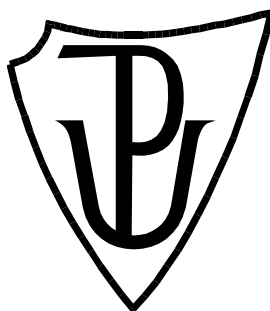


UNIVERZITA PALACKÉHO v OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Analýza metabolomu lidské moči pomocí

GC×GC-TOF

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Marie Zdráhalová**

Studijní program: B1406 Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **RNDr. Jaroslava Jáčová**

Rok: 2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 30. 4. 2014

Děkuji vedoucí mé diplomové práce RNDr. Jaroslavě Jáčové za odborné vedení, ochotu, obětavost, čas, trpělivost, konzultace a mnoho cenných rad při vypracování této práce. Velmi děkuji také prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. a RNDr. Janě Tomkové, Ph.D. za cenné rady a odbornou pomoc při práci. Děkuji také všem pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Olomouci za umožnění realizace experimentální části mé práce. V neposlední řadě děkuji také všem studentům Laboratoře metabolomiky.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Marie Zdráhalová
Název práce	Analýza metabolomu lidské moči pomocí GC×GC-TOF
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	RNDr. Jaroslava Jáčová
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Dvojměrná plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí umožňuje analýzu vysoce komplexních vzorků, mezi které patří i lidská moč. Nezbytnou součástí úspěšné separace jsou vhodně zvolené podmínky, při kterých analýza probíhá. Tyto podmínky se liší nejen pro každý typ vzorku, ale i pro jednotlivé analyty. Předložená práce se zabývá metabolickou analýzou silylovaných metabolitů lidské moči. Optimalizační vzorek moči je analyzován na různých kolonových uspořádáních, které se liší polaritou, tloušťkou vrstvy stacionární fáze a vnitřním průměrem kolon. Porovnávána jsou tato kolonová uspořádání: BPX5/SolGel-WAX, BPX5/SLB-IL59, BPX50/SolGel-WAX, BPX50/BPX5, SolGel-WAX/BPX5, SLB-IL59/BPX50. U jednotlivých setů je hodnocena ortogonalita a na jejím základě je stanoveno nejlepší kolonové uspořádání BPX5/SolGel-WAX. Toto kolonové uspořádání je použito pro analýzu vzorků zdravých dětí a pacientů s glutarovou acidurií.

Klíčová slova	moč, metabolomika, dvojměrná plynová chromatografie, ortogonalita, glutarová acidurie
Počet stran	78
Počet příloh	–
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Marie Zdráhalová
Title	A GC×GC-TOF analysis of the human urine metabolome
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	RNDr. Jaroslava Jáčová
The year of presentation	2014

Abstract

Two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry detection allows us to analyze very complex samples. Appropriate conditions of analysis play a key role in successful separation. For every type of sample and each analyte there are unique conditions. This work is dealing with metabolomic analysis of urine sample. Silylation agent is used for derivatization. Urine sample used for optimization is analyzed by different column sets with varied polarity, width of stationary phase and internal diameter of column. BPX5/SolGel-WAX, BPX5/SLB-IL59, BPX50/SolGel-WAX, BPX50/BPX5, SolGel-WAX/BPX5, SLB-IL59/BPX50 are columns used for analysis in this work and compared. Separation success is characterized by orthogonality. Column combination BPX5/SolGel-WAX was determined as the best. This combination is used for urine sample analysis of healthy children and patients with glutaric aciduria.

Keywords	urine, metabolomics, two-dimensional gaschromatography, orthogonality, glutaric aciduria
Number of pages	78
Number of appendices	–
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Moč.....	10
2.1.1	Ledviny a jejich funkce.....	10
2.1.2	Anatomie ledvin	10
2.1.3	Renální cirkulace.....	11
2.1.4	Definitivní moč	14
2.2	Dědičné metabolické poruchy	15
2.2.1	Organické acidurie	15
2.2.2	Glutarová acidurie.....	16
2.3	Metabolomika.....	17
2.3.1	Metabolismus	17
2.3.2	Metabolomika	18
2.3.3	Analytické přístupy metabolomiky	19
2.4	Plynová chromatografie	20
2.5	Dvojměrná plynová chromatografie spojená s průletovým hmotnostním analyzátozem	23
2.5.1	Dvojměrná plynová chromatografie	23
2.5.2	Volba kolon.....	24
2.5.3	Lineární rychlost plynu	24
2.5.4	Teplotní program.....	25
2.5.5	Modulátor.....	26
2.5.6	Detekce pro dvojměrnou plynovou chromatografii.....	29
2.5.7	Separční prostor.....	31
2.6	Ortogonalita.....	32
2.6.1	Kolonové uspořádání	32

2.7	Prediktivní modelování pro optimalizaci GC×GC	33
2.8	Určení ortogonalitý.....	34
2.8.1	Faktorová analýza	35
2.8.2	Experimentální přístup.....	35
2.8.3	Grafický přístup	36
2.8.4	Informační teorie.....	37
3	Experimentální část.....	42
3.1	Instrumentace	42
3.2	Biologický materiál	44
3.3	Použité chemikálie	44
3.4	Příprava vzorků	44
3.4.1	Příprava vzorku pro optimalizaci.....	44
3.4.2	Příprava patientských vzorků, kontrolních zdravých vzorků a vzorků pro kontrolu kvality	45
3.5	Optimalizace kolonového uspořádání	45
4	Výsledky	47
4.1	Optimalizace kolonového uspořádání	47
4.1.1	Neúspěšné separace.....	47
4.1.2	Úspěšné separace	50
4.2	Glutarové acidurie	63
5	Diskuze	67
6	Závěr	71
7	Literatura.....	73
8	Seznam použitých symbolů a zkratk.....	78

1 ÚVOD

Lidská moč je komplexní a velice různorodá směs malých organických molekul – metabolitů, které se výrazně liší svou koncentrací. Analýza metabolomu lidské moči otevírá cesty k charakterizaci metabolitů, metabolických drah a aktuálních změn, které se v organismu odehrávají. Čím je získaná informace komplexnější, tím větší má výpovědní hodnotu. Vzhledem ke komplexnosti vzorků a rozdílům v koncentracích jednotlivých metabolitů je pro stanovení metabolitů v moči nutná specifická příprava vzorku k analýze následována vhodnou separační technikou a technikou detekce.

Metabolom lidské moči není možné analyzovat jedinou analytickou technikou, protože je příliš komplexní. Obsahuje množství analytů s různou chemickou povahou a v koncentracích, které se mohou lišit i o několik řádů (Almstetter *et al.*, 2012). Tato práce se zaměřuje na analýzu pomocí dvojrozměrné plynové chromatografie v kombinaci s průletovým hmotnostním analyzátozem (GC×GC-TOF).

Způsob přípravy vzorku určuje, které analyty lze ve vzorku detekovat a identifikovat. Stejně důležité jako příprava vzorku jsou i podmínky, při kterých analýza probíhá. Z tohoto důvodu se práce zaměřuje na optimalizaci kolonového uspořádání a podmínky separace u GC×GC-TOF pro analýzu metabolomu lidské moči.

V předložené práci zahrnuje příprava vzorku extrakci do etylacetátu a následnou derivatizaci, která umožňuje zplynění vzorku a jeho následnou analýzu. Pro derivatizaci byla použita silylace.

Optimalizační vzorek je analyzován na několika kolonových uspořádáních normálního typu, kdy pro první dimenzi je použita kolona s nižší polaritou, než na sekundární koloně (BPX5/SolGel-WAX, BPX5/SLB-IL59, BPX50/SolGel-WAX). Dále je testováno několik reverzních uspořádání (BPX50/BPX5, SolGel-WAX/BPX5, SLB-IL59/BPX50). Pokud je separace na daném setu úspěšná, je provedena ještě optimalizace vnitřního průměru a tloušťky stacionární fáze sekundární kolony. Práce se zaměřuje na porovnání separační účinnosti těchto kolonových uspořádání.

Separací účinnost je hodnocena na základě teorie podmíněné entropie, která popisuje pokrytí separačního prostoru a korelaci mezi retenčními daty.

Cílem práce je výběr nejlepšího kolonového uspořádání, které umožňuje komplexní analýzu metabolomu lidské moči pomocí dvojrozměrné plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

Toto kolonové uspořádání je následně použito pro analýzu vzorků zdravých dětí a pacientů s glutarovou acidurií.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Moč

2.1.1 Ledviny a jejich funkce

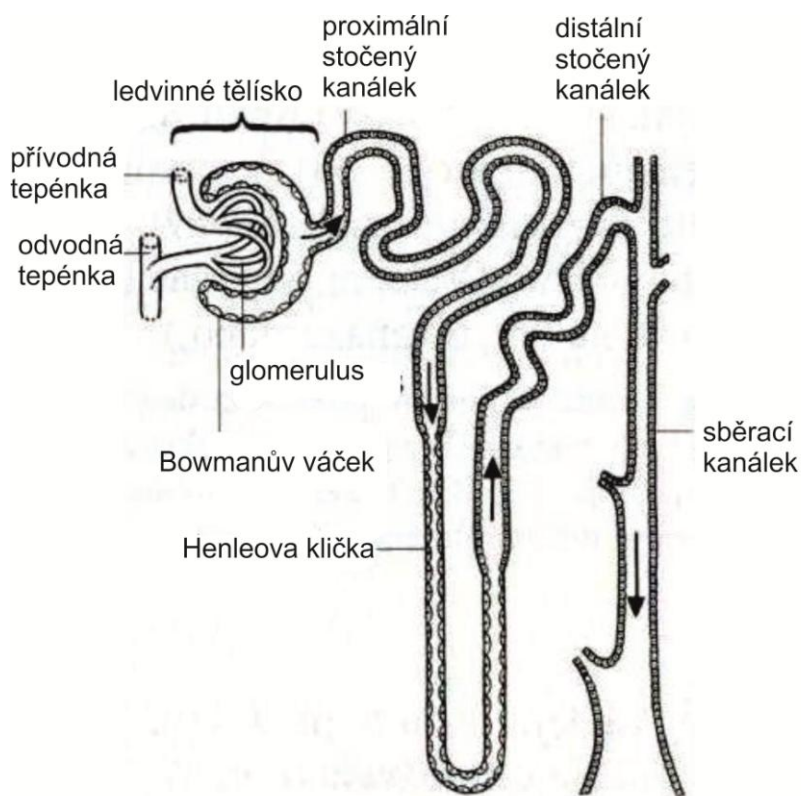
Ledviny se významným způsobem podílí na udržení homeostázy organismu (regulují osmolaritu a objem tělesných tekutin, acidobazickou a elektrolytickou rovnováhu, udržují stálou koncentraci těchto látek v extracelulární tekutině a mají vliv na produkci a sekreci hormonů; Kittnar *et al.*, 2011). Úkolem ledvin je vylučování těch látek, které v dané chvíli rovnováhu vnitřního prostředí nějakým způsobem narušují. Jedná se především o nevyužitelné zbytky metabolismu, látky pro organismus potřebné, ale v danou chvíli nadbytečné, cizorodé látky a nosiče vylučovaných látek. Ledviny odstraňují tyto látky rychlostí úměrnou jejich tvorbě tak, aby se v těle nehromadily (Trojan *et al.*, 1996).

2.1.2 Anatomie ledvin

Vylučovací soustava člověka je tvořena dvěma ledvinami, na které navazují močovody ústící do močového měchýře. Z něj pak vychází močová trubice (Kittnar *et al.*, 2011).

Ledviny jsou tmavě červené orgány, dlouhé asi 12 cm, široké 6 cm, na tloušťku mají přibližně 3 cm. Mají fazolovitý tvar. Jako jedny z mála břišních orgánů nejsou uloženy přímo v dutině břišní, ale až za ní, v tzv. retroperitoneální oblasti, po obou stranách bederní páteře. Toto uložení je výhodné z hlediska jejich mechanické ochrany, termostability a zároveň pro svou blízkost hlavního přívodu krve – abdominální aorty (Trojan *et al.*, 1996).

Základní funkční jednotkou ledvin jsou nefrony (Malpighiho tělíska). Jsou tvořeny klubičkem vlásečnic, které obaluje Bowmanovo pouzdro (Obr. 1). Jejich úkolem je filtrace plasmy. Ultrafiltrát pak přechází do tubulární části nefronů, ve které se tvoří definitivní moč. Sběracími kanálky je definitivní moč odváděna nejprve do ledvinových kalichů a odtud do ledvinové pánvičky, která přechází v močovod (Kittnar *et al.*, 2011).



Obr. 1 Nefron (upraveno podle Novotný a Hruška, 2008)

2.1.3 Renální cirkulace

Aby ledviny mohly dobře plnit svou funkci, musí být bohatě prokrveny. Ledvinami prochází asi čtvrtina klidového objemu krve pumpovaného srdcem, což je přibližně $1250 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (Trojan *et al.*, 1996).

Krev je do ledvin přiváděna renálními tepnami, odstupujícími z břišní aorty. Renální tepny se postupně větví až na arterioly. Každá arteriola se větví v hojně kapilární kličky, které vytvářejí klubičko uvnitř glomerulu (Ganong, 2005).

Z ledviny je krev odváděna renální žílou, která spojuje ledvinu s dolní dutou žílou. Renální žíla i renální tepna je obvykle jedna na každou ledvinu (Trojan *et al.*, 1996).

2.1.3.1 Glomerulární filtrace

Glomerulus vlásečnic zajišťuje kontakt extracelulární tekutiny (plasmy) s renálním parenchymem. Dochází zde ke glomerulární filtraci. Celková kontaktní plocha při 2 milionech glomerulů v obou ledvinách je asi $0,8\text{--}1,5 \text{ m}^2$, což přibližně odpovídá povrchu celého těla (Trojan *et al.*, 1996).

Stěny glomerulárních kapilár jsou tvořeny fenestrovaným endotelem, který je propustný pro všechny rozpuštěné složky plasmy, ale nepropustný pro erytrocyty a ostatní krevní tělíska. Stěny kapilár mají vysokou permeabilitu, asi 50x vyšší než stěny kapilár v kosterním svalu. Na fenestrovaný endotel kapilár navazuje bazální membrána zachycující všechny makromolekuly po globuliny a fibrinogen (Kittnar *et al.*, 2011).

Filtrační membrána glomerulů je záporně nabitá a tím diferencuje průchod různě nabitých částic. Bílkoviny a ostatní záporně nabitě částice jsou odpuzovány, zatímco neutrální nebo kladně nabitě částice prochází přes membránu mnohem snadněji.

Při glomerulární filtraci dochází k ultrafiltraci krevní plasmy, a vzniká primární moč (Trojan *et al.*, 1996). Jedná se o filtraci skrz polopropustnou membránu působením vyššího tlaku, než je pouhý tlak tekutiny. Vyšší tlak je dán zejména:

- Charakteristickým uspořádáním přívodné a odvodné cévy glomerulu (Vokurka *et al.*, 2005): přívodná tepénka je krátká, odvodná je dlouhá a má menší průsvit.
- Onkotickým tlakem – osmotickým tlakem způsobeným bílkovinami. Tekutina opouští kapiláru, bílkoviny však přes membránu projít nemohou. Osmotický tlak ultrafiltrátu, vzniklého v Bowmanově pouzdře je téměř nulový (Kittnar *et al.*, 2011).

Celkový objem plasmy v organismu je přibližně 2,75 litrů. Ledvinový průtok plasmy je asi $625 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, z něj vzniká 125 ml ultrafiltrátu za minutu, to znamená 7500 ml za hodinu a 180 litrů za den. Část, která se z plasmy přefiltruje, se nazývá filtrační frakce. Velikost glomerulární filtrace je určena průtokem krve ledvinami, ostatní hodnoty tlaku jsou v podstatě konstantní (Kittnar *et al.*, 2011).

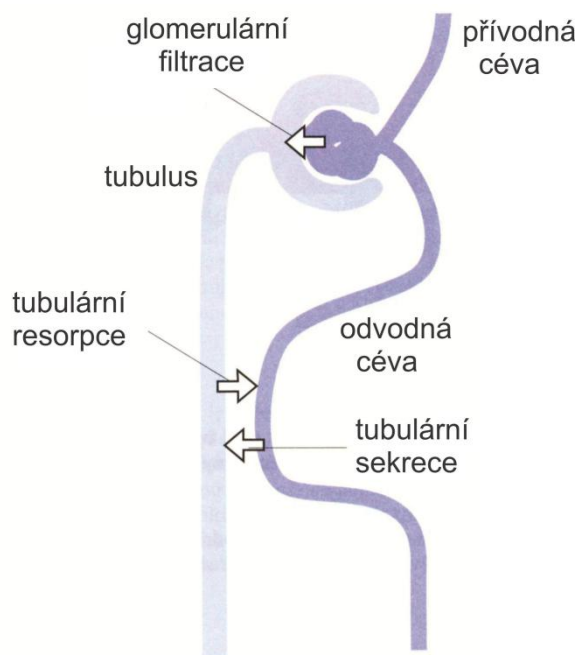
Pro stanovení velikosti glomerulární filtrace se používají takové látky, které se do moči dostávají výhradně touto cestou a nejsou během tubulárních procesů vstřebávány zpět do organismu. Ideální látkou pro stanovení glomerulární filtrace je inulin. Nevýhodou použití tohoto polysacharidu je jeho exogenní původ a pro stanovení je nutné zajistit jeho stálou koncentraci v organismu dlouhodobou infuzí (Racek *et al.*, 2006).

V klinické praxi se pro stanovení účinnosti glomerulární filtrace používá clearance kreatininu (Racek *et al.*, 2006).

Kreatinin je v organismu obsažen hlavně ve svalech jako konečný produkt metabolismu kreatinu a kreatinfosfátu. Denně je na kreatinin přeměněno asi 1–2 % kreatinu; kreatinin je pak jako odpadní látka vylučován ledvinami, kde je beze zbytku odfiltrován glomerulární filtrací, a v ideálním případě nepodléhá tubulárním procesům. Při normální tělesné zátěži odpovídá množství vyloučeného kreatininu množství přefiltrovanému při glomerulární filtraci. Výhodou tohoto stanovení je endogenní původ kreatininu v organismu (nemusí se zavádět infúzí) a časová i finanční nenáročnost (Racek *et al.*, 2006).

2.1.3.2 Tubuly a tubulární procesy

Primární nebo též primitivní moč přechází do tubulů, kde podléhá dvěma procesům Obr. 1(Obr. 2). Procesem tubulární resorpce dochází k resorpci různých potřebných látek, naopak při tubulární exkreci jsou do tubulární tekutiny secernovány další látky (Trojan *et al.*, 1996). Kombinací těchto procesů s glomerulární filtrací jsou získány čtyři možnosti vyloučení dané látky.



Obr. 2 Ledviny: schéma glomerulární filtrace a tubulárních procesů (Kittnar *et al.*, 2011)

- Glomerulární filtrace – látka podléhá jen glomerulární filtraci. Množství přefiltrované látky je stejné v primární i definitivní moči. Tyto látky proto mohou sloužit jako indikátory pro stanovení velikosti glomerulární filtrace (inulin, endogenní kreatinin).
- Glomerulární filtrace a tubulární exkrece – látka podléhá glomerulární filtraci a navíc je do tubulů vylučována buňkami, které jsou schopné odebírat tuto látku z krve v okolí tubulů a následně ji transportovat do tubulární tekutiny. V definitivní moči je tak obsaženo více dané látky, než bylo v primární moči vzniklé glomerulární filtrací (např.: kyselina para-aminohippuronová).
- Glomerulární filtrace a tubulární resorpce – látka podléhá glomerulární filtraci, ale poté je absorbována zpět do peritubulární krve. V definitivní moči se vyskytuje v menším množství než v primární moči (např. močovina), popřípadě se v moči vůbec nevyskytuje (tzv. prahové látky, např. glukóza).
- Tubulární exkrece – látka, vzniká až v renálním parenchymu, není obsažena v krvi. Do moči se dostává jen tubulární exkrecí (např. amoniak).

Tubulární transport probíhá buď pasivně difúzí (podle elektrochemického gradientu) nebo aktivně. Aktivní transport probíhá za účasti enzymů (proti směru gradientu nebo při jeho rovnováze). Jedinou molekulou transportovanou vždy pasivně je voda (Kittnar *et al.*, 2011).

Během tubulárních procesů dochází k resorpci zejména iontů jako Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- a exkreci glukosy, aminokyselin, močoviny, laktátu, fosfátu a také mnoha endogenních látek (žlučové soli, adrenalin) i látek exogenního původu (cizorodé látky, léky, penicilin, morfin; Kittnar *et al.*, 2011).

2.1.4 Definitivní moč

Moč odchází z tubulárního systému ledvinovými papilami do ledvinových kalichů, odtud do ledvinových pánviček. Na ty dále navazují močovody, ústící do močového měchýře, ve kterém je moč skladována a reflexně odstraňována z těla močovou trubicí (Kittnar *et al.*, 2011).

Moč má podobné kvalitativní složení jako krevní plasma; liší se jen koncentrací jednotlivých látek a absencí proteinů. Výjimkou je albumin, jehož fyziologická hladina

v moči nepřesahuje 0,2 % jeho plasmatické koncentrace. Zvýšené množství této látky tedy může poukázat na poškození glomerulárního filtru (Trojan *et al.*, 1996).

Čerstvá moč je čirá, zlatožlutá tekutina se slabě aromatickým zápachem, který se kontaktem se vzduchem mění na čpavkový, kvůli amoniakálnímu kvašení močoviny. Normální moč je slabě kyselá, pH moči závisí na stavu acidobazické rovnováhy a složení potravy. Hustota moči je 1001–1035 kg·m³ (Kittnar *et al.*, 2011).

Moč obsahuje velké množství látek různé chemické povahy (3079; Bouatra *et al.*, 2013), proto je její komplexní analýza velmi obtížná.

2.2 Dědičné metabolické poruchy

Dědičné metabolické poruchy jsou velice různorodou skupinou několika set onemocnění. Jejich společnou charakteristikou jsou enzymatické anomálie v metabolismu, s autosomálně recesivní, popřípadě gonosomálně dominantní i recesivní dědičností. Mutací v jaderném nebo mitochondriálním genomu vzniká dysfunkční protein, který nedokáže efektivně přeměňovat substrát na produkt. Tyto substráty jsou buď přeměněny alternativními cestami, nebo se v organismu hromadí a působí toxicky (Racek *et al.*, 2006).

Tato onemocnění jsou diagnostikována z plasmasy nebo moči, potvrzují se geneticky (Hoffmann *et al.*, 2006). Dědičné metabolické poruchy je možné rozdělit do tří skupin:

- poruchy intermediálního metabolismu (deficit enzymů metabolismu aminokyselin, peptidů, mastných kyselin, sacharidů, mitochondriálního metabolismu)
- poruchy biosyntézy a degradace komplexních molekul (metabolismus izoprenoidů, sterolů, purinů a pyrimidinů, lysozomální a peroxizomální onemocnění)
- poruchy neurotransmiterů a jim příbuzné poruchy (Hoffmann *et al.*, 2006).

2.2.1 Organické acidurie

Organické acidurie patří mezi dědičné poruchy, které mají jednu společnou charakteristiku: vylučování organických kyselin do moči. Organické kyseliny se v těle hromadí zejména při poruše metabolismu aminokyselin, mastných kyselin a sacharidů. Obvykle se jedná o deficity enzymů CoA-aktivovaných karboxylových kyselin

v mitochondriálním metabolismu. Do skupiny organických acidurií se řadí také poruchy metabolismu biotinu a kofaktoru mitochondriálních karboxylas.

