilizace určitého vzorku. Pro získání větší rychlosti sušení obecně platí, že větší plochy jsou preferovány před tlustšími vrstvami ledu [63].

Nevodné extrakty mohou být koncentrovány odpařením rozpouštědla. Odpařování organických rozpouštědel se zdá být velmi spolehlivou metodou pro koncentrování vzorků obsahujících primární metabolity. Proces je velmi rychlý, a proto dochází k minimálním ztrátám tepelnou degradací. Tento postup není vhodný pro vodné vzorky, jelikož trvá dlouho, než se voda vysuší pod vakuem a je často nutné vzorky zahřívat. Nicméně odpařování rozpouštědel má několik výhod před lyofilizací, protože je rychlejší a méně agresivní [63].

## **3.3 Metabolomická analýza LC/MS**

Nejčastěji zkoumanými biologickými vzorky jsou např. moč, krev, tuková tkáň [53], buňky a zvířecí tkáně [64] nebo části rostlin [65]. Analyzovány jsou různé druhy metabolitů, zahrnující metabolity z hlavních metabolických drah, včetně glykolýzy, metabolismu nukleotidů a aminokyselin [66], dále ceramidy, triacylglyceroly, fosfolipidy [67] a mnoho dalších metabolitů. Separace probíhá vždy za určitých podmínek teploty, pH, průtoku mobilní fáze a objemu analyzovaného vzorku [64].

Využívají se rozmanité typy kolon, chemicky modifikovaný silikagel s C18, C8, NH<sub>2</sub> atd.

Pro příklad uvádím konkrétní metabolomickou analýzu, ve které byly analyzovány vzorky lidské krve a moči. Cílem bylo nalézt nejvhodnější typy kolon pro analýzu v HILIC a RPLC módu [68]. Vzorky moči, krve a standardní směsi pro HILIC-MS a RPLC byly po přípravě analyzovány systémem HPLC/MS s Q-TOF a ESI [68]. Pro HILIC bylo porovnáváno 5 typů kolon: BEH amide, BEH HILIC, Hypersil GOLD HILIC, Synchronic HILIC a ZIC-HILIC. Mobilní fáze A se skládala z octanu amonného a směsi acetonitrilu a vody a mobilní fáze B se skládala z octanu amonného a směsi acetonitrilu a vody v jiném poměru [68]. Pro RPLC bylo porovnáváno 5 typů kolon: Hypersil GOLD, Hypersil GOLD aq, BEH C18, Kinetix a Zorbax SB. Mobilní fáze A se skládala z kyseliny octové ve vodě a mobilní fáze B se skládala z methanolu s kyselinou octovou [68]. Pomocí software byla na základě retenčního času, tvaru píku a signálu MS získána data metabolitů. Bylo provedeno několik analýz za různých podmínek pH a porovnáno se standardy. Zjistilo se, že analýza v HILIC-MS módu poskytuje optimální výsledky pro analýzu hydrofilních metabolitů. Největší zastoupení měly organické kyseliny a deriváty, aminokyseliny a konjugáty. Kolony pro RPLC-MS byly celkově hydrofobnější, což není optimální pro pokrytí metabolitů, neboť většina metabolitů obsažených v krvi je hydrofobních (např. lipidy, mastné kyseliny) a tak nemohou být eluovány z více hydrofobních kolon. RPLC-MS by byla dobře využívána v necílené metabolomické analýze. Nejlépe rozpoznatelnými metabolity v RPLC-MS byly organické kyseliny a deriváty, aminokyseliny a konjugáty, alkoholy a indoly [68]. Při kombinaci HILIC a RPLC-MS v pozitivních i negativních režimech ESI se v moči i plazmě rozšířilo pokrytí metabolomu díky tomu, že metabolity, které nebyly detekovatelné v HILIC, byly detekovatelné v RPLC-MS a naopak [68].