Organické acidurie jsou obvykle diagnostikovány z moči, ve které jsou patologicky přítomny nepřeměněné nebo alternativní cestou přeměněné substráty dysfunkčních enzymů, obvykle organické kyseliny. Pro diagnostiku je používána metoda plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Dále se organické acidurie (glutarová acidurie typ I a isovalerová acidurie) diagnostikují ze suché krevní skvrny v rámci celoplošného novorozeneckého screeningu.

Organických acidurií je mnoho, mezi nejrozšířenější patří methylmalonová acidurie, propionová acidurie, isovalerová acidurie, leucínosa, glutarová acidurie a mnoho dalších (Hoffmann *et al.*, 2006).

2.2.2 Glutarová acidurie

Existují tři typy glutarových acidurií. Jejich společnou charakteristikou je to, že se porucha metabolické dráhy projeví zvýšením hladiny glutarátu nebo jeho derivátů.

Glutarová acidurie typ I je nejčastější. Glutarová acidurie typ II (GA II) souvisí se vstřebáváním proteinů a lipidů v organismu, je způsobena mnohočetným deficitem acyl-CoA dehydrogenas. Glutarová acidurie typ III (GA III) je velmi vzácnou peroxisomální poruchou.

2.2.2.1 Glutarová acidurie typ I

Glutarová acidurie typu I (GA I) je autosomálně recesivní onemocnění způsobené dědičnou deficiencí glutaryl-CoA dehydrogenasy (GCDH; *EC 1.3.99.7*). Gen GCDH má 7 tisíc párů bazí a je tvořen 11 exony (Biery *et al.*, 1996). Je lokalizován na chromozomu 19p13.2 a kóduje flavin adenin dinukleotid-dependentní protein matrix mitochondrií, který se podílí na degradativním metabolismu L-lysinu, L-hydroxylysinu a L-tryptofanu. Enzym GCDH katalyzuje oxidativní dekarboxylaci glutaryl CoA na krotonoyl-CoA (Greenberg *et al.*, 1995; Fu *et al.*, 2004).

Výsledkem mutace v genu GCDH je produkce defektního enzymu a tedy neschopnost organismu zpracovávat aminokyseliny lysin a tryptofan. Je známo více než 200 mutací způsobujících toto onemocnění (Zschocke *et al.*, 2000).

Dochází k akumulaci zejména kyseliny glutarové, 3-hydroxyglutarátu (diagnostika pomocí plynové chromatografie), glutaryl-karnitinu (diagnostika pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie) a méně často také kyseliny glutakonové (Gordon, 2006). Tyto látky je možné detekovat v tělních tekutinách: moči, plasmě a cerebrospinální tekutině pomocí plynové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (Baric *et al.* 1999; Chace *et al.*, 2003).

U pacientů s glutarovou acidurií jsou z moči stanovovány následující metabolity: glutarát, 3-hydroxyglutarát, 3-hydroxybutyrát, acylkarnitiny a ketony.

Z biochemického hlediska je možné rozdělit pacienty do dvou skupin, podle toho, jestli secernují dané metabolity do moči v malém či velkém množství (Baric *et al.*, 1999). U obou skupin jsou patologické projevy stejně závažné (Christensen *et al.* 2004).

Z glutarových acidurií je GA I nejrozšířenějším typem. Odhadované rozšíření tohoto onemocnění je asi 1:100 000 novorozenců (Lindner *et al.*, 2004). Dítě vypadá zdravě, dokud neprodělá metabolickou krizi, obvykle v prvních měsících života. Neléčená GA I vede k opožděnému vývoji, hypotonii a makrocefalii s atrofií mozku, začínající už v prenatálním období. Dalším projevem jsou svalové křeče a poruchy pohybu (Hoffmann *et al.*, 1991; Kyllerman *et al.*, 1994; Heringer *et al.*, 2010).

Hlavním principem léčby je redukce produkce kyseliny glutarové a 3-hydroxyglutarátu, omezením příjmu proteinů obsahujících lysin a tryptofan a doplňováním karnitinu.

2.3 Metabolomika

2.3.1 Metabolismus

Metabolismus je souhrnem všech reakcí v živém organismu. Každý živý organismus se potřebuje adaptovat na vnější prostředí a zároveň si udržet stálé vnitřní prostředí. Jedná se o dynamický proces, kdy jsou metabolity neustále tvořeny, přeměňovány a degradovány nebo vylučovány organismem, a tak je třeba neustále přijímat nové látky (Musilová a Glatz, 2011; Almstetter *et al.*, 2012). To, jakou rychlostí jednotlivé reakce probíhají, je ovlivněno zejména koncentrací reagujících látek, velikostí aktivační energie, teplotou, pH, přítomností katalyzátorů (enzymů) a jejich vlastnostmi (kompetice, množství substrátu, množství enzymu; Kittnar *et al.*, 2011).

Primárním úkolem těchto reakcí je vytvoření energie nezbytné pro život a fungování organismu (Kittnar *et al.*, 2011).

2.3.2 Metabolomika

Jakákoli vnější nebo vnitřní změna vyvolá reakci organismu. Tato odpověď probíhá na několika úrovních: dochází k transkripci genů, tvorbě odpovídajících proteinů, ale také k okamžitým změnám koncentrace malých organických molekul – metabolitů. Jejich odpověď je rychlá a na rozdíl od genomu, transkriptomu nebo proteomu odráží aktuální stav buňky.

Aktuální stav organismu je ovlivněn řadou faktorů vnějších (prostředí, fyzická aktivita, léčba, stres) i vnitřních (věk, vrozené dispozice, zdravotní stav). Metabolom člověka je oproti genomu a proteomu několikanásobně menší ale aktuální (asi 20 687 genů, 1 000 000 proteinů, 2 500 metabolitů; Pennisi, 2012).

Analýza metabolomu – metabolomika otevírá dveře k poznání jednotlivých metabolických drah, jejich funkcí, vlastností a také poruch. To umožňuje detekci potenciálních biomarkerů a metabolických odchylek v brzkém stádiu infekce. Metabolom je tvořen mnoha různými skupinami nízkomolekulárních látek s různými chemickými vlastnostmi, v koncentracích, které se mohou lišit i o několik řádů (například několik signálních molekul v řádech $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a naproti tomu glukosa je v plasmatické koncentraci 700–1 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$; Koek *et al.*, 2008). Komplexní analýza metabolomu není dosud v praxi realizovatelná. Pro jednotlivé oblasti metabolomu jsou vyvinuty různé přístupy a je používáno množství analytických technik, neboť není možné vystačit si jen s jednou z nich (Almstetter *et al.*, 2012).

Rychlá a komplexní analýza vzorků bez nutné identifikace a kvantifikace jednotlivých metabolitů se označuje jako „metabolic fingerprinting“ a „metabolic footprinting.“ Nepodává informaci o tom, co se v příslušném vzorku nachází, ale ukazuje jen jeho metabolický profil. „Fingerprinting“ podává informace o metabolitech uvnitř buňky (endometabolom). „Footprinting“ informuje o extracelulárních metabolitech (exometabolom). Daný profil je specifický pro konkrétní typ tkáně nebo pro druh organismu. Umožňuje například rychlé určení přítomnosti patogena (Musilová a Glatz, 2011).

Metabolické profilování („metabolic profiling“) informuje o identitě a částečně i kvantitě analytů. Zaměřuje se na skupinu analytů, která má podobné chemické vlastnosti (např. sacharidy) nebo náleží ke konkrétní metabolické dráze.

V případě, že je vyžadována kvalitativní i kvantitativní analýza několika málo konkrétních metabolitů, jedná se o cílenou analýzu metabolitů („metabolic target analysis“). Před touto analýzou je obvykle nutná separace vybraných analytů od ostatních.

Zvláštním odvětvím metabolomiky je metabonomika. Neinformuje jen o metabolitech a metabolismu, ale její snahou je informovat o dynamických změnách v organismu. Používá se zejména ke sledování metabolické odpovědi na podávání léčiv či přítomnost toxické látky (Dunn a Ellis, 2005).

Novým odvětvím je také fluxomika. Vychází z experimentálních dat a stechiometrických modelů a na jejich základě se snaží odhadnout rychlost metabolických reakcí v celém biologickém systému (Winter a Krömer, 2013).

2.3.3 Analytické přístupy metabolomiky

To, jaká metoda je pro stanovení analytů použita, závisí na materiálu, který je zpracováván, na jeho množství a na tom, jaké jsou cíle analýzy (Musilová a Glatz, 2011). Pro metabolomické analýzy jsou nejčastěji používány metody nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS) s přímým nástřikem, v mnohem menší míře pak infračervená spektroskopie, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, nebo Ramanova spektrometrie.

Vzhledem ke komplexnosti vzorku je výhodné vzorek nejprve separovat a až poté detekovat jednotlivé analyty. Pro metabolomiku je typická separace pomocí plynové chromatografie (GC), kapalinové chromatografie (LC) a kapilární elektroforézy (CE), v kombinaci zejména s MS, která je v podstatě další separační metodou. Metody GC se používají zejména pro nepolární, LC a CE pro středně polární a polární metabolity. Pro všechna stanovení je důležitá vysoká citlivost, reprodukovatelnost měření i přípravy vzorku (Villas-Boas *et al.*, 2007).

2.3.3.1 Příprava vzorku

Proces přípravy vzorku pro metabolickou analýzu je poměrně náročný z několika důvodů. Aby analýza odrážela reálný stav organismu, je nutné co nejrychlejší zpracování vzorku. Toto je limitujícím faktorem všech následujících stanovení, protože i malé změny v metabolismu mohou poukazovat na významné změny v organismu a čím později analýza probíhá, tím méně odráží reálný stav. Dále je třeba, aby veškeré kroky, které vedou ke stanovení, nerušily stanovení ostatních metabolitů (Villas- Boas *et al.*, 2007).

U analýzy tělních tekutin (např. moč, krev, sputum, cerebrospinální tekutina...) je nutné zbavit se látek, které by jinak rušily stanovení (solí, proteiny, popř. lipidy nebo metabolity v příliš vysoké koncentraci). Obvyklá je extrakce metabolitů do vhodného rozpouštědla. Tím se pro následnou analýzu získá jen určitá „omezená“ skupina látek s podobnými vlastnostmi (Almstetter *et al.*, 2012). Mezi běžná extrakční činidla patří hexan, chloroform, dichloromethan, ethylacetát, acetonitril, alkoholy, acetát a voda (uvedeno podle rostoucí polarity).

Extrakčními procesy většinou dochází k naředění metabolitů. Dalším krokem přípravy vzorku je proto jeho zakoncentrování. Nejjednodušší je odpaření rozpouštědla za podmínek, kdy nedochází k další degradaci nebo interakci metabolitů, nejčastěji lyofilizací nebo odfoukáním pod inertní atmosférou. Následuje případná úprava vzorku (např. derivatizace) pro stanovení příslušnou technikou (Musilová a Glatz, 2011).

2.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie patří mezi separační metody na principu rozdělování látek mezi dvě fáze – kapalnou a plynnou. Po nástřiku vzorku na kolonu jsou analyty unášeny mobilní fází a současně interagují se stacionární fází. Dochází k mnohonásobnému ustavení rozdělovací rovnováhy mezi obě fáze. Distribuci látky x mezi mobilní a stacionární fází popisuje distribuční konstanta K_D :

$$K_D = \frac{x_s}{x_m}$$

kde x_s a x_m jsou molární koncentrace látky x v příslušné fázi. Čím vyšší je hodnota K_D , tím více je separovaná látka zadržována stacionární fází a eluuje se později. Mají-li dvě

látky stejnou hodnotu K_D , nebudou separovány. Hodnota K_D se pro tutéž látku mění podle použité mobilní a stacionární fáze (Opekar *et al.*, 2007).

Data, která popisují chromatografickou separaci a konkrétní analyty jsou:

- Retenční čas t_R , který udává dobu od nástřiku vzorku po detekci příslušného analytu v koncentračním maximu (Grob, 2004).
- Mrtvý čas t_M představuje dobu od nástřiku vzorku po maximální eluci takové látky, která není na koloně zadržována (Opekar *et al.*, 2007).
- Šířka chromatografického píku w se obvykle měří při základní linii mezi tečnami vzestupné a sestupné části píku ($w_{4\sigma}$). Šířku píku je možné měřit také například v 10 % výšky píku ($w_{10\%}$; Zhu *et al.*, 2006) v polovině výšky (w_h) popřípadě v inflexi (2σ , která pro ideální gausovský pik odpovídá 0,607 násobku výšky). Obvykle se šířka piků udává v jednotkách času (Opekar *et al.*, 2007).
- Výška h je vzdáleností mezi základní linií a nejvyšším bodem píku ve směru kolmém na časovou osu (Opekar *et al.*, 2007).
- Plocha A představuje plochu píku od jeho základny (Grob R., 2004).
- Píková kapacita udává množství látek (píků), které je daná kolona schopna rozdělit v rámci jedné analýzy (Harvey, 2000). Dá se vypočítat jako podíl celkového času separace a průměrné šířky píku při 4σ . Píková kapacita je silně závislá na výběru kolony, vlastnostech analytů, teplotě, rozměrech kolony, průtokové rychlosti, separační účinnosti a využití retenčního prostoru.

Analýza pomocí plynové chromatografie je vhodná zejména pro těkavé látky, a látky, které je možné chemickou úpravou, tzv. derivatizací, převést do plynného stavu. Plynný nebo kapalný vzorek se nastříkuje do injektoru. Vlivem vysoké teploty dochází ke zplynění vzorku, a ten je pak proudem nosného plynu unášen kolonou (Fowles, 1995).

K nástřiku vzorku existuje několik možných typů dávkovacích zařízení, s ohledem na charakter a množství vzorku.

- Injektor s děličem toku („split injection“) se obvykle používá v případě vysoce koncentrovaných analytů, protože kapilární kolony dokáží separovat jen velmi omezené množství vzorku. Pomocí děliče toku se část vzorku odpouští do atmosféry a na kolonu se dostává jen definovaný zlomek

původního nastříknutého množství, obvykle do 10 % (Jennings W *et al.*, 1997).

- Injektor bez děliče toku („splitless injection“) se využívá v případě málo koncentrovaných vzorků a při stopové analýze. Proudem nosného plynu je po zplynění do kolony unášen celý objem vzorku (Jennings W *et al.*, 1997).
- Injektor s teplotně programovaným nástřikem (PTV) se používá k zakoncentrování analytů v nástřikovém prostoru. V injektoru se postupně zvyšuje teplota. Rozpouštědla s nižší teplotou varu se proto vypařují nejdříve, splitem jsou odfouknuty a nevstupují na kolonu (Jennings W *et al.*, 1997).
- Dávkování vzorku na kolonu („on-column injection“) je vhodné zejména pro stanovení termolabilních analytů a pro přesnou kvantitativní analýzu. Kapalný vzorek je bez přehřátí a smíchání s nosným plynem nanášen přímo na kolonu (Fowles, 1995).

Teplota v injektoru by měla být dostatečně vysoká na to, aby byly na kolonu nanесeny všechny látky, zároveň nesmí být příliš vysoká, aby nedocházelo k jejich rozpadu. Obvykle je teplota injektoru nastavována asi o 50 °C výš než teplota varu vzorku.

Nastříknutý vzorek je proudem nosného plynu unášen kolonou. Pro GC analýzu jsou používány kolony tvořené nejčastěji křemennou kapilárou, potaženou vrstvou polyimidu (pro větší mechanickou odolnost) a na vnitřní straně kapiláry je ukotvena vrstva stacionární fáze (pevná látka nebo kapalina). Výhodou kapilárních kolon je jejich vysoká separační účinnost, nevýhodou malá zatížitelnost, proto se nastříkuje velmi malé množství vzorku (do 1 µl).

Pro separaci se využívají kapilární kolony z křemene, skla, kovu nebo plastu (polyamid, polyester, teflon; Sommer, 2000).

Volba kolony pro plynovou chromatografii závisí na chemické povaze látek, které je třeba separovat a na povaze vzorku, zejména složitosti matrice. Pro nepolární látky se často používají nepolární kolony, např. polymethylsiloxanové DB-1, HP-1, BPX-1, atd. Mezi polární kolony patří například polyethylenglykolové kolony DB-Wax, HP-FFAP. Pro vzorky s bohatou matricí se používají kolony o větší tloušťce stacionární fáze, které se vyznačují vyšší zatížitelností.

Kolona pro plynovou chromatografii je obvykle dlouhá 30 m. Pro separaci chemicky podobných látek se používají delší kolony, až stometrové.

Velký vliv na úspěšnost separace a délku analýzy mají také lineární rychlost plynu a teplotní program. Chromatografická analýza může být izotermální, ale velmi často je využíván teplotní program a teplota s časem vzrůstá. Programování teploty je výhodné zejména pro vzorky s širokým rozmezím teploty varu jednotlivých analytů (McNair a Miller, 1997).

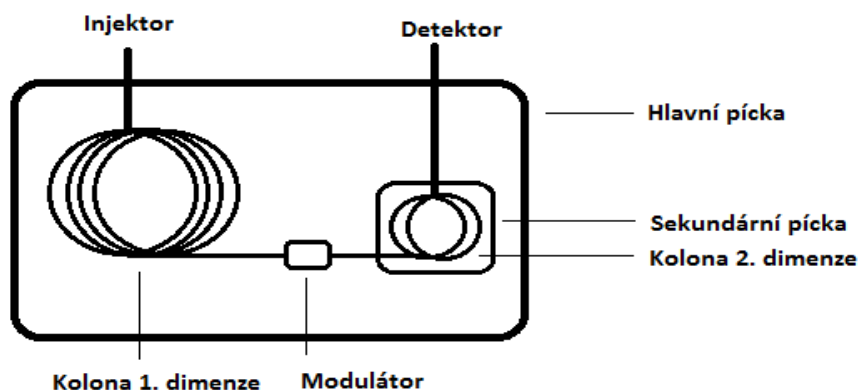
Látky separované v chromatografické koloně mohou být detekovány pomocí následujících detektorů: plamenoionizační detektor, tepelněvodivostní detektor, detektor elektronového záchytu.

Běžně používané je také spojení s hmotnostní spektrometrií. MS má tu výhodu, že umožňuje určit strukturu látky.

2.5 Dvojměrná plynová chromatografie spojená s průletovým hmotnostním analyzátozem

2.5.1 Dvojměrná plynová chromatografie

Snahou dvojměrné plynové chromatografie (GCxGC) je spojit dvě nezávislé chromatografické separace do jedné (Obr. 3). Tím je dosaženo vyšší separační účinnosti i citlivosti. Poté, co je vzorek nastříknut a separován na primární koloně, je zastaven modulátorem, který jeho úzké frakce v pravidelných intervalech nastříkuje do sekundární kolony. Modulační perioda udává, jak často je frakce z primární kolony nastříknuta na sekundární kolonu. V ideálním případě probíhá separace na první koloně zcela odlišným mechanismem, než na druhé koloně (Lewis, 2002).



Obr. 3 Schéma dvojrozměrné plynové chromatografie

2.5.2 Volba kolon

Při separaci hraje velmi důležitou roli správný výběr kolon s ohledem na složení a tloušťku stacionární fáze, délku kolony a její vnitřní průměr (Zu, 2009).

Typická kolona první dimenze je dlouhá 15–30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm a šířkou filmu 0,25-1,0 μm . Separace na druhé koloně má být rychlá a časově kratší než modulační perioda, aby nedocházelo k tomu, že na detektor přicházejí současně analyty ze dvou modulačních period (tzv. „wrap-around efekt“). Proto se obvykle pro druhou dimenzi používají kratší kolony (0,5–1,5 m) s menším vnitřním průměrem (0,1–0,25 mm) a menší šířkou stacionární fáze 0,1–0,25 μm (Mostafa *et al.*, 2012).

Aby byl separační proces ortogonální, musí být rozdělení látek v první a druhé dimenzi způsobeno jiným separačním mechanismem (Mostafa *et al.*, 2012).

2.5.3 Lineární rychlost plynu

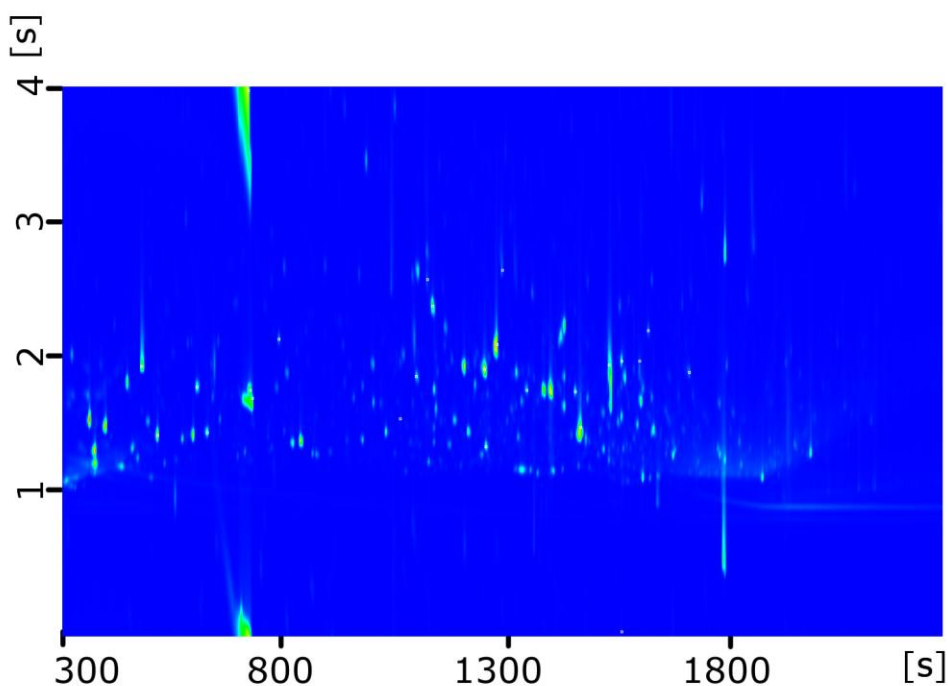
Lineární rychlost plynu se zásadně mění zejména v případě, kdy je sekundární kolona užší, a tím je pro každou dimenzi optimální jiná lineární rychlost. Ve dvojrozměrné separaci jsou difúzní koeficienty a také optimální rychlost na primární koloně daleko nižší, než by byly v jednodimenzionální GC a tlak nosného plynu na druhé koloně prudce vzrůstá.

Použití sekundární kolony s vnitřním průměrem stejným jako u primární kolony umožní činnost obou dimenzí při tlaku, který se blíží optimu (Mostafa, 2012).

2.5.4 Teplotní program

Teplotní program je důležitým faktorem ovlivňujícím GC×GC separaci, protože je možné výrazně zvýšit využití separačního prostoru ve druhé dimenzi (2D). Běžně používaný je lineární nárůst teploty v obou dimenzích, tím se retenční časy obou dimenzí stávají nezávislé (Venkatramani *et al.*, 1996).

Je-li naprogramovaná teplotní rampa v GC×GC spíše pomalá (např. jen 1–5°C/min), poskytuje relativně široké píky v první dimenzi (1D), což usnadňuje dostatečný počet modulací na každý pík. Nadměrně pomalá teplotní rampa může mít opačný efekt, nepříznivě působit na citlivost a způsobovat wrap-around, kdy se analyzovaná látka zdržuje ve stacionární fázi příliš dlouho a na detektor dopadá až s další modulací (Obr. 4). Pomalá teplotní rampa navíc výrazně zvýší délku analýzy (Mostafa *et al.*, 2011).



Obr. 4 Obrysový graf (contour plot), příklad wrap-around efektu močoviny

GC×GC systém může využívat buď jednu, nebo dvě nezávislé píčky a tím narůstá flexibilita systému. Použití jedné píčky má dva limitující faktory:

- maximální použitelná teplota je určena méně termálně stabilní kolonou
- teplota analýzy na sekundární koloně je závislá na eluční teplotě z 1D (Mostafa *et al.*, 2011).

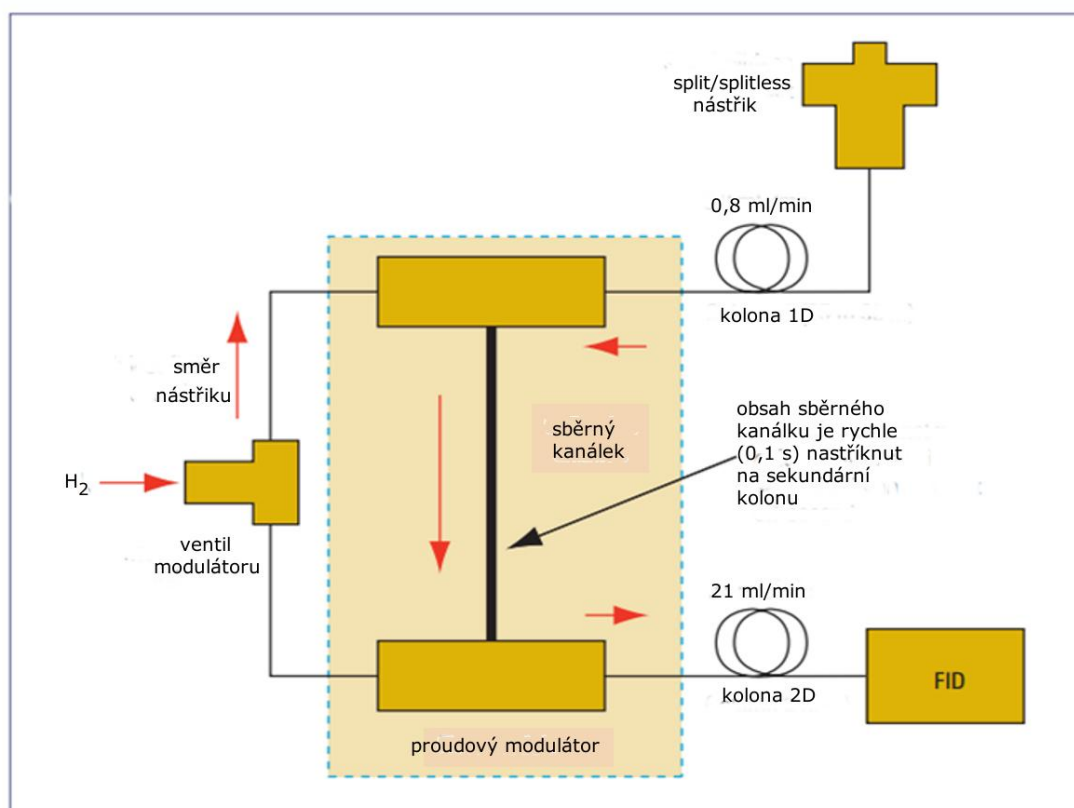
V případě, kdy jsou používány dvě nezávislé pece, sekundární píčka obvykle kopíruje teplotní program primární pece s offsetem +5–30 °C. Tím jak vzrůstá teplota primární pece, narůstá také eluční teplota z 1D, proto je pak separace ve druhé dimenzi účinnější při vyšší teplotě. Zároveň klesá pravděpodobnost přetížení sekundární kolony, protože kapacita kolony je při vyšší teplotě vyšší. Zvýšení eluční teploty má za následek pokles šířky píků v 1D a zkrácení doby analýzy (Mostafa *et al.*, 2012).

2.5.5 Modulátor

Klíčovou součástí dvojdimenzionální plynové chromatografie je modulátor. Jeho hlavním úkolem je zadržení a fokusace vzorku z první kolony, jeho nástřik na kolonu druhé dimenze a rychlý návrat do podmínek zadržování analytů.

Modulační perioda (P_M) je čas od chvíle, kdy je vzorek přitékající z 1D kolony zachycen v modulátoru do doby, než je vypuštěn na sekundární kolonu.

Existují dva základní typy modulací: teplotou a průtokem (Mostafa, 2012). U modulace průtokem se využívá sběrného kanálku, který se určitou dobu plní vzorkem, přitékajícím z primární 1D. Sběrný kanálek je po uplynutí určitého času rychle vyprázdněn do kolony druhé dimenze pomocí stlačeného plynu, jehož přívod je ovládán ventilem (Obr. 5).



Obr. 5 Průtokový modulátor během transferu effluentu na kolonu druhé dimenze (upraveno podle Agilent, 24. 4. 2014)

Běžněji používaná je modulace teplotou, kdy je k zachycení analytů a jejich následnému rychlému uvolnění použita změna teploty.

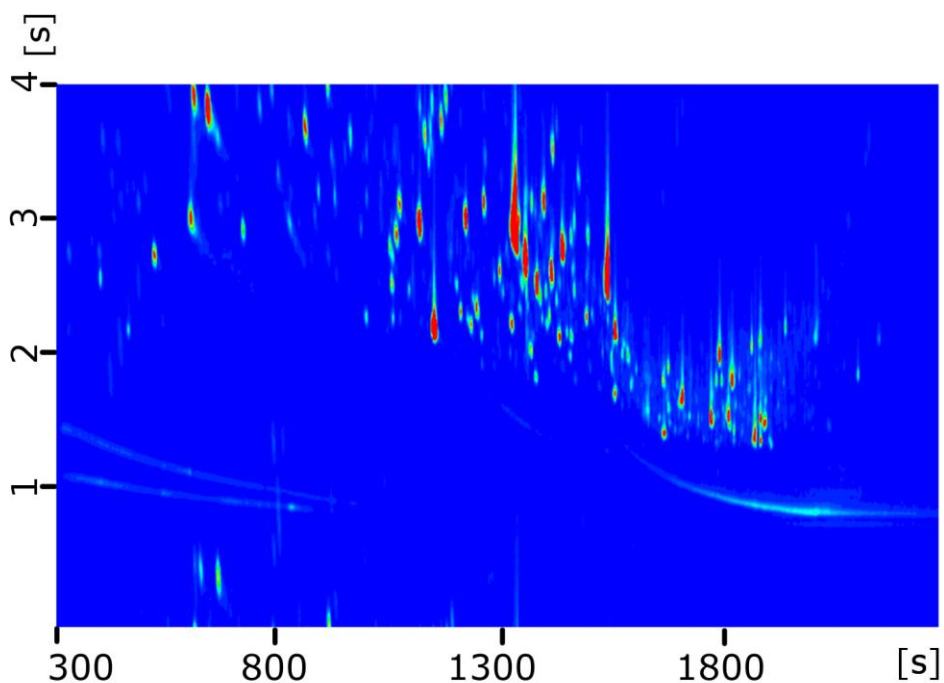
Pokles teploty způsobí zachycení a fokusaci přicházejících analytů. Jakmile je skupina analytů zachycena, chladná oblast musí být rychle zahřáta a tím dojde k opětovnému uvolnění analytů na kolonu druhé dimenze (Marriott 2002).

Aby se zabránilo úniku těkavých složek, používá se dvoufázové modulace: dvou studených a dvou horkých trysek situovaných obvykle na začátku sekundární kolony a pulzujících ve střídavém modu. První chladné stadium zachytí analyty z primární kolony ještě před místem chlazení. Poté jsou simultánně zapnuty první horká tryska a druhá chladicí, a analyty jsou posunuty do fokusační fáze modulátoru. Činností druhé horké trysky je skupina zachycených analytů eluována na sekundární kolonu; zároveň už je zapnuta první chladicí tryska (Mostafa *et al.*, 2012).

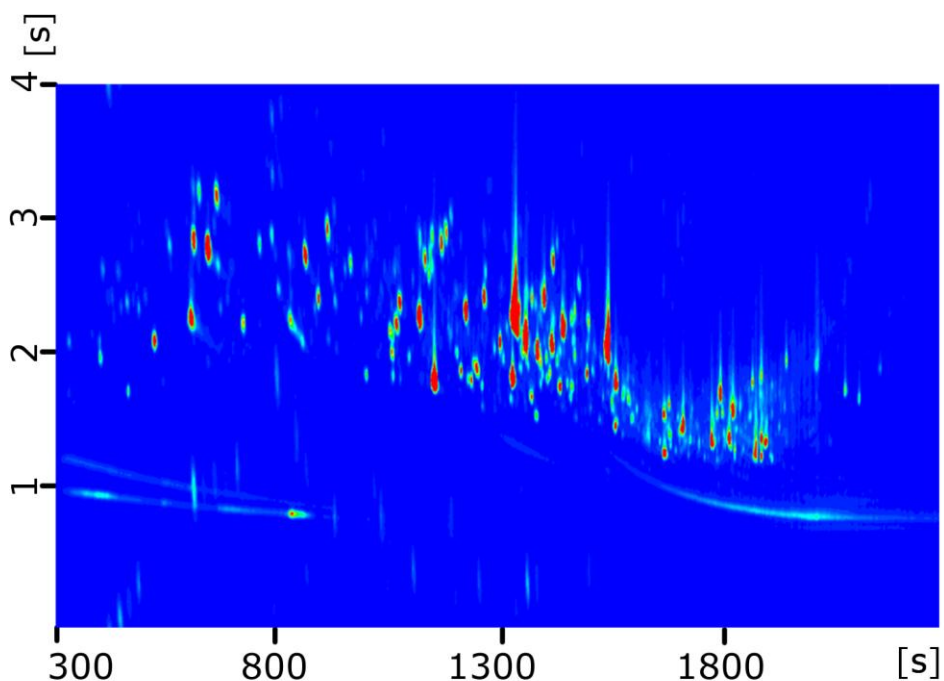
Tryskové modulátory umožňují modulaci buď na konci primární, nebo na začátku sekundární kolony. Zachycení analytů probíhá obvykle na té koloně, z jejíž stacionární fáze se analyty snáze desorbují a nedochází k pre-separaci kvůli rozdílnému času potřebnému k jejich desorpci.

Hlavní nevýhodou krátké modulační periody je wrap-around analytů (viz Obr. 4), které jsou silně zadržovány na sekundární koloně. „Wrap-around“ vzniká, pokud je retenční čas analytů ve 2D delší než modulační perioda. Místo toho, aby se analyty na obrysovém grafu objevily nahoře, objevují se dole v následující modulaci. Tento efekt ničí strukturu chromatogramu a komplikuje interpretaci dat, zejména v případech, kdy analyty ve wrapu koeluuji s analyty následující modulace. Wrap-around je akceptovatelný jen dokud jsou píky v „prázdném“ regionu separačního prostoru (mrtvý čas) a neničí strukturu chromatogramu (viz Obr. 4).

Pokud probíhá modulace na sekundární koloně, může teplotní offset modulátoru (rozdíl mezi teplotou horké trysky a teplotou pece) ovlivnit průměrnou teplotu sekundární kolony a tím retenční čas některých analytů. Vysoký offset způsobuje kromě změny tvaru píků i zkrácení retenčního času (Obr. 6 a Obr. 7).



Obr. 6 Obrysový graf: analýza moči s offsetem modulátoru +5 °C



Obr. 7 Obrysový graf: analýza moči s offsetem modulátoru +15 °C

2.5.6 Detekce pro dvojrozměrnou plynovou chromatografii

Další důležitou součástí GC×GC systému je detektor. GC×GC separace generuje na konci sekundární kolony velké množství velmi úzkých píků s šířkou 100-600 ms při základně (Purcaro *et al.*, 2010). Proto detektory používané pro GC×GC musí vykazovat vysokou rychlost sběru dat (Mostafa *et al.*, 2012), alespoň 50 Hz (Purcaro *et al.*, 2010).

Běžně používané je spojení s plamenoionizačním detektorem. V některých případech je používán sirný chemiluminiscenční, atomový emisní nebo dusíkatý chemiluminiscenční detektor (Chudoba a Šebor, 2008).

Velmi často je využíváno spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Purcaro *et al.*, 2010). Výhodou hmotnostních spektrometrů je, že kromě selektivního určení množství analytů, zároveň poskytují informace o struktuře analyzovaných látek (Mostafa *et al.*, 2012).

Nejběžněji používané MS detektory pro GC×GC jsou průletové hmotnostní analyzátoři (TOF) a kvadrupólové MS detektory (QMS, Purcaro *et al.*, 2010). Více než 80 % GC×GC používá TOF, kolem 16 % QMS (Mostafa *et al.*, 2012), protože skenovací rychlost kvadrupólů je nedostačující pro správnou rekonstrukci úzkých píků (80-200 ms; Purcaro *et al.*, 2010).

Hmotnostní spektrometr je tvořen třemi částmi: iontovým zdrojem, hmotnostním analyzátořem a detektorem (Watson a Sparkman, 2007). Pomocí iontového zdroje jsou analyty převáděny na ionty. Aby nedocházelo ke vzájemným interakcím mezi jednotlivými ionty, probíhá ionizace při velmi nízkém tlaku, proto jsou nezbytnou součástí analyzátoru vakuové pumpy (Opekar *et al.*, 2007).

Běžně používaný je elektronový iontový zdroj (EI). Produkuje proud elektronů (obvykle s energií kolem 70 eV, což je vyšší než běžná energie atomových vazeb), které narážejí do vzorku, tvoří kation radikály, a ty následně podléhají fragmentaci (Hoffmann a Stroobant, 2007).

Vzniklé fragmenty jsou separovány v hmotnostním analyzátoři. Ionty jsou separovány podle poměru své hmotnosti a náboje (m/z). Různé typy hmotnostních analyzátořů se liší tím, zda k transportu iontů používají elektrické nebo magnetické pole, popř. jestli ovlivňují dobu letu částic nebo jejich dráhu (Dass, 2007).

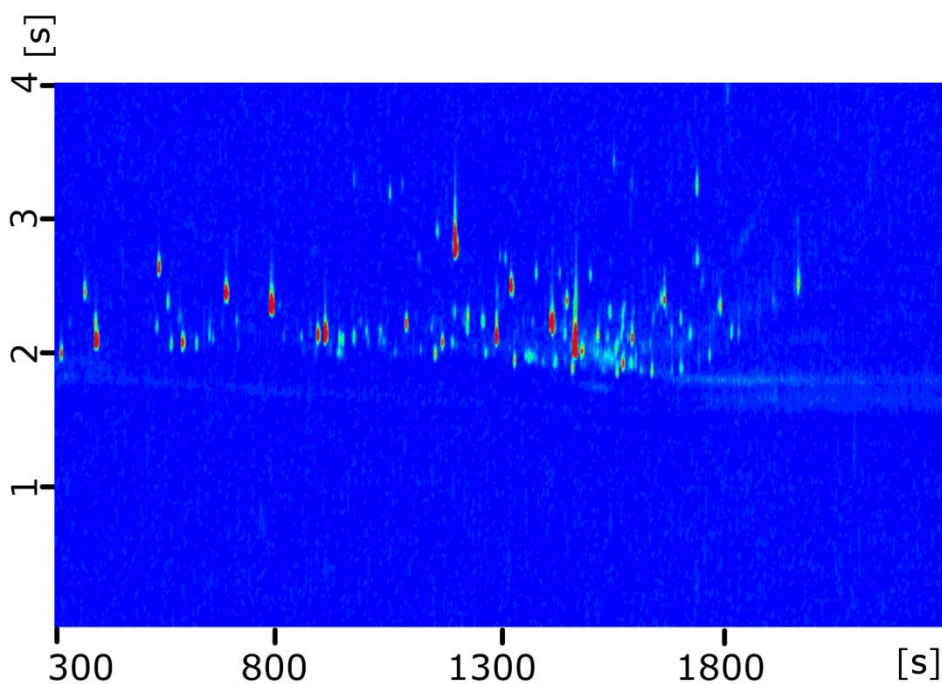
Průletový analyzátoř měří dobu letu iontů potřebnou pro překonání určité dráhy. Analyzátoř je tvořen dlouhou vakuovanou trubicí. Do analyzátoři jsou vstřelovány krátké pulsy iontů, urychlené napěťovým pulsem. Letí různou rychlostí v závislosti na svém m/z , proto dopadají na detektor v různém čase. Ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii letí rychleji a dopadnou na detektor dříve (Watson a Sparkman, 2007). Výhodou tohoto typu detektoru je jeho v podstatě neomezený hmotnostní rozsah. Záleží jen na době, po kterou se bude čekat, než ionty doletí. Měření spekter je rychlé.

Rychlost sběru dat je až 500 spekter/s. To umožňuje sběr 50 bodů na 100 ms pík, což je víc než dostačující pro jeho rekonstrukci a kvantifikaci. Hlavním limitujícím faktorem se stává snaha zachovat data s dobrou citlivostí a zároveň nemít příliš velký datový soubor. Kompromisem je použití skenovací rychlosti sběru dat 50 Hz (Mostafa *et al.*, 2012).

2.5.7 Separační prostor

Separační prostor je taková plocha dvojdimenzionálním GCxGC chromatogramu, na které jsou nebo mohou být distribuovány analyty. Jedná se vlastně o plochu ohraničenou z jedné strany retenčním časem první dimenze, z druhé strany retenčním časem druhé dimenze. Prostor druhé dimenze je však často využit jen velmi málo i přesto, že je chromatogram dobře strukturovaný. Toto nedostatečné využití může být způsobeno dvěma faktory (Obr. 8):

- separační mechanismy obou dimenzí nejsou nezávislé, existuje mezi nimi korelace
- nedostatečná optimalizace podmínek druhé kolony (např. velký mrtvý čas). Proto je zejména u komplexních vzorků nezbytná optimalizace stacionární fáze (Cordero *et al.*, 2006).



Obr. 8 Obrysový graf: velký mrtvý čas ve 2D a vzájemná korelace obou dimenzí (malé využití separačního prostoru; píky leží na diagonále)

2.6 Ortogonalita

Ortogonalita popisuje úspěšnost separace ve dvojdímenzionálním systému. Správně optimalizovaná GC×GC separace je ortogonální, retenční časy v obou dimenzích jsou na sobě nezávislé a analyty pokrývají celý separační prostor (Watson *et al.*, 2007). V dokonale ortogonální separaci dosahuje píkovaná kapacita stejné hodnoty, jako součin píkované kapacity první a druhé dimenze. Ale skutečná píkovaná kapacita je menší, protože separace není nikdy plně ortogonální a retenční data se navzájem ovlivňují. Obecným problémem GC×GC separací je také tendence analytů tvořit klastry podél diagonály ve dvojdímenzionálním separačním prostoru (Obr. 8).

Ortogonalita je závislá nejen na separačním mechanismu a vlastnostech analytů, ale také na separačních podmínkách jako je kombinace kolon, teplotní rampa a nastavení modulátoru (Zu, 2009). Optimalizace vždy ovlivní úspěšnost separace v první i druhé dimenzi. Podmínky ideální pro jednu dimenzi nemusí být ideální pro druhou.

2.6.1 Kolonové uspořádání

Správný výběr kolon je důležitým předpokladem úspěšné separace. Využití prostoru je tím větší, čím odlišnější jsou separační mechanismy zvolených kolon. Čím jsou separační mechanismy podobnější, tím více se redukuje využití 2D separačního prostoru, a většina analytů leží na diagonále (Ryan *et al.*, 2005). Nejvyšší ortogonalitu lze dosáhnout použitím nepolární kolony pro první dimenzi a polární pro druhou dimenzi. Toto uspořádání je vhodné pro různé typy vzorků, poskytuje lepší separaci a identifikaci analytů (Zu, 2009).

Pokud je kolona první dimenze polární, klesá využití separačního prostoru, i když je pro druhou dimenzi použita vhodná kolona (Omais *et al.*, 2011; Cordero *et al.*, 2006). Reverzní fáze je vhodná pro analýzu komplexních vzorků (semi- a vysoce polární látky; Zu, 2009).

Účinnost separace nezávisí jen na parametrech kolony ale také na vlastnostech analyzovaného vzorku. Například při použití dvou polárních kolon může být separace ortogonální, pokud analyty reagují s každou stacionární fází jiným způsobem (např. vodíkové můstky a interakce dipól-dipól).

Ortogonalita závisí také na tloušťce filmu stacionární fáze v kolonách. Pro komplexní vzorky, které mají velké rozdíly v koncentracích jednotlivých analytů,

narůstá ortogonalita použitím kolony se silnější vrstvou stacionární fáze. Retenční vztahy se rozbíhají a jednotlivé komponenty jsou v separačním prostoru lépe rozprostřeny (Cordero *et al.*, 2006). Separace je však pomalejší.

Pokud je při analýze prioritní rychlost separace, používá se kolona první dimenze s tenkou vrstvou stacionární fáze a užší vnitřní průměr sekundární kolony. Je-li vyžadováno vysoké rozlišení je vhodnější tlustší stacionární fáze (0,25–0,5 μm) primární kolony a větší průměr (0,15 mm) a silnější vrstva stacionární fáze sekundární kolony (Zhu *et al.*, 2006).

Použití delší sekundární kolony způsobí nárůst retenčního času na druhé koloně a je třeba prodloužit modulační periodu. Může docházet k degradaci separace z 1D (Tranchida *et al.*, 2007). Zvyšuje se také mrtvý čas druhé dimenze (Obr. 8), což má za následek zmenšení separačního prostoru.

Teoreticky poskytuje nejúčinnější separaci ve druhé dimenzi krátká, úzká kolona s tenkým filmem (Mostafa *et al.*, 2012). V praxi se ukazuje, že pokud je sekundární kolona kratší a užší (0,05 mm, s šířkou filmu 0,05 μm), je doba separace až 3x kratší beze ztráty rozlišení, ale kolona je dost náchylná k přetížení („overload“, Adachour *et al.*, 2005) a kolona není schopna pojmout takové množství vzorku, část tedy prochází bez separace a ničí strukturu chromatogramu. Přetížení sekundární kolony je obecným problémem GC \times GC separací. Často nastává u termálních modulátorů, kdy dochází ke stlačení zóny analytů během zachytávání do pasti.

Přetížení sekundární kolony se projeví zhoršením píkovej kapacity. Píky jsou široké a mohou pokrýt velkou část určeného 2D separačního prostoru. Širší kolona s tlustší vrstvou stacionární fáze tak může poskytovat lepší výsledky než užší (Harynuk *et al.*, 2005).

Nevhodně zvolená stacionární fáze sekundární kolony způsobuje wrap-around hodně zadržovaných analytů.

2.7 Prediktivní modelování pro optimalizaci GC \times GC

Optimalizace separace a selektivity stacionární fáze je vzhledem k délce analýzy časově velmi náročná. Proto se začínají objevovat matematické modely, které mohou optimalizační proces velice zjednodušit. Modely obvykle vychází z Kovatsových retenčních indexů nebo z retenčních indexů vypočtených z retenčních dat GC \times GC

separace (Mostafa *et al.*, 2012). V roce 2008 se objevil informační model, ve kterém byla GC×GC separace charakterizována jako funkce a s využitím termodynamických retenčních indexů byla předpovězena optimální separace. Jako vstupní data byly použity retenční časy analytů na každé stacionární fázi při dvou různých teplotních programech. Tím byl model schopen optimalizovat různé separace (Dorman *et al.*, 2008).