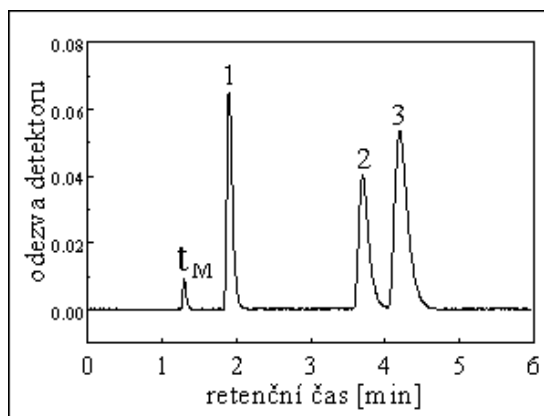
Jiným příkladem je analýza myšního mozku pomocí HILIC-MS s ESI ke kvantifikaci širokého spektra lipidů a metabolitů rozpustných ve vodě [69]. Vzorky myších mozků byly po přípravě analyzovány systémem UHPLC/MS s Q-TOF analyzátořem, ESI ionizací a kolonou na bázi aminů Luna Aminopropyl. Mobilní fáze A se skládala z octanu amonného a hydroxidu amonného ve vodě a mobilní fáze B se skládala z acetonitrilu [69]. Profilování bylo provedeno v negativním ionizačním režimu.

Poté bylo provedeno zpracování dat a jejich analýza. HILIC umožnila detekci několika lipidových metabolitů a metabolitů rozpustných ve vodě. Byly detekovány např. fosfolipidy, nukleotidy, aminokyseliny a neuropeptidy. Zjistilo se, že v různých částech mozku se objevují jiné typy metabolitů [69].

Příkladem rostlinné metabolické analýzy je zkoumání metabolické reakce listů dvou vyšlechtěných odrůd vinné révy za nedostatku vody po dobu 5 týdnů. Listy byly analyzovány profilováním jejich primárních a sekundárních metabolitů [70]. Po odebrání listů a po jejich přípravě byly vzorky analyzovány systémem UHPLC/MS s Q-TOF a ESI v negativním záznamu iontů. Chromatografická separace byla provedena na koloně Acquity UPLC BEH C18. Mobilní fáze A se skládala z vody, acetonitrilu a kyseliny mravenčí a mobilní fáze B se skládala z kyseliny mravenčí v acetonitrilu [70]. Data byla následně zpracována a statisticky analyzována. Výsledkem byly změny v množství a počtu změněných metabolitů. Primární metabolity byly významně citlivější oproti sekundárním metabolitům. Změny primárního metabolismu byly spojené s vodním stresem, zatímco změny sekundárního metabolismu byly zapříčiněny různými druhy kultivarů. Ve studii bylo zjištěno, že došlo k poklesu uhlíku v poměru k dusíku, protože při reakci na stres se zvyšuje biosyntéza aminokyselin na úkor metabolitů uhlíku. [70].

### **3.4 Zpracování dat metabolické analýzy**

Po přípravě vzorku, chromatografické separaci a detekci metabolitů hmotnostním spektrometrem nastává zpracování dat. Data jsou získána na základě hmotnostně-spektrometrického chromatogramu (Obrázek 14), který přináší informace o m/z, retenčním čase a jejich intenzitě metabolitů. Tato data musí být nejprve upravena filtrováním, detekcí a sjednocením příslušných znaků, vyrovnáním signálů, extrakcí hmotnostních spekter a normalizací dat [71]. Existuje několik softwarových programů, mezi které patří XCMS, MZmine 2 a MAVEN, které identifikují píky, srovnávají retenční časy a získávají informace o aduktových a izotopických iontech [72].



**Obrázek 14:** Příklad chromatogramu, 1, 2, 3 – píky,  $t_M$  – mrtvý čas [16]

Počátečním krokem při identifikaci a kvantifikaci příslušných signálů pro získání informací je detekce a zarovnání píků [71]. Při detekci je důležitý poměr signálu a šumu, protože pouze píky, které mají vysokou hodnotu šumu, jsou označeny za píky, které lze jednoznačně detekovat [72]. Ve vzorcích musí být píky porovnávány, aby bylo možné vypočítat odchylky retenčního času a intenzity iontů [73]. Dalším krokem je extrakce hmotnostních spekter sloučenin. Tento krok snižuje složitost dat identifikací  $m/z$  signálů stejných sloučenin a poskytuje základní informace potřebné pro stručnou charakteristiku metabolitů [71]. Posledním krokem je normalizace dat vedoucí k odstranění významných odchylek při přípravě vzorku [71]. Nutnou součástí je korigování intenzit každého prvku kvůli chemickému driftu. Drift vzniká v důsledku změn signálu, které vznikají při analýze metabolitů [72]. Dalším problémem mohou být chybějící hodnoty v podobě nulové intenzity. Řešením je zvýšená citlivost detekce MS [72].