V roce 2009 byl navržen model termodynamických parametrů, který odhaduje retenční časy analytů při použití různých stacionárních fází a různých nosných plynů. Autoři předpokládají, že pokud jsou termodynamické modely přesné, budou i retenční časy jednotlivých analytů předpovězeny přesně, nezávisle na provozních podmínkách, i přesto, že v praxi se vlastnosti jako retenční indexy mohou měnit s teplotou a nastavením a rychlostí teplotní rampy.

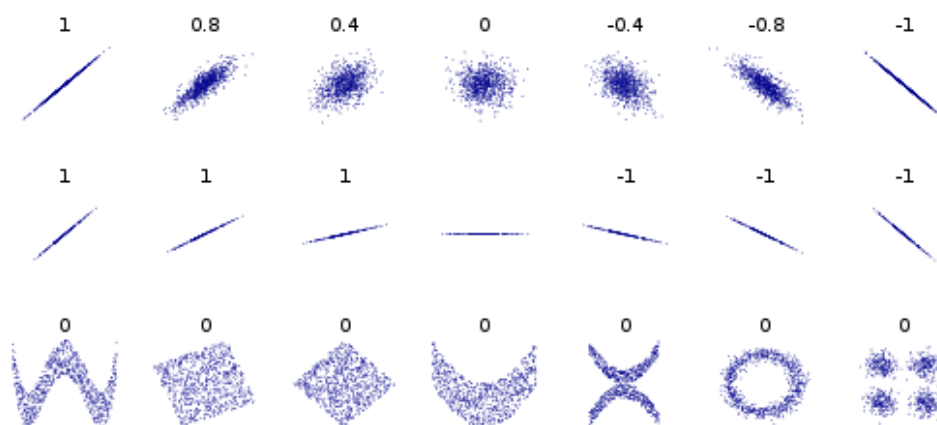
Dalším navrženým modelem byl model solvatačních parametrů, který předpovídá relativní retenci analytů. Tento experimentálně ověřený model ukázal, že nejlepší separace je dosaženo při použití kolon, které odlišně interagují s analyty a matricí, a polarita kolon je až druhotná (Zapadlo *et al.*, 2010; Seeley *et al.*, 2012).

2.8 Určení ortogonality

Pro charakteristiku ortogonality a míru využití separačního prostoru existuje několik přístupů.

Charakteristickou veličinou vyjadřující vztah mezi daty z obou dimenzí je korelace. Každý soubor retenčních dat (retenční čas, kapacitní faktor) z každé dimenze je považován za nezávislý vektor, který reprezentuje interakce mezi analytem a stacionární fází při konkrétních experimentálních podmínkách. Každý analyt separovaný v GC×GC je tak popsán dvěma nezávislými vektory a je možné určit stupeň korelace mezi nimi. Hodnota korelace odráží vlastnosti analytů, jejich molekulovou hmotnost, bod varu a také fyzikální a chemické vlastnosti chromatografického systému (Harvey, 2000; Cordero *et al.*, 2006).

Míru korelace vyjadřuje korelační koeficient c . Výpočet korelace (Pearsonův korelační koeficient) vychází z aritmetických průměrů proměnných X a Y . Korelační koeficient nabývá hodnot -1 až $+1$. Obě krajní hodnoty informují o vzájemném vztahu mezi daty. Pokud má systém korelaci nulovou, jsou obě jeho dimenze na sobě nezávislé (viz Obr. 9). Čím vyšší je korelace, tím nižší je ortogonalita systému (Ryan *et al.*, 2005).



Obr. 9: Korelace: Příklady grafického zobrazení a koeficienty jejich korelace s funkcí $y = x$ (Boigelot, 2011)

2.8.1 Faktorová analýza

Normalizací retenčních dat z první a druhé dimenze jsou získány korelační hodnoty (K^1, K^2) podle:

$$K_i^1 = \frac{x_i}{\bar{x}},$$

kde x_i je retenční čas i -tého analytu a \bar{x} průměrný retenční čas. Každý analyt separovaný v GC×GC je tak charakterizován dvěma vektory a je možné spočítat stupeň korelace (korelační koeficient c) mezi nimi (viz výše). Z něj je získán úhel pokrytí separačního prostoru β podle rovnice $\beta = \cos^{-1}c$. Čím více se hodnota úhlu pokrytí separačního prostoru β přibližuje 90 °C, tím je separace ortogonálnější. Korelační koeficient a úhel β dobře vysvětlují vysoké hodnoty disimilarity mezi dvěma dimenzemi ve vysoce ortogonálních systémech. Nevýhodou tohoto přístupu je, že nebere v úvahu distribuci píků v separačním prostoru (to jestli data tvoří či netvoří shluky; Cordero *et al.*, 2006).

2.8.2 Experimentální přístup

Ortogonalita separace je experimentálně určena pokrytím separačního prostoru. Tentýž vzorek je analyzován na mnoha kolonových uspořádáních stacionárních fází s různými vlastnostmi. Separační prostor je popsán na základě eluce píků nejméně (t_0) a nejvíce (t_{max}) zadržovaných analytů ve druhé dimenzi (Ryan *et al.*, 2005).

Nevýhodou tohoto přístupu je, že využitelnost prostoru závisí na eluci posledního analytu víc než na celkovém pokrytí prostoru (Cordero *et al.*, 2006).

2.8.3 Grafický přístup

První a druhá dimenze je charakterizována bezrozměrnými čísly (SO^1, SO^2). Tato čísla jsou definována jako rozdíl retenčních časů posledního a prvního eluovaného analytu ve vztahu k celkové době analýzy:

$$SO^1 = \frac{tr_n^{1D} - tr_1^{1D}}{T_{an}}$$

$$SO^2 = \frac{tr_n^{2D} - tr_1^{2D}}{P_{mod}}$$

kde T_{an} je doba analýzy a P_{mod} je modulační perioda. Tak je možné odhadnout pokrytí prostoru SO_{2D} použitím Euklidovské normy (Omais *et al.*, 2011).

$$SO_{2D} = \sqrt{\frac{(tr_n^{1D} - tr_1^{1D})^2}{2T_{analysis}^2} + \frac{(tr_n^{2D} - tr_1^{2D})^2}{2P_{mod}^2}}$$

Nevýhodou tohoto systému je, že stupeň pokrytí prostoru závisí více na eluci posledního analytu, než na celkovém pokrytí separačního prostoru (Cordero *et al.*, 2006).

Jiný grafický přístup je založen na určení stupně pokrytí plochy. Tento přístup rozděluje separační prostor na síť čtverců a hodnotí počet obsazených čtverců. P_{max} je počet všech čtverců (celková píková kapacita) a $\sum P_n$ je počet čtverců obsahujících píky. Tato metoda má určitá omezení: počet obsazených čtverců (O) se pro vysoké P_n stává konstantní a pro malé P_n vykazuje drastické odchylky (Gilar *et al.*, 2005).

$$O = \frac{\sum P_n - \sqrt{P_{max}}}{0,63P_{max}}$$

Výhodou tohoto přístupu je jeho jednoduchost. Nevýhodou je to, že je hodnoceno spíše pokrytí separačního prostoru než vzájemná korelace mezi dimenzemi (Pourhaghghi *et al.*, 2011).

2.8.4 Informační teorie

Informační teorie charakterizuje procentuální využití separačního prostoru (poměr mezi plochou pokrytou a nepokrytou píky a nevyužitým separačním prostorem pod druhou dimenzí; viz Obr. 10).

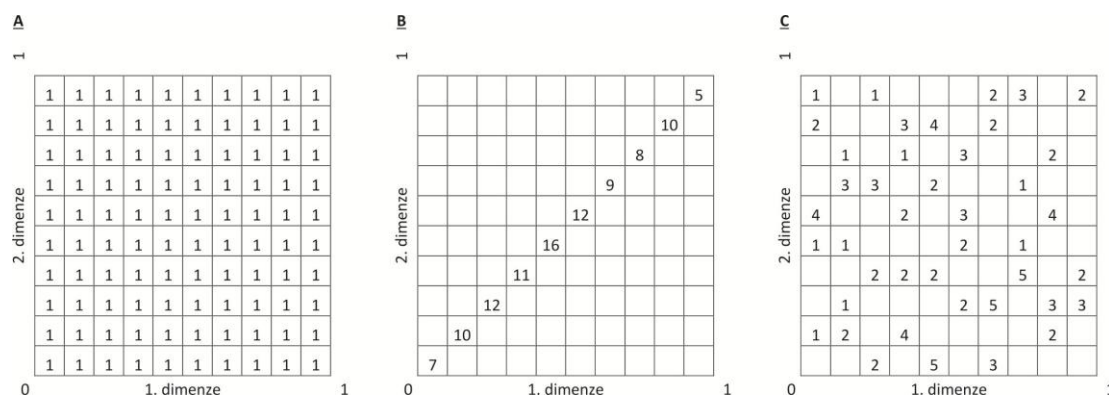
Analýza vychází z retenčních dat analytu, odtud se počítá normalizovaný retenční faktor X_a , podle rovnice:

$$X_a = \frac{R_{ti} - R_{t,min}}{R_{t,max} - R_{t,min}}$$

kde R_{ti} je retenční čas analytu v sekundách; $R_{t,min}$ retenční čas nezadržených komponent (mrtvý čas) a $R_{t,max}$ je retenční čas poslední eluované složky (Slonecker *et al.*, 1996). Tím jsou retenční data jednotlivých analytů srovnána na stejnou škálu a je možné je navzájem porovnávat a dále s nimi pracovat.

Ortogonalita pak může být charakterizována několika veličinami, které popisují plochu.

- Informační entropie vyjadřuje míru závislosti dat.
- Synentropie je procentem informační entropie diskriminované oběma dimenzemi (normalizovaná retenční data se spojují na diagonále). Je tím vyšší, čím menší je pokrytí separačního prostoru.
- Informační similarita



Obr. 10 Informační teorie, pokrytí separačního prostoru: A – dokonalé pokrytí separačního prostoru, B – neortogonální systém, C – náhodné rozdělení, částečně ortogonální systém (O = 59 %; podle Pourhaghighi *et al.*, 2011)

2.8.4.1 Informační entropie I

Informační entropie I vyjadřuje to, jestli spolu data souvisí nebo jsou naprosto náhodná. Sekvence naprosto náhodných čísel má maximální entropii. Čím více spolu čísla (data analytů) korelují, tím menší bude jejich entropie. V případě zcela rovnoměrného rozložení bude informační entropie maximální.

V aplikacích analytické chemie vyjadřuje informační entropie rozptyl dat v náhodném vzorku. Tuto pravděpodobnostní veličinu lze popsat rovnicí:

$$I = \sum_k (-\rho_k \log_2 \rho_k)$$

kde ρ_k je pravděpodobnost výskytu jednoho možného výsledku k z n možných výsledků (pravděpodobnost vzniku chromatografického píku k v konkrétním retenčním čase). Podobnost mezi dimenzemi je nejprve počítána pro každou dimenzi zvlášť $I(1st)$ a $I(2nd)$ a poté pro obě dimenze dohromady $I(1st, 2nd)$. Informační entropie 2D systému $I(1st, 2nd)$ odpovídá součtu informačních entropií pro každou dimenzi. Pokud mezi dimenzemi existuje závislost, je třeba odečíst hodnotu korelace (Slonecker *et al.*, 1996).

Porovnáním informační entropie dvou chromatografických dimenzí je možné spočítat hodnotu frakčního informačního obsahu („fractional informational content“) $h(1st, 2nd)$ podle rovnice:

$$h(1st, 2nd) = 1 - \frac{c}{I(1st, 2nd)}$$

kde c je hodnota korelace mezi dimenzemi. Odtud je možné spočítat hodnotu informační similarity.

2.8.4.2 Informační similarita H

Informační similarita H nevyjadřuje podobnost, ale to, jak moc tvoří data shluky nebo jak moc je dimenze nasycená. Informační similarita nabývá hodnot 0–1. Při dokonalé disperzi analytů je hodnota informační similarity 0. S informační similaritou 1 je separační prostor využit velmi špatně a analyty se shlukují. Informační similarita je počítána z frakčního informačního obsahu $h(1st, 2nd)$:

$$H(1st, 2nd) = \sqrt{1 - h(1st, 2nd)^2}.$$

2.8.4.3 Synentropie

Synentropie je tím vyšší, čím více dat leží na diagonále, tj. čím menší je využití separačního prostoru. Nabývá hodnoty 0 pro systém, ve kterém data obou dimenzí nekorelují. Nabývá-li hodnoty 100 %, systém není ortogonální a korelace je maximální (Slonecker *et al.*, 1996; Cordero, *et al.* 2006).

Informační teorie dobře popisuje ortogonalitu pro všechny experimentálně použité podmínky, zdůrazňuje efektivitu chromatografického systému v pokrytí separačního prostoru. Informační teorie je také efektivnější pro popis entropie celého dvojdimenzionálního systému. Vyplývá z ní, že ortogonalita GC×GC systému je funkcí rozdílu v teplotách eluce komponent produkovaných v 1D (Cordero *et al.*, 2006). Její nevýhodou je předpoklad, že závislá data vždy leží na diagonále.

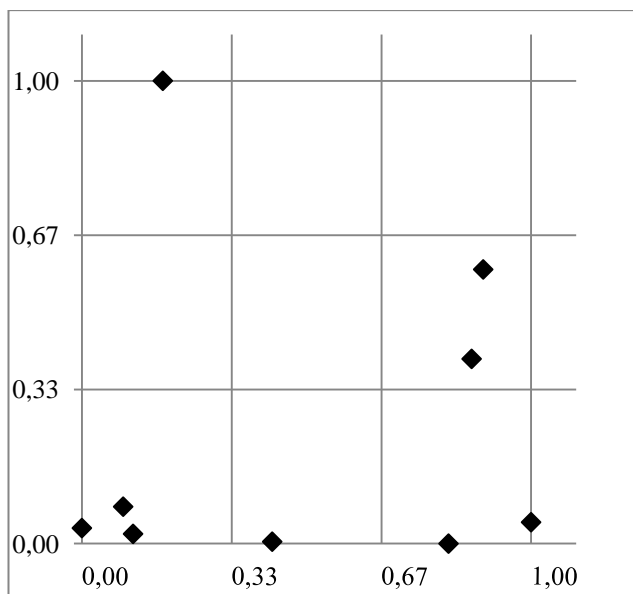
2.8.4.4 Podmíněná entropie

Studie Pourhaghighi (2011) vychází z informační teorie, ale navrhuje nový přístup založený na podmíněné entropii. Tento přístup uvažuje kvantitativní distribuci dat v celém separačním prostoru, i mimo diagonální korelaci mezi dvěma separačními mechanismy. Výhodou tohoto přístupu je, že ortogonalitu lze spočítat nezávisle na množství dat (píků) použitých k hodnocení. Další výhodou této metodologie je možnost porovnávat i data získaná různými separačními mechanismy (Pourhaghighi *et al.*, 2011).

Vychází z informační entropie

$$H = \sum_{k \in X} (-\rho_k \log_2 \rho_k)$$

Entropie je funkcí distribuce X a je závislá na pravděpodobnosti výskytu každého bodu. Například pro systém, ve kterém se porovnávalo 9 analytů, je separační prostor rozčleněn na 9 oblastí (Obr. 11). Systém bude plně ortogonální, pokud v každé oblasti bude právě jeden analyt.



Obr. 11 Informační teorie, graf pokrytí separačního prostoru: normalizovaná retenční data a jejich rozmístění po ploše

Nejprve je zkoumána distribuce analytů v jedné dimenzi (X), kdy je separační prostor na ose X rozčleněn na tři části: v první se nachází čtyři analyty, ve druhé jeden a ve třetí čtyři. Tedy:

$$H(X) = \frac{4}{9} \log_2 \frac{4}{9} + \frac{1}{9} \log_2 \frac{1}{9} + \frac{4}{9} \log_2 \frac{4}{9}$$

Analogicky se hodnotí distribuce analytů a tedy informační teorie ve druhé dimenzi:

$$H(Y) = \frac{6}{9} \log_2 \frac{6}{9} + \frac{2}{9} \log_2 \frac{2}{9} + \frac{1}{9} \log_2 \frac{1}{9}$$

a následně pro každou z devíti oblastí zvlášť ($I(X, Y)$).

$$H(X, Y) = \frac{3}{9} \log_2 \frac{3}{9} + \frac{1}{9} \log_2 \frac{1}{9} + \frac{2}{9} \log_2 \frac{2}{9} + \frac{2}{9} \log_2 \frac{2}{9} + \frac{1}{9} \log_2 \frac{1}{9}$$

z rozdílu $H(X, Y) - H(X)$ je získána hodnota informační entropie druhé dimenze v závislosti na první dimenzi. Odtud je možné vypočítat hodnotu ortogonalit O :

$$O\% = \frac{H(X, Y)}{H(Y)} \times 100$$

Pokud je 2D systém zcela neortogonální (např. pokud jsou retenční časy druhé dimenze kompletně závislé na první dimenzi) je hodnota $H(X, Y) = 0$. Naopak pokud je systém plně ortogonální (100 %), a separace je nezávislá, je hodnota $H(X, Y) = H(Y)$ a ortogonalita je 100 % (Slonecker *et al.*, 1996).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Instrumentace

Při práci byl používán plynový chromatograf Agilent 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), HT (high throughput – vysokoprostupný) průletový hmotnostní spektrometr (LECO Co. St. Joseph, USA) a automatický dávkovací systém MPS2/CIS4/ALEX (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo). Pro spojení kolon do systému GC×GC byl použit dvoustupňový modulátor se čtyřmi tryskami, uložený v primární peci (stejně jako sekundární pírka). Do horkých i studených trysek byl použit stlačený vzduch. Vzduch do studených trysek byl po předchozí filtraci vlhkosti imerzně ochlazován na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Horký vzduch byl ohříván teplotou modulátoru o $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ vyšší než teplota primární pece.

V této práci byly použity kolony s různou stacionární fází lišící se vlastnostmi a polaritou (viz Tab. 1).

BPX5 – nepolární kolona s 5% fenylsiloxanem je oproti zcela nepolární koloně selektivnější. Je vhodná pro stopovou analýzu. Ve srovnání s polárními kolonami je robustnější, termostabilní do $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Je vhodná pro 80 % všech analýz, např. pro stopovou analýzu, analýzu herbicidů, pesticidů, uhlovodíků, rozpouštědel, fenolů, aminů (SGE Analytical Science, BPX5, 24. 4. 2014).

BPX50 – termostabilní do $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, chromatograficky inertní, středně polární kolona vhodná pro analýzu herbicidů, drog, steroidů a v různých farmaceutických aplikacích (SGE Analytical Science, BPX50; 24. 4. 2014).

SolGel-WAX – polární fáze, vysoce robustní stabilní do $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; méně náchylná k poškození kyslíkem než ostatní WAX fáze; málo krvácí a je málo inertní, vhodná pro analýzu vysoce reaktivních vzorků (SGE Analytical Science, Solgel-WAX; 24. 4. 2014).

SLB-IL59 – ve srovnání s předchozí kolonou je polárnější, teplotně stabilnější (do $300\text{ }^{\circ}\text{C}$); vhodná pro analýzu neutrálních a mírně bazických vzorků (Sigma-Aldrich, SLB-IL59; 24. 4. 2014).

Nosným plynem bylo helium (99,999 %, Messer, ČR) v režimu korigovaného konstantního průtoku 1 ml/min .

Tab. 1 Používané kolony a jejich stacionární fáze

název	stacionární fáze
BPX5	5 % fenyl / 95 % methyl polysilfenylen siloxan
BPX50	50 % fenyl polysilfenylen siloxan
SolGel-WAX	polyetylen glykol
SLB-IL59	1,12-Di(tripropylfosfonium)dodekanbis(trifluoromethylsulfonyl)imid

Počáteční teplota primární pece byla 80 °C, která poté narůstala 4 °C/min do 130 °C; 6 °C/min do 200 °C a 12 °C/min do 285 °C při kterých byla udržována minimálně 10 min. Konečná teplota jednotlivých kolonových uspořádání se řídila teplotním maximem použitých kolon (tj. maximální teplotou, při které je vrstva stacionární fáze v koloně ještě stabilní; viz Tab. 2). Program sekundární pece kopíroval program primární pece s offsetem +5 °C. Modulační perioda byla 4 s, délka horkého pulsu byla 0,5 s; od času 1896 s byla délka horkého pulsu 0,75 s.

Nástřik vzorku byl 1 µl v režimu splitless (1 min) s programovatelným nástřikem injektoru. Iniciální teplota byla 40 °C, poté narůstala 10 °C za sekundu do 250 °C, při které byla udržována 1,5 min. Další zvýšení teploty bylo 10 °C za sekundu do 350 °C. Při této teplotě byl injektor udržován 3 min. Teplotní programy pro jednotlivá kolonová uspořádání jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Teplotní program pece u jednotlivých kolonových uspořádání

název	teplotní program			čas
C	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→280 °C	10 min
K	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→275 °C	12 min
H	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→300 °C	5 min
L	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→300 °C	5 min
I	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→285 °C	7 min
J	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→275 °C	8 min
E	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→300 °C	5 min
D	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→285 °C	10 min
G	4 °C/min→130 °C	6 °C/min→200 °C	12 °C/min→280 °C	7 min

Elektronová ionizace analytů v průletovém hmotnostním analyzátoru probíhala při -70 eV (250 °C). Teplota transferové linie a iontového zdroje byla 250 °C. Sběr dat v rozmezí m/z 35 – 650 probíhal rychlostí 100 Hz.

Ovládání systému, sběru a zpracování bylo řízeno pomocí ChromaTOF 4.33 (LECO Co., St. Joseph, USA). Nástřik vzorku systémem Gerstel byl řízen softwarem Maestro 1.3 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo). Data byla statisticky zpracována pomocí aplikace Microsoft Office Excel 2007.

3.2 Biologický materiál

Pro optimalizaci byl použit směsný vzorek moči zdravých dospělých jedinců, pro stanovení metabolitů glutarové acidurie vzorky moče pacientů s glutarovou acidurií a kontrolní moče zdravých dětí.

3.3 Použité chemikálie

Laktát (sodium L-lactate $^{13}\text{C}_3$, 98%), kyselina methylmalonová (d_3 MMA, 98 %) od firmy Cambridge Isotope Laboratories. Chlorid sodný (p.a.), bezvodý síran sodný (p.a.). 4-phenylbutyrát (d_8 ; 99 %), ethylacetát (99,7 %), methanol (MeOH, 99,9 %), aceton (99,8 %), N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA, 99 %), (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA, 99 %), O-Ethylhydroxylamine hydrochloride (97 %), 1% trimethylchlorsilan TMCS, byly koupeny od firmy SIGMA-Aldrich; pyridin (95,5 %) u firmy LOBA CHEMIE.

3.4 Příprava vzorků

3.4.1 Příprava vzorku pro optimalizaci

K 1 ml moče bylo přidáno 10 μl značené kyseliny methylmalonové ($1,04$ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 20 μl 4-phenylbutyrátu ($2,10$ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 1 malá lžička ethoxyamid hydrochloridu (cca 0,03 g). Vzorek byl inkubován 30 min při laboratorní teplotě; poté byla přidána (větší) lžička NaCl (cca 0,70 g) a 5 kapek HCl (1:1). Metabolity byly vytřepány do ethylacetátu (3 x 4 ml – vždy 10 min na třepačce). Všechny tři podíly byly slity dohromady, byla přidána lžička bezvodého Na_2SO_4 (cca 0,80 g) vzorek přikryt novým víčkem, protřepán a inkubován 10 min při laboratorní teplotě. Vzorek byl přelit do nové

zkumavky a odfoukán při 30 °C pod dusíkem do sucha. Vysušená zkumavka byla vymyta dvakrát 400 µl methanolu a jednou 300 µl acetonu, všechny tři podíly byly slity do 1 vialky. Vzorek byl při 30 °C odfoukán do sucha (pod dusíkem).

Do odfoukaných vialek bylo přidáno 150 µl pyridinu a 150 µl MSTFA, vzorky byly pod dusíkem uzavřeny, zvortexovány a inkubovány 45 min při 50 °C.

3.4.2 Příprava patientských vzorků, kontrolních zdravých vzorků a vzorků pro kontrolu kvality

Bylo analyzováno 13 vzorků pacientů s glutarovou acidurií, 17 zdravých kontrolních vzorků. Vzorky byly připravovány ve třech sériích. V každé sérii byly v náhodném pořadí zastoupeny patientské i kontrolní vzorky.

Z každého vzorku bylo odebráno takové množství, ve kterém je 0,25 mg kreatininu. Poté byl každý vzorek doplněn vodou do dvou mililitrů. K takto naředěné moči bylo přidáno 40 µl značené kyseliny methylmalonové (1,04 mmol·l⁻¹), 20 µl 4-fenylbutyrátu (12,79 mmol·l⁻¹) a 1 malá lžička O-ethylhydroxylamin hydrochloridu (cca 0,03 g). Zazátkovaný vzorek se nechal inkubovat 30 min při laboratorní teplotě; poté byla přidána (větší) lžička NaCl (cca 0,70 g) a 3 kapky HCl (1:1). Metabolity byly vytřepány do ethylacetátu (3 x 4 ml, vždy 10 min na třepačce). Všechny tři podíly byly slity dohromady, byla přidána lžička bezvodého Na₂SO₄ (cca 0,80 g) vzorek přikryt novou zátkou, promíchán a inkubován 10 min při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek přelit do nové zkumavky a odfoukán při 30 °C dusíkem do sucha. Vysušená zkumavka byla vymyta dvakrát 400 µl methanolu a jednou 300 µl acetonu (všechny tři podíly do 1 vialky). Vzorek byl při 30 °C odfoukán dusíkem.

Pro derivatizaci byla použita derivatizační směs, připravená smícháním 1,5 ml BSTFA, 1,5 ml pyridinu a 60 µl TMCS. 300 µl této směsi bylo přidáno do každé vialky a vzorek uzavřen pod dusíkem. Derivatizace probíhala 20 min při 70 °C.

3.5 Optimalizace kolonového uspořádání

Pro optimalizaci byla použita kolonová uspořádání lišící se délkou kolon, polaritou, vnitřním průměrem a tloušťkou filmu (viz Tab. 3).

Tab. 3 Použitá kolonová uspořádání

	název	typ kolony	délka kolony [m]	vnitřní průměr [mm]	tloušťka stacionární fáze [μm]
NP/P	C	BPX5	29,95	0,25	0,25
		SolGel-WAX	1,50	0,10	0,10
	K	BPX5	28,90	0,25	0,25
		SolGel-WAX	1,21	0,25	0,25
	D	BPX5	29,95	0,25	0,25
		SLB-IL59	2,00	0,10	0,08
MP/P	I	BPX50	29,74	0,25	0,25
		SolGel-WAX	1,56	0,10	0,10
	J	BPX50	29,74	0,25	0,25
		SolGel-WAX	1,21	0,25	0,25
MP/NP	H	BPX50	29,74	0,25	0,25
		BPX5	1,31	0,10	0,10
	L	BPX50	27,00	0,25	0,25
		BPX5	1,31	0,25	0,25
P/MP	E	SLB-IL59	27,90	0,25	0,25
		BPX50	1,21	0,10	0,10
P/NP	G	SolGel-WAX	29,85	0,25	0,25
		BPX5	1,31	0,10	0,10

NP – nepolární, MP – středně polární, P – polární

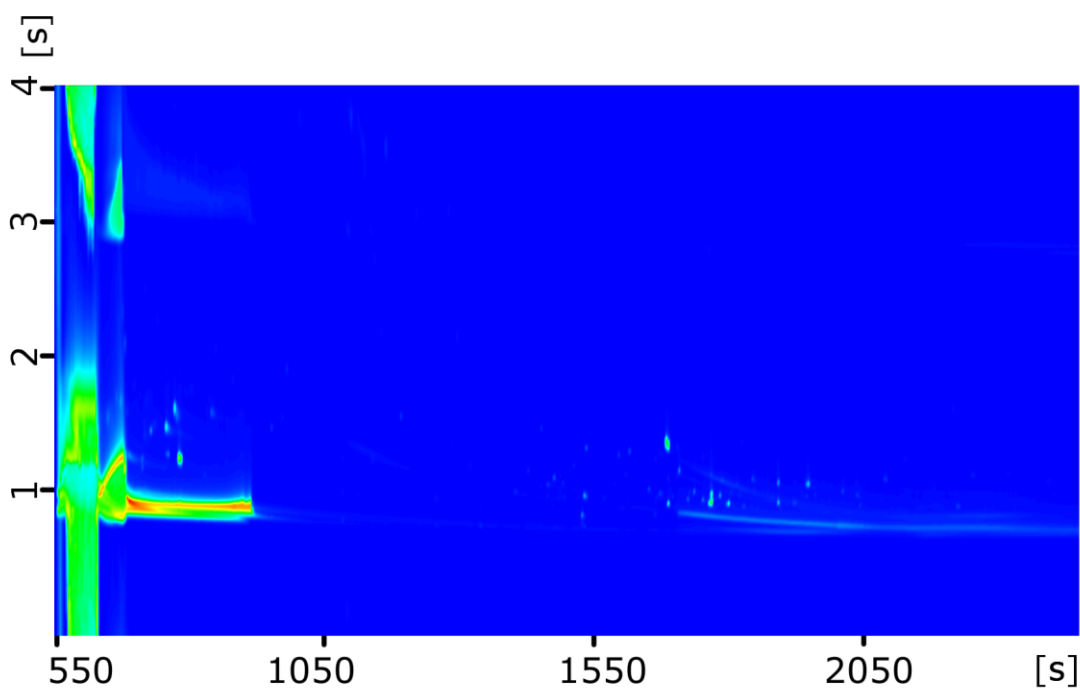
4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace kolonového uspořádání

4.1.1 Neúspěšné separace

4.1.1.1 Kolonové uspořádání SLB-IL59/ BPX50

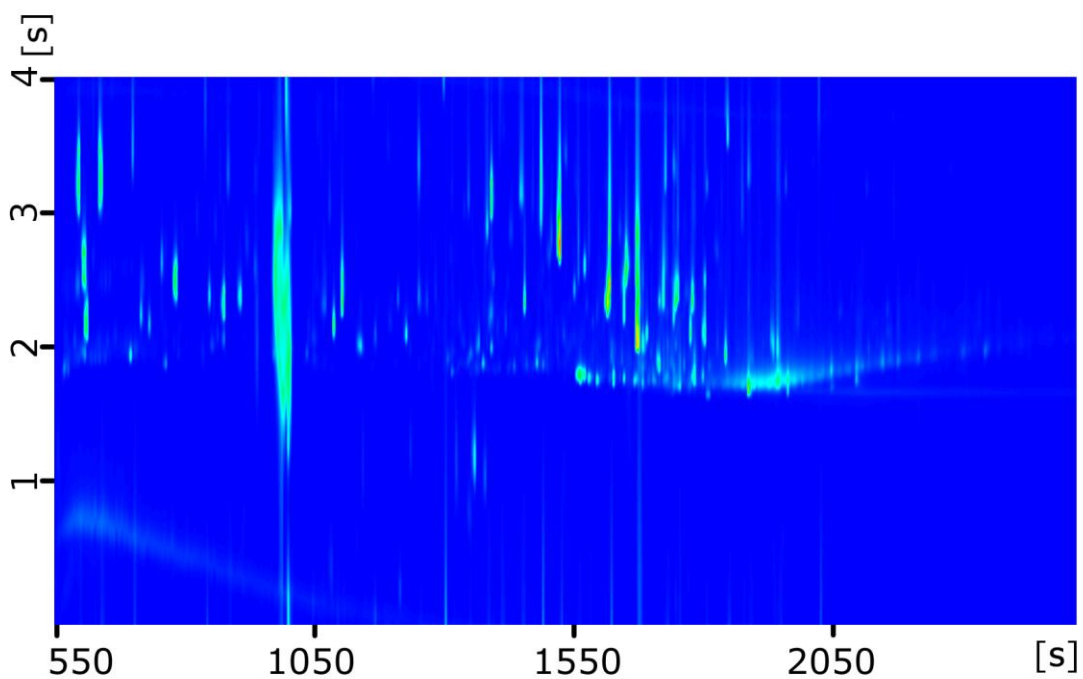
Analýza probíhala na kolonovém uspořádání SLB-IL59 (27,90 m × 0,25 mm × 0,20 μm) a BPX50 (1,21 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Z Obr. 12 je patrné, že separace neproběhla. Iontová kapalina použitá v první dimenzi je selektivní pro středně polární a nepolární analyty, zadržuje tedy většinu derivatizovaných analytů ve vzorku moči, které jsou po silylaci nepolární.



Obr. 12 Obrysový graf pro set SLB-IL59 (27,90 m × 0,25 mm × 0,20 μm) a BPX50 (1,21 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

4.1.1.2 Kolonové uspořádání BPX5/SLB-IL59

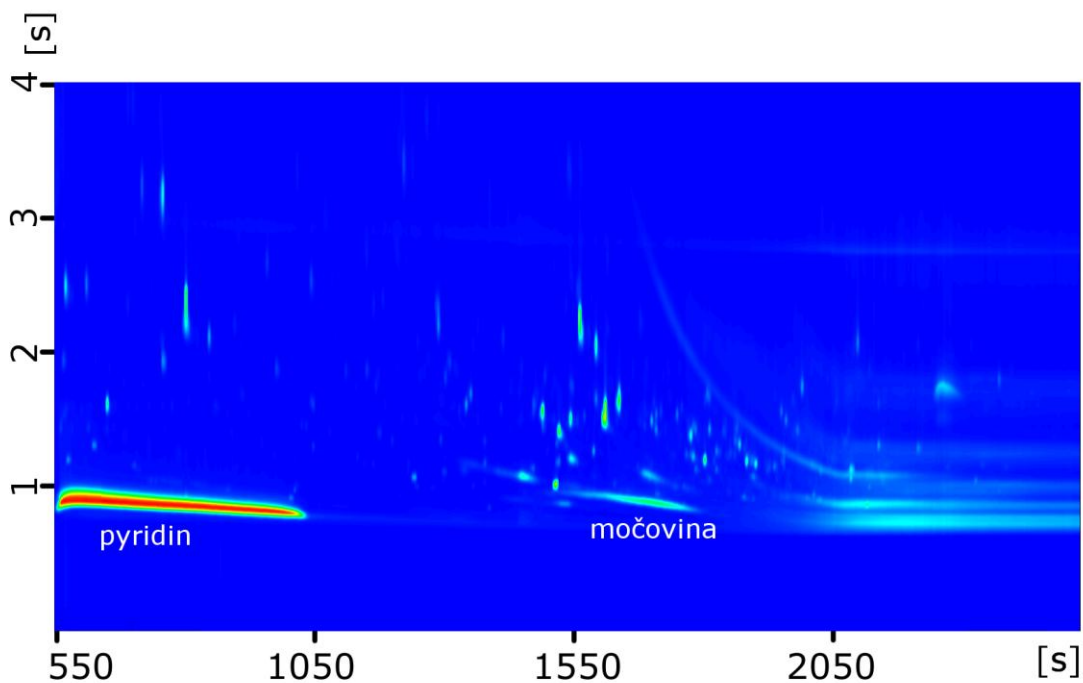
Analýza probíhala na kolonovém uspořádání BPX5 ($29,95 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$) a SLB-IL59 ($2,00 \text{ m} \times 0,10 \text{ mm} \times 0,08 \text{ }\mu\text{m}$). Jako kolona druhé dimenze byla použita iontová kapalina a stejně jako v předchozí analýze nedochází k separaci (Obr. 13). Navíc dochází k přetížení sekundární kolony vzhledem k malé tloušťce filmu stacionární fáze.



Obr. 13 Obrysový graf pro set BPX5 ($29,95 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$) a SLB-IL59 ($2,00 \text{ m} \times 0,10 \text{ mm} \times 0,08 \text{ }\mu\text{m}$).

4.1.1.3 Kolonové uspořádání SolGel-WAX/BPX5

Analýza probíhala na kolonovém uspořádání SolGel-WAX ($29,85 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$) a BPX5 ($1,31 \text{ m} \times 0,10 \text{ mm} \times 0,10 \text{ }\mu\text{m}$). Toto uspořádání příliš zadržuje rozpouštědla (pyridin) a močovinu (viz Obr. 14).



Obr. 14 Obrysový graf pro set SolGel-WAX ($29,85 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$) a BPX5 ($1,31 \text{ m} \times 0,10 \text{ mm} \times 0,10 \text{ }\mu\text{m}$)

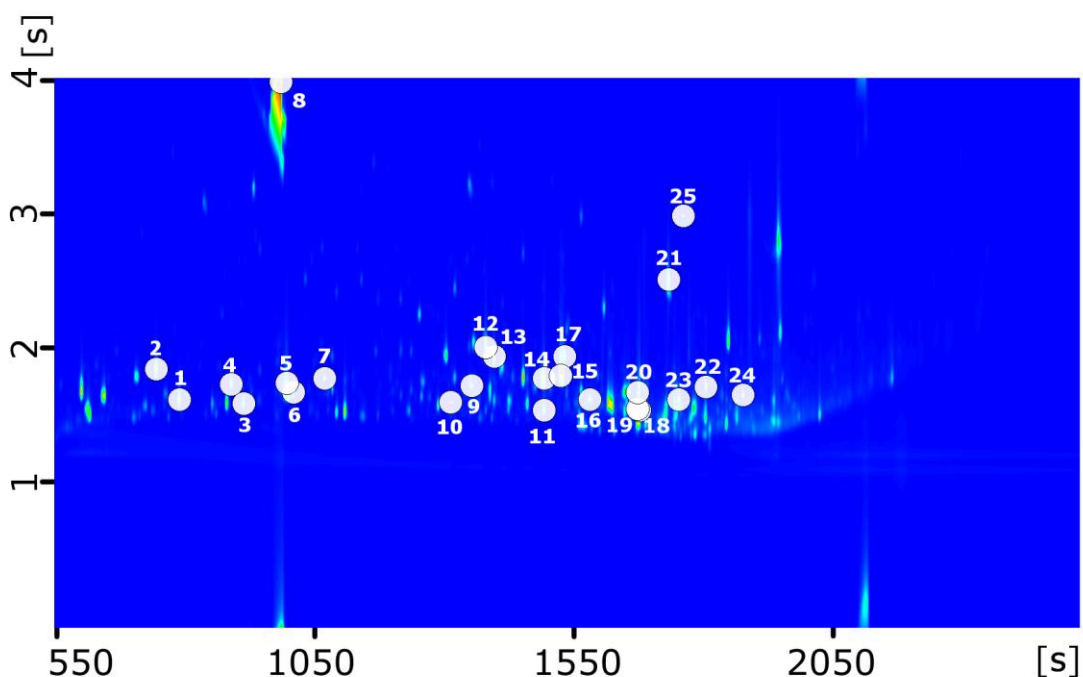
4.1.2 Úspěšné separace

Pokud byla separace úspěšná, byl u jednotlivých kolonových uspořádání hodnocen stupeň pokrytí separačního prostoru. Z analýzy na kolonovém uspořádání BPX5/SolGel-WAX bylo vybráno 25 analytů tak, aby co nejlépe pokrývaly separační prostor (viz Obr. 15). Tytéž analyty byly vybrány i pro hodnocení ostatních uspořádání. Ortogonalita jednotlivých kolonových uspořádání byla hodnocena pomocí podmíněné entropie.

4.1.2.1 Kolonové uspořádání BPX5/SolGel-WAX (1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

Analýza probíhala na kolonovém uspořádání BPX5 (29,95 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a SolGel-WAX (1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm).

Analyty spolu s retenčními časy jsou uvedeny v Obr. 4, jejich chromatografický záznam na Obr. 15.



Obr. 15 Contour plot pro set BPX5/SolGel-WAX (1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm; 1 – kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová; 2 – kyselina šťavelová; 3 – kyselina 2-ethyl-3 hydroxypropionová; 4 – kyselina methylpropandiová; 5 – kyselina trihydrogenfosforečná; 6 – kyselina ethylpropandiová; 7 – kyselina butandiová; 8 – močovina; 9 – kyselina adipová; 10 – kyselina jablečná; 11 – kyselina vinná; 12 – 5-oxo-L-prolin; 13 – 4-fenylbutyrát; 14 – 2 ketoglutarát; 15 – kyselina-4-hydroxybenzenoctová; 16 – kyselina suberová; 17 – kyselina-2,5-furandikarboxylová; 18 – kyselina citrónová; 19 – kyselina azealová; 20 – kyselina p hydroxyskořicová; 21 – kyselina hippurová; 22 – kyselina 1-H-indol-3-octová; 23 – kyselina vanilylpropionová; 24 – kyselina ferulová; 25 – kofein)

Tab. 4 Vybrané analyty a jejich retenční hodnoty pro set BPX5/SolGel-WAX (1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

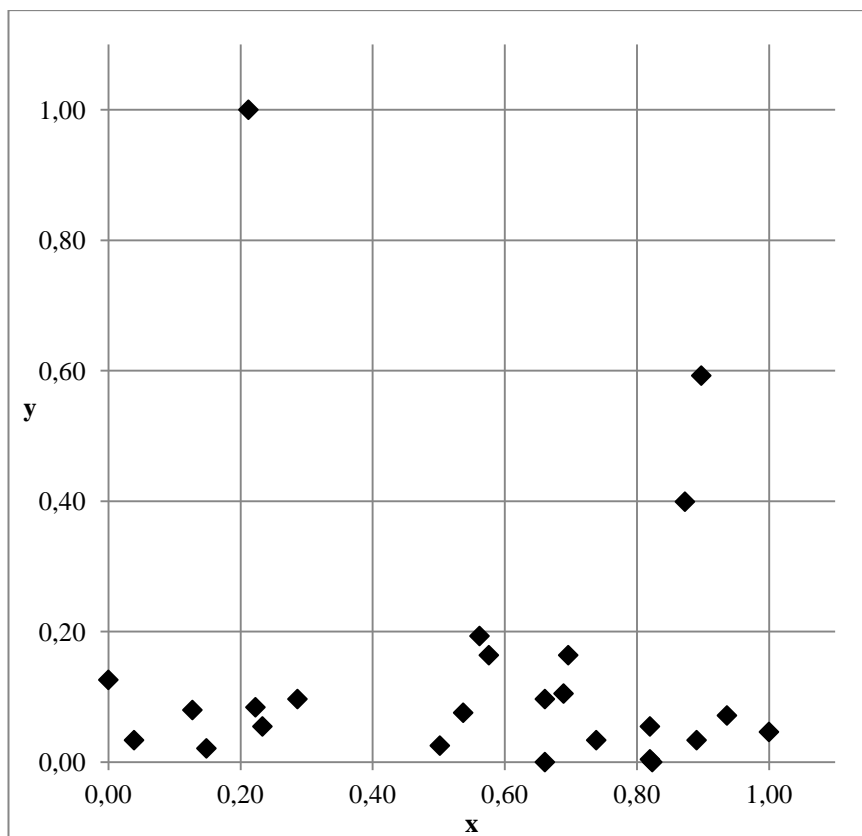
název	1D	X _{1st}	2D	X _{2nd}
1 kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová	790	0,04	1,66	0,03
2 kyselina šťavelová (oxalát)	746	0,00	1,88	0,13
3 Kyselina 2-ethyl-3-hydroxy-propionová	914	0,15	1,63	0,02
4 kyselina methylpropandiová	890	0,13	1,77	0,08
5 Kyselina trihydrogenfosforečná	998	0,22	1,78	0,08
6 kyselina ethylpropandiová	1010	0,23	1,71	0,05
7 kyselina butandiová	1070	0,29	1,81	0,10
8 močovina	986	0,21	3,96	1,00
9 kyselina adipová	1354	0,54	1,76	0,08
10 kyselina jablečná	1314	0,50	1,64	0,03
11 kyselina vinná	1494	0,66	1,58	0,00
12 5-oxo-L-prolin	1382	0,56	2,04	0,19
13 4-fenyl-butyrát	1398	0,58	1,97	0,16
14 2-ketoglutarát	1494	0,66	1,81	0,10
15 kyselina-4-hydroxy-benzenoctová	1526	0,69	1,83	0,11
16 kyselina suberová	1582	0,74	1,66	0,03
17 kyselina-2,5-furan-dikarboxylová	1534	0,70	1,97	0,16
18 kyselina citrónová	1678	0,82	1,58	0,00
19 kyselina azealová	1674	0,82	1,59	0,00
20 kyselina p-hydroxy-skořicová	1674	0,82	1,71	0,05
21 Kyselina hippurová (hippurát)	1734	0,87	2,53	0,40
22 kyselina 1-H-indol-3-octová	1806	0,94	1,75	0,07
23 kyselina vanilylpropionová	1754	0,89	1,66	0,03
24 kyselina ferulová	1878	1,00	1,69	0,05
25 kofein	1762	0,90	2,99	0,59

Hodnoty mrtvých časů v první a druhé dimenzi normalizovány na velikost separačního prostoru dané dimenze, aby bylo možné je vzájemně porovnat, a to pro každý analyt zvlášť.

$$X_{1st} = \frac{R_{t, fosfát} - R_{t, min}}{R_{t, max} - R_{t, min}} = \frac{998 - 746}{1762 - 746} = 0,22$$

$$X_{2nd} = \frac{R_{t, fosfát} - R_{t, min}}{R_{t, max} - R_{t, min}} = \frac{1,78 - 1,58}{3,96 - 1,58} = 0,08$$

Na základě normalizovaných hodnot byl sestaven graf charakterizující pokrytí separačního prostoru (Obr. 16).