Poté dochází ke statistické analýze dat. Metabolomická data jsou charakterizována tím, že chybné odchylky nejsou konstantní a rozdíly velikostí koncentrací metabolitů přináší složitost získávání informací ze zpracovávaných dat. Problém mohou řešit různé analýzy, jako je analýza rozptylu (ANOVA) nebo analýza hlavních komponent (PCA), anebo také řada softwarových programů využívající těchto analýz pro statistickou analýzu dat, mezi které patří například DeviumWeb nebo MetaboLyzer [71].

Charakterizace metabolitů je považována za nejnáročnější krok. Strukturální informace jsou obvykle získávány na základě hmotnostních spekter měřených pomocí analyzátorů s vysokou rozlišovací schopností a správností určení  $m/z$  [71].



Interpretaci dat, která je komplikována velikostí a složitostí, napomáhá mapování metabolických drah [71]. Existují různé databáze, ve kterých jsou uvedena různá metadata, analytická data a informace o vyhledávání metabolitů na základě LC/MS spekter [71].

## Závěr

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma metabolomické analýzy biologických vzorků kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií.

V teoretické části práce jsou vysvětleny nejdůležitější pojmy, týkající se metabolomiky, metabolismu a souboru látek (metabolitů) vystupujících složitými drahami z metabolismu. Spojením kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie lze provést vysoce přesnou metabolomickou analýzu širokého počtu metabolitů v živočišných i rostlinných organismech a také v lidských biologických vzorcích. HILIC, jako jedna z možností separace, je stále více populárnější metodou, což je patrné četností používání v rozmanitých vědeckých publikacích. V neposlední řadě jsou vysvětleny ionizační techniky a hmotnostní analyzátory. Mezi nejvýznamnější v rámci metabolomické analýzy LC/MS patří ESI a MALDI ionizační techniky a QqQ, QqTOF, ICR a Orbitrap hmotnostní analyzátory.

Rešeršní část je zaměřena na metabolomické přístupy. Pomocí nich je možné provádět cílené i necílené analýzy v závislosti na tom, je-li definována specifická skupina metabolitů určená k analýze, či nikoliv. Dále je popsána příprava vzorku, která je nedílnou součástí před samotnou analýzou. Příprava vzorku zahrnuje zhášení buněčného metabolismu, extrakci intracelulárních a extracelulárních metabolitů a zakoncentrování vzorku, z nichž nejdůležitější je extrakce metabolitů, neboť tento proces závisí na použití vhodného extrakčního činidla k získání co největšího počtu metabolitů ze vzorku. Uvedeny jsou i konkrétní metabolomické analýzy lidské krve a moči, myších mozků a vinné révy. Výsledná data z analýzy se poté zpracovávají a statisticky analyzují, což je uvedeno v poslední kapitole.

Metabolomika je poměrně mladá věda, jejíž metody, přístupy a strategie se budou i nadále pečlivě studovat a rozšiřovat, což je užitečné v mnoha oblastech výzkumu, vědy, medicíny a dalších oblastech.

## Použitá literatura

- [1] MATSUDA, Fumio. Technical Challenges in Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrometry* [online]. 2016, **5**(2) [vid. 2018-06-24]. ISSN 2187-137X. Dostupné z: doi:10.5702/massspectrometry.S0052
- [2] CHEN, Chi a Sangyub KIM. LC-MS-based Metabolomics of Xenobiotic-induced Toxicities. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 2013, **4** [vid. 2018-06-24]. ISSN 2001-0370. Dostupné z: doi:10.5936/csbj.201301008
- [3] KHOOMRUNG, Sakda, Kwanjeera WANICHTHANARAK, Intawat NOOKAEW, Onusa THAMSERMSANG, Patcharamon SEUBNOOCH, Tawee LAOHAPAND a Pravit AKARASEREENONT. Metabolomics and Integrative Omics for the Development of Thai Traditional Medicine. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, **8** [vid. 2018-05-15]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00474
- [4] GOLDANSAZ, Seyed Ali, An Chi GUO, Tanvir SAJED, Michael A. STEELE, Graham S. PLASTOW a David S. WISHART. Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. *PLoS ONE* [online]. 2017, **12**(5) [vid. 2018-05-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0177675
- [5] PINU, Farhana R., Silas G. VILLAS-BOAS a Raphael AGGIO. Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols. *Metabolites* [online]. 2017, **7**(4) [vid. 2018-05-15]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo7040053
- [6] KRAUS, Virginia Byers, Bruce BURNETT, Javier COINDREAU, Susan COTTRELL, David EYRE, Michael GENDREAU, Jennifer GARDINER, Patrick GARNERO, John HARDIN, Yves HENROTIN, Dick HEINEGÅRD, Amy KO, Stefan LOHMANDER, Gloria MATTHEWS, Joseph MENETSKI, Roland MOSKOWITZ, Stefano PERSIANI, Robin POOLE, Jean Charles ROUSSEAU a Martin TODMAN. Application of Biomarkers in the Development of Drugs Intended for the Treatment of Osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* [online]. 2011, **19**(5), 515–542. ISSN 1063-4584. Dostupné z: doi:10.1016/j.joca.2010.08.019

- [7] ROBERTS, Lee D., Amanda L. SOUZA, Robert E. GERSZTEN a Clary B. CLISH. Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2012, **CHAPTER**, Unit30.2. ISSN 1934-3639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb3002s98
- [8] BILGIN, Tugce a Andreas WAGNER. Design Constraints on a Synthetic Metabolism. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(6) [vid. 2018-05-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0039903
- [9] ALBERICH, Ricardo, José A. CASTRO, Mercè LLABRÉS a Pere PALMER-RODRÍGUEZ. Metabolomics analysis: Finding out metabolic building blocks. *PLoS ONE* [online]. 2017, **12**(5) [vid. 2018-05-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0177031
- [10] MATIAS RODRIGUES, João F a Andreas WAGNER. Genotype networks, innovation, and robustness in sulfur metabolism. *BMC Systems Biology* [online]. 2011, **5**, 39. ISSN 1752-0509. Dostupné z: doi:10.1186/1752-0509-5-39
- [11] *Integrace metabolických drah v organismu. Zdeňka Klusáčková - PDF* [online]. [vid. 2018-07-13]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/43903198-Integrace-metabolickyh-drah-v-organismu-zdenka-klusackova.html>
- [12] BENDER, David A. *Introduction to Nutrition and Metabolism, Fourth Edition*. B.m.: CRC Press, 2007. ISBN 978-1-4200-4313-6.
- [13] PENG, Bo, Hui LI a Xuan-Xian PENG. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein & Cell* [online]. 2015, **6**(9), 628–637. ISSN 1674-800X. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-015-0185-x
- [14] COSKUN, Ozlem. Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul* [online]. 2016, **3**(2), 156–160. ISSN 2536-4553. Dostupné z: doi:10.14744/nci.2016.32757
- [15] *Ústav fyziky a materiálového inženýrství* [online]. [vid. 2018-05-24]. Dostupné z: <http://ufmi.ft.utb.cz/index.php?page=kzm>
- [16] *HPLC* [online]. [vid. 2018-07-13]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

- [17] NAGY, Kornél a Vékey KÁROLY. Chapter 5 - Separation methods. In: Károly VÉKEY, András TELEKES a Akos VERTES, ed. *Medical Applications of Mass Spectrometry* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2008 [vid. 2018-06-19], s. 61–92. ISBN 978-0-444-51980-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451980-1.50007-0
- [18] COOPER, William T. Normal-Phase Liquid Chromatography. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. B.m.: American Cancer Society, 2006 [vid. 2018-06-19]. ISBN 978-0-470-02731-8. Dostupné z: doi:10.1002/9780470027318.a5913
- [19] AGUILAR, Marie-Isabel. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In: *HPLC of Peptides and Proteins* [online]. B.m.: Springer, Totowa, NJ, 2004 [vid. 2018-06-19], Methods in Molecular Biology™, s. 9–22. ISBN 978-1-59259-742-0. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-742-4:9
- [20] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231–247. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5308-5
- [21] WERNISCH, Stefanie a Subramaniam PENNATHUR. Evaluation of coverage, retention patterns and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. 2016, **408**(22), 6079–6091. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-016-9716-4
- [22] KAH SAY, Getu, Huiying SONG, Ann VAN SCHEPDAEL, Deirdre CABOOTER a Erwin ADAMS. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **87**, Review Papers on Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013, 142–154. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2013.04.015
- [23] HAN, Liang a Catherine E. COSTELLO. Mass Spectrometry of Glycans. *Biochemistry. Biokhimiia* [online]. 2013, **78**(7), 710–720. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297913070031
- [24] LUZZATTO-KNAAN, Tal, Alexey V. MELNIK a Pieter C. DORRESTEIN. Mass spectrometry tools and workflows for revealing microbial chemistry. *The Analyst*