Obr. 16: Graf pokrytí separačního prostoru pro set BPX5/SolGel-WAX (1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm): normalizovaná data retenčních časů a jejich rozmístění po ploše

Odtud byly vypočítány entropie jednotlivých dimenzí $H(X)$, $H(Y)$, sdružená entropie $H(X,Y)$, podmíněná entropie $H(X/Y)$ a ortogonalita O .

$$H(X) = 3 \left(\frac{4}{25} \log_2 \frac{4}{25} \right) + \left(-\frac{5}{25} \log_2 \frac{5}{25} \right) + \left(-\frac{8}{25} \log_2 \frac{8}{25} \right) = 2,24$$

$H(Y)$:

$$H(Y) = \frac{22}{25} \log_2 \frac{22}{25} + \frac{0,5}{25} \log_2 \frac{0,5}{25} + \frac{1,5}{25} \log_2 \frac{1,5}{25} + \frac{1}{25} \log_2 \frac{1}{25} = 0,70$$

$H(X,Y)$:

$$H(X,Y) = 2 \left(\frac{4}{25} \log_2 \frac{4}{25} \right) + \frac{3}{25} \log_2 \frac{3}{25} + \frac{5}{25} \log_2 \frac{5}{25} + \frac{6}{25} \log_2 \frac{6}{25} + \frac{0,5}{25} \log_2 \frac{0,5}{25} + \frac{1,5}{25} \log_2 \frac{1,5}{25} + \frac{1}{25} \log_2 \frac{1}{25} = 2,70$$

$$H\left(\frac{X}{Y}\right) = 2,70 - 2,24 = 0,46$$

$$O\% = \frac{0,46}{0,70} \times 100 = 65,71 \%$$

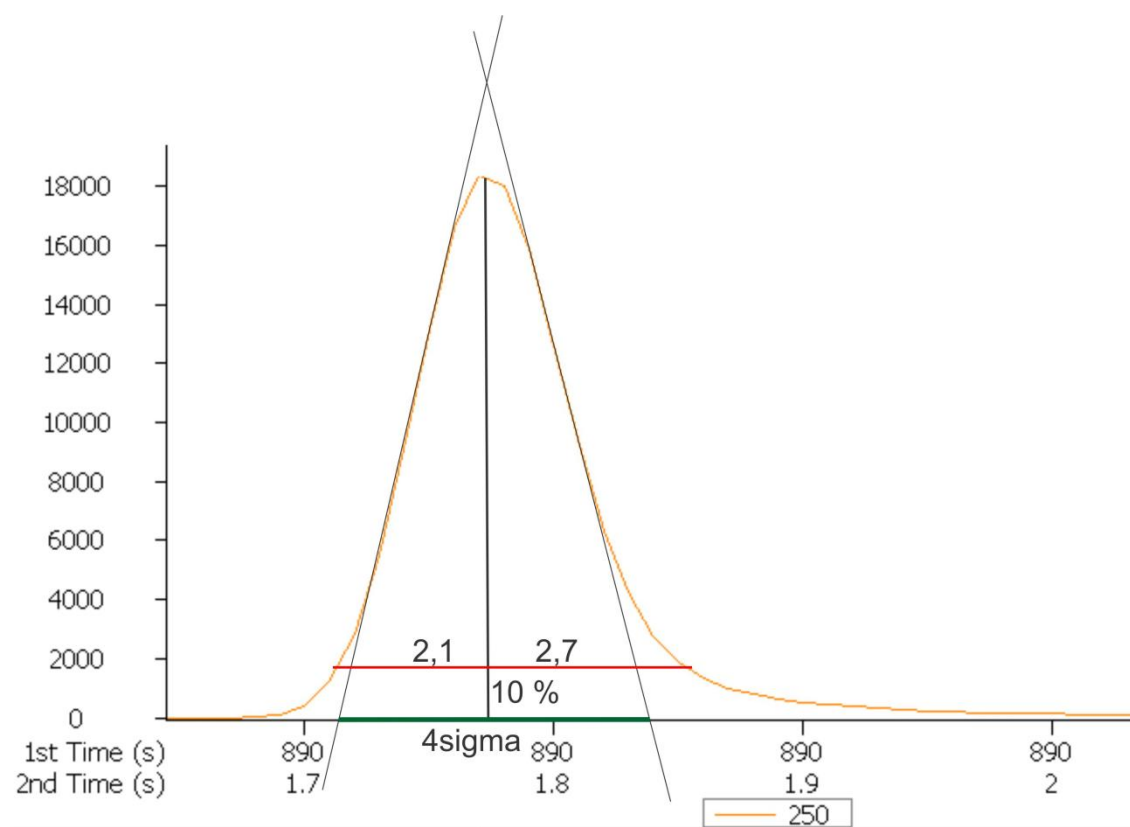
Ortogonalita pro set BPX5/SolGel-WAX(1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm) je 65,71 %.

Dalším hodnoceným parametrem byla šířka píků při základně (4σ), a jejich asymetrie (hodnoceno v 10 % výšky píku; viz Obr. 17). Pro srovnání byl vybrán pík značené methylmalonové kyseliny, která je blízko močoviny. Je-li separace úspěšná, je značená methylmalonová kyselina od močoviny separována a její pík je úzký, stejně jako píky ostatních analytů. Šířka i asymetrie píku byla počítána při charakteristické hmotě deuterované kyseliny methylmalonové (m/z 250).

Asymetrie píku značené methylmalonové kyseliny

$$As = \frac{2,7}{2,1} = 1,29$$

Pro hodnoty As v rozmezí 0,8 až 1,2 je pík považován za symetrický. Šířka píku $w_{4\sigma} = 0,13$ s.



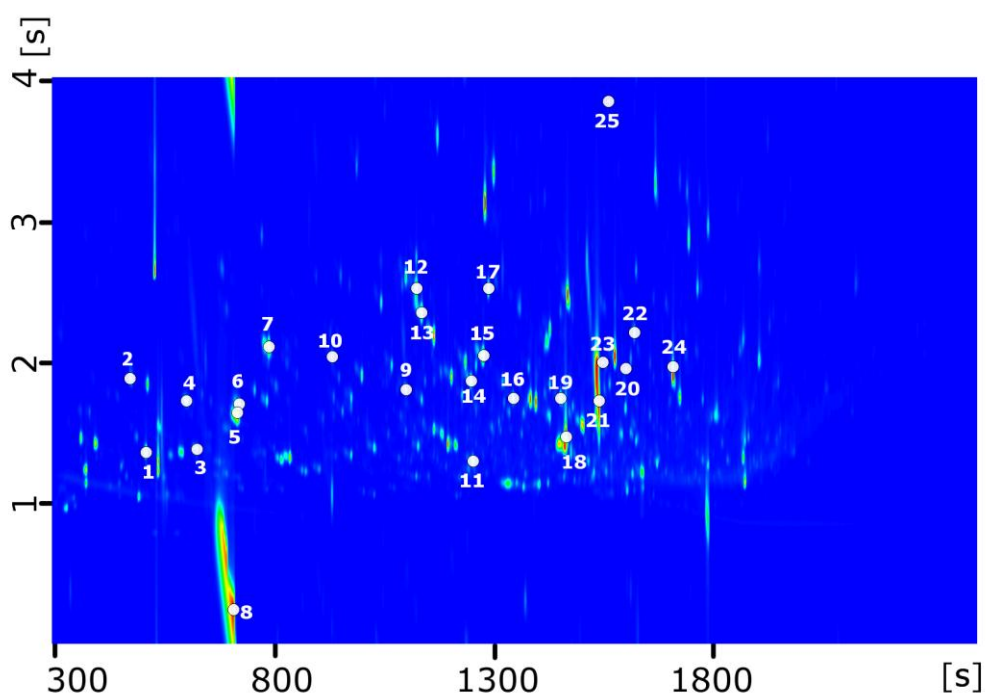
Obr. 17 Ilustrační obrázek výpočtu šířky a asymetrie píku

4.1.2.2 Kolonové uspořádání BPX5/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

Analýza probíhala na kolonovém uspořádání BPX5 (28,90 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm).

Analyty spolu s retetnčními časy jsou uvedeny v Tab. 5, jejich chromatografický záznam na Obr. 18.

Ortogonalita pro set BPX5/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm) je 76,39 %. Symetrie $A_s = 1,02$. Šířka píku $w_{4\sigma} = 0,13$ s.



Obr. 18 Obrysový graf pro set BPX5/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm; **1** – kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová; **2** – kyselina šťavelová; **3** – kyselina 2 ethyl-3-hydroxypropionová; **4** – kyselina methylpropandiová; **5** – kyselina trihydrogenfosforečná; **6** – kyselina ethylpropandiová; **7** – kyselina butandiová; **8** – močovina; **9** – kyselina adipová; **10** – kyselina jablečná; **11** – kyselina vinná; **12** – 5-oxo-L-prolin; **13** – 4-fenylbutyrát; **14** – 2-ketoglutarát; **15** – kyselina-4-hydroxybenzenoctová; **16** – kyselina suberová; **17** – kyselina-2,5-furandikarboxylová; **18** – kyselina citrónová; **19** – kyselina azealová; **20** – kyselina p-hydroxyskořicová; **21** – kyselina hippurová; **22** – kyselina 1-H-indol-3-octová; **23** – kyselina vanilylpropionová; **24** – kyselina ferulová; **25** – kofein)

Tab. 5 Vybrané analyty a jejich retenční hodnoty pro set BPX5/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

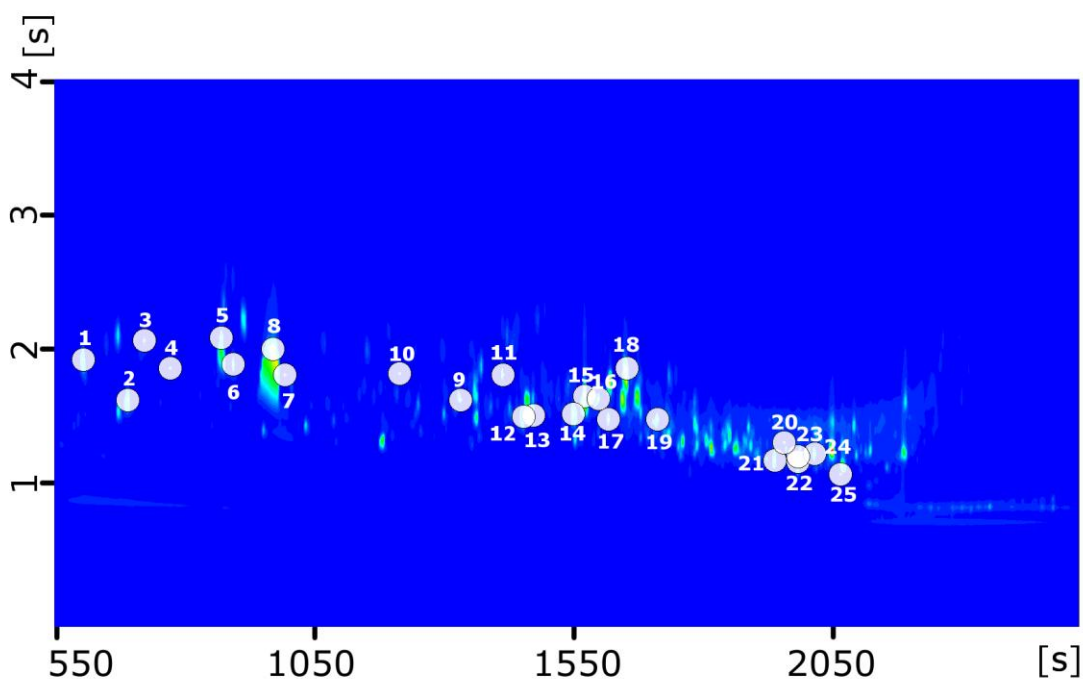
název	1D	X _{1st}	2D	X _{2nd}
1 kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová	516	0,03	1,35	0,02
2 kyselina ethandiová	480	0	1,87	0,2
3 kyselina 2-ethyl-3-hydroxy-propionová	632	0,12	1,37	0,03
4 kyselina methyl-propandiová	608	0,1	1,71	0,14
5 kyselina trihydrogenfosforečná	724	0,2	1,63	0,11
6 kyselina ethyl-propandiová	728	0,2	1,69	0,14
7 kyselina butandiová	796	0,26	2,09	0,27
8 močovina	716	0,19	4,25	1
9 adipát	1108	0,51	1,79	0,17
10 malát	940	0,37	2,02	0,25
11 kyselina L-(+)-tartarová	1260	0,63	1,29	0
12 5-oxo-L-prolin	1132	0,53	2,5	0,41
13 4-fenyl-butyrát	1144	0,54	2,33	0,35
14 ketoglutarát	1256	0,63	1,85	0,19
15 kyselina-4-hydroxy-benzenoctová	1284	0,65	2,03	0,25
16 suberát	1352	0,71	1,73	0,15
17 kyselina-2,5-furan-karboxylová	1296	0,66	2,5	0,41
18 kyselina citrónová	1472	0,8	1,46	0,06
19 kyselina azealová	1460	0,79	1,73	0,15
20 kyselina p-hydroxy-skořicová	1608	0,91	1,94	0,22
21 hipurát	1548	0,86	1,71	0,14
22 kyselina 1-H-indol-3-octová	1628	0,93	2,19	0,3
23 kyselina vanilylpropionová	1556	0,87	1,98	0,23
24 kyselina ferulová	1716	1	1,95	0,22
25 kofein	1568	0,88	3,81	0,85

4.1.2.3 Kolonové uspořádání BPX50/BPX5 (1,31 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

Analýza probíhala na kolonovém uspořádání BPX50 (29,74 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a BPX5 (1,31 m × 0,10 mm × 0,10 μm).

Analyty spolu s retetnčními časy jsou uvedeny v Tab. 6, jejich chromatografický záznam na Obr. 19.

Ortogonalita setu BPX50/BPX5 (1,31 m × 0,10 mm × 0,10 μm) je 48,85 %. Symetrie $A_s = 1,04$. Šířka píku $w_{4\sigma} = 0,19$ s.



Obr. 19. Obrysový graf pro set BPX50/BPX5 (1,31 m × 0,10 mm × 0,10 μm; **1** – kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová; **2** – kyselina šťavelová; **3** – kyselina 2-ethyl-3-hydroxypropionová; **4** – kyselina methylpropandiová; **5** – kyselina trihydrogenfosforečná; **6** – kyselina ethylpropandiová; **7** – kyselina butandiová; **8** – močovina; **9** – kyselina adipová; **10** – kyselina jablečná; **11** – kyselina vinná; **12** – 5-oxo-L-prolin; **13** – 4-fenylbutyrát; **14** – 2-ketoglutarát; **15** – kyselina-4-hydroxybenzenoctová; **16** – kyselina suberová; **17** – kyselina-2,5-furandikarboxylová; **18** – kyselina citrónová; **19** – kyselina azealová; **20** – kyselina p-hydroxyskořicová; **21** – kyselina hippurová; **22** – kyselina 1-H-indol-3-octová; **23** – kyselina vanilylpropionová; **24** – kyselina ferulová; **25** – kofein)

Tab. 6 Vybrané analyty a jejich retenční hodnoty pro set BPX50/BPX5 (1,31 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

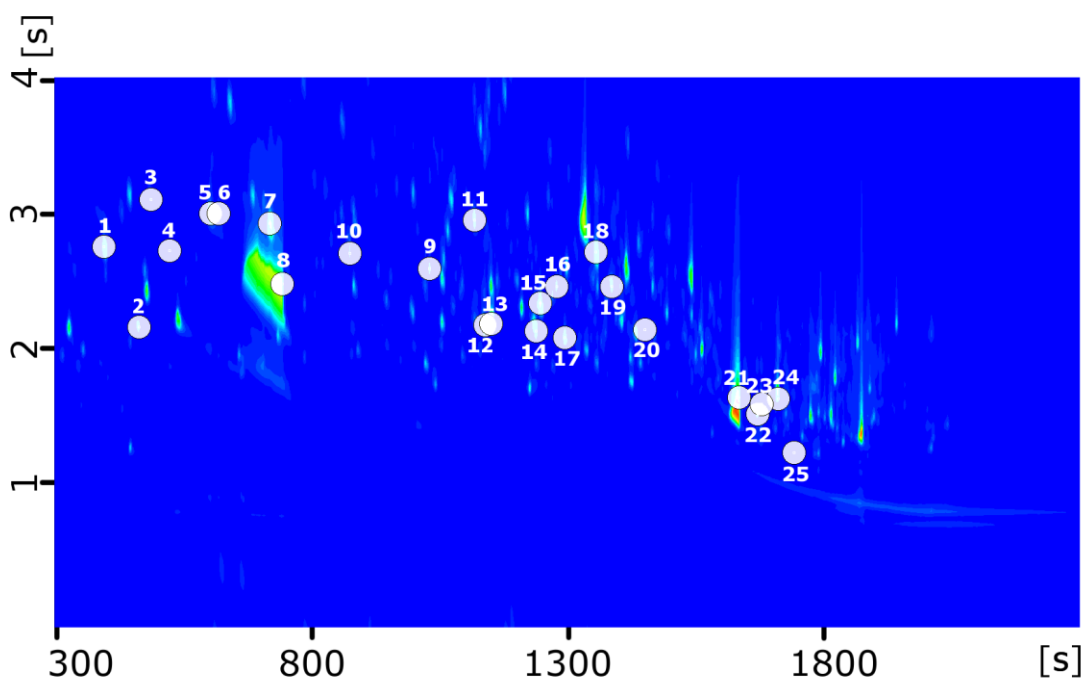
název	1D	X _{1st}	2D	X _{2nd}
1 kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová	602	0,00	1,94	0,84
2 kyselina ethandiová	678	0,06	1,65	0,55
3 kyselina 2-ethyl-3-hydroxy-propionová	706	0,08	2,08	0,98
4 kyselina methyl-propandiová	750	0,11	1,88	0,78
5 kyselina trihydrogenfosforečná	838	0,18	2,10	1,00
6 kyselina ethyl-propandiová	858	0,20	1,91	0,81
7 kyselina butandiová	946	0,27	1,83	0,73
8 močovina	926	0,25	2,02	0,92
9 adipát	1246	0,50	1,65	0,55
10 malát	1142	0,42	1,84	0,74
11 kyselina L-(+)-tartarová	1318	0,55	1,83	0,73
12 5-oxo-L-prolin	1354	0,58	1,53	0,42
13 4-fenyl-butyrát	1370	0,59	1,54	0,43
14 ketoglutarát	1438	0,65	1,55	0,44
15 kyselina-4-hydroxy-benzenoctová	1458	0,66	1,68	0,58
16 suberát	1482	0,68	1,66	0,56
17 kyselina-2,5-furan-karboxylová	1498	0,69	1,51	0,40
18 kyselina citrónová	1530	0,72	1,88	0,78
19 kyselina azealová	1582	0,76	1,51	0,40
20 kyselina p-hydroxy-skořicová	1798	0,93	1,34	0,23
21 hipurát	1782	0,91	1,21	0,10
22 kyselina 1-H-indol-3-octová	1822	0,94	1,20	0,09
23 kyselina vanilylpropionová	1822	0,94	1,24	0,13
24 kyselina ferulová	1850	0,97	1,26	0,15
25 kofein	1894	1,00	1,11	0,00

4.1.2.4 Kolonové uspořádání BPX50/BPX5 (1,31 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

Analýza probíhala na kolonovém uspořádání BPX50 (27,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a BPX5 (1,31 m × 0,25 mm × 0,25 μm).

Analyty spolu s retenčními časy jsou uvedeny v Tab. 7; jejich chromatografický záznam na Obr. 20.

Ortogonalita pro set BPX50/BPX5 (1,31 m × 0,25 mm × 0,25 μm) je 49,54 %. Symetrie $A_s = 1,07$. Šířka píku $w_{4\sigma} = 0,73$ s.



Obr. 20 Obrysový graf pro set BPX50/BPX5(1,31 m × 0,25 mm × 0,25 μm; **1** – kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová; **2** – kyselina šťavelová; **3** – kyselina 2-ethyl-3-hydroxypropionová; **4** – kyselina methylpropandiová; **5** – kyselina trihydrogenfosforečná; **6** – kyselina ethylpropandiová; **7** – kyselina butandiová; **8** – močovina; **9** – kyselina adipová; **10** – kyselina jablečná; **11** – kyselina vinná; **12** – 5-oxo-L-prolin; **13** – 4-fenylbutyrát; **14** – 2 ketoglutarát; **15** – kyselina-4-hydroxybenzenoctová; **16** – kyselina suberová; **17** – kyselina-2,5-furandikarboxylová; **18** – kyselina citrónová; **19** – kyselina azealová; **20** – kyselina p hydroxyskořicová; **21** – kyselina hippurová; **22** – kyselina 1-H-indol-3-octová; **23** – kyselina vanilylpropionová; **24** – kyselina ferulová; **25** – kofein)

Tab. 7 Vybrané analyty a jejich retenční hodnoty pro set BPX50/BPX5 (1,31 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

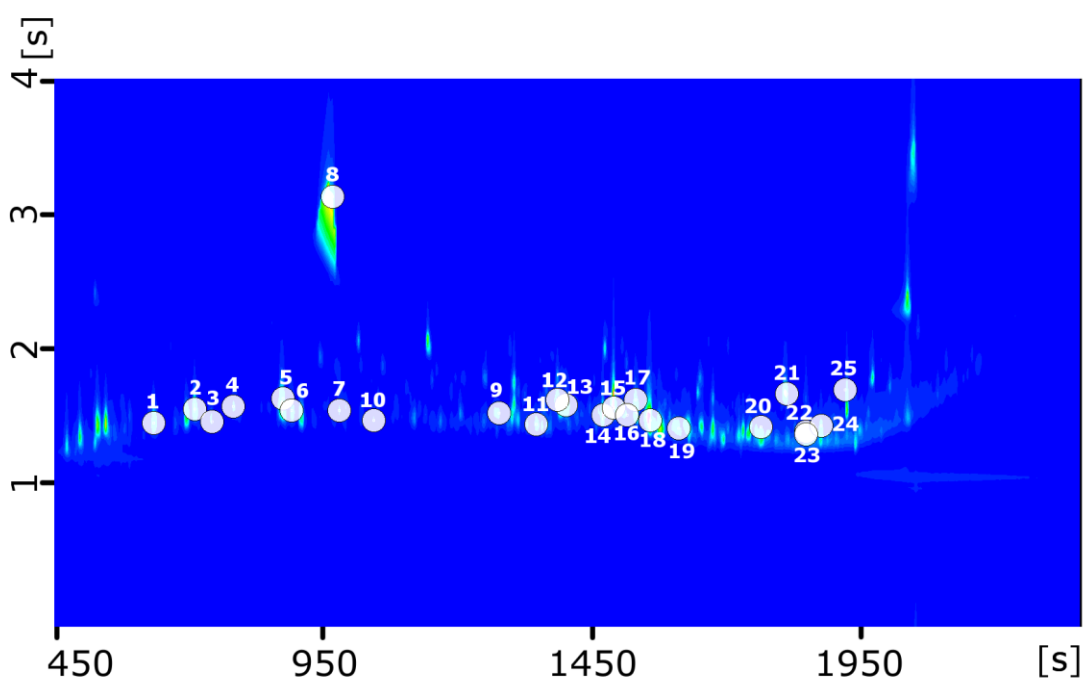
název	1D	X _{1st}	2D	X _{2nd}
1 kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová	396	0,00	2,76	0,81
2 kyselina ethandiová	464	0,05	2,18	0,50
3 kyselina 2-ethyl-3-hydroxy-propionová	488	0,07	3,10	1,00
4 kyselina methyl-propandiová	524	0,09	2,73	0,80
5 kyselina trihydrogenfosforečná	604	0,15	3,00	0,95
6 kyselina ethyl-propandiová	620	0,17	3,00	0,95
7 kyselina butandiová	720	0,24	2,93	0,91
8 močovina	744	0,26	2,49	0,67
9 adipát	1032	0,47	2,60	0,73
10 malát	876	0,36	2,71	0,79
11 kyselina L-(+)-tartarová	1120	0,54	2,95	0,92
12 5-oxo-L-prolin	1140	0,55	2,19	0,50
13 4-fenyl-butyát	1152	0,56	2,20	0,51
14 ketoglutarát	1240	0,63	2,15	0,48
15 kyselina-4-hydroxy-benzenoctová	1248	0,63	2,35	0,59
16 suberát	1280	0,66	2,47	0,66
17 kyselina-2,5-furan-karboxylová	1296	0,67	2,10	0,45
18 kyselina citrónová	1356	0,71	2,72	0,79
19 kyselina azealová	1388	0,74	2,47	0,66
20 kyselina p-hydroxy-skořicová	1452	0,78	2,16	0,49
21 hipurát	1636	0,92	1,67	0,22
22 kyselina 1-H-indol-3-octová	1672	0,95	1,55	0,15
23 kyselina vanilylpropionová	1680	0,95	1,62	0,19
24 kyselina ferulová	1712	0,98	1,66	0,21
25 kofein	1744	1,00	1,27	0,00

4.1.2.5 Kolonové uspořádání BPX50/SolGel-WAX (1,56 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

Analýza probíhala na kolonovém uspořádání BPX50 (29,74 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a SolGel-WAX (1,56 m × 0,10 mm × 0,10 μm).