[online]. 2015, **140**(15), 4949–4966. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/c5an00171d

[25] *Kapalinová chromatografie v analytické toxikologii Věra Pacáková Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie. - ppt stáhnout* [online]. [vid. 2018-07-13]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/2523025/>

[26] WILM, Matthias. Principles of electrospray ionization. *Molecular & cellular proteomics: MCP* [online]. 2011, **10**(7), M111.009407. ISSN 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M111.009407

[27] BANERJEE, Shibdas a Shyamalava MAZUMDAR. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, **2012** [vid. 2018-06-01]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2012/282574

[28] *Metody strukturní analýzy MS, RTG difrakce. Pavel Matějka - PDF* [online]. [vid. 2018-07-13]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/24243973-Metody-strukturni-analyzy-ms-rtg-difrakce-pavel-matejka.html>

[29] *Electrospray (ESI) and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) - MASONACO - Mass Spectrometry of Natural Compounds* [online]. [vid. 2018-06-01]. Dostupné z: <https://sites.google.com/site/masonaco/Home/mass-spectrometry/sample-introduction-and-ionization/esi-apci>

[30] CLARKE, W. Chapter 1 - Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls. In: *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* [online]. San Diego: Academic Press, 2017 [vid. 2018-06-01], s. 1–15. ISBN 978-0-12-800871-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8

[31] *Atmospheric Pressure Chemical Ionization - MagLab* [online]. [vid. 2018-06-01]. Dostupné z: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/apci>

[32] *Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) - ppt video online download* [online]. [vid. 2018-07-13]. Dostupné z: <https://slideplayer.com/slide/7885464/>

[33] HE, Jun a Shahab A. SHAMSI. Chiral micellar electrokinetic chromatography (CMEKC)-atmospheric pressure photoionization of benzoic derivatives using mixed

molecular micelles. *Electrophoresis* [online]. 2011, **32**(10), 1164–1175. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201000581

[34] *Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) - MagLab* [online]. [vid. 2018-06-03]. Dostupné z: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/appi>

[35] SANGHVI, Raju. LC-MS Instrumentation & Applications. In: [online]. Education. B.m. 03:16:38 UTC [vid. 2018-07-13]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/rajusanghvi1/lcms-instrumentation>

[36] RAFFAELLI, Andrea a Alessandro SABA. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2003, **22**(5), 318–331. ISSN 0277-7037, 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.10060

[37] CHIU, Tai-Chia. Recent Advances in Bacteria Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using Nanomaterials as Affinity Probes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(5), 7266–7280. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15057266

[38] EL-ANEED, Anas, Aljandro COHEN a Joseph BANOUB. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2009, **44**(3), 210–230. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704920902717872

[39] *Mass Spectrometry (Mass Spec.) - ppt video online download* [online]. [vid. 2018-07-13]. Dostupné z: <https://slideplayer.com/slide/10520000/>

[40] WOLLNIK, H. Time-of-flight mass analyzers. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. nedatováno, **12**(2), 89–114. ISSN 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.1280120202

[41] WILEY, W. C. a I. H. MCLAREN. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1955, **26**(12), 1150–1157. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1715212

[42] HOLČAPEK, Michal. *Hmotnostní analyzátory* [online]. 2012. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf)

- [43] HOFFMANN, Edmond de a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [44] *Laserová ablace se hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu LA-ICP-MS - PDF* [online]. [vid. 2018-07-14]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/46200537-Laserova-ablace-se-hmotnostni-spektrometrii-indukcne-vazaneho-plazmatu-la-icp-ms.html>
- [45] HOPFGARTNER, Gérard. Theory and Instrumentation of Mass Spectrometry. In: *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, 2011 [vid. 2018-06-13], s. 255–290. ISBN 978-0-470-92927-8. Dostupné z: doi:10.1002/9780470929278.ch8
- [46] STUPKAR. Hmotnostní Spektroskopie. In: [online]. Technology. B.m. 12:45:37 UTC [vid. 2018-07-14]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/stupkar/hmotnostn-spektroskopie>
- [47] NICOLARDI, Simone, Bogdan BOGDANOV, André M. DEELDER, Magnus PALMBLAD a Yuri E. M. VAN DER BURGT. Developments in FTICR-MS and Its Potential for Body Fluid Signatures. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(11), 27133–27144. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms161126012
- [48] SCIGELOVA, Michaela, Martin HORNSHAW, Anastassios GIANNAKOPOULOS a Alexander MAKAROV. Fourier Transform Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* [online]. 2011, **10**(7) [vid. 2018-06-14]. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M111.009431
- [49] *FT-ICR (Proteomics)* [online]. [vid. 2018-07-14]. Dostupné z: <http://what-when-how.com/proteomics/ft-icr-proteomics/>
- [50] Figure 1. Design of the Orbitrap mass analyzer. 1 – central electrode (... *ResearchGate* [online]. [vid. 2018-07-14]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Design-of-the-Orbitrap-mass-analyzer-1-central-electrode-2-3-two-halves-of-the\\_fig1\\_282430396](https://www.researchgate.net/figure/Design-of-the-Orbitrap-mass-analyzer-1-central-electrode-2-3-two-halves-of-the_fig1_282430396)



- [51] NIKOLSKIY, Igor, Gary SIUZDAK a Gary J. PATTI. Discriminating precursors of common fragments for large-scale metabolite profiling by triple quadrupole mass spectrometry. *Bioinformatics* [online]. 2015, **31**(12), 2017–2023. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btv085
- [52] SPALDING, JonathanL., Kevin CHO, NathanielG. MAHIEU, Igor NIKOLSKIY, ElizabethM. LLUFRIO, Stephen L. JOHNSON a Gary J. PATTI. Bar Coding MS2 Spectra for Metabolite Identification. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, **88**(5), 2538–2542. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b04925
- [53] ANDRA, Syam S., Christine AUSTIN, Dhavalkumar PATEL, Georgia DOLIOS, Mahmoud AWAWDA a Manish ARORA. Trends in the application of high-resolution mass spectrometry for human biomonitoring: An analytical primer to studying the environmental chemical space of the human exposome. *Environment international* [online]. 2017, **100**, 32–61. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2016.11.026
- [54] ZHOU, Bin, Jun Feng XIAO, Leepika TULI a Habtom W. RESSOM. LC-MS-based metabolomics. *Molecular bioSystems* [online]. 2012, **8**(2), 470–481. ISSN 1742-2051. Dostupné z: doi:10.1039/c1mb05350g
- [55] SCHWARZ, Doreen, Isabel ORF, Joachim KOPKA a Martin HAGEMANN. Recent Applications of Metabolomics Toward Cyanobacteria. *Metabolites* [online]. 2013, **3**(1), 72–100. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo3010072
- [56] FIEHN, Oliver. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics* [online]. 2001, **2**(3), 155–168. ISSN 1532-6268. Dostupné z: doi:10.1002/cfg.82
- [57] EVERETT, Jeremy R. A New Paradigm for Known Metabolite Identification in Metabonomics/Metabolomics: Metabolite Identification Efficiency. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 2015, **13**, 131–144. ISSN 2001-0370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2015.01.002
- [58] DONA, Anthony C., Michael KYRIAKIDES, Flora SCOTT, Elizabeth A. SHEPHARD, Dorsa VARSHAVI, Kirill VESELKOV a Jeremy R. EVERETT. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics

experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 2016, **14**, 135–153. ISSN 2001-0370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2016.02.005

[59] LV, Huanhuan, Feng JIANG, Daogang GUAN, Cheng LU, Baosheng GUO, Chileung CHAN, Songlin PENG, Baoqin LIU, Wenwei GUO, Hailong ZHU, Xuegong XU, Aiping LU a Ge ZHANG. Metabolomics and Its Application in the Development of Discovering Biomarkers for Osteoporosis Research. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(12) [vid. 2018-05-18]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17122018

[60] FAN, Teresa W.-M. a Andrew N. LANE. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* [online]. 2016, **92–93**, 18–53. ISSN 0079-6565. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnmrs.2016.01.005

[61] SER, Zheng, Xiaojing LIU, Ngoc Nu TANG a Jason W LOCASALE. Extraction parameters for metabolomics from cell extracts. *Analytical biochemistry* [online]. 2015, **475**, 22–28. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2015.01.003

[62] PINU, Farhana R. a Silas G. VILLAS-BOAS. Extracellular Microbial Metabolomics: The State of the Art. *Metabolites* [online]. 2017, **7**(3) [vid. 2018-05-19]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo7030043

[63] VILLAS-BÔAS, Silas G. Sampling and Sample Preparation. In: *Metabolome Analysis* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, 2006 [vid. 2018-05-20], s. 39–82. ISBN 978-0-470-10551-1. Dostupné z: doi:10.1002/9780470105511.ch3

[64] SCHULTZ, Andrew W., Junhua WANG, Zheng-Jiang ZHU, Caroline H. JOHNSON, Gary J. PATTI a Gary SIUZDAK. Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Characterization of Metabolites Guided by the METLIN Database. *Nature protocols* [online]. 2013, **8**(3), 451–460. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2013.004

[65] MELLON, Fred A., Richard N. BENNETT, Birgit HOLST a Gary WILLIAMSON. Intact Glucosinolate Analysis in Plant Extracts by Programmed Cone Voltage Electrospray LC/MS: Performance and Comparison with LC/MS/MS Methods.

*Analytical Biochemistry* [online]. 2002, **306**(1), 83–91. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.2002.5677

[66] YUAN, Min, Susanne B BREITKOPF, Xuemei YANG a John M ASARA. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nature protocols* [online]. 2012, **7**(5), 872–881. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2012.024

[67] *Lipidomics by ultrahigh performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and its application to complex biological samples* [online]. [vid. 2018-07-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6013032/>

[68] CONTREPOIS, Kévin, Lihua JIANG a Michael SNYDER. Optimized Analytical Procedures for the Untargeted Metabolomic Profiling of Human Urine and Plasma by Combining Hydrophilic Interaction (HILIC) and Reverse-Phase Liquid Chromatography (RPLC)–Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* [online]. 2015, **14**(6), 1684–1695. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M114.046508

[69] IVANISEVIC, Julijana, Adrian EPSTEIN, Michael E. KURCZY, H. Paul BENTON, Winnie URITBOONTHAI, Howard S. FOX, Michael D. BOSKA, Howard E. GENDELMAN a Gary SIUZDAK. Brain Region Mapping using Global Metabolomics. *Chemistry & biology* [online]. 2014, **21**(11), 1575–1584. ISSN 1074-5521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2014.09.016

[70] HOCHBERG, Uri, Asfaw DEGU, David TOUBIANA, Tanya GENDLER, Zoran NIKOLOSKI, Shimon RACHMILEVITCH a Aaron FAIT. Metabolite profiling and network analysis reveal coordinated changes in grapevine water stress response. *BMC Plant Biology* [online]. 2013, **13**, 184. ISSN 1471-2229. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2229-13-184

[71] PEREZ DE SOUZA, Leonardo, Thomas NAAKE, Takayuki TOHGE a Alisdair R FERNIE. From chromatogram to analyte to metabolite. How to pick horses for courses from the massive web resources for mass spectral plant metabolomics.

*GigaScience* [online]. 2017, **6**(7), 1–20. ISSN 2047-217X. Dostupné z: doi:10.1093/gigascience/gix037

[72] GRAHAM, Emma, Jessica LEE, Magda PRICE, Maja TARAILO-GRAOVAC, Allison MATTHEWS, Udo ENGELKE, Jeffrey TANG, Leo A. J. KLUIJTMANS, Ron A. WEVERS, Wyeth W. WASSERMAN, Clara D. M. VAN KARNEBEEK a Sara MOSTAFAVI. Integration of genomics and metabolomics for prioritization of rare disease variants: a 2018 literature review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. 2018, **41**(3), 435–445. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-018-0139-6

[73] SMITH, Colin A., Elizabeth J. WANT, Grace O'MAILLE, Ruben ABAGYAN a Gary SIUZDAK. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* [online]. 2006, **78**(3), 779–787. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac051437y