Analyty spolu s retenčními časy jsou uvedeny v Tab. 8; jejich chromatografický záznam na Obr. 21.

Ortogonalita pro set BPX50/SolGel-WAX (1,56 m × 0,10 mm × 0,10 μm) je 48 %. Symetrie $A_s = 1,75$. Šířka píku $w_{4\sigma} = 0,22$ s.



Obr. 21: Obrysový graf pro set BPX50/SolGel-WAX (1,56 m × 0,10 mm × 0,10 μm; 1 – kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová; 2 – kyselina šťavelová; 3 – kyselina 2-ethyl-3-hydroxypropionová; 4 – kyselina methylpropandiová; 5 – kyselina trihydrogenfosforečná; 6 – kyselina ethylpropandiová; 7 – kyselina butandiová; 8 – močovina; 9 – kyselina adipová; 10 – kyselina jablečná; 11 – kyselina vinná; 12 – 5-oxo-L-prolin; 13 – 4-fenylbutyrát; 14 – 2-ketoglutarát; 15 – kyselina-4-hydroxybenzenoctová; 16 – kyselina suberová; 17 – kyselina-2,5-furandikarboxylová; 18 – kyselina citrónová; 19 – kyselina azealová; 20 – kyselina p-hydroxyskořicová; 21 – kyselina hippurová; 22 – kyselina 1-H-indol-3-octová; 23 – kyselina vanilylpropionová; 24 – kyselina ferulová; 25 – kofein)

Tab. 8 Vybrané analyty a jejich retenční hodnoty pro set BPX50/SolGel-WAX (1,56 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

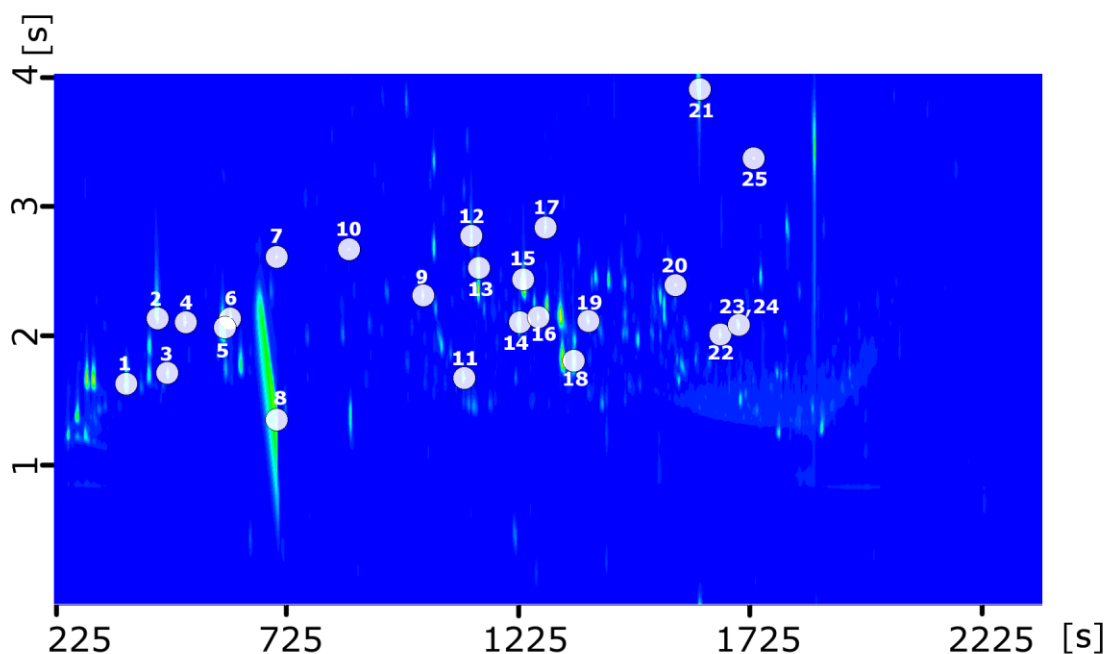
název	1D	X _{1st}	2D	X _{2nd}
1 kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová	634	0,00	1,49	0,05
2 kyselina ethandiová	710	0,06	1,59	0,10
3 kyselina 2-ethyl-3-hydroxy-propionová	742	0,08	1,50	0,05
4 kyselina methyl-propandiová	782	0,12	1,61	0,12
5 kyselina trihydrogenfosforečná	874	0,19	1,67	0,15
6 kyselina ethyl-propandiová	890	0,20	1,58	0,10
7 kyselina butandiová	978	0,27	1,58	0,10
8 močovina	966	0,26	3,13	1,00
9 adipát	1274	0,50	1,56	0,09
10 malát	1042	0,32	1,51	0,06
11 kyselina L-(+)-tartarová	1342	0,55	1,48	0,04
12 5-oxo-L-prolin	1382	0,58	1,66	0,15
13 4-fenyl-butyát	1398	0,60	1,62	0,12
14 ketoglutarát	1466	0,65	1,55	0,08
15 kyselina-4-hydroxy-benzenoctová	1486	0,67	1,60	0,11
16 suberát	1510	0,68	1,55	0,08
17 kyselina-2,5-furan-karboxylová	1526	0,70	1,66	0,15
18 kyselina citrónová	1554	0,72	1,51	0,06
19 kyselina azealová	1606	0,76	1,45	0,02
20 kyselina p-hydroxy-skořicová	1758	0,88	1,46	0,03
21 hipurát	1806	0,92	1,70	0,17
22 kyselina 1-H-indol-3-octová	1842	0,94	1,43	0,01
23 kyselina vanilylpropionová	1842	0,94	1,41	0,00
24 kyselina ferulová	1870	0,97	1,47	0,03
25 kofein	1914	1,00	1,73	0,19

4.1.2.6 Kolonové uspořádání BPX50/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

Analýza probíhala na kolonovém uspořádání BPX50 (29,74 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm).

Analyty spolu s retenčními časy jsou uvedeny v Tab. 9 Vybrané analyty a jejich retenční hodnoty pro set Tab. 9, jejich chromatografický záznam na Obr. 22.

Ortogonalita pro set BPX50/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm) je 73,94 %. Symetrie $A_s = 1,58$. Šířka píku $w_{4\sigma} = 0,21$ s.



Obr. 22: Obrysový graf pro set BPX50/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm; **1** – kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová; **2** – kyselina šťavelová; **3** – kyselina 2-ethyl-3-hydroxypropionová; **4** – kyselina methylpropandiová; **5** – kyselina trihydrogenfosforečná; **6** – kyselina ethylpropandiová; **7** – kyselina butandiová; **8** – močovina; **9** – kyselina adipová; **10** – kyselina jablečná; **11** – kyselina vinná; **12** – 5-oxo-L-prolin; **13** – 4-fenylbutyrát; **14** – 2-ketoglutarát; **15** – kyselina-4-hydroxybenzenoctová; **16** – kyselina suberová; **17** – kyselina-2,5-furandikarboxylová; **18** – kyselina citrónová; **19** – kyselina azealová; **20** – kyselina p-hydroxyskořicová; **21** – kyselina hippurová; **22** – kyselina 1-H-indol-3-octová; **23** – kyselina vanilylpropionová; **24** – kyselina ferulová; **25** – kofein)

Tab. 9 Vybrané analyty a jejich retenční hodnoty pro set BPX50/SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

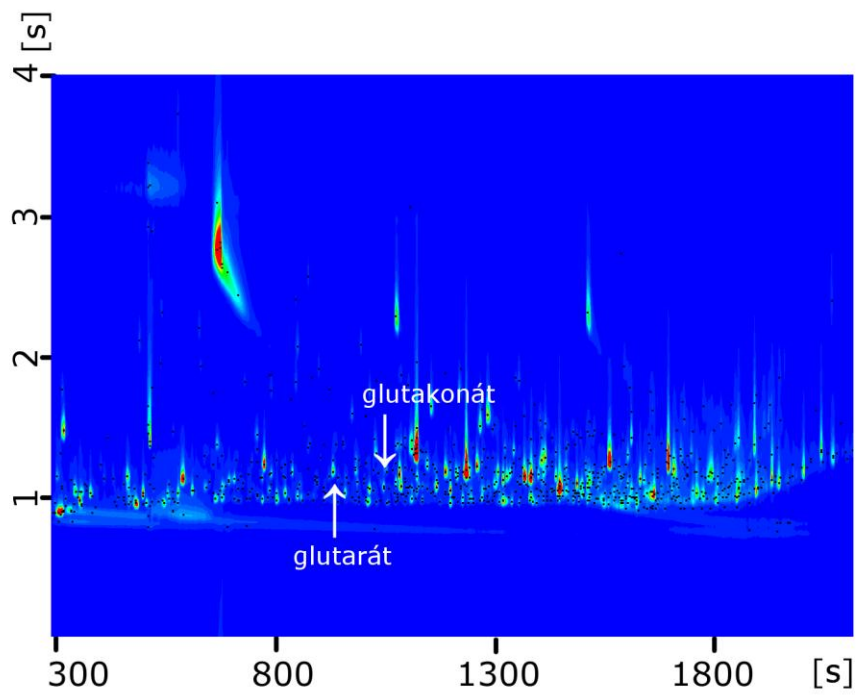
název	1D	X _{1st}	2D	X _{2nd}
1 kyselina 2-methyl-3-hydroxypropanová	381	0,00	1,66	0,11
2 kyselina ethandiová	449	0,05	2,15	0,31
3 kyselina 2-ethyl-3-hydroxy-propionová	469	0,07	1,74	0,14
4 kyselina methyl-propandiová	509	0,09	2,12	0,29
5 kyselina trihydrogenfosforečná	593	0,16	2,08	0,28
6 kyselina ethyl-propandiová	605	0,17	2,15	0,31
7 kyselina butandiová	705	0,24	2,61	0,49
8 močovina	705	0,24	1,39	0,00
9 adipát	1021	0,47	2,32	0,38
10 malát	861	0,36	2,67	0,52
11 kyselina L-(+)-tartarová	1109	0,54	1,70	0,13
12 5-oxo-L-prolin	1125	0,55	2,77	0,56
13 4-fenyl-butyřát	1141	0,56	2,53	0,46
14 ketoglutarát	1229	0,63	2,12	0,29
15 kyselina-4-hydroxy-benzenoctová	1237	0,63	2,44	0,42
16 suberát	1269	0,66	2,16	0,31
17 kyselina-2,5-furan-karboxylová	1285	0,67	2,83	0,58
18 kyselina citrónová	1345	0,71	1,83	0,18
19 kyselina azealová	1377	0,74	2,13	0,30
20 kyselina p-hydroxy-skořicová	1565	0,88	2,40	0,41
21 hipurát	1617	0,91	3,87	1,00
22 kyselina 1-H-indol-3-octová	1661	0,95	2,03	0,26
23 kyselina vanilylpropionová	1701	0,98	2,10	0,29
24 kyselina ferulová	1701	0,98	2,10	0,29
25 kofein	1733	1,00	3,35	0,79

4.2 Glutarové acidurie

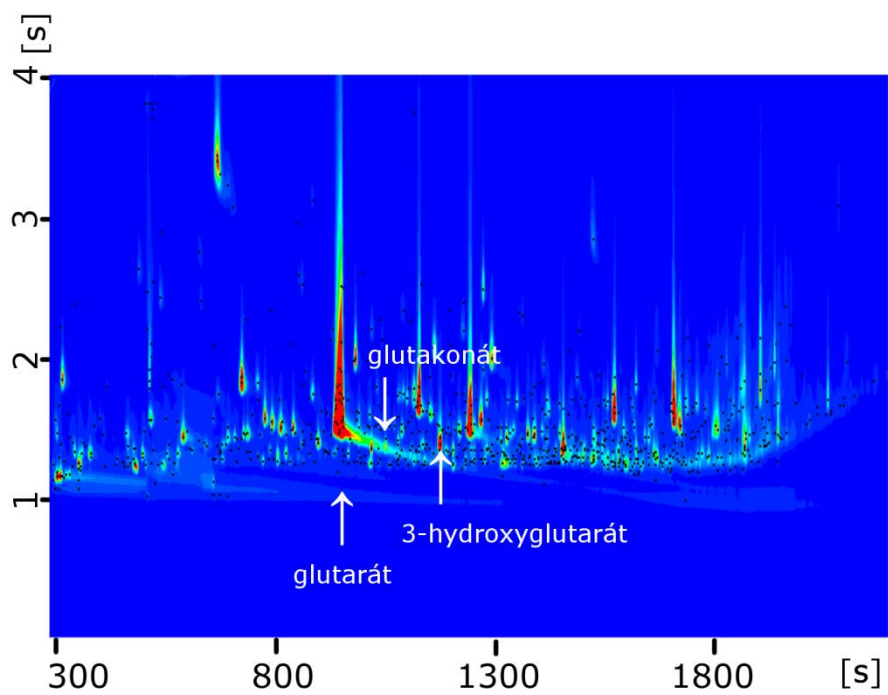
Pro analýzu pacientů s glutarovou acidurií bylo vybráno kolonové uspořádání BPX5 (29,90 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm) s nejvyšší ortogonalitou (76,39 %). Toto uspořádání bylo dále optimalizováno. Oproti optimalizační metodě se konečná metoda liší offsetem modulátoru (+15 °C).

Byly hodnoceny markery onemocnění glutarát, 3-hydroxyglutarát a glutakonát. Příklad obrysové grafu kontrolního vzorku je na Obr. 23 a pro pacienta s glutarovou acidurií na Obr. 24.

Separace byla úspěšná, byly identifikovány a kvantifikovány: glutarát, glutakonát a v některých vzorcích 3-hydroxyglutarát (viz Tab. 10).



Obr. 23 Obrysový graf kontrolního vzorku, vyznačeny nalezené markery glutarové acidurie



Obr. 24 Obrysový graf pacienta s glutarovou acidurií, vyznačeny markery GA

Pro glutarát je referenční rozmezí zdravého člověka 0–2 milimolů na mol kreatininu. Signifikantní hladina zvýšené koncentrace glutarátu je 500–12000 milimolů na mol kreatininu.

Referenční rozmezí pro 3-hydroxyglutarát je 0–3 milimolů na mol kreatininu. Významně patologická hladina je 60–3000 milimolů na mol kreatininu.

Normální hladina glutakonátu je 0–2 milimolů na mol kreatininu. Pro onemocnění může být signifikantní hladina glutakonátu v rozmezí 0–360 milimolů na mol kreatininu (Metabolic and Genetic Information Center, 28. 4. 2014).

Významnost odchylky v koncentraci jednotlivých markerů u pacientů a kontrol byla zhodnocena pomocí t-testu. Kritická hodnota pro hladinu významnosti 0,05 je pro daný počet vzorků 2,048. Signifikantní odchylky od kontrolních vzorků byly pozorovány jen v případě 3-hydroxyglutarátu ($t=7,66$). Pro glutarát ($t=1,90$) ani pro glutakonát ($t=0,09$) významné odchylky pozorovány nebyly.

Tab. 10 Glutarová acidurie: koncentrace příslušných markerů onemocnění u pacientů a zdravých jedinců

	glutarát (mmol·mol ⁻¹ kreatininu)	3-hydroxyglutarát (mmol·mol ⁻¹ kreatininu)	glutakonát (mmol·mol ⁻¹ kreatininu)
P1	3,05	13,19	1,52
P2	18,81	12,83	0,96
P3	19,33	21,42	4,45
P4	10,41	14,89	2,05
P5	21,77	20,67	3,33
P6	6,31	14,60	1,56
P7	49,31	18,31	6,04
P8	12,28	13,46	0,85
P9	316,86	17,13	3,09
P10	5,78	17,46	2,14
P11	31,11	7,83	1,60
P12	128,94	0,00	4,81
P13	897,53	25,38	0,71
K1	0,70	0,00	0,98
K2	4,12	0,00	3,31
K3	1,94	0,00	6,14
K4	0,45	5,23	4,31
K5	4,08	0,00	5,10
K6	1,10	0,00	3,18
K7	1,73	4,83	1,54
K8	1,20	0,00	1,95
K9	2,41	0,00	2,51
K10	0,50	0,00	1,23
K11	5,01	1,58	1,07
K12	5,31	0,00	1,55
K13	1,39	2,14	0,83
K14	2,19	1,51	1,49
K15	2,05	11,28	3,42
K16	1,71	2,23	2,26
K17	10,81	1,37	1,50

P – patientský vzorek; K – kontrolní vzorek

5 DISKUZE

Dvojdimenzionální plynová chromatografie není pro analýzu lidské moči příliš často využívána a to i přesto, že má ve srovnání s jednodimenzionální několik výhod: narůstá píková kapacita, citlivost a schopnost identifikace, minimalizuje se možnost koeluce. Nevýhodou je větší časová náročnost analýzy (Mitreviski *et al.*, 2010). Doposud byla GC×GC použita jen v několika málo oblastech.

Velkou skupinu analyzovanou dvojrozměrnou chromatografií tvoří steroidy v moči. Pro analýzu je obvykle použito normální uspořádání fází, např. mírně polární primární kolona ZB-1 (30,00 m × 0,25 mm × 1,00 μm) v kombinaci se středně polární BPX-50 (1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Mitrevski *et al.* (2010) použili pro analýzu steroidů nepolární BPX5 (30,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a BPX50 (1,00 m × 0,10 mm × 0,20 μm). Při normálním uspořádání (BPX5/BPX50) je dosaženo lepší separace, v reverzním (BPX50/BPX5) lepšího tvaru píků a citlivosti (Mitreviski *et al.*, 2008).

Reverzní uspořádání s lehce polární kyanopropyl-fenylovou kolonou první dimenze a nepolární fenyl-methylpolysiloxanovou sekundární kolonou je použito v práci Brailsforda *et al.* (2012). Píky jsou užší a tím dochází ke zvýšení citlivosti a spolehlivosti MS analýzy.

GC×GC byla také využita při dopingové kontrole pro analýzu klenbuterolu, norandrosteronu, epimetendiolu, metabolitů methylsteronu a 3-hydroxystanozololu. Pro analýzu byly použity nepolární HP-1 (17,00 m × 0,20 mm × 0,11 μm) a středně-polární OV-1701 (1,00 m × 0,10 mm × 0,10 μm; Silva *et al.*, 2009)

Dvojrozměrná plynová chromatografie byla využita také pro stanovení potenciálních biomarkerů různých onemocnění (např. rakovina močového měchýře; Pasikanti *et al.*, 2013; nebo diabetes; Li *et al.*, 2009). Pasikanti *et al.* (2013) použili pro separaci nepolární kolonu DB-1 (30,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) v kombinaci se středně polární kolonou Rxi-17 (1,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Průměrně bylo v každé analýze (při použití ureasového protokolu a následné silylaci) detekováno 930 znaků. V této práci bylo pomocí nejortogonálnějšího kolonového uspořádání (ortogonalita 76,39 %) BPX5/SolGel-WAX (30,00 m; 0,25 mm; 0,25 μm / 1,10 m; 0,25 mm; 0,25 μm) detekováno 1500 znaků. Ve srovnání s tím bylo pomocí setu BPX50/SolGel-WAX

(29,74 m × 0,25 mm × 0,25 μm/1,56 m × 0,10 mm × 0,10 μm) detekováno jen 860 znaků.

Dále byla GC×GC použita pro analýzu drog (exkrece Δ9-tetrahydrokanabinolu u chronických drogově závislých pacientů). Bylo použito normální uspořádání s nepolární DB-1MS a vysoce polární ZB-50. U tohoto stanovení nebylo oproti jednodimenzionální separaci pozorováno výrazné zlepšení (Lowe *et al.*, 2009).

Vysoká separační účinnost a minimalizace koeluce vedla k využití GC×GC pro analýzu hydroxylovaných polycyklických aromátů, které mají podobnou strukturu a různé izomerní formy. Pro analýzu byla použita mírně-polární DB-5 (30,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) ve spojení se středně-polární RTX-50 (1,00 m × 0,10 mm × 0,10 μm; Amarin *et al.*, 2009).

Vzhledem k vysoké citlivosti byla dvojrozměrná plynová chromatografie úspěšně využita pro stanovení stopových množství anabolických steroidů. Pro analýzu bylo použito uspořádání BPX5 (30,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a BPX50 (1,00 m × 0,10 mm × 0,10 μm; Mitrevski b *et al.*, 2010).

Dále bylo publikováno několik studií zaměřených na diagnózu organických acidurií ze vzorků moči (Kourenemos *et al.*, 2010; Wojtowicz *et al.*, 2010).

Kourenemos *et al.* (2010) použili pro metabolické profilování kolonové uspořádání: nepolární BPX5 (30,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a středně-polární BPX50 (1,00 m × 0,10 mm × 0,10 μm) a reverzní uspořádání BPX50 (30,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a BPX5 (1,00 m × 0,10 mm × 0,10 μm). V případě normálního uspořádání fází byla nižší retence nepolárních analytů ve druhé dimenzi a analyty byly nahuštěny na sobě. U reverzního uspořádání bylo pozorováno lepší využití separačního prostoru. V této práci bylo nejvyšší ortogonalita (76,39 %) dosaženo při použití normálního kolonového uspořádání BPX5 (28,90 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Maximální ortogonalita reverzního uspořádání 49,54 % byla u setu BPX50/BPX5.

V práci Wojtowicze *et al.* (2010) byla použita mírně polární Rxi-5 (30,00 m × 0,25 mm × 0,25 μm) v kombinaci se středně polární BPX50 (2,50 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Nevýhodou tohoto setu byla nízká ortogonalita, všechna data se nacházela na diagonále. Ortogonalitu snižoval také vysoký mrtvý čas ve druhé dimenzi (délka

modulace byla 3 s, mrtvý čas 2 s). U optimálního setu to byla hodnota mrtvého času 1 s. Délka modulační periody pro každou analýzu byla 4 s.

Rocha (2012) použil pro metabolomickou analýzu nepolární kolonu HP-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm) tentokrát v kombinaci s vysoce polární sekundární kolonou DB-FFAP (0,79 m × 0,25 mm × 0,25 μm) což výrazně zvyšovalo ortogonalitu systému. Počet detekovaných znaků byl 700.

Zhu *et al.* (2006) dospěli k závěru, že pokud je vyžadováno vysoké rozlišení, je vhodnější použití sekundární kolony s tlustší vrstvou stacionární fáze. V této práci byla ortogonalita pro set BPX5/SolGel-WAX s tlustší vrstvou stacionární fáze vyšší (76,39 %) než pro užší film stacionární fáze ve 2D (65,71 %).

Naproti tomu, míra separace narůstá se zužujícím se vnitřním průměrem sekundární kolony (Cordero *et al.*, 2008), protože jsou produkovány užší píky. Zároveň se ukázalo, že je vhodné, aby byla co nejoptimálnější rychlost na obou kolonách a tedy širší vnitřní průměr sekundární kolony. V předložené práci byla úspěšnější separace na kolonových uspořádáních s širším vnitřním průměrem. V případě BPX50/SolGel-WAX byl pozorován výrazný nárůst ortogonalita z 48 % pro 2D kolonu s užším vnitřním průměrem na 73,94 % pro kolonu s širším vnitřním průměrem.

Analýza GA I pomocí GC×GC má oproti jednodimenzionální chromatografii výrazně vyšší citlivost. Zatímco u GC je dosaženo alespoň 8 bodů na pík (Dallüge *et al.*, 2002) vysoká rychlost sběru dat u GC×GC umožňuje sběr až 50 bodů na 100 ms pík (Mostafa *et al.*, 2012).

Pro diagnostiku GA I jsou z moči stanovovány obvykle glutarát, 3-oxoglutarát. Al-Dirbashi *et al.* (2005) kvantifikovali glutarát a 3-oxoglutarát s dobrou reprodukovatelností a citlivostí pomocí HPLC s limitem detekce pro glutarát byl 0,2 μmol.l⁻¹ a 3-oxoglutarát 0,4 μmol.l⁻¹. Zde byla prokázána přítomnost 3OHG u všech pacientů s GAI (průměrná hodnota 15,17 mmol na 1 mol kreatininu).

Analýza glutarátu není na rozdíl od 3-oxoglutarátu vždy průkazná. Je popsáno několik pacientů, kteří mají normální hladiny GA, ale zvýšenou hladinu 3-oxoglutarátu (Baric *et al.*, 1999; Schor *et al.*, 2002)

Skupina Al-Dirbashi *et al.* (2011) podobně jako Baric *et al.* (1999) stanovovala kromě glutarátu a 3-oxoglutarátu také glutarylkarnitin,. Bylo potvrzeno, že pokud by se

do novorozeneckého screeningu jako běžně stanovovaný analyt z moči přidal i glutarylkarnitin, zvýšila by se úspěšnost záchytu onemocnění. Nedokonalá metodologie diagnostiky je bezpochyby zodpovědná za některé patologické projevy onemocnění a úmrtí pacientů.

Podobně i skupina Tortorelli *et al.* (2005) srovnávala výpovědní hodnotu glutarylkarnitinu v moči pro stanovení GA I. Zvýšená hladina glutarátu a 3-oxoglutarátu není pro stanovení GA I specifická, přestože jsou oba analyty používány jako klinické diagnostické markery. Jejich zvýšená hladina může ukazovat na různé ketosy (Goodman *et al.*, 2011; Baric *et al.*, 1998; Bijarnia *et al.*, 2008) narušující od glutarylkarnitinu, jehož stanovení v moči je specifické.

Rovněž Shigematsu *et al.* (2005) stanovovali glutarát, 3-hydroxyglutarát, 2-oxoglutarát a glutarylkarnitin. Jejich snahou bylo rozvinout praktickou, ale citlivou metodu pro rutinní stanovení. V práci byla použita metoda izotopového ředění, která se ukázala jako dostatečně citlivá.

Práce Couce *et al.* (2011) se zaměřovala na stanovení glutarylkarnitinu z moči, vzhledem k falešně negativním výsledkům pacienta s GA I analýzou glutarylkarnitinu z plasmy při novorozeneckém screeningu. Ukázalo se, že toto stanovení je specifičtější než stanovení z plasmy. Protože četnost onemocnění je 1:30 023, ale v novorozeneckém screeningu je diagnostikovaná četnost GA I: jen 1:35 027.

6 ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo zpracovat literární rešerši na téma metabolom lidské moči, popsány možné přístupy jeho analýzy se zaměřením na GC×GC-TOF a porovnat různá kolonová uspořádání pro analýzu metabolomu moče: BPX5/SolGel-WAX, BPX5/SLB-IL59, BPX50/SolGel-WAX, BPX50/BPX5, SolGel-WAX/BPX5, SLB-IL59/BPX50.

Mezi neúspěšné patří separace na koloně SLB-IL59. V případě SLB-IL59/BPX50 nedochází k separaci. Tato kolona je selektivní pro nepolární a středně polární analyty. Vzhledem k tomu, že součástí přípravy vzorků byla silylace, byly látky vlivem své nízké polarizability na koloně zadržovány. Podobně u BPX5/SLB-IL59 proběhla separace jen v 1D, ve druhé dimenzi se analyty neseperoaly, navíc došlo k přetížení sekundární kolony vzhledem k malé tloušťce stacionární fáze (0,08 μm). Neúspěšná byla také separace na setu SolGel-WAX/BPX5. V tomto uspořádání byly příliš zadržovány rozpouštědla (pyridin) a močovina, které znemožňovaly dobrou separaci a detekci ostatních analytů.

Mezi úspěšné patřily separace na kolonách BPX5/SolGel-WAX, BPX50/SolGel-WAX, BPX50/BPX5. Pro tato kolonová uspořádání byly použity vždy dvě sekundární kolony lišící se tloušťkou stacionární fáze a vnitřním průměrem.

Bylo vybráno 25 analytů, tak aby co nejlépe pokrývaly separační prostor; mezi vybranými analyty byly také tři kritické páry. Na základě tohoto výběru bylo hodnoceno pokrytí separačního prostoru (Tab. 11).

Tab. 11 Jednotlivá kolonová uspořádání, jejich ortogonalita, asymetrie a šířka píku značené methylmalonové kyseliny

Kolonové uspořádání	Ortogonalita	asymetrie	šířka píku
BPX5 (29,95x0,25x0,25) SolGel-WAX (1,50x0,10x0,10)	65,71 %	1,29	0,13 s
BPX5 (28,90x0,25x0,25) SolGel-WAX (1,21x0,25x0,25)	76,39 %	1,02	0,13 s
BPX50 (29,74x0,25x0,25) SolGel-WAX (1,56x0,10x0,10)	48,00 %	1,75	0,22 s
BPX50 (29,74x0,25x0,25) SolGel-WAX (1,21x0,25x0,25)	73,94 %	1,58	0,21 s
BPX50 (29,74x0,25x0,25) BPX5 (1,31x0,10x0,10)	48,85 %	1,04	0,19 s
BPX50 (27,00x0,25x0,25) BPX5 (1,31x0,25x0,25)	49,54 %	1,07	0,73 s

Jako nejvhodnější byl zvolen set BPX5 (29,90 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a SolGel-WAX (1,21 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Na tomto setu byla následně provedena analýza vzorků pacientů s glutarovou acidurií typ I a zdravých kontrolních vzorků. Byly identifikovány a kvantifikovány markery onemocnění glutarát, 3-hydroxyglutarát a glutakonát. Významnost odchylky v koncentraci jednotlivých markerů u pacientů a kontrol byla zhodnocena pomocí t-testu. Kritická hodnota pro hladinu významnosti 0,05 je pro daný počet vzorků 2,048. Signifikantní odchylky od kontrolních vzorků byly pozorovány jen v případě 3-hydroxyglutarátu (t=7,66). Pro glutarát (t=1,90) ani pro glutakonát (t=0,09) významné odchylky pozorovány nebyly. Důvodem nízkých hladin markerů onemocnění u pacientů byl zřejmě fakt, že se jednalo o již diagnostikované a léčené pacienty.

7 LITERATURA

- Adahchour M., Jover E., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. T. (2005): Twin comprehensive two-dimensional gas chromatographic system: concept and applications. *Journal of Chromatography A*, **1086**, 128–34.
- Agilent Technologies: www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-9889EN.pdf (24. 4. 2014).
- Al-Dirbashi O. Y., Jacob M., Al-Amoudi M., Al-Kahtani K., Al-Odaib A., El-Badaoui F., Rasheda M. S. (2005): Quantification of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids in urine of glutaric acidemia type I patients by HPLC with intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization. *Clinica chimica acta*, **359**, 179–88.
- Al-Dirbashi O. Y., Kölker S., Ng D., Fisher L., Rupar T., Lepage N., Rashed M. S., Santa T., Goodman S. I., Geraghty M. T., Zschocke J., Christensen E., Hoffmann G. F., Chakraborty P. (2011): Diagnosis of glutaric aciduria type 1 by measuring 3-hydroxyglutaric acid in dried urine spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of inherited metabolic disease*, **34**, 173–180.
- Almstetter M. F., Oefner P. J., Dettmer K. (2012): Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **402**, 1993–2013.
- Amorima L. C. A., Dimandjab J. M., de Lourdes Cardeala Z. (2009): Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 2900–4.
- Baric I., Wagner L., Feyh P., Liesert M., Buckel W., Hoffmann G. F. (1999): Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I. *Journal of inherited metabolic disease*, **22(8)**, 867–81.
- Bijarnia S., Wiley V., Carpenter K., Christodoulou J., Ellaway C. J., Wilcken B. (2008): Glutaric aciduria type I: outcome following detection by newborn screening. *Journal of inherited metabolic disease*, **31**, 503–7.
- Boigelot D. (2011): http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Correlation_examples2.svg (24. 4. 2014).
- Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A. C., Wilson M. R., Knox C., Bjorndahl T. C., Krishnamurthy R., Saleem F., Liu P., Dame Z. T., Poelzer J., Huynh J., Yallow F. S., Psychogios N., Dong E., Bogumil R., Roehring C., Wishart D. S. (2013): The Human Urine Metabolome. *PLOS ONE* 8(9): e73076
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0073076> (24. 4. 2014).
- Brailsford A. D., Gavrilović I., Ansell R. J., Cowan D. A., Kicman A. T. (2012): Two-dimensional gas chromatography with heart-cutting for isotope ratio mass spectrometry analysis of steroids in doping control. *Drug Testing and Analysis*, **4(12)**, 962–9.
- Cordero C., Rubiolo P., Sgorbini B., Galli M., Bicchi C. (2006) Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the analysis of volatile samples of natural origin: A multidisciplinary approach to evaluate the influence of second dimension column coated with mixed stationary phases on system orthogonality. *Journal of Chromatography A*, **1132**, 268–279.
- Cordero C., Bicchi C., Galli M., Galli S., Rubiolo P. (2008): Evaluation of different internal-diameter column combinations in comprehensive two-dimensional gas chromatography in flavour and fragrance analysis. *Journal of Separation Science*, **31**, 3437–50.
- Couce M. L., Castiñeiras D. E., Bóveda M. D., Baña A., Cocho J. A., Iglesias A. J., Colón C., Alonso-Fernández J. R., Fraga J. M. (2011): Evaluation and long-term follow-up of infants with inborn errors of metabolism identified in an expanded screening programme. *Molecular genetics and metabolism*, **104**, 470–5.
- Dallüge J., van Rijn M., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. T. (2002): Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-offlight mass spectrometric detection

- applied to the determination of pesticides in food extracts. *Journal of Chromatography A*, **965**, 207–17.
- Dass C. (2007) *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. 1st ed., John Wiley and Sons, Chichester, UK, 585 stran.
- de Hoffmann E., Stroobant V. (2007) *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 3rd ed., John Wiley and Sons, Chichester, UK, 489 stran.
- Dorman F. L., Schettler P. D., Vogt L. A., Cochran J. W. (2008): Using computer modeling to predict and optimize separations for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1186**, 196–201.
- Dunn W. B., Ellis D. I. (2005): Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, **24**, 285–287.
- Fowles I. A. (1995): *Gas Chromatography*. 2nd ed., John Wiley and Sons, Chichester, UK, 261 stran.
- Fu Z., Wang M., Paschke R., Rao K. S., Frerman F. E., Kim J. J. (2004): Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions. *Biochemistry* **43(30)**, 9674–84.
- Ganong W. F. (2005): *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd., Galén, Praha, Česká republika, 890 stran.
- Gilar M., Olivova P., Daly A. E., Gebler J. C. (2005) Orthogonality of Separation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **77**, 6426–6434
- Gordon N. (2006): Glutaric aciduria types I and II. *Brain and Development*, **28**, 136–140.
- Greenberg C. R., Reimer D., Singal R., Triggs-Raine B., Chudley A. E., Dilling L. A., Philipps S., Haworth J. C., Seargeant L. E., Goodman S. I. (1995): A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Human molecular genetics* **4(3)**, 493–495.
- Grob R. L. (2004): Introduction. In: *Modern practice of gas chromatography*. 4th ed., (Grob R. L., Barry E. F.), John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, Canada, 1–21.
- Harvey D. (2000): *Modern analytical chemistry*. 1st ed., McGraw-Hill Companies, Inc. Boston, USA, 798 stran.
- Harynuk J., Górecki T., de Zeeuw J. (2005): Overloading of the second-dimension column in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1071**, 21–27.
- Heringer J., Boy S. P., Ensenauer R., Assmann B., Zschocke J., Harting I., Lücke T., Maier E. M., Mühlhausen C., Haegi G., Hoffmann G. F., Burgard P., Kölker S. (2010): Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type I. *Annals of neurology*, **68(5)**, 743–52.
- Hoffmann G. F., Trefz F. K., Barth P. G., Böhles H. J., Biggemann B., Bremer H. J., Christensen E., Frosch M., Hanefeld F., Hunneman D. H. (1991): Glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a distinct encephalopathy. *Pediatrics*, **88(6)**, 1194–203.
- Hoffmann G. F., Nyhan W. L., Zschocke J., Kahler S. G., Mayatepek E. (2006): *Dědičné metabolické poruchy*. Grada Publishing, Praha, Česká republika, 416 stran.
- Chace D. H., Kalas T. A., Naylor E. W. (2003): Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clinical Chemistry*, **49(11)**, 1797–817.
- Christensen E., Ribes A., Merinero B., Zschocke J. (2004): Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **27(6)**, 861–8.
- Chudoba J. a Šebor G. (2008): Možnosti využití hmotnostní spektrometrie při analýze ropných vzorků. *Chemické listy*, **102**, 969–976.
- Jennings W., Mittlefehldt E., Stremple P. (1997): *Analytical Gas Chromatography*. 2nd ed., Academic Press, San Diego, USA, 389 stran.
- Kittnar O. a kol. (2011): *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, Praha, Česká republika, 790 stran.
- Koek M. M., Muilwijk B., van Stee L. L. P., Hankemeier T. (2008): *Journal of Chromatography A*, **1186**, 420–429.

- Korman S. H., Salomons G. S., Gutman A., Brooks R., Jakobs C. (2004): D-2-hydroxyglutaric aciduria and glutaric aciduria type 1 in siblings: coincidence, or linked disorders? *Neuropediatrics*, **35**(3), 151–6.
- Kouremenos K. A., Pitt J., Marriott P. J. (2010): Metabolic profiling of infant urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography: Application to the diagnosis of organic acidurias and biomarker discovery. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 104–11.
- Kyllerman M., Skjeldal O. H., Lundberg M., Holme I., Jellum E., von Döbeln U., Fossen A., Carlsson G. (1994): Dystonia and dyskinesia in glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and therapeutic considerations. *Movement disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, **9**(1), 22–30.
- Lewis A. C. (2002): Order 3 *Multidimensional High Resolution Gas Chromatography*. In: *Multidimensional Chromatography* (Mondello L., Lewis A. C., Bartle K. D.), John Wiley and Sons, Chichester, UK, 47–76.
- Li, Z. Xu, X. Yang, P. Yin, H. Kong, Y. Yu, G. Xu, (2009): Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabonomics: Biomarker discovery for diabetes mellitus. *Analytica chimica acta*, **633**, 257–62.
- Lindner M., Kölker S., Schulze A., Christensen E., Greenberg C. R., Hoffmann G. F. (2004): Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **27**(6), 851–9.
- Lowe R. H., Abraham T. T., Darwin W. D., Herning R., Cadet J. L., Huestis M. A. (2009): Extended urinary Δ^9 -tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure. *Drug and Alcohol Dependence*, **105**, 24–32.
- Marriott P. J. (2002): Order 4 *Orthogonal GC–GC*. In: *Multidimensional Chromatography* (Mondello L., Lewis A. C., Bartle K. D.), John Wiley and Sons, Chichester, UK, 77–108
- McNair H. M., Miller J. M. (1997): *Basic gas chromatography Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley a Sons, Chichester, UK, 193 stran.
- Metabolic and Genetic Information Center: http://www.metagene.de/program/d.prg?id_d=8 (24. 4. 2014).
- Mitrevski B. S., Wilairat P., Marriott P. J. (2010): Comprehensive two-dimensional gas chromatography improves separation and identification of anabolic agents in doping control. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 127–135.
- Mostafa A., Górecki T., Tranchida P. Q., Mondello L. (2011): 4. *History, evolution and optimization aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography*. In: *Comprehensive chromatography in combination with mass spectrometry*. 1st ed. (Mondello L., ed.), John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2011, 496 stran.
- Mostafa A., Edwards M., Górecki T. (2012) Optimization aspects of comprehensive two dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1255**, 38-55.
- Musilová J., Glatz Z. (2011): Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie. *Chemické listy*, **105**, 745–751.
- Nakagawa K., Kawana S., Hasegawa Y., Yamaguchi S. (2010): Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *Journal of Chromatography B*, **878**, 942–8.
- Novotný I., Hruška M. (2008): *Biologie člověka*, 4.ed., Fortuna, Praha, 239 stran.
- Omais B., Courtiade M., Charon N., Ponthus J., Thiébaud D. (2011): Considerations on Orthogonality Duality in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, **83**, 7550-7554.
- Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z. (2007): *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha, Česká republika 201 stran.
- Pasikanti K. K., Esuvaranathan K., Hong Y., Ho P. C., Mahendran R., Mani L. R. N., Chiong E., Chan E. C. Y. (2013): Urinary metabotyping of bladder cancer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, **12**, 3865–73.
- Pennisi E. (2012): Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science (New York, N. Y.)*, **337**(6099), 1159–1161.

- Popa I., Novotná R. (2012): *Základy NMR spektroskopie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika, 94 stran.
- Pourhaghighi M. R., Karzand M., Girault H. H. (2011) Orthogonality of Two-dimensional separations based on conditional entropy, *Analytical Chemistry*, **83**, 7676-7681.
- Purcaro G, Tranchida P. Q., Ragonese C., Conte L., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2010): Evaluation of a Rapid-Scanning Quadrupole Mass Spectrometer in an Apolar \times Ionic-Liquid Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography System. *Analytical Chemistry*, **82**, 8583–8590
- Racek J., Dastych M., Matouš B., Verner M. (2006): *Klinická biochemie*. 2. vyd., Galén, Praha, Česká republika, 329 stran.
- Rocha S. M., Caldeira M., Carrola J., Santos, M., Cruz N., Duarte I. F. (2012): Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1252**, 155–63.
- Ryan D., Morrison P., Marriott P. (2005): Orthogonality considerations in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1071**, 47–53.
- Seeley J. V., Bates C. T., McCurry J. D., Seeley S. K. (2012): Stationary phase selection and comprehensive two dimensional gas chromatographic analysis of trace biodiesel in petroleum-based fuel. *Journal of chromatography A*, **1226**, 103–109.
- SGE Analytical Science: <http://www.sge.com/products/columns/gc-columns/bpx5> (24. 4. 2014)
- SGE Analytical Science: <http://www.sge.com/products/columns/gc-columns/bpx50> (24. 4. 2014)
- SGE Analytical Science: <http://www.sge.com/products/columns/gc-columns/solgel-wax> (24. 4. 2014)
- Shigematsu Y., Hata I., Tanaka Y., Tajima G., Sakura N., Naito E., Yorifuji T. (2005): Stable-isotope dilution gas chromatography–mass spectrometric measurement of 3-hydroxyglutaric acid, glutaric acid and related metabolites in body fluids of patients with glutaric aciduria type 1 found in newborn screening. *Journal of Chromatography B*, **823**, 7–12.
- Schor D.S.M., Verhoeven N. M., Struys E. A., ten Brink H. J., Jakobs C. (2002): Quantification of 3-hydroxyglutaric acid in urine, plasma, cerebrospinal fluid and amniotic fluid by stable-isotope dilution negative chemical ionization gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **780**, 199–204.
- Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=104140952> 19.2.2014
- Slonecker P. J., Li X., Ridgway T. H., Dorsey J. G. (1996): Informational Orthogonality of Two-Dimensional Chromatographic Separations. *Analytical Chemistry*, **68**, 682–689.
- Sommer L. (2000): *Základy analytické chemie*. Vutium, Brno, Česká republika, 347 stran.
- Tortorelli S., Hahn S. H., Cowan T. M., Brewster T. G., Rinaldo P., Matern D. (2005): The urinary excretion of glutarylcarnitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric acidemia type I. *Molecular genetics and metabolism*, **84**, 137–43.
- Tranchida P. Q., Casilli A., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2007): Generation of improved gas linear velocities in a comprehensive two-dimensional gas chromatography system. *Analytical Chemistry*, **79**, 2266–2275.
- Trojan S. a kol. (1996): *Lékařská fyziologie*. 2. vyd. Grada Publishing, Praha, Česká republika, 489 stran.
- Venkatramani C. J., Jingzhen X., Phillips J. B. (1996): Separation orthogonality in temperature-programmed comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical Chemistry*, **68**, 1486-1492.
- Villas-Boas S. G., Roessner U., Hansen M. A. E., Smedgaard J., Nielsen J. (2007): 2. *The chemical challenge in functional genomics and system biology*. In: *Metabolom analysis: An introduction*. (Nielsen J., ed.), John Wiley and Sons Inc., New Jersey, USA, 319.
- Vokurka M., Hugo J. (2005): *Velký lékařský slovník*. 5. vyd., Maxdorf, Praha, Česká republika, 1001 stran.
- Watson J. T., Sparkman O. D. (2007) *Introduction to mass spectrometry*. 4st ed., John Wiley and Sons, Chichester, UK, 818 stran.

- Watson N. E., Siegler W. C., Hoggard J. C., Synovec R. E. (2007): Comprehensive three-dimensional gas chromatography with parallel factor analysis. *Analytical chemistry*, **79**, 8270–8280.
- Winter G., Krömer J. O. (2013): Fluxomics – connecting ‘omics analysis and phenotypes. *Environmental Microbiology* **15** (7), 1901–1916.
- Wojtowicz P., Zrostlíková J., Kovalczuk T., Schůrek J., Adam T. (2010): Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of inherited metabolic disorders using an automated data processing strategy. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 8054–61.
- Zapadlo M., Krupčík J., Májek P., Armstrong D. W., Sandra P. (2010): Use of polar ionic liquid as second column for the comprehensive two-dimensional GC separation of PCBs. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 5859–5867.
- Zhu Z., Harynuk J., Górecki T. (2006): Effect of first-dimension column film thickness on comprehensive two-dimensional gas chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, **1105**, 17–24.
- Zschocke J., Quak E., Guldberg P., Hoffmann G. F. (2000): Mutation analysis in glutaric aciduria type I. *Journal of medicinal genetics*, **37**(3), 177–81.
- Zu S. (2009) Effect of column combinations on two-dimensional separation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: Estimation of orthogonality and exploring mechanism. *Journal of Chromatography A*, **1216**; 3312–3317

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1D	první dimenze; jednodimenzionální
2D	druhá dimenze; dvojdimezionální
CE	kapilární elektroforéza
GA I	glutarová acidurie typ I
GA II	glutarová acidurie typ II
GA III	glutarová acidurie typ III
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním analyzátozem
GC×GC	dvojrozměrná plynová chromatografie
GC×GC-TOF	dvojrozměrná plynová chromatografie s průletovým hmotnostním analyzátozem
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance