

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Analýza organických kyselín v biologických vzorkách
metódou LC-MS/MS pre diagnostiku a štúdium
patobiochémie vybraných ochorení**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Ivana Rošková
Študijný program:	N1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Denná
Vedúci práce:	Mgr. Barbora Piskláková
Rok:	2023

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som poučená, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 31.07.2023

Veľká vďaka patrí školiteľke Mgr. Barbore Pisklákovej pod vedením prof. RNDr. Davida Friedeckého, Ph.D.za neuveriteľnú trpezlivosť a za každú pomoc a radu pri spisovaní mojej diplomovej práce a uskutočnení jej praktickej časti. Rada by som poďakovala za všetok vyhradený čas. Taktiež by som rada poďakovala všetkým pracovníkom Laboratória Dedičných Metabolických Porúch Fakultnej Nemocnici v Olomouci za vytvorenie príjemnej atmosféry na pracovisku, vďaka ktorému bola celá práca a čas strávený v laboratóriách a v kancelárii jednoduchší.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Ivana Rošková
Názov práce	Analýza organických kyselín v biologických vzorkách metódou LC-MS/MS pre diagnostiku a štúdium patobiochémie vybraných ochorení
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Laboratórium dedičných metabolických porúch
Vedúci práce	Mgr. Barbora Pisklákova
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Organické acidúrie tvoria početnú skupinu dedičných metabolických porúch (DMP), počas ktorých dochádza k akumulácii organických kyselín a ich konjugátov (hlavne acylkarnitíny a acylglycíny) v bunkách a telových tekutinách. Dôsledkom akumulácie týchto látok dochádza k narušeniu acidobázickej rovnováhy organizmu a ďalej k takým symptómom, ktoré môžu v najhoršom prípade skončiť smrťou pacienta. Rutinne sú organické acidúrie diagnostikované metódou plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS), avšak táto metóda prináša určité nedostatky, preto je snaha o jej nahradenie.</p> <p>V teoretickej časti bola spracovaná literárna rešerš - úvod do problematiky dedičných metabolických porúch a organických acidúrií aj s príkladmi, ako je leucinóza, izovalerová acidúria a deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom. Bola spracovaná aj rešerš zaoberajúca sa súčasnými možnosťami analýzy organických kyselín a teóriou metódy kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS).</p>

V praktickej časti bola LC-MS/MS validovaná pre 140 látok zo skupiny organických kyselín, acylkarnitínov a acylglycínov. Overované boli parametre ako je linearita, presnosť a správnosť, matricové efekty a carry-over. Následne bola metóda použitá na analýzu vzoriek pacientov a zdravých kontrol. Pre transformáciu nameraných dát bolo zavedené robustné škálované hodnoty a zmeny hladín biomarkerov oproti zdravej populácii. Analýzy vzoriek pacientov s organickými acidúriami boli vyhodnotené pomocou robustne škálovaných hodnôt a výsledky boli vyobrazené pomocou programov GraphPad Prism a Cytoscape.

Kľúčové slová

Dedičné metabolické poruchy, organické acidúrie, kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria, validácia

Počet strán

88

Počet príloh

2

Jazyk

Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Ivana Rošková
Title	Analysis of organic acids in biological samples by LC-MS/MS for diagnosis and study of pathobiochemistry of selected diseases
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Inherited Metabolic Diseases
Supervisor	Mgr. Barbora Piskláková
The year of presentation	2023
Abstract	<p>Organic acidurias are group of inherited errors of metabolism (IMDs), when organic acids and their conjugates (mainly acylcarnitines and acylglycines) are accumulated in cells and body fluids. The accumulation of these metabolites causes acidosis and symptoms that may even end with the patient's death. Organic acidurias are diagnosed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), but this method has specific negatives, so efforts are being made to replace the method.</p> <p>In the theoretical part, a literature review - an introduction to IMD and organic acidurias with examples such as maple syrup urine disease, isovaleric aciduria and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency - was elaborated There is also a review of present possibilities of organic acid analysis and the theory of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)</p> <p>In experimental part the LC-MS/MS was validated for 140 metabolites (organic acids, acylglycines, acylcarnitines). Carry-over, matrix effects, linearity, accuracy and precision, were verified. Then the method was used for the analysis of the patient and healthy</p>

control samples. The robust scaled values and the changes of the biomarkers levels against healthy controls was established for the transformation of measured data. The analysis of the patient samples with organic acidurias were evaluated and the results were imaged in GraphPad Prism and Cytoscape softwares.

Keywords	Inherited metabolic disorders, organic acidurias, liquid chromatography, mass spectrometry, validation
Number of pages	88
Number of appendices	2
Language	Slovak

OBSAH

Ciele práce.....	10
1 Úvod.....	10
2 Teoretická časť.....	11
2.1 Dedičné metabolické poruchy.....	11
2.2 Organické acidúrie.....	12
2.2.1 Vybrané organické acidúrie.....	14
2.2.1.1 Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom 15	
2.2.1.2 Izovalerová acidúria.....	16
2.2.1.3 Leucinóza.....	18
2.2.2 Diagnostika organických acidúrií.....	20
2.2.2.1 Plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou....	21
2.2.2.2 Kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou	23
2.3 Metóda kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou	24
2.3.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.....	26
2.3.2 Hmotnostná spektrometria.....	26
2.3.2.1 Kvadrupólové analyzátory.....	28
3 Experimentálna časť.....	31
3.1 Materiál.....	31
3.1.1 Chemikálie.....	31
3.1.2 Biologický materiál.....	33
3.1.3 Použité roztoky.....	33
3.1.4 Príprava interných štandardov.....	34
3.1.4.1 Príprava kalibračných roztokov.....	34
3.1.4.2 Príprava vzoriek kontroly kvality.....	35
3.1.4.3 Príprava zmesných vzoriek.....	35
3.1.4.4 Príprava patientskych vzoriek a vzoriek zdravých kontrol.....	35
3.1.5 Overenie a vyhodnotenie validačných parametrov.....	36
3.1.6 Prístroje a vybavenie.....	37
3.2 Metódy.....	38
3.2.1 Analýza vzoriek metódou kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou.....	38
3.2.2 Vyhodnotenie výsledkov analýzy patientskych vzoriek.....	39

4	Výsledky	40
4.1	Validácia metódy	40
4.2	Analýza patientskych vzoriek.....	45
4.2.1	Analýza vzorky pacienta s deficitom acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom.....	46
4.2.2	Analýza vzorky pacienta s izovalerovou acidúriou	46
4.2.3	Analýza vzorky pacienta s leucinózou.....	46
5	Diskusia.....	53
6	Záver	58
7	Literatúra.....	59
8	Zoznam použitých skratiek	67
9	Prílohy	70

Ciele práce

- Vypracovanie literárnej rešerše o doterajších poznatkoch diagnostiky dedičných metabolických porúch so zameraním na organické acidúrie
- Vypracovanie literárnej rešerše o aktuálnom stave analýzy organických kyselín a ich konjugátov v biologických vzorkách
- Validácia metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou
- Príprava biologických vzoriek a ich analýza metódou LC-MS/MS, vyhodnotenie a štatistické spracovanie výsledkov, interpretácia nameraných dát

1 Úvod

Organické acidúrie tvoria rozsiahlu skupinu dedičných metabolických porúch. Ich hlavným znakom je akumulácia hlavne organických kyselín, prípadne ich konjugátov s karnitínom a glycínom v bunkách a telových tekutinách. Ako dôsledok akumulácie týchto látok dochádza k narušeniu acidobázickej rovnováhy organizmu, laktátovej acidóze a ketóze. Zasahujú do mnohých metabolických dráh, ako je napríklad močovinový cyklus a metabolizmus aminokyselín, mastných kyselín, sacharidov atď. Mnohé z organických acidúrií sa vyznačujú ťažkým priebehom a vážnymi akútnymi stavmi.

Rutinne sú organické kyseliny analyzované metódou plynovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou, ktorá sa okrem mnohých pozitív vyznačuje aj nevýhodami, ktoré ovplyvňujú diagnostiku. Jedným hlavným nedostatkom je povaha organických kyselín a ich obmedzená tekavosť, ktorá je pre analýzu plynovou chromatografiou jednou z vyžadovaných vlastností. Preto je potrebné zvýšiť ich tekavosť a analyty vo vzorke derivatizovať a následne ich extrahovať do vhodného rozpúšťadla. Z toho dôvodu je celá analýza časovo náročná a pracná. Preto je v dnešnej dobe snaha mnohých výskumov o zavedenie inej výhodnejšej metódy pre diagnostiku organických acidúrií. Jednou z možností ako účinnejšie a zároveň jednoduchšie analyzovať organické kyseliny spolu s ich konjugátmi je použitie metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou.

2 Teoretická časť

2.1 Dedičné metabolické poruchy

Dedičné metabolické poruchy (DMP) predstavujú širokú skupinu vzácných genetických ochorení, z ktorých každá ovplyvňuje špecifickú chemickú reakciu v rámci mnohých normálnych metabolických dráh. (Saudubray *et al.*, 2016).

Väčšina DMP sa dedí autozomálne recesívne. Sú spôsobené mutáciou jedného génu (tzv. single-gen-diseases), ktorá môže predstavovať odstránenie jedného alebo viac nukleotidov DNA, ich inverziu, premiestnenie na iné miesto génu, opakovanie určitej sekvencie apod. (Racek a Rajdl, 2021). Následnou transkripciou a transláciou chybného génu dochádza k štrukturálnym zmenám proteínu v častých prípadoch enzýmu (Racek a Rajdl, 2021). Deficit takého enzýmu spôsobí akumuláciu substrátu (Davison, 2020) za súčasného nedostatku produktu. Nahromadený substrát môže byť pre organizmus toxický, prípadne môže byť alternatívnou reakciou premenený na toxickú látku (Davison, 2020). DMP môžu byť spôsobené dysfunkciou aj iných proteínov, napr. transmembránového prenášača (v prípade cystickej fibrózy), krvných proteínov (hemoglobín, α_1 -inhibitor proteáz), štrukturálnych membránových proteínov (zmena tvaru, funkcie buniek), regulačných proteínov a receptorov, prípadne dysfunkciou celých organel, (Racek a Rajdl, 2021).

Klinicky DMP majú rôzne prejavy od akútnych po chronické a môžu sa objaviť v rôznych obdobiach od narodenia až po dospelosť (Lie *et al.*, 2021). Z dôvodu ich rozmanitosti, sú rôzne aj ich priebehy, ktoré sú často špecifické pre každú jednu z nich. Niektoré z nich sú ľahko zvládnuteľné, zatiaľ čo mnohé z nich spôsobujú multisystémovú dysfunkciu a sú spojené s progresívnym zhoršovaním zdravotného stavu (Davison, 2020). Medzi príznaky patrí potravinová intolerancia, ospalosť, hypotónia, záchvaty a pri rýchlom klinickom zhoršení nastáva kóma a až smrť (Saudubray *et al.*, 2006, Pulido *et al.*, 2021)

Aj keď sú DMP v populácii zriedkavé, ich následky môžu byť až život ohrozujúce (Joseph and Russo, 2000). Z toho dôvodu je dôležité, aby boli včasne diagnostikované. Nie všetky geneticky podmienené deficity proteínov v metabolických dráhach vedú k ochoreniu s klinickými príznakmi ako napr. hydroxyprolinémia (OMIM #237000), ktorá často býva príčinou falošnej pozitivity skríningu pre leucinózu

- MSUD (OMIM 248600), tzv. ochorenie javorového sirupu (Dimitrov *et al.*, 2021; Staufner *et al.*, 2016; Baykal *et al.*, 2004)

Niektoré DMP majú k dispozícii špecifickú liečbu, ktorá je založená na ich povahe. Jednou z možností je diétna liečba (úprava stravy, nahradenie vitamínov a enzýmových kofaktorov, vynechaním určitých zložiek) alebo enzýmová substitučná liečba, prípadne transplantácia hematopoetických kmeňových buniek, či celých orgánov, pričom prístupy génovej terapie sa čím ďalej, tým častejšie uplatňujú tiež pri liečbe DMP (Davison, 2020, Davidson and Rahman, 2017). Včasná detekcia a diagnostika DMP môže viesť k lepšej liečbe, pretože následky, ktoré sa vyvinú pred samotnou liečbou sú často nezvratné (Lie *et al.*, 2021 Davison, 2020).

Pre závažnosť problematiky DMP je v krajinách uskutočňovaný tzv. novorodenecký skrining (NBS), ktorý má za úlohu vyhľadávanie najčastejších DMP u všetkých novorodencov. Spektrum vyhľadávaných chorôb závisí ako na ich početnosti v danej geografickej oblasti, tak aj na závažnosti choroby a dostupnosti všeobecne uznávaných skriningových testov, nie len z organizačnej ale aj z ekonomickej stránky (Racek a Rajdl, 2021; novorozenekyskrining.cz). NBS je prvoradým hodnotením DMP a v rámci neho sú identifikované dedičné poruchy u zdravých novorodencov v presymptomatickom štádiu s cieľom včasného zachytenia poruchy a nasadenia liečby (Lie *et al.*, 2021). V niektorých prípadoch jedinci s potenciálne život ohrozujúcou diagnózou DMP sa narodili ako asymptomatickí a prvé symptómy sa začali prejavovať až v ich postnatálnom štádiu života (Harting *et al.*, 2009).

2.2 Organické acidúrie

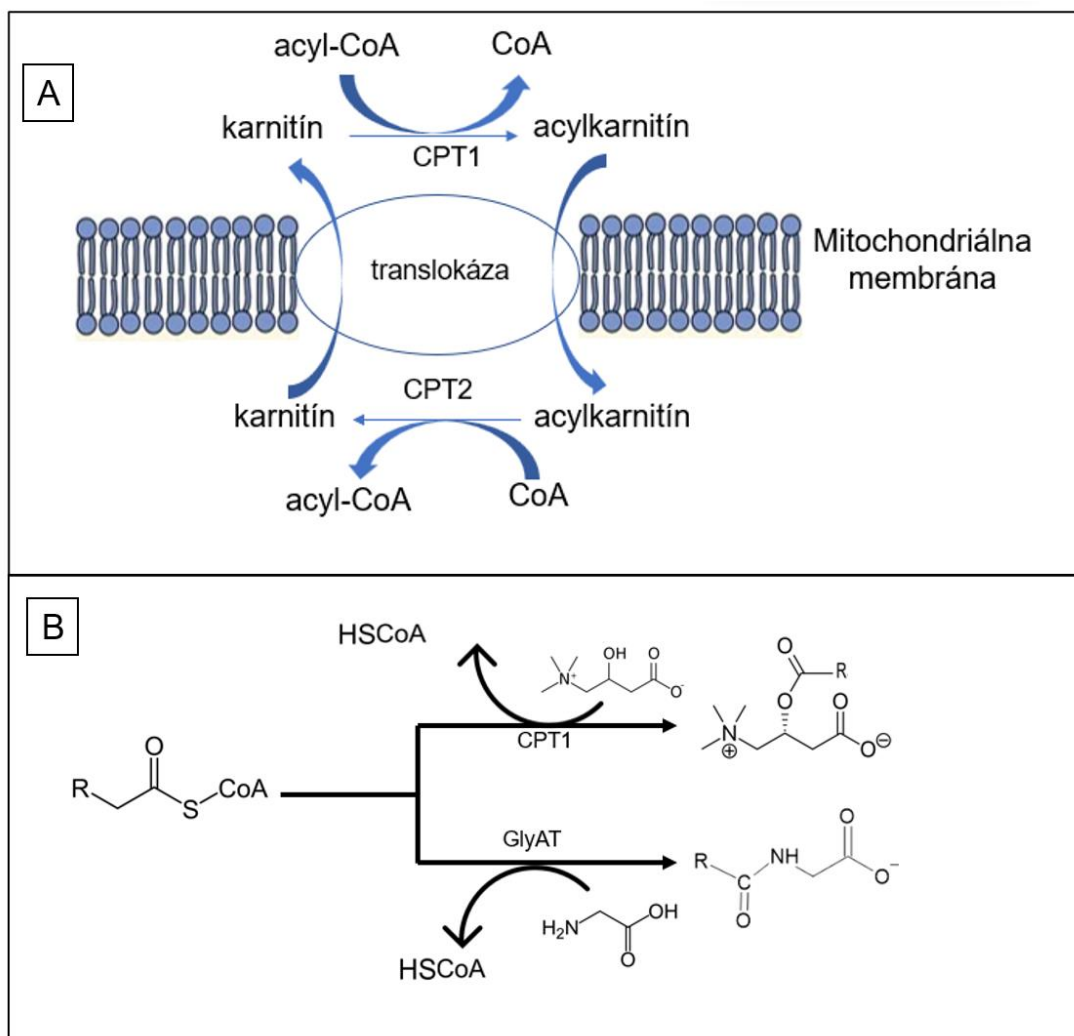
Organické acidúrie sú jednou z skupín DMP centrálného metabolizmu (Ozand and Gascon, 1991). Väčšina organických acidúrií vykazujú autozomálne recesívnu dedičnosť, aj keď existujú aj výnimky - napríklad deficit (S)-3-hydroxyacyl-CoA:NAD⁺ oxidoreduktázy (2-metyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenáza, MHBD, EC 1.1.1.35) - (HSD10, OMIM #300438), ktorý je viazaný na chromozóm X (Wajner, 2019).

Spoločným biochemickým znakom organických acidúrií je akumulácia neamino-karboxylových organických kyselín v bunkách a v biologických tekutinách a vzhľadom na ich polaritu sú dobré rozpustné vo vode a ľahko vylučované močom

(Dimitrov *et al.*, 2021). Akumuláciu týchto látok je možné zistiť v moči (acidúrie) alebo v krvi, kedy sa jedná o acidémie. Ako dôsledok hromadenia organických kyselín dochádza k narušeniu acidobázickej rovnováhy organizmu, laktátovej acidóze a ketóze. V rámci metabolizmu dochádza k vzniku konjugátov organických kyselín, hlavne acylkarnitínov a acylglycínov, ktoré sa tvoria v mitochondriách pečene a obličiek (De Keyzer *et al.*, 2009).

Acylkarnitíny sú medzi produkty metabolizmu mastných kyselín (Ramsay *et al.*, 2001). Ich tvorba je kľúčová pre transport jednotlivých acylov mastných kyselín (obr. 1A, obr. 1B) cez mitochondriálne membrány a je to dôležitý mechanizmus bunky za účelom eliminovať potenciálne hromadenie toxických medzi produktov acyl-koenzýmu A (acyl-CoA) v mitochondriách (Ventura *et al.*, 1998). Acylglycíny sú syntetizované hlavne v pečeni a v obličkách a radia sa medzi sekundárne metabolity pochádzajúce hlavne z oxidácie mastných kyselín. Vznikajú konjugáciou glycínov a acyl-CoA prostredníctvom enzýmu S-adenozyl-L-metionín:glycín N-metyltransferázy (glycín-N-transferáza, GlyAT, EC 2.1.1.20) (obr. 1B) (Gregersen *et al.*, 1984).

Toxicita organických kyselín a ich konjugátov je často spôsobená indukciou mitochondriálnej dysfunkcie, energetického poškodenia a môžu spôsobiť aj oxidačný stres bunky. Tieto dôsledky môžu zapríčiniť dysfunkciu celých orgánov, ktoré sa vyznačujú vysokou potrebou energie (Dimitrov *et al.*, 2021). Organické acidúrie sa prejavujú hlavne v detstve s akútnymi príznakmi katabolického stresu, avšak sa môžu prejaviť kedykoľvek od narodenia až po starobu (Kölker, 2015).



Obr. 1 A - Prenos a tvorba acylkarnitínov na mitochondriálnej membráne. CPT1, CPT2 – acyl-CoA:karnitín O-acetyltransferáza, EC 2.3.1.7; 1 - B Tvorba acylkarnitínu a acylglycínu z acyl-CoA. CPT1-karnitínacyltransferáza 1 GlyAT – glycín-N-transferáza

V niektorých prípadoch organických acidúrií je postačujúca včasná diagnostika a dodržiavanie diétnej liečby. Avšak niekedy ani to najprísnejšie dodržiavanie liečby zároveň s včasnou diagnostikou nezabránia rozvoju ochorenia dokonca aj u jedincov, ktorí netrpeli žiadnym z akútnych stavov (Tuncel *et al.*, 2018).

2.2.1 Vybrané organické acidúrie

Organické acidúrie tvoria veľkú časť DMP (tisícky) a zasahujú do intermediálneho metabolizmu (Adams a Venditti, 2007). V tejto kapitole sú uvedené organické acidúrie, ktoré sú bežne vyšetřované v populácii a sú často popisované v literatúre.

V nasledujúcich podkapitolách sú detailnejšie popísané 3 organické acidúrie, s ktorými som sa stretla počas vypracovávania praktickej časti. Prvá podkapitola sa

venuje deficitu acyl-CoA so stredne dlhým reťazcom:elektrón-transfer flavoprotein 2,3-oxidoreduktázy (acyl-CoA dehydrogenáza mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom, MCAD, EC 1.3.8.7). V druhej podkapitole je časť venovaná izovalerovej acidúrii a tretia podkapitola je venovaná leucinóze.

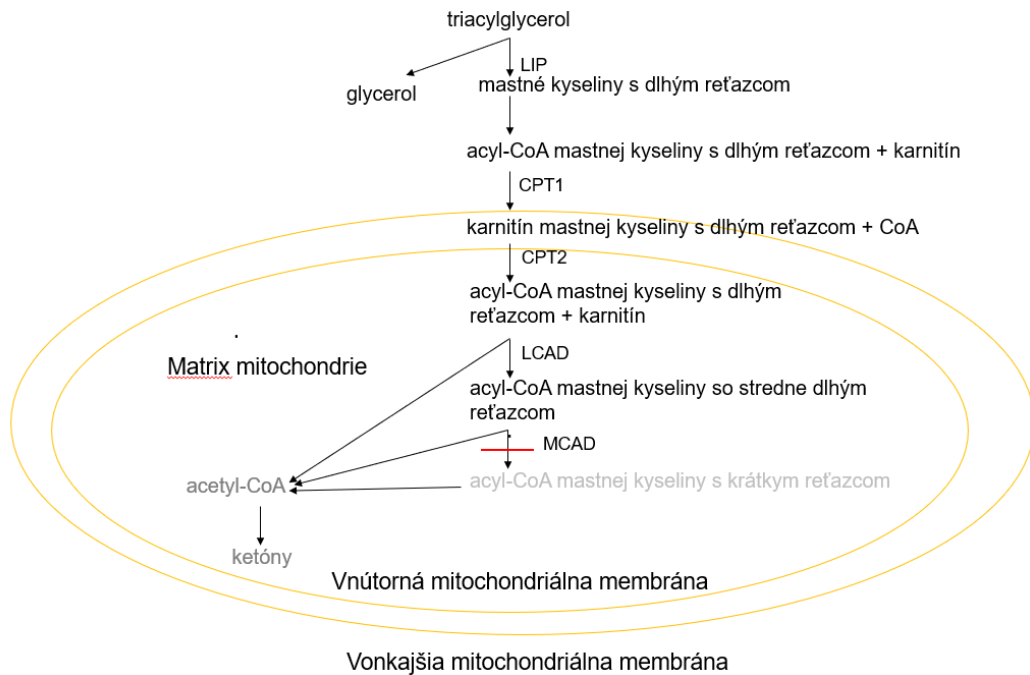
2.2.1.1 Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom

Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom (MCADD, OMIM #607008) je jednou z najčastejších metabolických porúch β -oxidácie mastných kyselín v mitochondriách (obr. 2). Ide o mutáciu v *ACADM* géne (Ibrahim a Temtem, 2022; Tucci *et al.*, 2021). Podľa databázy metagene.de je celosvetový výskyt tejto poruchy u jedného človeka z 9000 až 13000 ľudí.

Vplyvom deficitu enzýmu MCAD, dochádza v tkanivách k nedostatočnej produkcii energie z mastných kyselín (Koolman a Röhm 2012; Ibrahim a Temtem, 2022). Hlavne v hepatocytoch β -oxidácia mastných kyselín poskytuje acetyl-CoA pre ketogénu, ktorá slúži ako hlavný zdroj energie po vyčerpaní zásob glykogénu (obr. 2) (Nohara *et al.*, 2022). Ako dôsledok nastáva akumulácia nie len nepremených acylov mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom, ale aj ich konjugátov vo forme glycínov a karnitínov (Ibrahim a Temtem, 2022).

Medzi symptómy patrí zvracanie, hypoketotická hypoglykémia a encefalopatia (Schuck *et al.*, 2009), aj keď je často u novorodencov asymptomatický, prvé symptómy sa zvyknú prejaviť v období od troch mesiacov do troch rokov (Kennedy *et al.*, 2010).

Diagnostika je založená na detekcii hlavne zvýšeného oktanoylkarnitínu v suchej krvnej škvvrne metódou tandemovej hmotnostnej spektrometrie (novorozeneckyskrining.cz; Waisbren *et al.*, 2013). U pacientov s pozitívnym výsledkom v rámci skríningu nasledujú ďalšie diagnostické testy ako je analýza organických kyselín a genetické potvrdenie mutácie v *ACADM* géne (Kennedy *et al.*, 2010).



Obr. 2 Zjednodušená schéma metabolizmu triacylglycerolu v rámci β -oxidácie mastných kyselín. Krok katalyzovaný defektným enzýmom MCAD, LIP – triacylglycerol acylhydroláza (lipáza, LIP EC 3.1.1.3), LCAD – acyl-CoA s dlhým reťazcom:elektrón-transfer flavoproteín 2,3-oxidoreduktáza (acyl-CoA dehydrogenáza mastných kyselín s dlhým reťazcom, LCAD, EC 1.1.1.211), časť metabolizmu označená čiernou farbou predstavuje metabolické deje prebiehajúce u pacienta s deficitom MCADD a časť metabolizmu označená sivou farbou predstavuje metabolické deje, ktoré prebiehajú u zdravej populácie

Vo všeobecnosti pacienti s defektom v oxidácii mastných kyselín majú v tele zvýšené estery karnitínov a glycerínov. (novorozeneckyskrining.cz; Waisbren *et al.*, 2013). Následnou analýzou organických kyselín a ich konjugátov v moči sú pozorované zvýšené hodnoty aj ďalších markerov ako je suberylglycín, fenypropionylglycín, heptanoyl- a hexanoylglycín, hexanoylkarnitín a suberát (Mason *et al.*, 2023).

Dôležitá je včasná diagnostika tohto deficitu, ktorá môže zabrániť ďalším závažným dôsledkom. Následná liečba spočíva v úprave stravovacích návykov za vysokého príjmu sacharidov a za nízkeho príjmu tukov vo forme triacylglyceridov so stredne dlhým reťazcom (Ibrahim a Temtem, 2022).

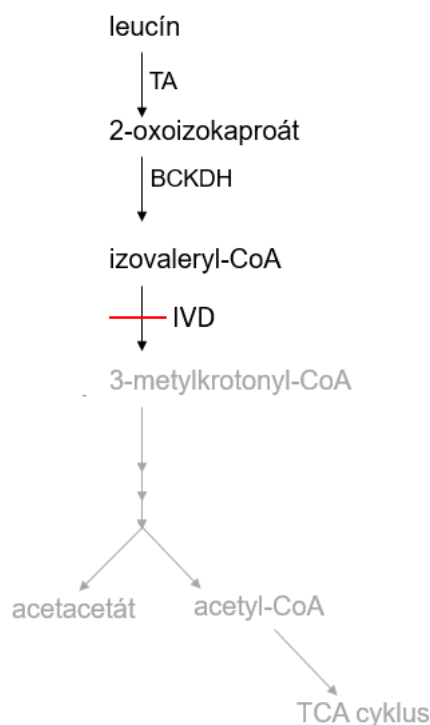
2.2.1.2 Izovalerová acidúria

Izovalerová acidúria (IVA, OMIM #243500) patrí medzi klasické organické acidúrie. Je spôsobená defektom mitochondriálneho enzýmu 3-metylbutanoyl-CoA:elektrón-transfer flavoproteín oxidoreduktázy (izovaleryl-CoA dehydrogenáza, IVD, EC 1.3.8.4), ktorý katalyzuje premenu izovaleryl-CoA na 3-metylkrotonyl-CoA - 3. krok

metabolizmu leucínu (obr. 3) (Dionisi-Vici *et al.*, 2004; Mohsen a Vockley, 2015) a nastáva akumulácia samotného izovaleryl-CoA a jeho metabolitov v biologických tekutinách (obr. 3) (Grünert *et al.*, 2012).

IVA bola v roku 1966 prvou diagnostikovanou organickou acidúriou metódou plynovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou (Tanaka, *et al.*, 1966). Od roku 1990 je izovalerová acidúria súčasťou novorodeneckého skríningu v mnohých krajinách po celom svete (Mütze *et al.*, 2020). Podľa databázy metagene.de je výskyt tejto acidúrie u jedného zo 100 000 jedincov.

IVA sa delí na dva typy a to na: akútna novorodenecká IVA a chronická IVA. Akútna novorodenecká izovalerová acidúria sa prejavuje symptómami ako je encefalopatia, letargia, zápach spotených nôh, triaškou a vývojovým oneskorením. Prejavy chronickej izovalerovej acidúrie sú spojené s príjmom potravín s vysokým obsahom proteínov a s infekciami (Dercksen *et al.*, 2012).



Obr. 3 Zjednodušená schéma metabolizmu leucínu. Krok katalyzovaný defektným enzýmom IVD vyznačený na červeno. TA – aminokyselina:2-oxokyselinaa aminotransferáza (transamináza, TA, EC 2.6.1.x) BCKDH - 3-metyl-2-oxobutanoát:[dihydrolipoyllyzín (2-metylpropanoyl)transferáza]-lipoyllyzín 2-oxidoreduktáza (dehydrogenáza alfa-ketokyselín s rozvetveným reťazcom, BCKDH, EC 1.2.4.4), časť metabolizmu označená čiernou farbou predstavuje metabolické deje prebiehajúce u pacienta s deficitom IVA a časť metabolizmu označená sivou farbou predstavuje metabolické deje, ktoré prebiehajú u zdravej populácie

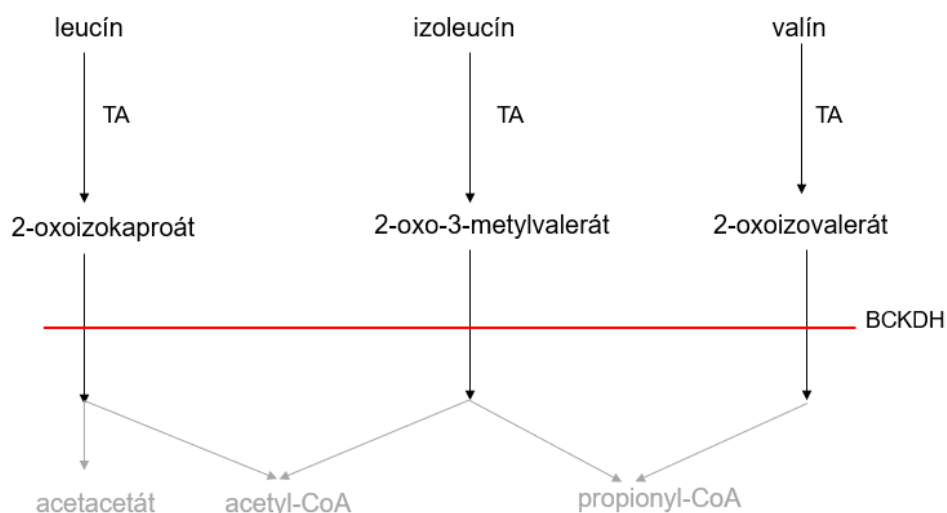
Laboratórna diagnostika izovalerovej acidúrie v rámci novorodeneckého skríningu je založená na detekcii zvýšených karnitínov s piatimi acylovými uhlíkmi v suchej krvnej škrvne tandemovou hmotnostnou spektrometriou. Ide o zmes izomérov izovalerylkarnitínu, z ktorých 1 nie je fyziologicky prítomný v telových tekutinách – pivaloylkarnitín (Diep, 1995; Brass, 2002).

Detekovaný pivaloylkarnitín (izomér izovalerylkarnitínu) spôsobuje falošnú pozitivitu pre IVA (Murko *et al.*, 2023). Pivaloylkarnitín nie je fyziologicky v telových tekutinách prítomný a v tele vzniká dôsledkom užívania antibiotík (Diep, 1995) alebo jeho deriváty sú používané ako aditíva v kozmetike, prípadne môžu byť prítomné v mäse (Dembitsky, 2006). Pomocou druhostupňových metód (tzv. second-tier metód), ktoré zahŕňajú metódu ako je UPHLC-MS/MS je možné rozlíšiť jednotlivé C5 izoméry pivaloyl-, 2-metylbutyryl-, izovaleryl-, and valerylkarnitín (Minkler *et al.*, 2017). V biologických tekutinách sú prítomné aj metabolity izovalerátu a to hlavne 3- a 4-hydroxyizovalerát a 3-hydroxybutyrát (Villani *et al.*, 2017).

Pre pacientov je dôležité dodržiavať diétu s obmedzeným množstvom bielkovín. Terapia často spočíva v p.o. aplikácii L-karnitínu a L-glycínu. Pacientom, hlavne novorodencom je podávaná zmes aminokyselín bez obsahu leucínu, aby bol zabezpečený normálny rast a vývoj dieťaťa (Baulny a Saudubray, 2002)

2.2.1.3 Leucinóza

Leucinóza alebo inak nazývaná choroba javorového sirupu (Maple Syrup Urine Disease - MSUD, OMIM #248600) je známa od roku 1954 (Blackburn *et al.*, 2017; Dancis *et al.*, 1959). Ide o defekt dehydrogenázového komplexu alfa-ketokyselín s rozvetveným reťazcom (Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase - BCKDH), ktorý sa uplatňuje v metabolizme leucínu, izoleucínu a valínu (obr. 4) (Blackburn *et al.*, 2017). Medziprodukty metabolizmu esenciálnych aminokyselín s rozvetveným reťazcom sú súčasťou ďalších metabolických dráh v bunkách, ako je glukoneogenéza, proteosyntéza, syntéza mastných kyselín a cholesterolu (Hassan a Gupta, 2022).



Obr. 4 Zjednodušená schéma metabolizmu leucínu, izoleucínu a valínu. Krok katalyzovaný defektným enzýmom - BCKDH zvýraznený na červeno, časť metabolizmu označená čiernou farbou predstavuje metabolické deje prebiehajúce u pacienta s deficitom IVA a časť metabolizmu označená sivou farbou predstavuje metabolické deje, ktoré prebiehajú u zdravej populácie

Existuje 5 klinicky rôznych fenotypov MSUD na základe miesta mutácie v tetramére BCKDH. Pri prvom type, ktorý označovaný ako klasický ide o mutáciu podjednotiek E1 α , E1 β a E2 a tento typ je najčastejšie diagnostikovaný v neonatálnom veku pacientov. Ďalšie 4 typy bývajú diagnostikované u pacientov v rôznom veku. Ide o tzv. bežný typ (mutácia podjednotiek E1 α , E1 β a E2), zriedkavý typ (mutácia podjednotiek E1 α , E1 β a E2), typ citlivý na tiamín (mutácia podjednotky E2) a E3 deficientný typ (mutácia podjednotky E3) (Blackburn *et al.*, 2017).

Celosvetový výskyt pre MSUD je 1:185000 (metagene.de). Diagnostika MSUD je v novorodeneckom skríningu založená na sledovaní pomeru Leu+Ile/Phe+Ala v suchej krvnej škvŕne (Strauss *et al.*, 2020). MSUD je ďalej detekovaná pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie avšak touto metódou nemusí byť diagnostikovaná práve ľahšia forma MSUD. Táto ľahšia forma MSUD sa vyznačuje normálnymi hladinami leucínu v biologických tekutinách (Blackburn *et al.*, 2017). V moči sú detekované okrem zvýšeného leucínu, izoleucínu a valínu aj ďalšie markery ako je napríklad 2-hydroxyizovalerát, 2-hydroxyizokaproát, 2-oxoizovalerát a 3-hydroxybutyrát (Villani *et al.*, 2017).

Hydroxyprolinémia býva často príčinou falošnej pozitivity skríningu pre MSUD z dôvodu zhodnej molekulovej hmotnosti hydroxyprolínu, leucínu a izoleucínu (Staufner *et al.*, 2016; Baykal *et al.*, 2004). Táto porucha z veľkej časti

nespôsobuje žiadne fyzické ťažkosti a neboli pozorované ani zmeny v kognitívnych funkciách jedinca (Kim *et al.*, 1997). V niektorých prípadoch bola u jedincov s touto poruchou pozorovaná hematuria (metagene.de). Práve druhostupňové metódy sú nápomocné pri odlíšení MSUD od hydroxyprolinémie, ďalšie laboratórne testy zahŕňajú plynovú alebo kvapalinovú chromatografiu s hmotnostnou spektrometriou a testovanie aktivity enzýmov (Blackburn *et al.*, 2017).

Novorodenci s MSUD sú často asymptomatický, avšak prvé symptómy sa začínajú prejavovať už pár hodín po narodení. Medzi prvé symptómy patrí veľmi nízka hmotnosť, letargia, apnea a zápach moču – zápach javorového sirupu. Ak sa MSUD nepodchyť včas už po 10 dňoch môže nastať edém, kóma a zlyhanie dýchania (Strauss *et al.*, 2020). Terapia zahŕňa vylúčenie aminokyselín s rozvetveným reťazcom zo stravy, podávanie tiamínu, avšak občas je v týchto prípadoch potrebná transplantácia pečene (Blackburn *et al.*, 2017, Hallam *et al.*, 2005)

2.2.2 Diagnostika organických acidúrií

Z definície DMP vyplýva aj podstata ich diagnostiky. V biologickom materiáli sú analyzované markery vyplývajúce z defektnej metabolickej dráhy, ako sú nahromadené substráty, znížené hodnoty pre analyty určujúce nedostatok produktu alebo je možné detekovať produkty tvorené alternatívnymi metabolickými dráhami. Laboratórna diagnostika organických acidúrií je všeobecne založená na detekcii vysokej koncentrácie charakteristických organických kyselín v moči a v sére (Wajner, 2019). Prvou diagnostikovanou organickou acidúriou bola v 1966 izovalerová acidúria metódou plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou – GC-MS (Tanaka, *et al.*, 1966). Konečná diagnostika je založená až na genetickom testovaní (novorozeneckyskrining.cz).

V dnešnej dobe sa najčastejšie využíva pre analýzu organických kyselín hmotnostná spektrometria, ktorá je už dnes nenahraditeľná pri diagnostike DMP. Rutinne je analýza organických kyselín stále doménou GC-MS, ale pretrváva snaha o jej nahradenie. V mnohých štúdiách boli na diagnostiku organických acidúrií použité metódy kvapalinovej chromatografie ako sú napríklad vysokoúčinná kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou s kvadrupólovým analyzátorom a analyzátorom doby letu - HPLC-QTOF/MS (Körver-Keularts *et al.*, 2018) a ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

v spojení s hmotnostnou spektrometriou s trojitým kvadrupólom - UHPLC-QqQ (Minkler *et al.*, 2017).

Na analýzu organických acidúrií môže byť využívaná aj nukleárna magnetická rezonancia (NMR). NMR je často preferovanou analytickou metódou pre reprodukovateľnú detekciu zlúčenín s nízkou molekulovou hmotnosťou v biologických tekutinách a v toxikologických metabolomických štúdiách (Pasinkanti *et al.*, 2008). Ide o rýchlu a účinnú metódu. Na analýzu je potrebné malé množstvo vzorky a jej spracovanie a interpretácia výsledkov nie je časovo náročná, ale má obmedzenú citlivosť (Pulido *et al.*, 2021). V diagnostike organických acidúrií môže byť metóda $^1\text{H-NMR}$ používaná spoločne s GC-MS. Ide hlavne o diagnostiku acidémií, ako sú izovalerová, propiónová, metylglutakónová a glutarová typ I, ďalej poruchy metabolizmu fenylalanínu a deficity acyl-CoA dehydrogenázy so stredne dlhým reťazcom (Pulido *et al.*, 2021).

Ďalšou staršou metódou pre analýzu organických acidúrií je aj chromatografia na tenkej vrstve (TLC). TLC je nenákladná, reprodukovateľná metóda jednoduchá na prevedenie. Poskytuje kvalitatívnu identifikáciu niekoľkých organických acidúrií hromadnom skriningu a aj pri akútnych stavoch pacientov. Táto metóda môže slúžiť na predbežnú diagnostiku a na intervenciu ešte pred tým, ako sa diagnóza potvrdí inou diagnostickou metódou. Odporúča sa ďalšia analýza pomocou GC-MS na potvrdenie diagnózy (Shetty *et al.*, 2021). Z dôvodu svojej nízkej nákladnosti sa môže využívať na diagnostiku organických acidúrií v rozvojových krajinách ako je napríklad India (Shetty *et al.*, 2021, Kulshrestha *et al.*, 2014). Analyzované boli markery ako acetoacetát, sukcinylacetón, homogentisát, kyselina metylmalonová, laktát, glutarát a pyruvát (Shetty *et al.*, 2021).

2.2.2.1 Plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou

Plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) je od roku 1970 populárnou metódou na profilovanie metabolitov a stále sa používa na diagnostiku mnohých metabolických porúch (Chace, 2011). GC-MS našla svoje zastúpenie v diagnostike celej rady organických acidúrií a dodnes sa využíva pre rutinnú laboratórnu diagnostiku organických acidúrií. Toto spojenie sa ukázalo ako veľmi užitočná metóda z dôvodu svojej vysokej citlivosti a reprodukovateľnosti (Jin *et al.*, 2022; Chace, 2001).

GC-MS má výhody ako je napríklad vysoká separačná účinnosť, špecifita, citlivosť, nízke maticové efekty a množstvo dostupných popísaných hmotnostných spektier na identifikáciu všetkých metabolitov prítomných vo vzorke (Körver-Keularts *et al.*, 2018). Celú analýzu komplikuje skutočnosť, že vyhľadávanie v dostupných hmotnostných spektrách vyžaduje školený personál a celé vyhľadávanie je časovo náročné, pretože treba prechádzať jednotlivé píky. V diagnostike organických acidúrií je dôležité diagnostikovať nie len samotné organické kyseliny, ale aj ich konjugáty. Acylglycíny sú ťažko analyzovateľné metódou GC-MS, z dôvodu nízkej citlivosti a tvorby širokých píkov a ich zlého tvaru v chromatograme. Práve pre analýzu acylglycínov a acykarnitínov v biologických tekutinách je vhodnejšia práve LC-MS (Körver-Keularts *et al.*, 2018; Ivanovová *et al.*, 2021).

Hlavným znakom látok, ktoré sú vhodné pre analýzu GC-MS je práve prchavosť a tepelná stabilita. Organické kyseliny a ďalšie metabolity v moči sú polárne a neprchavé a vzorky je potrebné pred samotnou analýzou derivatizovať (Pasikanti *et al.*, 2008). Preto je celá analýza od prípravy vzorky až po jej vyhodnotenie pracná a časovo náročná (Körver-Keularts *et al.*, 2018). Vo všeobecnosti sa ako derivatizačné činidlá sa pre amino- a organické kyseliny používajú kyselina perfluoropropiónová, kyselina perfluorobutánová, anhydrid kyseliny trifluoroctovej, N-acetylimidazol, pentafluorobenzylbromid, hydroxid tetrametylamónny, metylchlóroformiát a diazometán (McCullagh a Oldham, 2019). Na derivatizáciu organických kyselín sa v klinickej praxi používa samotný N,O-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid alebo v kombinácii s trimetylchlórosilánom, ktoré sú účinné pre derivatizáciu analytov obsahujúcich karboxy- a hydroxy- skupinu. Vzorky sa pred analýzou extrahujú najčastejšie do etylacetátu (Christou *et al.* 2014, Villani *et al.*, 2017). Ako nosný plyn je využívaný inertný plyn – hélium (Wajner *et al.*, 2009).

Čas analýzy sa skrátil s príchodom techniky dvojrozmernej plynovej chromatografie (GCxGC) v spojení s hmotnostnou spektrometriou s analýzou doby letu (TOF-MS). Tým sa zvýšilo aj množstvo analytov, ktoré je možné detekovať počas jednej analýzy (Pasikanti *et al.*, 2008).

GC-MS má svoje postavenie v klinickej diagnostike nielen organických acidúrií, ale aj iných skupín DMP už od 90. rokov 20. storočia, ale pre porovnanie kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou poskytuje vyššiu špecifitu.

LC-MS je vhodnejšia pre polárne analyty ako sú organické kyseliny a ich konjugáty (McCullagh a Ordham, 2019). Ako už bolo spomenuté, GC-MS je časovo náročná metóda, ako z pohľadu prípravy a analýzy vzorky, ale aj z hľadiska vyhodnotenia, preto veľmi nie je vhodná pre vzorky určené k urgentnému laboratórnemu vyšetreniu, tzv. STATIM vzorky.

2.2.2.2 Kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou

Pre nedostatky GC-MS pre analýzu organických kyselín v moči je snaha o zavedenie vhodnejších metód. Pre matricu moču vyzerá sľubne práve LC-MS/MS, ktorá sa začína využívať ako druhostupňová metóda novorodeneckého skríningu pre jej mnohé výhody. Je použiteľná hlavne pre metabolizmus aminokyselín, organických kyselín a mastných kyselín (Jin *et al.*, 2022; Gelb, *et al.*, 2022).

Techniky LC-MS pre diagnostiku organických acidúrií sú v porovnaní s GC-MS jednoduchšie na prevedenie z dôvodu povahy organických kyselín. Už prvotné experimenty ukázali, že LC-MS je budúcnosť pre laboratórnu diagnostiku organických kyselín, pretože poskytuje lepšie výsledky oproti doteraz využíwanej GC-MS (Jin *et al.*, 2022; Körver-Keularts *et al.*, 2018).

Diagnostika je možná aj pomocou komerčne dostupných diagnostických kitov, ktoré boli vyvinuté firmami *Zivak Technologies a Jasem*. Oba kity sú určené pre LC-MS/MS diagnostiku organických kyselín (zivak.com, jasem.com.tr).

Zivak Technologies kitmi je možné analyzovať až 73 organických kyselín, ktoré slúžia ako napríklad nutričné, mitochondriálne markery, markery Krebsovho cyklu, metabolizmu aminokyselín, ketónov a mastných kyselín, ale aj oxalátové a neurotransmitérové metabolity. Podľa odporúčaní výrobcu analýza organických kyselín prostredníctvom kitu od firmy *Zivak Technologies* trvá približne 20 minút. V tom čase je zahrnutá nie len samotná analýza vzorky, ale aj jej príprava (zivak.com).

Pomocou kitu od firmy *Jasem* je možné analyzovať 54 organických kyselín bez derivatizácie vzorky. Firma takisto deklaruje úspešnú separáciu aj izomérnych foriem organických kyselín ([Jasem.com.tr](http://jasem.com.tr)).

Počas niektorých štúdií bola klinicky validovaná UHPLC-QTOF-MS, kedy sa podarilo separovať a identifikovať 258 metabolitov, ktoré zahŕňali aj acylkarnitíny, aminokyseliny, puríny a pyrimidíny (Steinbusch *et al.*, 2021).

Talianski vedci (Ruopollo *et al.*, 2022) analyzovali vzorky suchých krvných škvŕn novorodencov narodených v rokoch 2017-2020. Jednotlivé vzorky boli testované v rôznych laboratóriách v Taliansku a rozdiely pre jednotlivé laboratória boli v spôsobe derivatizácie vzoriek. Boli používané aj komerčne dostupné kity. Detekcia metabolitov v DBS prebiehala pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie a po analýze nasledovali druhostupňové metódy na vyradenie falošne pozitívnych výsledkov. Najčastejšie ako druhostupňová metóda bola použitá LC-MS/MS. Testované boli aminoacidémie, organické acidémie, defekty v betaoxidácii mastných kyselín a v močovinovom cykle. Výsledky jednotlivých laboratórií sa líšili práve pri prevedení druhostupňových metód a záverom bola snaha o harmonizáciu týchto metód aj pre ďalšie laboratóriá (Ruopollo *et al.*, 2022).

V Číne sa rutinne na diagnostiku používa MS/MS alebo GC/MS (Ngan *et al.*, 2022), avšak už prebehli niektoré štúdie analýzy metabolitov pomocou HPLC-MS/MS pre kvantitatívnu analýzu, kde na prípravu vzorky boli použité kity pre MS/MS analýzu bez derivatizácie analytov. Z metabolitov boli testované aminokyseliny, acylkarnitíny a ketóny (Zhang *et al.*, 2022).

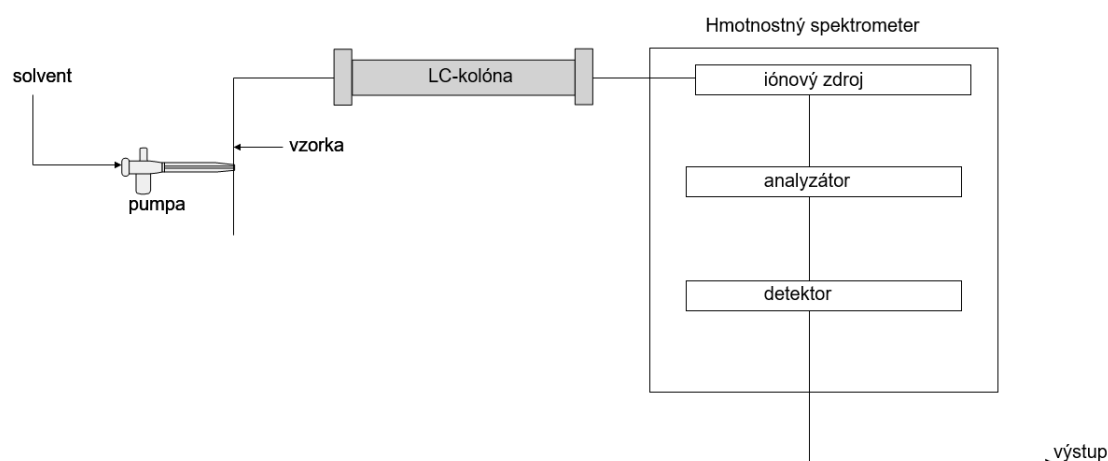
LC-MS/MS sa používa aj v proteomických analýzach DMP – bottom up proteomická stratégia, kde sú proteíny separované buď 2D SDS-PAGE alebo kvapalinovou chromatografiou a následne sú proteíny analyzované tandemovou hmotnostnou spektrometriou s použitím hlavne MALDI ako ionizačnej techniky (Chantada-Vázquez *et al.*, 2022).

2.3 Metóda kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou

Chromatografické techniky v biochemickej praxi sú jednou z najdôležitejších separačných metód, ktoré sú využívané ako na analytické tak aj na preparatívne účely (Pingoud 2002). Zvýšené nároky na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu komplexnejších vzoriek sú výzvou pre modernú analýzu. Pre komplexné organické vzorky ako sú napr. telesné tekutiny, tak tieto nároky spĺňajú práve chromatografické alebo elektroforetické separácie s hmotnostnou detekciou (Kromidas, 2017).

Vo všeobecnosti hlavným princípom separácie je rozdielna distribúcia látok medzi dvoma navzájom nemiešateľnými komponentami, ako napríklad kvapalina-tuhá látka (LC-liquid chromatography) (Pingoud 2002). V prípade kvapalinovej chromatografie je mobilnou fázou kvapalina – rozpúšťadlo alebo zmes rozpúšťadiel a stacionárna fáza môže byť rozprestretá na plochom podklade (chromatografia na tenkej vrstve) alebo uzavretá v stĺpci (Foldra, 2013, McCullagh a Ordham, 2019). Tekutá vzorka je vstrekaná do mobilnej fázy, ktorá preteká po povrchu stacionárnej fázy (McCullagh a Ordham, 2019). Techniky kvapalinovej chromatografie je možné rozdeliť na základe povahy mobilnej fázy na NP-LC (normal phase – normálna fáza) a RP-LC (reverse phase – obrátené fáze). V systéme normálnej fázy je stacionárna fáza polárnejšia než mobilná fáza a v systéme obrátenej fáze je to naopak (Foldra, 2013).

V spojení LC-MS sú analyty separované z chromatografickej kolóny selektívne detekované pomocou hmotnostnej spektrometrie (Foldra, 2013). V rámci detekcie látok hmotnostnou spektrometriou, ktoré boli separované kvapalinovou chromatografiou dochádza k trom krokom – ionizácia analytov, rozdelenie iónov podľa pomeru m/z a ich urýchlenie v analyzátore a nakoniec detekcia iónov (obr. 5) (Nováková *et al.*, 2013). Spojenie LC s MS nie je jednoduchá úloha vzhľadom na techniku, pretože kvapalná fáza kvapalinovej chromatografie sa musí spojiť s plynnou fázou hmotnostnej spektrometrie (Foldra, 2013). Využitie LC-MS v analýze biologických vzoriek „otvára brány“ novým možnostiam (McCullagh a Ordham, 2019).



Obr. 5 Schéma LC-MS

Medzi výhody spojenia týchto dvoch techník patrí: možnosť analýzy zložitých zmesí, menšia spotreba vzorky, lepšia kvalita spektrálnych dát, nižšia interferencia a celkovo vyššia spoľahlivosť analýzy. Spojenie LC-MS techník sa využíva nie len k identifikácii analytov, ale aj na ich kvantifikáciu, prípadne na určenie molekulovej hmotnosti (Nováková *et al.*, 2013).

2.3.1 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Základný princíp vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie je založený na rovnakom princípe ako klasická kvapalinová chromatografia. Na rozdiel od klasických techník sa vyznačuje lepším celkovým výkonom, ktorý zahŕňa vlastnosti ako lepšie rozlíšenie, kratší čas samotnej analýzy a lepšia reprodukovateľnosť (Pingoud 2002).

Chromatografické HPLC kolóny majú vyššiu kapacitu a je nimi možné uskutočniť analýzy, ktoré vyžadujú vysoké prietoky. Tieto vysoké prietoky sú zabezpečené vysokým tlakom, pričom je možné dosiahnuť tlak až 10^7 Pa (100 bar), prípadne viac, záleží od samotnej kolóny a eluentu (Pingoud 2002). HPLC kolóny sú naplnené malými poréznymi časticami a mobilná fáza je cez celý systém poháňaná vysokotlakovou pumpou alebo čerpadlom (David, 2013).

HPLC je dnes jednou z najrozšírenejších separačných techník nie len v analytických a výskumných laboratóriách, ale aj v tých rutinných. Medzi výhody týchto techník patrí robustnosť, vysoká životnosť systému a rozsah použitia. Je vhodná pre analýzu malých molekúl ako sú nízkomolekulárne látky a anorganické ióny, ale aj pre biopolyméry ako sú cukry, peptidy a lipidy. (Nováková *et al.*, 2012.).

2.3.2 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria je analytická metóda, ktorá je založená na interakcii nabitých častíc vo vákuu s magnetickým alebo elektrickým poľom – tvorba iónov z atómov alebo molekúl (Pingoud, 2002, McCullagh a Ordham, 2019). Intenzita meraného signálu závisí na pomere m/z interagujúcich častíc v plynnej fáze, takže ak je známy náboj je možné určiť hmotu (molárnu hmotnosť...) (Pingoud, 2002; McCullagh a Ordham, 2019).

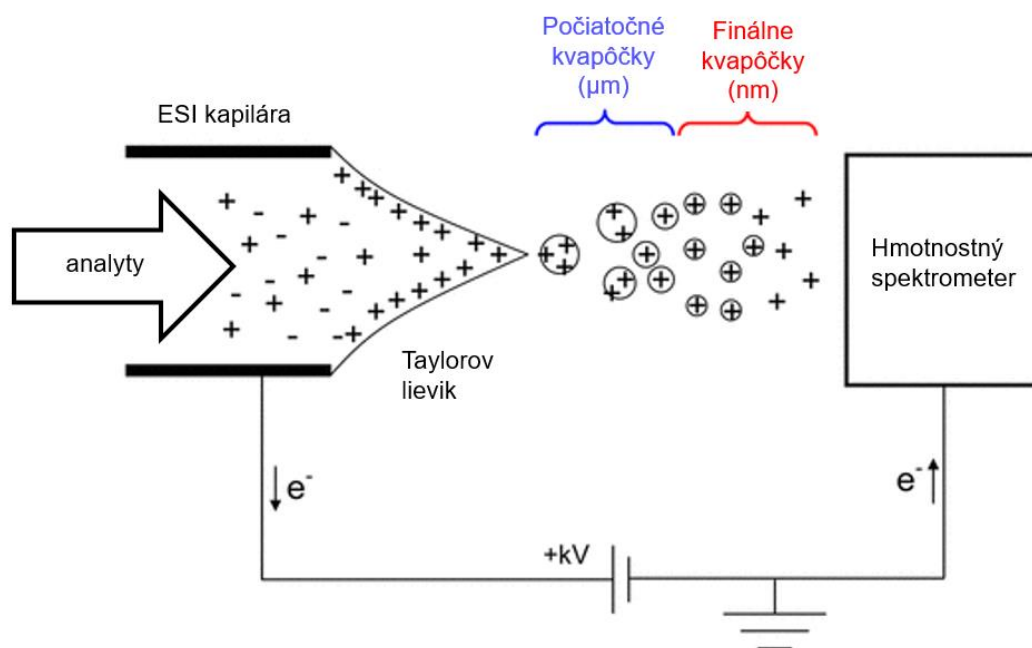
Táto technika sa vyznačuje vysokou citlivosťou a selektivitou, pretože veľmi málo iónov je potrebných na produkciu merateľného signálu. Udáva sa, že technika je

taká citlivá, že je možné určiť m/z pre jednu zložku z 10^4 bez nejakých väčších problémov (Pingoud, 2002). Takže MS je vhodná pre analýzu tuhých, kvapalných a plyných vzoriek v malom množstve. V spojení s chromatografickými technikami predstavuje MS spoľahlivý a citlivý detektor (McCullagh a Ordham, 2019).

Vďaka svojej selektivitě je možné analyzovať aj komplexnejšie zmesi, čo je výhoda pre analýzu biologických vzoriek (McCullagh a Ordham, 2019). Často sa pomocou hmotnostnej spektrometrie analyzujú malé molekuly. S postupným vývojom je už možné analyzovať aj veľké molekuly, makromolekuly a makromolekulové komplexy s použitím vhodných ionizačných techník ako je ESI a MALDI (Pingoud 2002).

Dôležitým krokom pre MS je ionizácia analytu a celá analýza prebieha v plynnej fáze. Aby to bolo možné MS vyžaduje vysoké vakuum, aby ióny v plynnej fáze boli analyzované bez toho, aby boli ovplyvnené molekulami okolia. Ďalšou požiadavkou je, aby vzniknuté ióny v plynnej fáze boli dostatočne stabilné až po detektor (McCullagh a Ordham, 2019). Ionizácia analytov je možná rôznymi spôsobmi – strata elektrónu (elektrónová ionizácia, Penningova ionizácia, fotoionizácia), záchyt elektrónu, výmena náboja, odoberanie aniónu, prenos protónu a tvorbou aduktov. Dnes sa uplatňuje hlavne pri spojení hmotnostnej spektrometrie s plynovou a kvapalinovou chromatografiou (Lemr a Borovcová, 2020).

Elektrosprejová ionizácia (ESI, obr. 6) sa uplatňuje v analýze polárnych malých organických látok a makromolekúl. Ide o spôsob rozprašovania roztoku pôsobením elektrického poľa. Počas rozprašovania sa tvoria veľmi malé nabitě kvapky (obr. 6). Elektrosprejovanie je vyvolané vložením napätia medzi sprejovaciú kapiláru a vstup do vakuovanej časti hmotnostného spektrometru. Analyty sú privádzané vo vhodnom rozpúšťadle, tvoria sa nabitě kvapky, následne sa tieto kvapky zmenšujú a ióny sa uvoľnia do plynnej fázy (Lemr a Borovcová, 2020; Fenn 2000). Pri elektrosprejovaní je na vzniknutých kvapkách akumulovaný náboj, kedy dochádza k zmene tvaru kvapôčiek na kužeľovitý útvar, tzv. Taylorov lievik (obr. 6) (Taylor, 1969).



Obr. 6 Ionizácia elektrosprejom (ESI), (prevzaté a upravené Konnerman *et al.*, 2013)

Existuje niekoľko typov analyzátorov pre MS. Medzi často používané patria analyzátory doby letu (time of flight – TOF) a kvadrupólové analyzátory (Pingoud, 2002) a tzv. iónové pasce. V prípade spojenia hmotnostnej spektrometrie s kvapalinovou chromatografiou sa stretávame s kvadrupólovými analyzátormi, ako je jednoduchý a trojitý kvadrupól (Chester, 2013).

Rozvoj hmotnostnej spektrometrie pomohol rozvíjať analýzy v klinickej, toxikologickej a forenznej oblasti. Je dôležitou súčasťou v oblasti diagnostiky – v oblasti klinickej biochémie a v klinickej mikrobiológii v rámci diagnostiky infekčných ochorení (Pluháček a Havlíček, 2020; Palyzová a Havlíček 2020).

Využitie techník hmotnostnej spektrometrie pre diagnostiku DMP zahŕňa detekciu a kvantifikáciu vopred určeného biomarkeru – metabolitu, ktorý je mimo referenčné rozmedzie. MS techniky sú pre túto diagnostiku vhodné, pretože určený metabolit obsiahnutý v biologickom materiáli je často vo veľmi nízkej koncentrácii v porovnaní s ostatnými metabolitmi (McCullagh a Oldham, 2019).

2.3.2.1 Kvadrupólové analyzátory

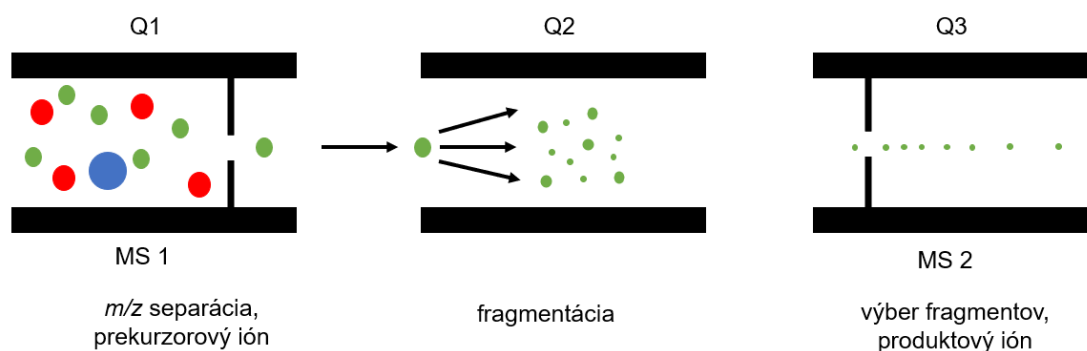
Analyzátory tvoria základ hmotnostného spektrometra a sú navrhnuté tak, aby mohli separovať ióny na základe rozdielneho m/z (McCullagh a Ordham, 2019).

Kvadrupólový analyzátor je jeden z najrozšírenejších analyzátorov v rámci hmotnostnej spektrometrie. Bol popísaný v roku 1953 (Paul a Steinwedel, 1953). Vyznačuje sa jednoduchou obsluhou je robustný, poskytuje vysoké a presné rozlíšenie hmoty a vyžaduje relatívne jednoduchú obsluhu. Je vhodný na spojenie so separačnými technikami (Havlíček a Tureček, 2020; Friedecký a Lemr 2012; McCullagh a Ordham, 2019).

Kvadrupól je preletová varianta hmotnostného analyzátoru. Podstatou kvadrupólového analyzátoru je oscilujúce elektrické pole, ktoré ovplyvňuje trajektóriu nabitých častíc, ktoré ním buď prejdú alebo sa zachytia. Je tvorený kombináciou štyroch tyčí, na ktoré je privedená kombinácia jednosmerného a striedavého napätia (Havlíček a Tureček, 2020; Friedecký a Lemr 2012). Kvadrupólové analyzátory sú dynamické prístroje, ktoré ovplyvňujú trajektórie iónov súborom časovo závislých a dynamických síl (March a Todd, 2005).

Hmotnostné spektrometre s trojitým kvadrupólom sú vhodné pre kvantifikáciu malých molekúl (Volný, 2020) a v experimentoch tandemovej hmotnostnej je veľmi flexibilný a silný nástroj, ktorý zaisťuje vysokú citlivosť a flexibilitu (McCullough a Oldham, 2019). Typické meranie v tandemovej spektrometrii spočíva v troch základných krokoch: izolácia iónov s následnou aktiváciou a vybudením energie iónov, čo môže nastať napríklad zrážkou s neutrálnym plynom a ako posledná nasleduje analýza vzniknutých fragmentov (Sadílek, 2020).

Trojité kvadrupól je najčastejšie spojený so separačnou HPLC technikou v metabolomike (McCullough a Oldham, 2019). Tento typ analyzátoru v konfigurácii v LC-MS má množstvo výhod pre analýzu malých molekúl. Ide o nízku hranicu stanoviteľnosti a detekcie pri použití napríklad MRM módu (multiple reaction monitoring mode, obr. 7), takisto má najväčší dynamický lineárny rozsah a prijateľnú cenu (Volný, 2020). Jednotlivé analyty sa v prvom kvadrupóle (Q1) rozdelia podľa molekulovej hmotnosti a ďalej putujú do kolíznej cely (Q2), kde nastáva fragmentácia. Pomocou tretieho kvadrupólu sa monitorujú produktové ióny na základe výberu vopred určených párov prekurzorových a produktových iónov (Xien *et al.*, 2015).



Obr. 7 MRM mód trojitého kvadrupólu tandemovej hmotnostnej spektrometrie

Kvadrupóly nemusia byť spojené v tandemovej hmotnostnej spektrometrii len navzájom, ale v praxi sa stretávame aj s inými variantami, ako je napríklad spojenie kvadrupólu s analyzátorom doby letu (QTOF-MS) (Steinbusch *et al.*, 2021). Spojenie viacerých hmotnostných analyzátorov je v moderných analýzach bežné (McCullagh a Ordham, 2019). Tandemová hmotnostná spektrometria dnes zaujíma významné postavenie v analytickej oblasti. Prístroj umožňujúci postupnú dvoj- a viacstupňovú hmotnostnú analýzu otvára široké pole možností ako študovať ionizované molekuly. Pojem tandemová hmotnostná spektrometria pomenúva experimenty a výsledky z minimálne dvoch typov hmotnostných spektrometrov – dva hmotnostné analyzátory za sebou alebo jeden analyzátor, ktorý zachytí jeden špecifický ión, ktorý môže byť excitovaný a následne je merané hmotnostné spektrum vzniknutých produktov (Sadílek, 2020). Všeobecne ide o viacnásobnú fragmentáciu. Najčastejším usporiadaním je dvojstupňový tandemový prístroj, v ktorom je zrážková komora vložená medzi dva hmotnostné analyzátory (Sadílek, 2020). Prístup v tandemovej MS umožňuje kontrolovanú fragmentáciu a spoľahlivú selekciu m/z hodnôt (McCullagh a Ordham, 2019).

3 Experimentálna časť

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- Acros Organics (Čína): kyselina 4-aminobutánová
- Aldrich (Nemecko): kyselina 2-ketoglutátorvá, kyselina α -hydroxyizobutánová
- Avanti (USA): 3-metylglutaryl-L-karnitín
- Calbiochem (USA): kyselina pipekolová
- Cambridge Isotope Laboratories (USA) – D9-izovalerylkarnitín, kyselina $^{13}\text{C}_6$ ^{18}O homovanilová, kyselina orotová $^{15}\text{N}_2$, L-laktát sodný $^{13}\text{C}_3$
- CDN Isotopes (Kanada): kyselina 2-metyl-D3-citrónová
- Fluka (Nemecko): kyselina adipová, kyselina suberová
- Fluka (Švajčiarsko): kyselina 5-hydroxyindol-3-octová, kyselina fumarová, kyselina jantárová
- Fluka (USA): citramalát, kyselina oxaloctová
- Fluka (Taliansko): N-acetyl-L-aspartát
- Honeywell (Nemecko): LC-MS acetonitril, LC-MS kyselina mravčia, LC-MS metanol, LC-MS voda
- ChemCruz (Holandsko): kyselina 3-hydroxysebaková
- ICN Biochemicals (USA): kyselina orotová
- Lachema (Česká republika): kyselina hipurová, kyselina malónová
- Matrix Scientific (USA): kyselina hydantoin-5-propiónová
- MCA Laboratory (Belgicko) – level 1, level 2
- Santa-Cruz biotechnology (USA): vanillaktát
- Sigma-Aldrich (Austrália): adipoyl-L-karnitín, malonyl-L-karnitín hydrochlorid, sebakoyl-L-karnitín, suberoyl-L-karnitín, tigloyl-L-karnitín, trans-2-decenoyl-L-karnitín, trans-2-oktenoyl-L-karnitín, valeryl-L-karnitín
- Sigma-Aldrich (Čína) – etylacetoacetát, kyselina 3-hydroxyglutárová, kyselina 3-hydroxyizovalerová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina azealová, kyselina DL- α -hydroxyglutárová, kyselina fenoxyoctová, kyselina gentisová, kyselina glyoxylová, kyselina mandľová, kyselina pimelová, kyselina pyrohroznová
- Sigma-Aldrich (Francúzsko): kyselina fenylactová

- Sigma-Aldrich (India): kyselina 2-hydroxyizovalerová, kyselina 3-metylglutárová
- Sigma-Aldrich (Izrael): sukcinylacetón
- Sigma-Aldrich (Japonsko): kreatinín, kyselina (\pm)-3-hydroxyoktánová, kyselina (S)-(-)-2-hydroxyizokaproová, kyselina 2-hydroxybutánová, kyselina 3-hydroxypropiónová
- Sigma-Aldrich (Kanada): kyselina 3-hydroxymandľová, kyselina DL-3,4-dihydroxymandľová
- Sigma-Aldrich (Nemecko): 4-metyl-2-oxovalerát, acetoacetát, butyryl-L-karnitín, dekanoyl-L-karnitín, glutaryl-L-karnitín, hexanoyl-L-karnitín, kyselina 2-hydroxyfenyloctová, kyselina 3-hydroxy-3-metylglutárová, kyselina 3-hydroxyfenyloctová, kyselina *cis*-akonitová, kyselina D,L-glycerová, kyselina D,L-jablčná, kyselina etylmalonová, kyselina citrónová, kyselina γ -hydroxybutánová, kyselina glutakonová, kyselina glutarová, kyselina glykolová, kyselina homovanilová, kyselina L-pyroglutamová kyselina metylmalónová, kyselina sebaková, lauroyl-L-karnitín, myristoyl-L-karnitín, O-acetyl-L-karnitín hydrochlorid, oktanoyl-L-karnitín, N-acetyl-L-tyrozín, palmitoyl-L-karnitín, propionyl-L-karnitín, stearoyl-L-karnitín
- Sigma-Aldrich (Slovensko): kyselina 3-metyladipová
- Sigma-Aldrich (Španielsko): (\pm)-karnitín hydrochlorid
- Sigma-Aldrich (Švajčiarsko): (\pm)- β -hydroxyizobutyrát sodný, (\pm)-mevalonolaktón, [(3R)-3-hydroxyhexanoyl]-L-karnitín, [(3R)-3-hydroxyhexadekanoyl]-L-karnitín, [(3R)-3-hydroxyoktadekanoyl]-L-karnitín, [(3R)-3-hydroxytetradekanoyl]-L-karnitín, 2-metylbutyryl-L-karnitín, 2-metylcitrát, 3-metylkrotonyl-L-karnitín, arachidonyl-L-karnitín, D,L-indol-3-laktát, izobutyryl-L-karnitín, izovaleryl-L-karnitín, kyselina (\pm)-2,4-dihydroxybutánová, kyselina (2R,3S)-2,3-dihydroxybutánová, kyselina (4R)-4-hydroxy-L-glutamová, kyselina (E)-2-metylglutakonová, kyselina (S)-3,4-dihydroxybutánová, kyselina 2-oxoadipová, kyselina 2-oxobutyrová, kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, kyselina 3-metylglutakonová, kyselina D,L-2 aminoadipová, kyselina D,L-4-hydroxy-2-ketoglutarová, kyselina fenyropyrohroznová, L-(-)-3-fenyllaktát, L-laktát sodný, N-glutarylglycín
- Sigma Aldrich (Švédsko): kyselina (\pm)-3-hydroxydekánová

- Sigma-Aldrich (Taliansko): kyselina L-(+)-vínna
- Sigma-Aldrich (USA): kyselina 3-hydroxybutánová, kyselina 4-hydroxyfenylpyrohroznová, kyselina D,L-izocitrónová, kyselina D,L-p-hydroxyfenylmliečna, kyselina maleínová, kyselina metyl-D3-malonová, kyselina metyljantárová, kyselina oxalová, N-glycyl-L-prolín, Sigmatrix – syntetický moč, valproát sodný
- Sigma-Aldrich (UK): kyselina 2-pikolinová, kyselina 4-hydroxyfenyloctová, kyselina homogentisová, kyselina kynurenová
- TRC Canada (Kanada): hexanoylglycín (¹³C2, ¹⁵N), kyselina (2R,3R)-rel-2,3-dihydroxy-2-metylbutánová, kyselina 3-hydroxyvalerová, kyselina rac-3-hydroxypentánová
- VU Medical Center (Holandsko): (D,L)-2-metylbutyrylglycín, 3-metylkrotonylglycín, acetylglycín, butyrylglycín, fenylpropionylglycín, heptanoylglycín, hexanoylglycín, izobutyrylglycín, izovalerylglycín, pivaloylglycín, propionylglycín, suberylglycín, tiglylglycín, valerylglycín
- Winlab (UK): kyselina glykolová

3.1.2 Biologický materiál

Všetky vzorky moču (zdravé kontroly a patientske vzorky), ktoré boli použité pre analýzu boli k dispozícii v Laboratóriu dedičných metabolických porúch vo Fakultnej Nemocnici Olomouc (LDMP FNOL). Použité boli vzorky pacientov z FNOL a z Centra pre DMP Národného ústavu detských chorôb v Bratislave (NÚDCH, BA). Tieto vzorky boli uchovávané v mraze pri teplote -80 °C.

Použitý bol aj zmesný moč - kontrolný materiál pochádzajúci z programu externého hodnotenia kvality laboratórií zaoberajúcich sa diagnostikou DMP (Quality Assurance in Laboratory Testing for IEM – ERNDIM - kvantitatívna analýza organických kyselín v moči Quantitative Organic Acids in Urine - QLOU a účinnosti testovania Diagnostic Proficiency Testing – DPT. Tieto vzorky boli pre analýzu k dispozícii zamrazené na -80 °C priamo v LDMP FNOL, ktoré sú na pracovisku LDMP skladované od roku 2010.

3.1.3 Použité roztoky

- Mobilná fáza A – 0,5 % kyselina mravčia v LC-MS vode
- Mobilná fáza B – LC-MS acetonitril

- Zásobný roztok laktátu sodného $^{13}\text{C}_3$ o koncentrácii $2,24 \text{ mol.l}^{-1}$
- Zásobný roztok kyseliny metyl-D3-malonovej o koncentrácii $41,3 \text{ mmol.l}^{-1}$ v LC-MS vode
- Zásobný roztok kyseliny orotovej $^{15}\text{N}_2$ o koncentrácii $100 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ v LC-MS vode
- Zásobný roztok D9-izovalerylkarnitínu o koncentrácii 10 mmol.l^{-1} v LC-MS vode
- Zásobný roztok kyseliny $^{13}\text{C}_6$ ^{18}O homovanilovej o koncentrácii 10 mmol.l^{-1} v LC-MS vode
- Zásobný roztok kyseliny metyl-D3-citrónovej o koncentrácii $6830 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$
- Zásobný roztok hexanoylglycínu ($^{13}\text{C}_2$, ^{15}N) o koncentrácii 10 mmol.l^{-1} v LC-MS vode
- Štandardy organických kyselín ($n=95$) a ich konjugátov (acylglycíny $n=15$, acylkarnitíny $n=30$) (zoznam vid' 9. Prílohy – tab. 4) o koncentrácii 10 mmol.l^{-1}

3.1.4 Príprava interných štandardov

Bol pripravený roztok zmesi interných štandardov do 10 ml odmernej banky. Zásobný roztok značeného laktátu bol nariadený 10x na celkový objem $100 \text{ }\mu\text{l}$. $22 \text{ }\mu\text{l}$ 10x zriedeného roztoku bolo pridaných do odmernej banky. Zásobný roztok D9-izovalerylkarnitínu bol najskôr nariadený 100x a $10 \text{ }\mu\text{l}$ takto zriedeného roztoku bolo pridaných do odmernej banky.

Do odmernej banky bolo ďalej pridaných $50 \text{ }\mu\text{l}$ zásobného roztoku kyseliny metyl-D3-malonovej, 1 ml zásobného roztoku značenej kyseliny orotovej, $200 \text{ }\mu\text{l}$ zásobného roztoku značenej kyseliny homovanilovej, $50,5 \text{ }\mu\text{l}$ zásobného roztoku kyseliny metyl-D3-citrónovej a $11,5 \text{ }\mu\text{l}$ zásobného roztoku značeného hexanoylglycínu. Objem v odmernej banke bol doplnený do 10 ml LC-MS vodou. Takto pripravená zmes interných štandardov bola rozdelená na 1 ml alikvóty do mikroskúmavok a uchovávaná v mraze pri teplote $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.4.1 Príprava kalibračných roztokov

Pripravených bolo 11 zmesí po 9-15 analytov v jednej zmesi z dôvodu veľkého počtu analytov (rozdelenie jednotlivých analytov do zmesí zoznam vid' 9. Prílohy – tab. 4). Z každej zmesi bola pripravená 10 bodová kalibračná rada získaná 2-násobným

riedením v syntetickej moči Sigmatrix (Sigmatrix Urine Diluent) (koncentrácia roztokov vid' 9. Prílohy – tab. 5). Kalibračné roztoky zmesí boli analyzované jednotlivo počas troch dní. Kalibračné rozpätie bolo určené na základe Piskláková, 2020.

3.1.4.2 Príprava vzoriek kontroly kvality

Pre účely merania presnosti a správnosti merania metódy boli pripravené vzorky kontroly kvality (quality control – QC) na troch úrovniach koncentrácie (vysoká koncentrácia - HQC – high concentration quality control, stredná koncentrácia - MQC – medium concentration quality control, nízka koncentrácia - LQC – low concentration quality control). Pripravených bolo 11 zmesí pre každý level koncentrácie.

Jednotlivé úrovne koncentrácie boli určené nasledovne – HQC koncentračná úroveň predstavovala 75 % kalibračnej rady, MQC – ekvivalent k strednej hodnote, čo predstavuje 50 % a LQC predstavuje spodnú hranicu fyziologických hodnôt.

Rozdelenie analytov v každej zmesi a ich koncentrácia pre každú úroveň je uvedená v prílohe vid' 9. Prílohy – tab. 4.

3.1.4.3 Príprava zmesných vzoriek

Pre validačné experimenty bol pripravovaný tzv. poolovaný moč (zmesná vzorka, združený moč). Poolovaný moč bol pripravený zmiešaním moču zdravých kontrol ($n = 38$) o koncentrácii kreatinínu 2 mmol.l^{-1} a objeme $500 \mu\text{l}$. Pokiaľ moč obsahoval viac ako 2 mmol.l^{-1} kreatinínu, tak bol nariadený vodou. Ak moč obsahoval koncentráciu kreatinínu nižšiu než 2 mmol.l^{-1} bol tento moč neriedený a odpipetovaný v celom objeme $500 \mu\text{l}$ do 10 ml banky. Zmesný moč bol rozdelený na 1 ml alikvóty, ktoré boli uchovávané pri teplote $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.4.4 Príprava patientskych vzoriek a vzoriek zdravých kontrol

Vzorky moču s koncentráciou kreatinínu nad 1 mmol.l^{-1} boli nariadené na túto koncentráciu LC-MS vodou, na objem $100 \mu\text{l}$. Vzorky moču s koncentráciou kreatinínu nižšou ako 1 mmol.l^{-1} boli analyzované nenariedené (bol upravený objem IS a nástrek adekvátny k danej koncentrácii kreatinínu). Ku $100 \mu\text{l}$ vzorkám bolo pridaných $10 \mu\text{l}$ zmesi interných štandardov pripravených v kap. 3.2.1. Finálny objem zmesi pre analýzu vo vialkách s inzertom je $110 \mu\text{l}$ a konečná koncentrácia IS vo vzorkách vid' tab. 1. Bolo pripravených 94 vzoriek pacientov (35 organických acidúrií) a ďalšie vzorky, z ktorých bolo vybraných 200 vzoriek zdravých kontrol.

Tab. 1 Konečná koncentrácia IS vo vzorkách pripravených pre analýzu

Interný štandard	c [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
kyselina metyl-D3-malonová	18,8
hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N	1
kyselina 2-metyl-D3-citrónová	3,1
kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O	18,2
izovaleryl-D9-L-karnitín	0,009
kyselina orotová $^{15}\text{N}_2$	0,9
kyselina mliečna - $^{13}\text{C}_3$	44,8

3.1.5 Overenie a vyhodnotenie validačných parametrov

Metóda bola validovaná na základe smerníc Európskej liekovej agentúry – European Medical Agency (EMA) a Správy potravín a liečiv - U.S. Food and Drug Administration (FDA) (EMA, 2018; FDA, 2020). Boli overované parametre: linearita, presnosť a správnosť, matricové efekty a carry-over celkom pre 140 látok. Celkovo je v metóde zahrnutých 146 látok, ktoré pozostávajú z organických kyselín, acylkarnitínov a acylglycínov. Metóda nebola validovaná pre 6 látok z dôvodu nedostupnosti štandardov (metylacetoacetát, Hawkinsin, 3-hydroxyizovalerylkarnitín, 3-hydroxybutyrylkarnitín) alebo pre analyty, ktoré nie sú priamym diagnostickým markerom (kreatinín, močovina). Všetky validované analyty majú diagnostický význam pre organické acidúrie.

Pre prevedenie a vyhodnotenie linearity, presnosti a správnosti bolo analyzovaných 11 zmesí vzoriek - QC zmesí na troch leveloch koncentrácie (high, medium, low) v 5 replikátoch počas troch dní s použitím 10 bodov kalibrácie. Pre analýzu boli zmiešaných 50 μl QC vzorky, 50 μl QC poolovaného moču a 10 μl zmesi IS. Linearita bola vyhodnotená na základe pomerov plochy píkov pre jednotlivé analyty k ploche píku interného štandardu. Limit detekcie (LOD) a limit kvantifikácie (LOQ) boli vypočítané ako množstvo koncentrácie (cs), ktoré zodpovedalo trojnásobku a desaťnásobku signálu k šumu (S/N) (obr. 8).

$$LOD = 3 \times \frac{N}{S} \times c_S$$

$$LOQ = 10 \times \frac{N}{S} \times c_S$$

Obr. 8 Výpočet limitu detekcie (LOD) a kvatifikácie (LOQ). S je signál, N je šum, c_S je koncentrácia

Zo získaných dát boli zostrojené kalibračné krivky a z príslušných rovníc kalibračných kriviek bol získaný korelačný koeficient (R) a koeficient determinácie (R^2) pre každý analyt. Pre účely vyhodnotenia presnosti bol vypočítaný variačný koeficient (CV). Správnosť bola vyhodnotená ako percento z pomeru určených hodnôt koncentrácie QC vzoriek ku skutočnej koncentrácii.

Matricové efekty boli vyhodnotené na základe analýzy moču 10 zdravých jedincov a blanku (LC-MS voda) s postkolonovou infúziou interného štandardu - kyselina metyl-D3-malonová (-MRM mód) a izovaleryl-D9-L-karnitín (+MRM mód) pri prietoku 7 μ L za minútu. Vyhodnotené boli na základe zmeny intenzity signálu v chromatograme (obr. 9), kde došlo k nárastu alebo supresii signálu pre vzorku moču oproti blanku. Matricové efekty boli vypočítané pre každý moč zvlášť (obr. 9) a vypočítané hodnoty boli následne spriemerované. Carry-over bol analyzovaný a vyhodnotený na základe LC-MS/MS analýzy vody po analýze vzorky, ktorá obsahovala analyty o známej koncentrácii – najvyšší bod kalibrácie.

3.1.6 Prístroje a vybavenie

Kvapalinový chromatograf Exion LC (Sciex), hmotnostný spektrometer QTRAP 6500 (Sciex), kolóna Acquity UPLC HSS T3 C18 (Waters), automatické pipety (Eppendorf), automatická elektronická pipeta eVol (SGE Analytical Science), vortex (ArgLab) mikroskúmvky, vialky, počítačové softvéry Cytoscape 3.9.1, GraphPad Prism 9.5.1, Sciex-OS 3.0 a Excel 2021

$$M_E = \left(\frac{I_B}{I_M} \times 100 \right) - 100$$

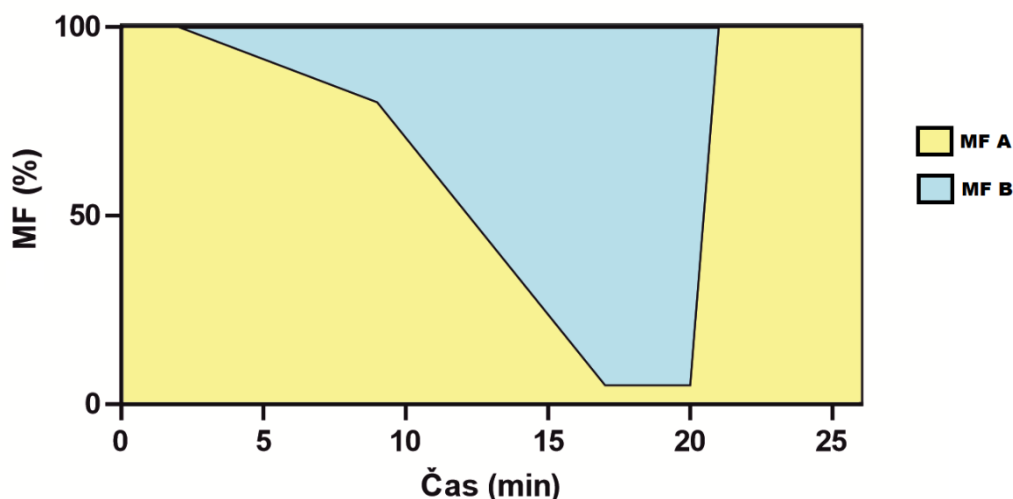
Obr. 9 Výpočet matricových efektov, kde I_B je intenzita analytu v blanku, I_M je intenzita analytu v moči

3.2 Metódy

3.2.1 Analýza vzoriek metódou kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou

Analýza všetkých vzoriek pacientov, zdravých kontrol a vzoriek na overenie validačných parametrov bola prevedená podľa Pisklákova, 2020 a Pisklákova *et al.*, 2023. Použitý bol hmotnostný spektrometer QTRAP 6500 s iónovým zdrojom - ESI: gas 1/2: 50 psi, -4500/+5500 V, 450 °C. Pred samotnou analýzou vzoriek bol spustený proces premývania autosamplera (teplota autosamplera 5 °C) - 2 cykly po 10 minút. Bolo nastavené vyhrievanie kolóny na 30 °C. Pomocou programu Analyst bol napísaný batch (nastavenie a pomenovanie vzoriek, umiestnenie vzoriek). Po nastavení binárneho gradientu (obr. 10) – 100 % mobilnej fázy A, 0 % mobilnej fázy B. Prietok bol nastavený na hodnotu 0,37 ml.min⁻¹. Ideálny tlak na začiatku analýzy je 460-480 bar, ktorý postupne klesá na 200 bar. Po kontrole tlaku bol systém 1 minútu ekvilibrovaný a po skončení ekvilibračie bola spustená analýza. Nástrek vzoriek bol nastavený na objem 1 µl.

Analýza jednej vzorky trvala 26 minút a bola uskutočnená s vopred určenými MRM prechodmi (scheduled MRM mode) so systémom zmeny polarita.



Obr. 10 grafické znázornenie zmien koncentrácie mobilných fáz počas gradientovej elúcie z chromatografickej kolóny

3.2.2 Vyhodnotenie výsledkov analýzy patientskych vzoriek

Namerané dáta boli spracované v programe SCIEX-OS, kde prebehlo prvotné spracovanie dát. V získaných chromatogramoch analýz boli píky pre jednotlivé analyty a interné štandardy integrované. Retenčné časy jednotlivých analytov sú uvedené v prílohe vid' 9. Prílohy – tab. 4. Získané dáta boli exportované ako pomer pík analytu k ploche píku zodpovedajúceho interného štandardu do tabuľkového programu Excel 2021. Dáta boli následne transformované na robustne štandardizovanú hodnotu (obr. 11).

Vypočítané robustne škálované hodnoty boli následne použité na vizualizáciu výsledkov v programoch GraphPad Prism 9.5.1 a Cytoscape 3.9.1 na základe porovnania s hodnotami zdravej populácie. Bolo získané rozmedzie robustne škálovaných hodnôt 200 zdravých kontrol, pre ktoré bolo použitý výpočet podľa obr. 11.

V programe GraphPad Prism 9.5.1 boli vložené výsledky robustne škálovaných hodnôt pre zdravé kontroly a pacientov, z ktorých boli vytvorené krabicové grafy s viac premennými - výsledky zobrazené ako robustne škálované hodnoty pacienta v porovnaní so zdravou populáciou.

V programe Cytoscape 3.9.1 (Shannon *et al.*, 2003) bola vytvorená mapa organických acidúrií. Jednotlivé organické acidúrie sú v Cytoscape mape rozdelené na základe metabolizmu, do ktorého zasahujú. Koncové uzly predstavujú jednotlivé biomarkery priamo spojené s daným ochorením. Hodnoty RS pre každý biomarker každého pacienta boli do softvéru importované a na základe veľkosti týchto hodnôt boli nastavené zmeny parametrov koncových uzlov, ako je veľkosť, farba uzlu a popiskov.

$$RS = \frac{x - \text{medián}}{(Q3 - Q1)}$$

Obr. 11 Výpočet robustne škálovaných hodnôt, kde RS predstavuje robustne škálovanú hodnotu pre daný biomarker pacienta, x je pôvodne nameraná hodnota biomarkeru (pomer plochy píku analytu ku píku interného štandardu), Q1 a Q3 je prvý a tretí kvartil. Medián a hodnoty Q1 a Q3 boli určené z nameraných hodnôt analytu pre zdravé kontroly (n=200), (Swallow a Kianfard, 1996; Dazsykowki *et al.*, 2007)

4 Výsledky

4.1 Validácia metódy

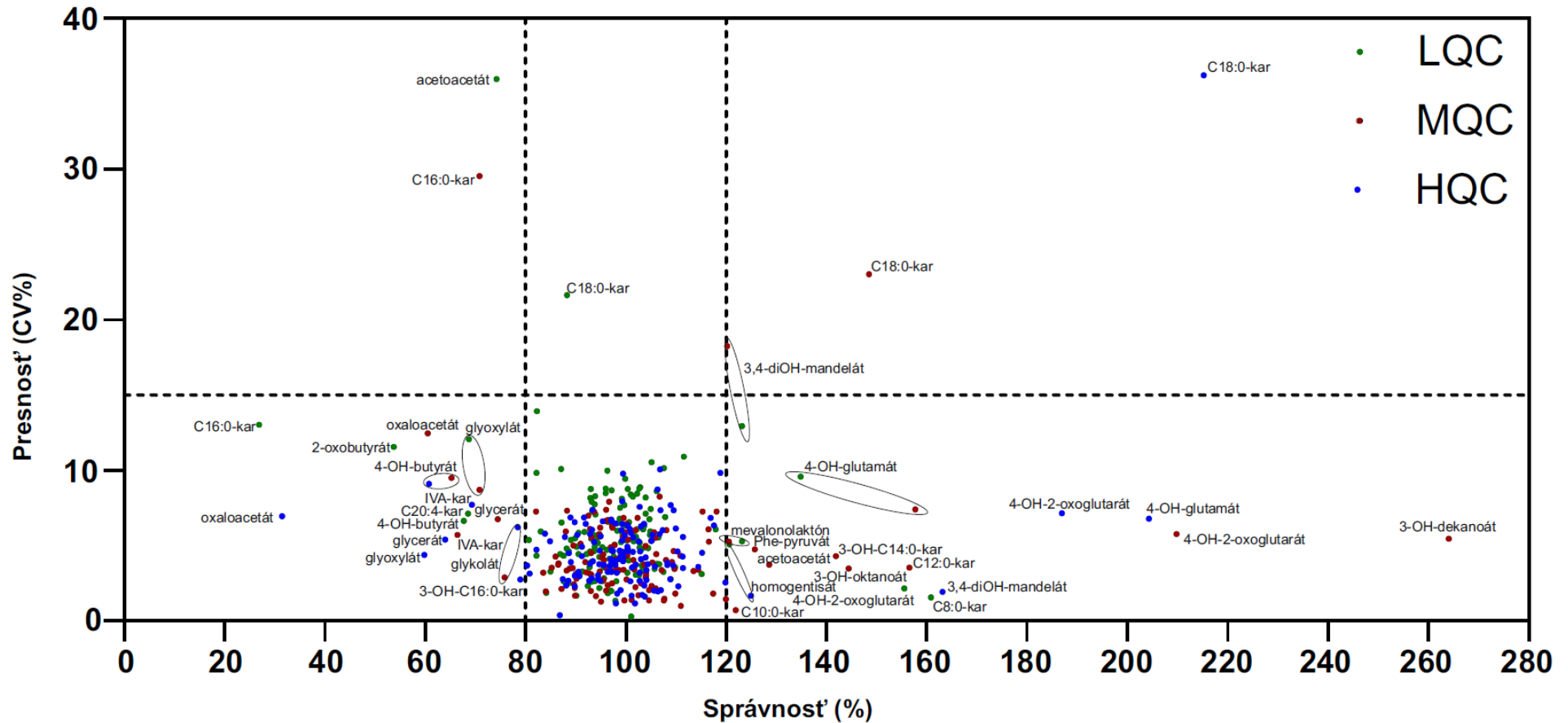
V rámci vyhodnotenia linearity bol stanovený limit detekcie a kvantifikácie, korelačný koeficient (R) a koeficient determinácie (R^2) pre jednotlivé analyty (zoznam vid' 9. Prílohy – tab. 5). Kritériu $R^2 > 0,980$ nevyhovelo 10 analytov uvedených v tab. 2. Jedná sa o dlhšie karnitíny (hexadekanoylkarnitín), oxokyseliny (acetoacetát) a hydroxykyseliny (homogentisát). Najnižšie LOD a LOQ bolo stanovené analyt zo skupiny karnitínov - oktanoylkarnitín a najvyššie pre analyt zo skupiny oxokyselín, konkrétne 2-oxoglutarát. LOD sa pohybovalo v rozmedzí od $LOD = 3,07 \times 10^{-11} \text{ mol.l}^{-1}$ (oktanoylkarnitín) po $LOD = 3,29 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ (2-oxoglutarát). LOQ bolo určené v rozmedzí od $LOQ = 1,02 \times 10^{-11} \text{ mol.l}^{-1}$ (oktanoylkarnitín) po $LOQ = 10 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (2-oxoglutarát).

Pre meranie správnosti podľa dokumentov EMA a FDA by stredná koncentrácia mala byť $100 \pm 20 \%$ určených hodnôt pre vzorky kontroly kvality (HQC, MQC a LQC) a pri meraní presnosti by variačný koeficient nemal presiahnuť 20% (Zheng *et al.*, 2020). Na obr. 12-14 je možné vidieť výsledky merania presnosti a správnosti v rámci jedného dňa (takže pre 1., 2. a 3. deň). Stanoveným požiadavkám nevyhoveli napríklad dlhé karnitíny (hexadekanoylkarnitín – C16:0-kar), ktoré majú vyššie retenčné časy alebo látky veľmi polárne, ktoré sú eluované v mŕtvom čase, aj kyseliny s dlhším alifatickým reťazcom alebo oxokyseliny, prípadne analyty zadržované v kolóne, pri ktorých došlo k interakcii s nepolárnou zložkou kolóny.

Tab. 2 Limity detekcie a kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie pre vybrané analyty, pre ktoré platí $R^2 < 0,980$, rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky

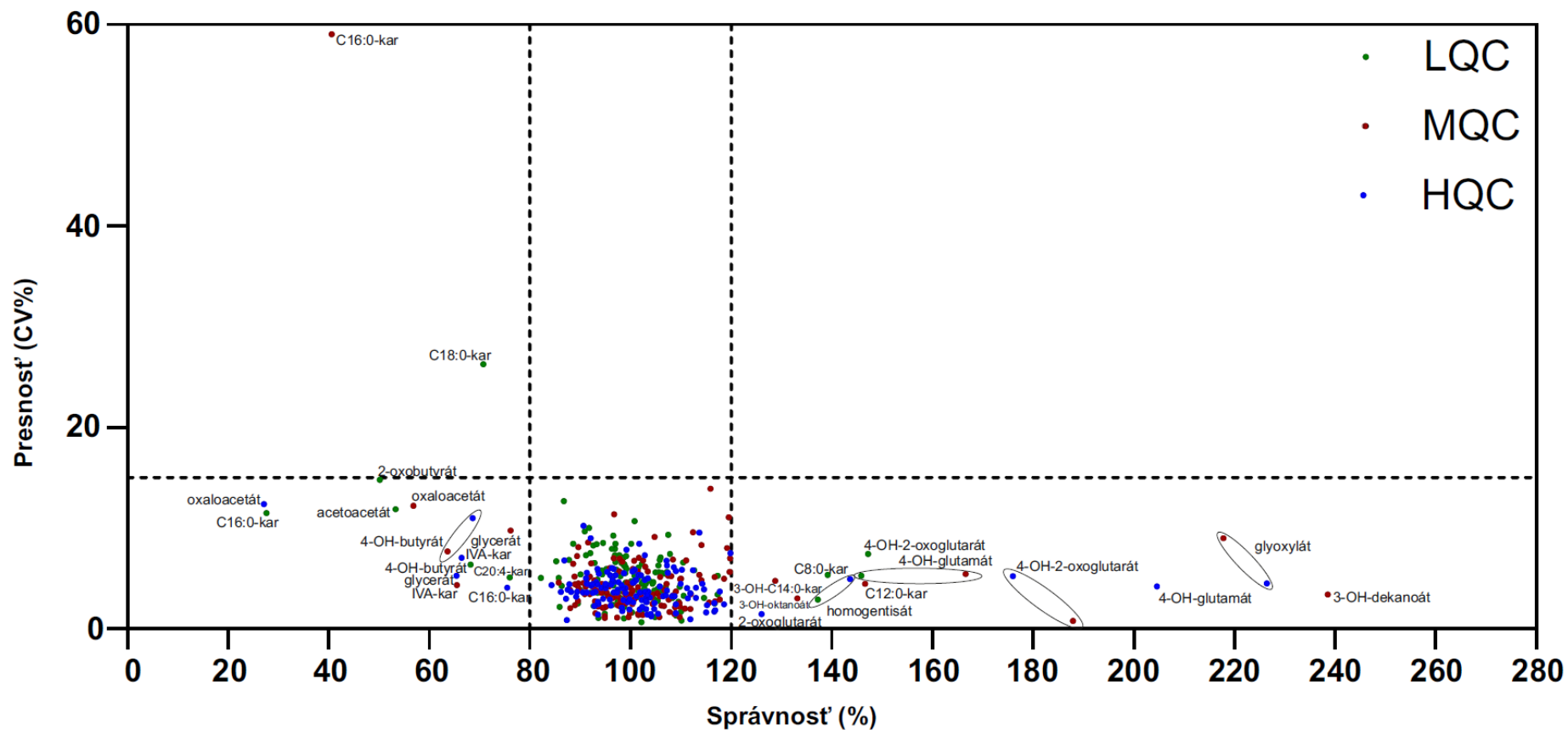
analyt	c_{KAL1} [mol.l⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l⁻¹]	LOD [mol.l⁻¹]	LOQ [mol.l⁻¹]	R	R²
homogentisát	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	5,64x10 ⁻⁸	1,88x10 ⁻⁷	0,9216	0,8391
3,4-diOH-mandelát	1,00x10 ⁻⁶	1,95x10 ⁻⁹	6,33x10 ⁻⁷	2,11x10 ⁻⁶	0,9413	0,8665
4-OH-fenylpyruvát	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,78x10 ⁻⁷	9,25x10 ⁻⁷	0,9539	0,8889
acetoacetát	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,30x10 ⁻⁵	4,33x10 ⁻⁵	0,9789	0,8973
2-oxoadipát	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	3,35x10 ⁻⁷	1,11x10 ⁻⁶	0,9642	0,9141
3-metylglutakonát	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,44x10 ⁻⁶	1,14x10 ⁻⁵	0,9917	0,9214
2-metylglutakonát	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	4,55x10 ⁻⁶	1,52x10 ⁻⁵	0,9726	0,9332
hexadekanoylkarnitín	1,00x10 ⁻⁷	1,95x10 ⁻¹⁰	4,57x10 ⁻¹⁰	1,52x10 ⁻⁹	0,9834	0,9670
3-OH-oktadekanoylkarnitín	1,00x10 ⁻⁷	1,95x10 ⁻¹⁰	6,74x10 ⁻¹⁰	2,24x10 ⁻⁹	0,9780	0,9566
3-OH-tetradekanoylkarnitín	1,00x10 ⁻⁷	1,95x10 ⁻¹⁰	1,21x10 ⁻¹⁰	4,04x10 ⁻¹⁰	0,9795	0,9594

Deň 1



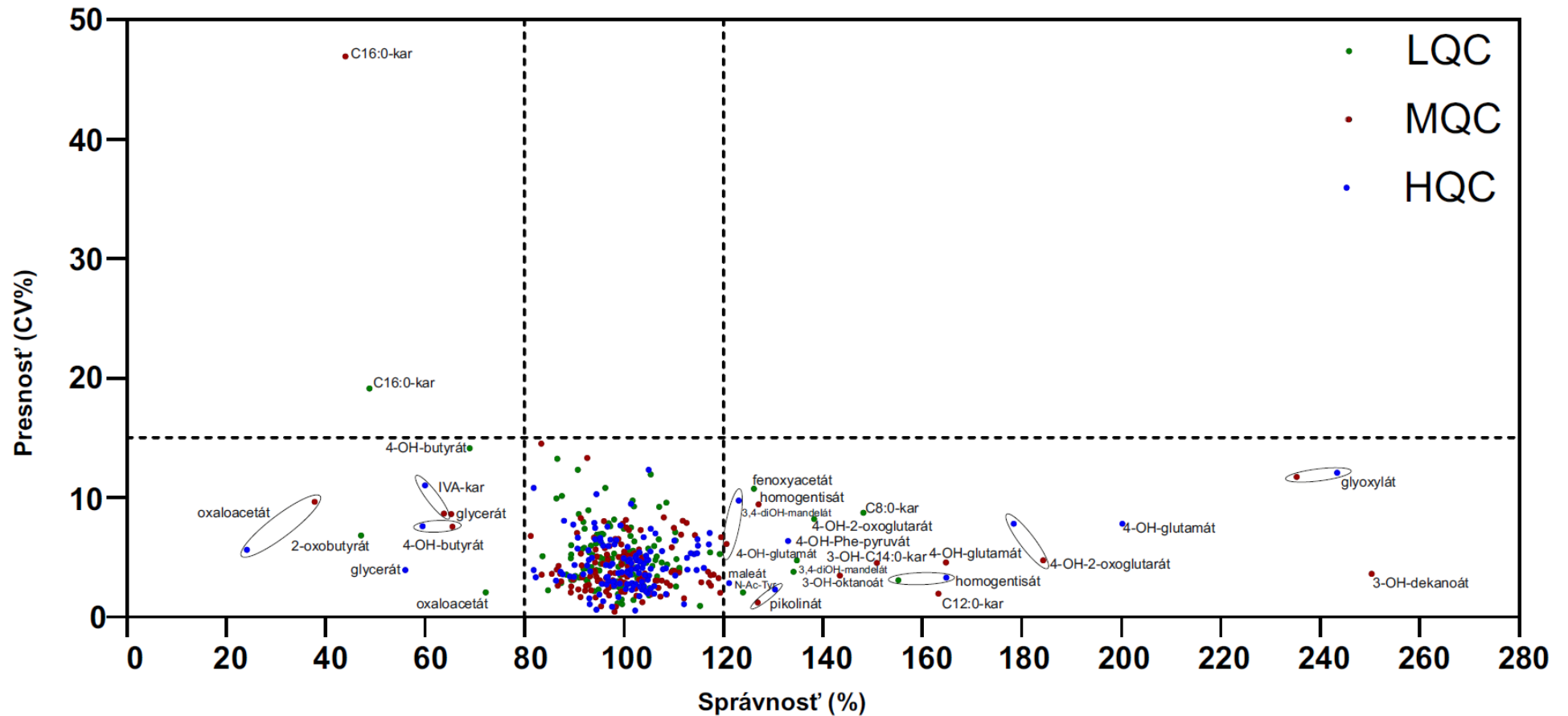
Obr. 12 Výsledky merania – presnosť a správnosť 1. deň. Na x-ose je správnosť merania a na y-ose je presnosť merania vyjadrená ako variačný koeficient. Prerušované čiary vyjadrujú stanovené parametre určené podľa smerníc EMA a FDA (správnosť merania 100 ± 20 % a presnosť CV < 15%)

Deň 2



Obr. 13 Výsledky merania – presnosť a správnosť 2. deň. Na x-ose je správnosť merania a na y-ose je presnosť merania vyjadrená ako variačný koeficient. Prerušované čiary vyjadrujú stanovené parametre určené podľa smerníc EMA a FDA (správnosť merania 100 ± 20 % a presnosť $CV < 15\%$)

Deň 3



Obr. 14 Výsledky merania – presnosť a správnosť 3. deň. Na x-ose je správnosť merania a na y-ose je presnosť merania vyjadrená ako variačný koeficient. Prerušované čiary vyjadrujú stanovené parametre určené podľa smerníc EMA a FDA (správnosť merania 100 ± 20 % a presnosť CV < 15%)

Tab. 3 Merané matricové efekty pre vybrané analyty v pozitívnom a negatívnom móde, s príslušnými retenčnými časmi a s percentuálnym vyjadrením obohatenia (+) a supresie (-)

-MRM			+MRM			
RT [min]	analyty	ME	RT [min]	analyty	ME	
0,8	glyoxylát	368,0%	0,71	4-hydroxyglutamát	38,0%	
	močovina		0,8	4-aminobutykrát		
0,9	tartarát		0,9	karnitín	- 77,0%	
	4-OH-2-oxoglutarát		1,0	aminoadipát	- 23,0%	
	oxaloacetát		1,3	malonylkarnitín		
glycerát	1,52		pipekolát			
1,1	2,4-diOH-butykrát		1,55	pikolinát		
	glykolát		1,59	orotát		
	malát		1,6	glycylprolín		
	3,4-diOH-butykrát		1,75	N-acetylaspartát		
	pyruvát		1,92	acetylkarnitín		
1,2	izocitrát		2,3	acetoacetát		
2,5	citrát		2,47	pyroglutamát	35,0%	
8,65	3-metyladipát		-32,0%			
8,66	4-OH-fenylacetát		28,0%			
8,7	suberylglycín					
8,75	pimelát					

Boli vyhodnotené matricové efekty na základe zmeny intenzity signálu v pozorovaných oblastiach chromatogramu. V tab. 3 sú uvedené analyty aj s retenčnými časmi, v ktorých oblastiach bol pozorovaný efekt matrice v oboch módoch, ako v negatívnom aj v pozitívnom. Príslušné obohatenie alebo supresia bola vyjadrená v percentách. V daných retenčných časoch je pozorovaná zmena (nárast alebo supresia) signálu interného štandardu, ktorý môže znamenať ovplyvnenie stanovenia látok, ktoré eluujú v danom čase uvedených v tab. 3.

Carry over bol určený nižší ako 5 % po analýze blanku po vzorke s najvyšším bodom kalibrácie pre všetky analyty.

4.2 Analýza patientskych vzoriek

Validovaná LC-MS/MS metóda bola otestovaná a aplikovaná na analýzu 94 vzoriek pacientov, ktoré zahŕňali 35 organických acidúrií a vzoriek zdravých kontrol, z ktorých bol vybraný súbor kontrol pre výpočet referenčného rozmedzia robustne škálovaných hodnôt

(n=200). Pre účely tejto práce boli spracované a vyhodnotené výsledky analýz troch pacientov s deficitmi popísanými v kap. 2.2.1.1 – 2.2.1.3.

4.2.1 Analýza vzorky pacienta s deficitom acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom

Bola analyzovaná vzorka pacienta s MCADD (chlapec, vek 5 rokov), ktorá bola pôvodom z Centra pre DMP Národného ústavu detských chorôb v Bratislave (NÚDCH, BA).

Po vypočítaní robustne škálovaných hodnôt pre všetky markery boli tieto hodnoty graficky vyobrazené (obr. 15,16). Podľa grafického vyobrazenia v diagrame a v mape organických kyselín (obr. 15,16) boli určené zvýšené robustne škálované hodnoty pre dôležité acylkarnitíny a acylglycíny so šiestimi až ôsmimi acylovými zbytkami (C6-C8): suberylglycín (RS=3951,5), hexanoylglycín (RS=554,4), heptanoylglycín (RS=375,1) a hexanoylkarnitín (RS=213,2), oktanoylkarnitín (RS=393,2). Pozorujeme zvýšené hodnoty v moči pre špecifický biomarker MCADD - fenylpropionylglycín (RS=427,7).

4.2.2 Analýza vzorky pacienta s izovalerovou acidúriou

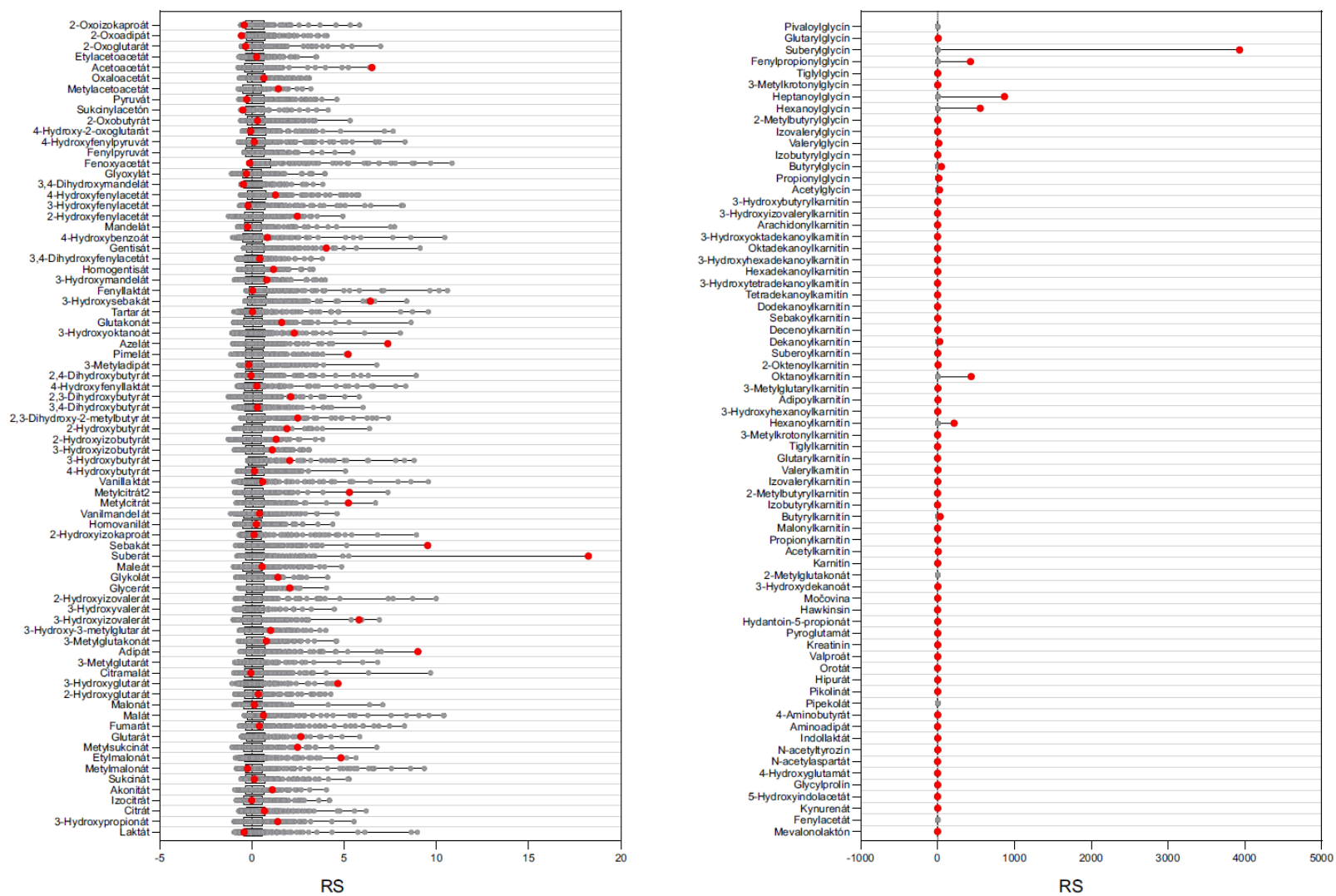
Vzorka pacienta (dievča, 10 mesiacov) bola pôvodom z Centra pre DMP Národného ústavu detských chorôb v Bratislave (NÚDCH, BA).

Pre vzorku moču pacienta s IVA boli (obr. 17,18) zvýšené hodnoty biomarkerov: izovalerylkarnitínu (RS=29,5) a izovalerylglycínu (RS=221,1) v porovnaní so zdravou populáciou.

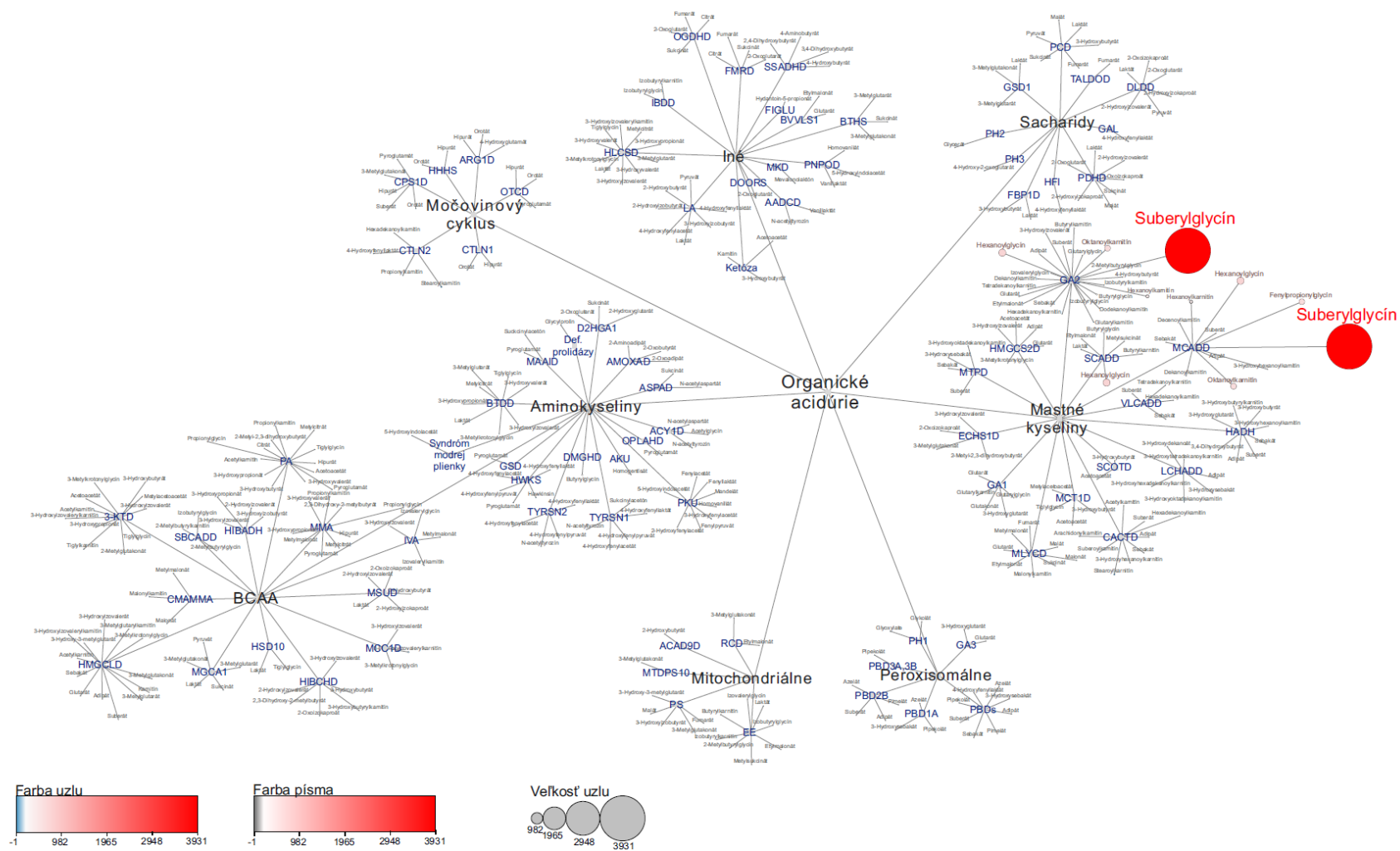
4.2.3 Analýza vzorky pacienta s leucinózou

Vzorka tretieho pacienta (vzorka DPT-2018-F) je vzorka, ktorá bola súčasťou externého hodnotenia kvality laboratórií zaoberajúcimi sa diagnostikou DMP. Podľa oficiálneho dokumentu s výsledkami je to vzorka od 8-ročného pacienta s MSUD.

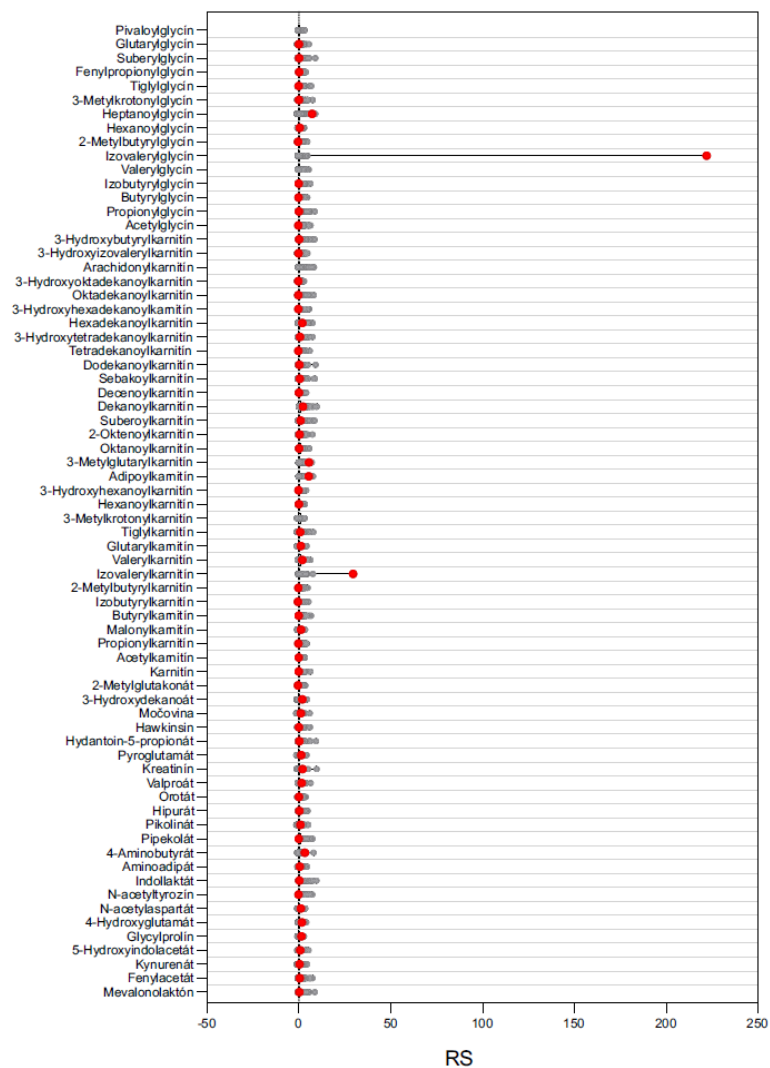
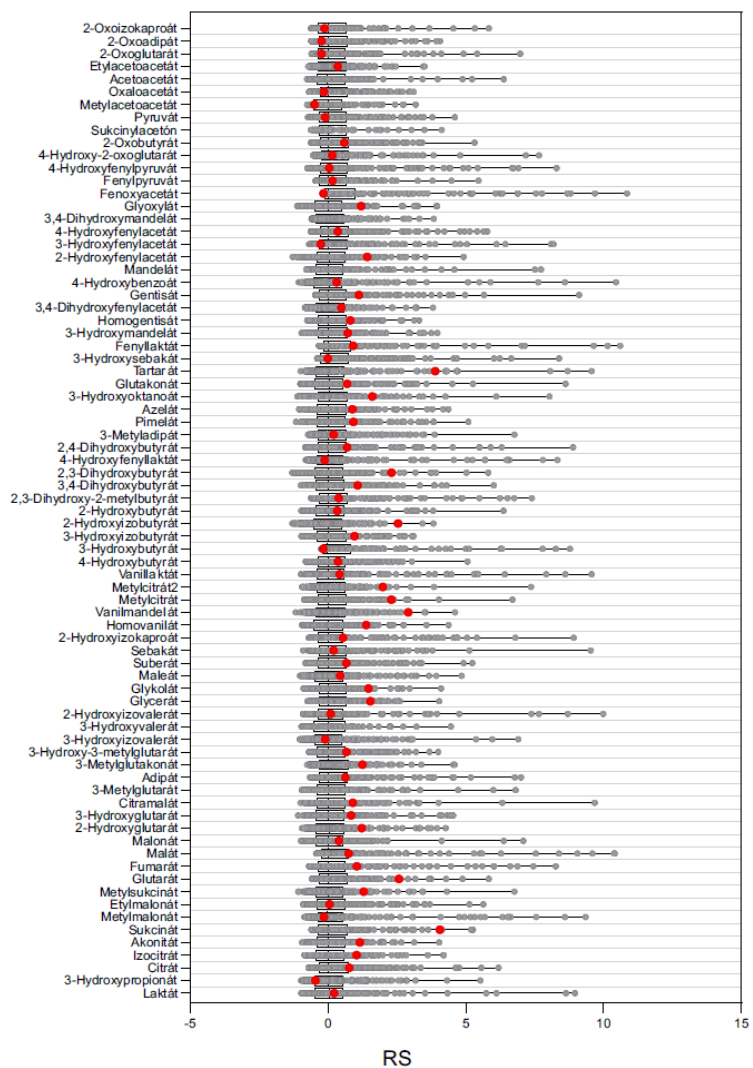
Analýzou organických kyselín, acylglycínov a acylkarnitínov boli detekované dôležité biomarkery: 2-oxoizokaproát (RS=84,6), 2-hydroxyizokaproát (RS=1001,4) a 2-hydroxyizovalerát (RS=2716,2).



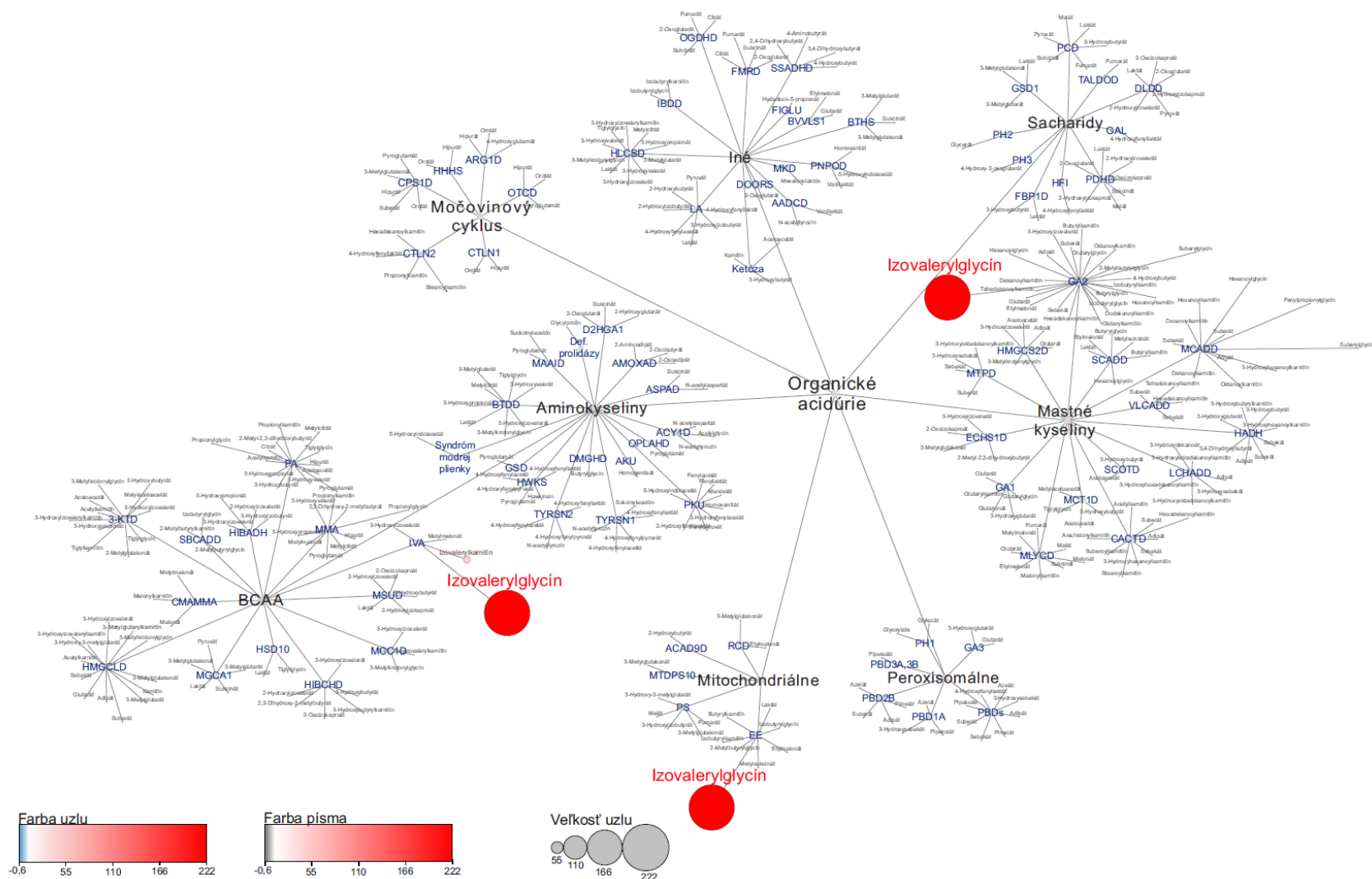
Obr. 15 Profil (robustne škálované hodnoty - osa x) organických kyselín, acylkarnitínov a acylglycínov (osa y) v moči pacienta s MCADD (červená farba) v porovnaní so zdravou populáciou (sivá farba) v programe GraphPad Prism 9.5.1



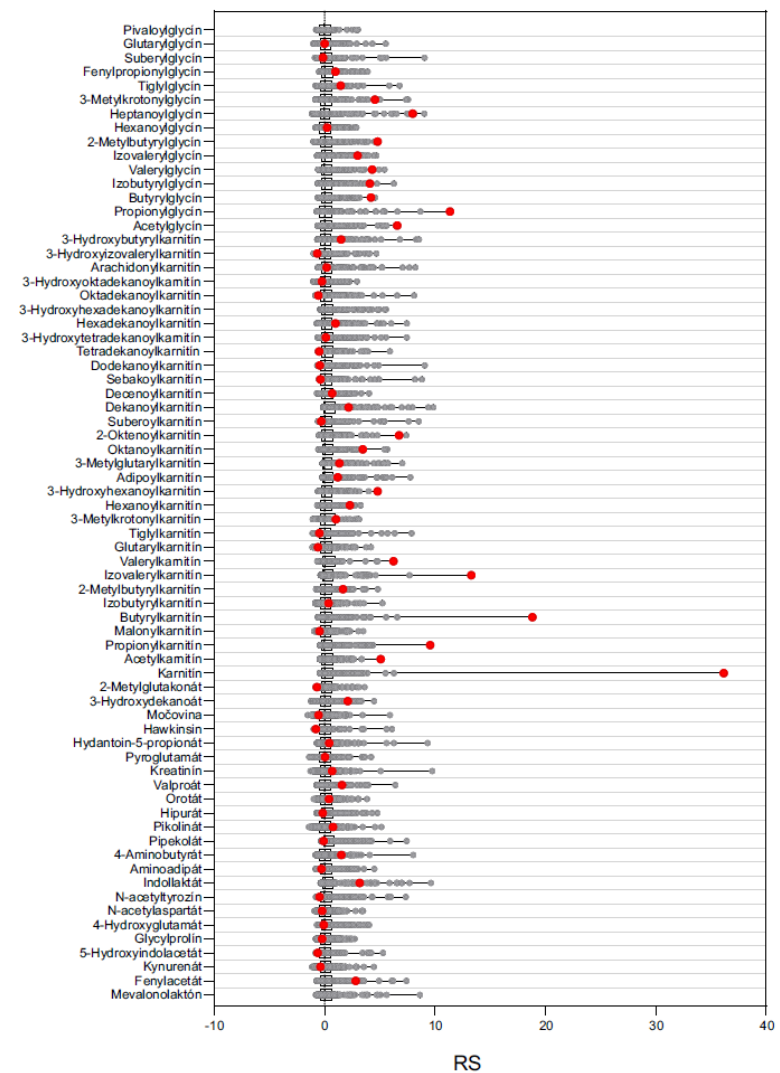
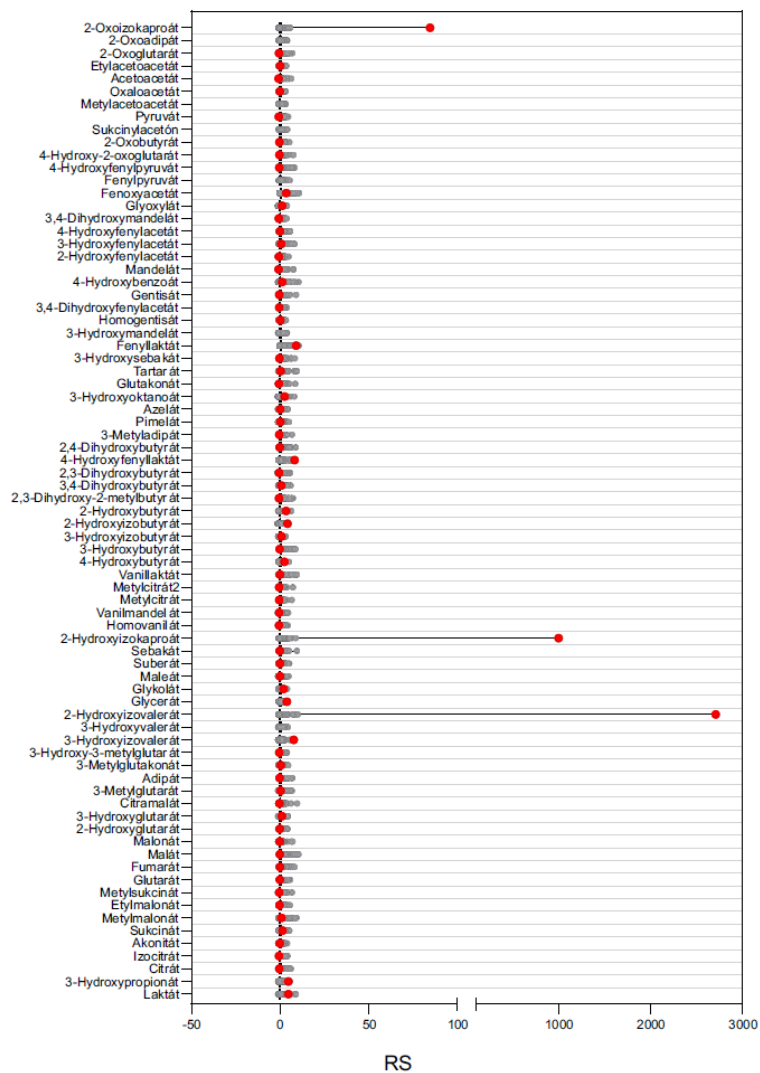
Obr. 16 Mapa organických acidúrií s výsledkami analýzy moču pacienta s MCADD. Veľkosť a farba koncového uzlu a písma metabolitu je priamo úmerná robustne škálovaným hodnotám pre daný analyt.



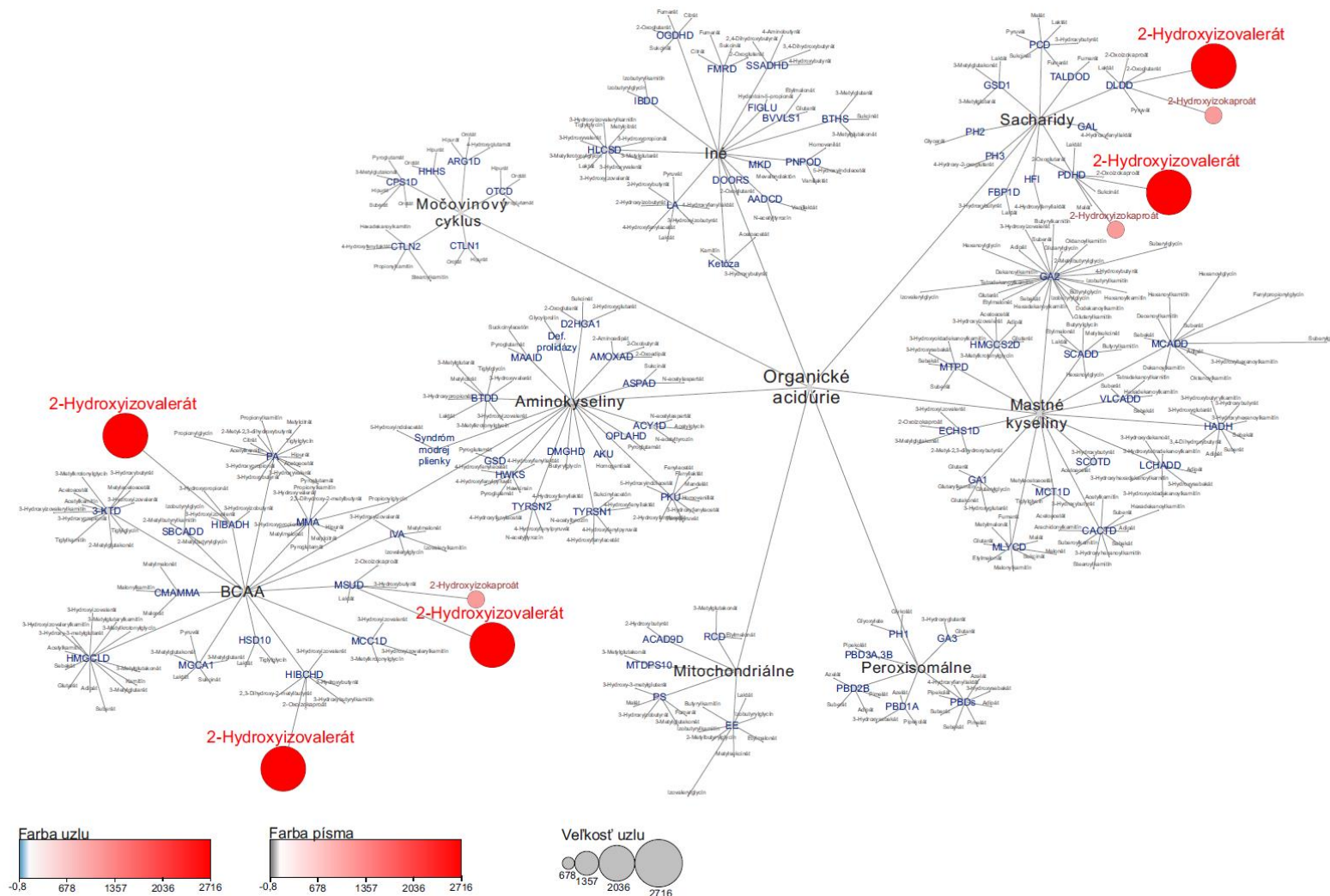
Obr. 17 Profil (robustne škálované hodnoty - osa x) organických kyselín, acylkarnitínov a acylglycínov (osa y) v moči pacienta s izovalerovou acidúriou (červená farba) v porovnaní so zdravou populáciou (sivá farba) v programe GraphPad Prism 9.5.1



Obr. 18 Mapa organických acidúrií s výsledkami analýzy moču pacienta s izovalerovou acidúriou Veľkosť a farba koncového uzlu a písma metabolitu je priamo úmerná robustne škálovaným hodnotám pre daný analyt.



Obr. 19 Profil (robustne škálované hodnoty - osa x) organických kyselín, acylkarnitínov a acylglycínov (osa y) v moči pacienta s leucinózou (červená farba) v porovnaní so zdravou populáciou (sivá farba) v programe GraphPad Prism 9.5.1



Obr. 20 Mapa organických acidúrií s výsledkami analýzy moču pacienta s leucinózou. Veľkosť a farba koncového uzlu a písma metabolitu je priamo úmerná robustne škálovaným hodnotám pre daný analyt

5 Diskusia

Vyvinutá LC-MS/MS metóda pre analýzu organických kyselín, acylkarnitínov a acylglycínov podľa Pisklákova, 2020 a Piskláková *et al.*, 2023 je v porovnaní s rutinnou GC-MS metódou vhodnejšou pre diagnostiku organických acidúrií. LC-MS/MS je v porovnaní s GC-MS jednoduchšia na prevedenie z hľadiska prípravy vzorky, pretože pre analyty nie sú potrebné zdĺhavé kroky derivatizácie a extrakcie do vhodného rozpúšťadla a z toho hľadiska nie je potrebné ani veľké množstvo vzorky (iba 100 µl). Z toho dôvodu sa celá príprava vzorky pred samotnou analýzou skraca len na potrebné kroky, ktoré sú nariadenie na jednotnú koncentráciu kreatinínu, zmiešanie so zmesou IS a vzorka je pripravená na analýzu. Samotná analýza vzorky trvá 26 minút a vyhodnotenie analýz je jednoduchšie na prevedenie a metóda poskytuje možnosť automatizácie niektorých krokov (Piskláková *et al.*, 2023).

Čas od zisku vzorky až po získanie výsledku zohráva dôležitú úlohu pri akútnych klinických stavoch, keďže mnohé DMP sa vyznačujú rýchlym nástupom a ťažkými stavmi z dôvodu nefunkčnosti enzýmov a proteínových transportérov. Práve preto je LC-MS/MS v porovnaní s rutinnou GC-MS vhodnejšia, pretože sa skraca celkový čas, nie len prípravy vzorky, analýzy ale aj vyhodnocovania výsledkov (Jin *et al.*, 2022; Ruopollo *et al.*, 2022). Výsledok analýzy môže byť známy už o jednu hodinu od zisku vzorky (Piskláková *et al.*, 2023).

Celosvetovo beží mnoho výskumov ohľadom alternatívnych metód, ktoré by mohli rutinnú GC-MS nahradiť a celú diagnostiku zjednodušiť a skrátiť jej čas. Počas týchto štúdií je snaha aj o zahrnutie väčšieho spektra analytov a zároveň rozšíriť možnosti diagnostiky viacerých porúch (Jin *et al.*, 2022; Ruopollo *et al.*, 2022). Včasná diagnostika a zároveň rýchle nasadenie terapie znižuje úmrtnosť na organické acidúrie (Kolker *et al.*, 2023).

Sú skúmané možnosti diagnostiky a nových možností pomocou metódy LC-MS/MS s derivatizáciou analytov alebo možnosť diagnostiky bez derivatizácie (ako sú už vyvinuté niektoré LC-MS/MS kity) analytov v telových tekutinách (Jasem.com.tr; Ueyanagi *et al.*, 2021).

Körver-Keularts *et al.*, 2018 testovali metódu LC-MS/MS (LC-QTOF/MS), ktorá bola nakoniec použitá na 78 DMP, ktorá sa ukázala ako veľmi účinná a rýchlejšia metóda pre diagnostiku organických acidúrií (Körver-Keularts *et al.*, 2018). Prebehli ďalšie štúdie pre metódu LC-QTOF/MS na plne automatickú analýzu organických kyselín s derivatizáciou a deproteinizáciou vzorky pomocou 3-nitrofenylhydrazínu (tzv. systém CLAM-2030), ktoré sa ukázalo ako účinné na analýzu nie len organických kyselín ale aj acylkarnitínov a acylglycínov v sére pacientov s tromi organickými acidúriami – propiónová, metylmalonová acidúria a 3-metylkrotonylglycinúria. Doba analýzy bola menej než 1 hodinu a vo vzorkách bolo analyzovaných 19 organických kyselín. Nevýhodou tohto systému je nie len derivatizácia vzorky, ale aj jej potrebná inkubácia (Ueyanagi *et al.*, 2021)

Už spomínané LC-MS/MS kity v kap. 2.2.2.2 od firmy *Jasem*, vďaka ktorým je možné analyzovať 54 organických kyselín bez derivatizácie vzorky. Firma takisto deklaruje úspešnú separáciu aj izomérnych foriem organických kyselín (*Jasem.com.tr*).

Výskum Jin *et al.*, 2022 testoval rýchlu a jednoduchú analýzu organických kyselín a ich konjugátov bez derivatizácie vzoriek. Táto metóda bola vyvinutá na analýzu organických kyselín ako v sére, tak aj v moči pacientov. Testované vzorky pacientov s organickými acidúriami – 3-hydroxy-3-metylglutarová, izovalerová, metylmalonová a glutarová acidúria typu I. LC-MS/MS analýza organických kyselín sa ukázala ako rýchly a účinný nástroj na kvantifikáciu viacerých organických kyselín a autori spomínajú budúcnosť na rozšírenie pre ďalšie organické acidúrie (Jin *et al.*, 2022).

Vyvinutá metóda bola validovaná. Presnosť a správnosť bola vyhodnotená na základe nezávislých analýz QC vzoriek počas troch dní a v porovnaní so stanoveným kritériom (správnosť merania 100 ± 20 % a presnosť CV < 15%) nevyhoveli látky s nízkym alebo vysokým retenčným časom (dlhé karnitíny, veľmi polárne látky, vid' obr. 12-14). Pri vyhodnení efektov matrice moču v určitých retenčných časoch v pozitívnom aj negatívnom móde dochádzalo k supresii alebo obohateniu signálu pre analyty (tab. 3), avšak tieto látky majú len doplnkový význam pri diagnostike. V podobnej práci z roku 2018 bola metóda, ktorá zahŕňala 75 analytov (markery pre DMP a markery liekov) validovaná. V rámci validácie bolo analyzovaných 99 diagnostických vzoriek pacientov (32 DMP) a 88 zdravých kontrol.

Výsledky boli vyhodnotené pomocou z-skóre (Körver-Keularts *et al.*, 2018). V práci Jin *et al.*, 2022 boli v rámci validácie pre LC-MS/MS overované linearita, LOD, LOQ, carry-over, matricové efekty, výťažnosť, presnosť a správnosť. Kalibračné krivky pre všetky organické kyseliny poskytovali spoľahlivé výsledky (dobrá linearita, korelačný koeficient a koeficient determinácie). Pri overovaní carry-over neboli pozorované žiadne cieľové píky v blanku po analýze 6. roztoku kalibračnej rady. Boli pozorované efekty matrice pre analyty – metylmalonát, glutarát, 3-hydroxypropionát, 3-hydroxy-3-metylglutarát a izovalerylglucín, ktoré boli kompenzované po korekcii interným štandardom (Jin *et al.*, 2022).

Validovaná metóda bola otestovaná na patientskych vzorkách. Bola otestovaná na 94 vzorkách a tri z nich boli vyhodnotené pre účely tejto diplomovej práce. Vybrané boli MCADD, IVA a MSUD. Výsledky analýz boli relatívne kvantifikované, na základe zavedenia robustne škálovaných hodnôt. Relatívna kvantifikácia je založená na samotnej vlastnosti biomarkerov ochorení – tzv. odľahlých hodnôt, pretože sa ich koncentrácie v telových tekutinách značne líšia v porovnaní so zdravou populáciou. Použitá transformácia dát bola zvolená z dôvodu veľkého rozsahu a variability analytov a z dôvodu povahy dát, ktoré nemajú povahu klasického Gaussovského rozdelenia (Swallow a Kianfard, 1996; Dazsykowki *et al.*, 2007).

Ako veľmi účinný je aj nástroj grafického zobrazovania robustne škálovaných hodnôt. Jednou z možností grafického zobrazenia je použitie krabicového grafu s viac premennými v programe GraphPad Prism, kde je možné vyobraziť výsledky analýz pacienta v porovnaní so zdravou populáciou. Pri tomto grafickom zobrazení je možné sledovať všetky zmeny pre biomarkery zahrnuté v metóde naraz u jedného pacienta.

Ako druhá možnosť grafického zobrazenia bolo použitie programu Cytoscape. Ide o grafické interaktívne zobrazenie organických acidúrií. Jednotlivé ochorenia sú rozdelené podľa metabolizmu a ku každému ochoreniu sú priradené biomarkery ochorenia a aj robustne škálované hodnoty pre každý jeden biomarker (Shannon *et al.*, 2003). V tomto type zobrazenia je možné vidieť nie len zvýšené robustne škálované hodnoty pre zvoleného pacienta, ale vďaka priradeniu biomarkerov k jednotlivým organickým acidúriam je možné vidieť priamo, ktorý metabolizmus môže byť u pacienta zasiahnutý a môže fungovať ako účinný nástroj k diagnostike pacientov.

Z hľadiska diagnostiky je pre MCAD deficit dôležitá správna detekcia nie len zvýšených hodnôt organických kyselín, ale aj zvýšených hodnôt acylkarnitínov a acylglycínov (Couce *et al.*, 2013), pre ktoré nie je vhodná GC-MS/MS, ale práve LC-MS/MS (Mason *et al.*, 2022; Körver-Keularts *et al.*, 2018). Pre patientske vzorky sa často vyznačujú zvýšenými hodnotami oktanoyl- a dekanoylkarnitínu, avšak tieto karnitíny môžu spôsobiť aj falošnú negativitu pre MCADD (Couce *et al.*, 2013). Pri analýze vzorky pacienta s MCADD boli pozorované zvýšené hodnoty pre karnitíny so šiestimi a ôsmimi acylovými zvyškami (hexanoylkarnitín, oktanoylkarnitín) a glycíny, ale aj špecifický marker – fenylpropionylglycín. Fenylpropionylglycín je zvýšený u týchto pacientov, pretože črevné baktérie vytvárajú fenylpropionát (Tuchman *et al.*, 1991). Fenylpropionát (PPA) je netoxický a je produkovaný črevnými baktériami ako produkt degradácie lignínu, flavonoidov a aromatických aminokyselín (Smith *et al.*, 2003), avšak ako substrát (9 uhlíková skelet – stredne dlhý reťazec) enzýmu MCAD u pacientov s MCADD deficitom nemôže byť metabolizovaný. Pacienti s MCADD nedokážu PPA metabolizovať a po zaťažení PPA ho vylučujú po konjugácii s glycínom (Tuchman *et al.*, 1991). Podľa vyobrazenia pomocou softvéru Cytoscape by bolo možné určiť niekoľko možných organických acidúrií, pretože jednotlivé markery sú spoločné pre viac acidúrií, ktoré vyplývajú z metabolizmu mastných kyselín, ale boli detekované práve zvýšené hodnoty pre fenylpropionylglycín, ktorý je ako marker len u MCADD. Ďalšie markery MCADD sú spojené s dysfunkciou mitochondrií. Pri dysfunkcii mitochondrií dochádza k masívnej produkcii reaktívnych kyslíkových radikálov, ktoré ovplyvňujú viacero biologických molekúl, ako napríklad sú napríklad lipidy. Môže nastať k oxidácii fosfocholínov a fosfatidylserínov, ktoré môžu slúžiť ako biomarkery oxidatívneho stresu, dysfunkcie mitochondrií a MCADD (Najdekr *et al.*, 2015).

Analýzou vzorky pacienta s IVA boli určené zvýšené hlavne zvýšené hodnoty izovalerylkarnitínu a izovalerylglycínu, ktoré sú doplnkové markery pre diagnostiku (Villani *et al.*, 2017). U pacientov s touto acidúriou je snaha organizmu tieto nepremenené acyly vylúčiť z organizmu alebo ich premeniť na alternatívny produkt, pretože voľný izovalerát je pre organizmus toxický, je konjugovaný s glycínom a karnitínom a tieto konjugáty môže organizmus ľahko vylúčiť močom (Sweetman *et al.*, 2001). Pri analýze vzoriek pacientov sa v závislosti od pacienta môžu byť detekované metabolity izovalerátu 3-hydroxyizovalerát a 3-hydroxybutyrát (Villani *et*

al., 2017), ktoré prípade analyzovaných vzoriek v tejto práci dosahovali normálne hladiny. Pri analýze vzoriek býva často problémom nedostatočné rozlíšenie izomérov karnitínov s piatimi acylovými zbytkami, čo zjednodušuje použitie LC-MS/MS metódy, vďaka ktorej je tieto izoméry možné separovať a vylúčiť falošnú pozitivitu výsledkov (Murko *et al.*, 2023).

V metóde nie sú zahrnuté esenciálne aminokyseliny valín, leucín a izoleucín, ktoré slúžia ako spoľahlivé biomarkery MSUD, pretože ich metódou nie je možné analyzovať z dôvodu aminoskupiny, ktorá spôsobuje vysokú polaritu a neposkytujú žiadnu interakciu s nepolárnou zložkou chromatografickej kolóny. Avšak metódou je možné detekovať zvýšené hodnoty pre produkty ich transaminázovej reakcie, ako je napríklad 2-oxoizokaproát a 2-oxoizovalerát, ktoré môžu naznačovať nízku aktivitu prípadne nefunkčnosť BCKDH komplexu. Ako ďalšie makre pre MSUD slúžia 2-hydroxyizovalerát, 2-hydroxyizokaproát, a 3-hydroxybutyrát (Villani *et al.*, 2017). V prípade analýzy vzorky pacienta s MSUD boli zo spomínaných markerov detekované zvýšené hodnoty pre 2-oxoizokaproát, 2-hydroxyizokaproát a 2-hydroxyizovalerát. U týchto pacientov zvýšené hodnoty príslušných oxokyselín, ktoré nie je možné metabolizovať predstavujú riziko z dôvodu ich neurotoxicity (Yunus *et al.*, 2011).

6 Záver

V práci bola vypracovaná literárna rešerš zaoberajúca sa teóriou kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou, dedičných metabolických porúch, organických acidúrií a o stave ich súčasnej diagnostiky. Ako príklady organických acidúrií boli vysvetlené 3 deficity – MCADD, IVA a MSUD, ktoré boli aj vyhodnotené v praktickej časti.

Testovaná LC-MS/MS metóda bola validovaná pre 140 látok. Testované boli matricové efekty, carry-over, linearita a presnosť a správnosť. LC-MS/MS metóda bola použitá pre analýzu organických kyselín spolu s ich konjugátmi (karnitíny a glycíny) v moči pacientov.

Vo výsledku použitá LC-MS/MS metóda poskytuje spoľahlivé výsledky pre diagnostiku organických acidúrií. Metódou je možné rozlíšiť izoméry, ktoré sú často kľúčové pre správnu diagnostiku a metóda je jednoduchšia z pohľadu prípravy vzorky, času analýzy, ale aj času potrebného pre vyhodnotenie. Metóda LC-MS/MS má budúcnosť v rámci zahrnutia ďalších biomarkerov a následne sa zaradiť do diagnostiky nie len organických acidúrií, ale aj ďalších DMP.

7 Literatúra

- Adams, David a Charles P. Venditti, 2007. Metabolic Acidosis. *Comprehensive Pediatric Hospital Medicine*. Elsevier, 2007, 848-854. ISBN 9780323030045. Dostupné z: doi:10.1016/B978-032303004-5.50137-X
- Baykal, T., I. Karaaslan, G. Gokcay, F. Demir, Y. Laleli a M. Demirkol, 2004. Hyperhydroxyprolinaemia detected in newborn screening with tandem mass spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 27(6), 781-782. ISSN 01418955. Dostupné z: doi:10.1023/B:BOLI.0000045839.08631.9d
- Blackburn, Patrick, Jennifer Gass, Filippo Pinto e Vairo, Kristen Farnham, Herjot Atwal, Sarah Macklin, Eric Klee a Paldeep Atwal, 2017. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *The Application of Clinical Genetics*. 10, 57-66. ISSN 1178-704X. Dostupné z: doi:10.2147/TACG.S125962
- Blackburn PR, Gass JM, Vairo FPE, Farnham KM, Atwal HK, Macklin S, Klee EW, Atwal PS. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *Appl Clin Genet*. 2017;10:57-66.
- Brass, E. P., 2002. Pivalate-Generating Prodrugs and Carnitine Homeostasis in Man. *Pharmacological Reviews*. 54(4), 589-598. ISSN 00316997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.54.4.589
- CENTER FOR DRUG EVALUATION a RESEARCH. Bioanalytical method validation guidance for industry. In: U.S. Food and Drug Administration [online]. 29. 4. 2020 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidancedocuments/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
- Couce, Maria, Paula Sánchez-Pintos, Luisa Diogo, et al., 2013. Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: regional experience and high incidence of carnitine deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 8(1). ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-8-102
- Dancis, J., M. Levitz, S. Miller a R. G. Westall, 1959. "Maple Syrup Urine Disease." *BMJ*. 1(5114), 91-93. ISSN 0959-8138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.1.5114.91
- Daszykowski, M., K. Kaczmarek, Y. Vander Heyden a B. Walczak, 2007. Robust statistics in data analysis — A review. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 85(2), 203-219. ISSN 01697439. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemolab.2006.06.016
- Davison, James E., 2020. Eye involvement in inherited metabolic disorders. *Therapeutic Advances in Ophthalmology* [online]. 12 [cit. 2021-11-23]. ISSN 2515-8414. Dostupné z: doi:10.1177/2515841420979109
- Davison, James E a Shamima Rahman, 2017. Recognition, investigation and management of mitochondrial disease. *Archives of Disease in Childhood*. 102(11), 1082-1090. ISSN 0003-9888. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2016-311370
- De Keyzer, Yves, Vassili Valayannopoulos, Jean-François Benoist, et al., 2009. Multiple OXPHOS Deficiency in the Liver, Kidney, Heart, and Skeletal Muscle of Patients With Methylmalonic Aciduria and Propionic Aciduria. *Pediatric Research*. 66(1), 91-95. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1203/PDR.0b013e3181a7c270
- Dembitsky, Valery M., 2006. Natural neo acids and neo alkanes: Their analogs and derivatives. *Lipids*. 41(4), 309-340. ISSN 0024-4201. Dostupné z: doi:10.1007/s11745-006-5103-9
- Diep, Q, 1995. Formation of pivaloylcarnitine in heart and brown adipose tissue in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1243(1), 65-70. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/0304-4165(94)00129-L

- Dimitrov, Bianca, Femke MOLEMA, Monique WILLIAMS, Jessica SCHMIESING, Chris MÜHLHAUSEN, Matthias R. BAUMGARTNER, Anke SCHUMANN a Stefan KÖLKER, 2021. Organic acidurias: Major gaps, new challenges, and a yet unfulfilled promise. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 44(1), 9-21. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1002/jimd.12254
- EMA. Bioanalytical method validation. In: European Medicines Agency [online]. 17. 9. 2018 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>
- Fenn J.: *Int. J. Mass Spectrom.* 200, 459 (2000).
- Fidel Toldra, 2013. *Food Analysis by HPLC*. ISBN 9781439830840.
- Friedecký, David a Karel Lemr, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* 20(41), 152-157.
- Gelb, Michael H., Khaja Basheeruddin, Alberto Burlina, et al., 2022. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening Laboratories. *International Journal of Neonatal Screening*. 8(4). ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns8040062
- Gregersen, Niels, Steen Kølvrå a Per Brøbech Mortensen, 1986. Acyl-CoA: Glycine N-acyltransferase: in vitro studies on the glycine conjugation of straight- and branched-chained acyl-CoA esters in human liver. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. 35(2), 210-218. ISSN 08854505. Dostupné z: doi:10.1016/0885-4505(86)90076-9
- Grünert, Sarah C, Udo Wendel, Martin Lindner, Michael Leichsenring, K Otfried Schwab, Jerry Vockley, Willy Lehnert a Regina Ensenauer, 2012. Clinical and neurocognitive outcome in symptomatic isovaleric acidemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 7(1). ISSN 1750-1172. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1172-7-9
- Hallam, P., M. Lilburn a P. J. Lee, 2005. A new protein substitute for adolescents and adults with maple syrup urine disease (MSUD). *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 28(5), 665-672. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-005-0061-6
- Harting, Inga, Eva Neumaier-Probst, Angelika Seitz, et al., 2009. Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I. *Brain*. 132(7), 1764-1782. ISSN 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awp112
- Hassan SA, Gupta V. Maple Syrup Urine Disease. [Updated 2022 Sep 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557773/>
- Havlíček, V. a F. Tureček, 2020. Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti. *Chemické listy*. 114(2), 106-112.
- Chace, D. H., 2001. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chemical reviews*. 101(2), 445-477. Dostupné z: doi:10.1021/CR990077+
- Chantada-Vázquez, Maria del Pilar, Susana B. Bravo, Sofia Barbosa-Gouveia, José V. Alvarez a María L. COUCE, 2022. Proteomics in Inherited Metabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(23). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232314744
- Chester, Thomas L., 2013. Recent Developments in High-Performance Liquid Chromatography Stationary Phases. *Analytical Chemistry*. 85(2), 579-589. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac303180y
- Christou, Chrysoula, Helen. G. Gika, Nikolaos Raikos a Georgios Theodoridis, 2014. GC-MS analysis of organic acids in human urine in clinical settings: A study of derivatization and other analytical parameters. *Journal of Chromatography B*. 964, 195-201. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2013.12.038

- Ibrahim S, Temtem T. Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. 2022 Jul 12. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32809672.
- Ivanovová, Eliška, Barbora Pisklákova, Dana Dobešová, Aleš Kvasnička a David Friedecký, 2021. Novel LC-MS tools for diagnosing inborn errors of metabolism. *Microchemical Journal*. 170. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2021.106654
- Jasem [online], 2023. Turecko: JASEM Laboratory Systems and Solutions A.S [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://jasem.com.tr/>
- Jin, Lizi, Zhenni Liu, Jie Zeng, et al., 2022. A simple method for rapid screening and diagnosis of common organic acidemias: quantitative detection of serum and urine organic acid profiles based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 414(27), 7823-7837. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-022-04316-9
- Joseph, Fred a Troy M. Russo, 2000. Origins of Spurious Organic Acidurias. *Laboratory Medicine*. 31(11), 622-624. ISSN 0007-5027. Dostupné z: doi:10.1309/QPU5-FB98-9BJ4-JU19
- Kennedy, Shelley, Beth K Potter, Kumanan Wilson, Lawrence Fisher, Michael Geraghty, Jennifer Milburn a Pranesh Chakraborty, 2010. The first three years of screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) by newborn screening ontario. *BMC Pediatrics*. 10(1). ISSN 1471-2431. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2431-10-82
- Kim, Sook Za, Liza Varvogli, Susan E. Waisbren a Harvey L. Levy, 1997. Hydroxyprolinemia: Comparison of a patient and her unaffected twin sister. *The Journal of Pediatrics*. 130(3), 437-441. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(97)70207-5
- Kölker, Stefan, Angeles Garcia Cazorla, Vassili Valayannopoulos, et al., 2015. The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 38(6), 1155-1156. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-015-9867-z
- Kölker, Stefan a Matthias R. Baumgartner, 2023. Organic acidurias: Ingredients for precision medicine. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 46(3), 369-370. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1002/jimd.12614
- Konermann, Lars, Elias Ahadi, Antony D. Rodriguez a Siavash Vahidi, 2013. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*. 85(1), 2-9. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac302789c
- Koolman, Jan a Klaus-Heinrich Röhm, 2012. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada. ISBN 978-802-4729-770.
- Körver-Keularts, Irene M. L. W., Ping Wang, Huub W. A. H. Waterval, et al., 2018. Fast and accurate quantitative organic acid analysis with LC-QTOF/MS facilitates screening of patients for inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 41(3), 415-424. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-017-0129-0
- Kromidas, Stavros, 2017. *The HPLC-MS handbook for practitioners*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 1 online resource. ISBN 9783527809202.
- Kulshrestha, Manish Raj, Bharti K. Uppal, Rakesh Khara, Kiran Dahiya a Rupita Kulshrestha, 2014. Neonatal Screening for Aminoaciduria: Can TLC be used as an Affordable Method in Developing Countries?. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences (SJAMS)*. 2(6C), 3011-3014. ISSN 2320-6691. Dostupné z: doi:10.36347/sjams.2014.v02i06.034

- Liu, Ning, Jing Xiao, Charul Gijavanekar, et al., 2021. Comparison of Untargeted Metabolomic Profiling vs Traditional Metabolic Screening to Identify Inborn Errors of Metabolism. *JAMA Network Open*. 4(7). ISSN 2574-3805. Dostupné z: doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.14155
- Mak, Chloe Miu, Han-Chih Hencher Lee, Albert Yan-Wo Chan a Ching-Wan Lam, 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 50(6), 142-162. ISSN 1040-8363. Dostupné z: doi:10.3109/10408363.2013.847896
- March R. E., Todd J. F. J., *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*, 2. vyd., kapitola 2, str. 38. Wiley-Interscience, Hoboken 2005.
- Mason, Emily, Charles C. T. Hindmarch a Kimberly J. Dunham-Snary, 2023. *Medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Pathogenesis, diagnosis, and treatment*. 6(1). ISSN 2398-9238. Dostupné z: doi:10.1002/edm2.385
- Mccullagh, James a Neil Oldham, [2019]. *Mass spectrometry*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press. Oxford chemistry primers. ISBN 978-0-19-878904-8.
- Metagene: Knowledgebase IEM [online], 2021. Nemecko: Metagene, Rheinstetten [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://www.metagene.de/index.html>
- Minkler, Paul E., Maria S. K. Stoll, Stephen T. Ingalls, Janos Kerner a Charles L. Hoppel, 2015. Validated Method for the Quantification of Free and Total Carnitine, Butyrobetaine, and Acylcarnitines in Biological Samples. *Analytical Chemistry*. 87(17), 8994-9001. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b02198
- Minkler, Paul E., Maria S.K. Stoll, Stephen T. Ingalls a Charles L. Hoppel, 2017. Selective and accurate C5 acylcarnitine quantitation by UHPLC–MS/MS: Distinguishing true isovaleric acidemia from pivalate derived interference. *Journal of Chromatography B*. 1061-1062, 128-133. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.07.018
- Mohsen, Al-Walid A. a Jerry Vockley, 2015. Kinetic and spectral properties of isovaleryl-CoA dehydrogenase and interaction with ligands. *Biochimie*. 108, 108-119. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2014.11.007
- M., Sadílek, 2020. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*. 114(2), 133-144. Dostupné také z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3541>
- Murko, Simona, Asra Dadkhah Aseman, Friederike Reinhardt, Gwendolyn Gramer, Jürgen Günther Okun, Ulrike Mütze a René Santer, 2023. Neonatal screening for isovaleric aciduria: Reducing the increasingly high false-positive rate in Germany. *JIMD Reports*. 64(1), 114-120. ISSN 2192-8312. Dostupné z: doi:10.1002/jimd2.12345
- Mütze, Ulrike, Lucy Henze, Florian Gleich, et al., 2021. Newborn screening and disease variants predict neurological outcome in isovaleric aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 44(4), 857-870. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1002/jimd.12364
- Najdekr, Lukáš, Alžběta Gardlo, Lucie Mádrová, David Friedecký, Hana Janečková, Elon S. Correa, Royston Goodacre A Tomáš Adam, 2015. Oxidized phosphatidylcholines suggest oxidative stress in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Talanta*. 139, 62-66. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.02.041
- Ngan, Olivia M. Y., Wing Ki Wong, Janice Ching Tam a Chi Kong Li, 2022. Assessing the Content Quality of Online Parental Resources about Newborn Metabolic Disease Screening: A Content Analysis. *International Journal of Neonatal Screening*. 8(4). ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns8040063

- Nohara, Fumikatsu, Go Tajima, Hideo Sasai a Yoshio Makita, 2022. MCAD deficiency caused by compound heterozygous pathogenic variants in ACADM. *Human Genome Variation*. 9(1). ISSN 2054-345X. Dostupné z: doi:10.1038/s41439-021-00177-3
- Nováková, Lucie a Michal Douša, 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4243-3.
- Nováková, Lucie, Michal Douša a Petr Česla, 2021. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. ISBN 978-80-270-8560-6.
- Novorozenecký screening* [online], 2013. Česká republika: Votava [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz/>
- Ogier De Baulny, H. a J.M. Saudubray, 2002. Branched-chain organic acidurias. *Seminars in Neonatology*. 7(1), 65-74. ISSN 10842756. Dostupné z: doi:10.1053/siny.2001.0087
- Ozand, Pinar T. a Generoso G. Gascon, 1991. Topical Review Article: Organic Acidurias. *Journal of Child Neurology*. 6(3), 196-219. ISSN 0883-0738. Dostupné z: doi:10.1177/088307389100600302
- Palyzová, A. a V. Havlíček, 2020. Hmotnostní spektrometrie v diagnostice infekčních onemocnění. *Chemické listy*. 114(3), 225-229.
- Pasikanti, Kishore K., P.C. Ho a E.C.Y. Chan, 2008. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of Chromatography B*. 871(2), 202-211. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.033
- Paul, Wolfgang a Helmut Steinwedel, 1953. Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung A*. 8(7), 448-450. ISSN 1865-7109. Dostupné z: doi:10.1515/zna-1953-0710
- Pingoud, A., 2002. *Biochemical methods: a concise guide for students and researchers*. 1. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 35-273-0299-9.
- Piskláková, Barbora, 2020. *Multikomponentní analýza organických kyselin v biologických vzorcích pro laboratorní diagnostiku dědičných metabolických poruch*. Olomouc. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Biochemie. Vedoucí práce Doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
- Piskláková, Barbora, Jaroslava Friedecká, Eliška Ivanovová, et al., 2023. Rapid and efficient LC-MS/MS diagnosis of inherited metabolic disorders: a semi-automated workflow for analysis of organic acids, acylglycines, and acylcarnitines in urine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. ISSN 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2023-0084
- Pluháček, T. a V. Havlíček, 2020. Hmotnostní spektrometrie v toxikologii a forenzní analýze. *Chemické listy*. 114(3), 220-224.
- Pulido, Ninna, Johana M. Guevara-Morales, Alexander Rodriguez-López, Álvaro Pulido, Jhon Díaz, Ru Angelie Edrada-Ebel a Olga Y. Echeverri-Peña, 2021. 1H-Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Urine as Diagnostic Tool for Organic Acidemias and Aminoacidopathies. *Metabolites*. 11(12). ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo11120891
- Ramsay, Rona R., Richard D. Gandour a Feike R. Van Der Leij, 2001. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1546(1), 21-43. ISSN 01674838. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4838(01)00147-9

- Ruoppolo, Margherita, Sabrina Malvagìa, Sara Boenzi, et al., 2022. Expanded Newborn Screening in Italy Using Tandem Mass Spectrometry: Two Years of National Experience. *International Journal of Neonatal Screening*. 8(3). ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns8030047
- Ryckman, Kelli K., Stanton L. Berberich, Oleg A. Shchelochkov, Daniel E. Cook a Jeffrey C. Murray, 2013. Clinical and environmental influences on metabolic biomarkers collected for newborn screening. *Clin Biochem*. 46(1-2), 133-138. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.013
- Saudubray, J.-M., F. Sedel a J. H. Walter, 2006. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 29(2-3), 261-274. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-006-0358-0
- Shannon, Paul, Andrew Markiel, Owen Ozier, et al., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*. 13(11), 2498-2504. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.1239303
- Shetty, Prajna P, Prince Jacob, RevathiP Shenoy a K Nalini, 2021. Use of single solvent thin layer chromatography to diagnose different organic acidurias. *Indian Journal of Medical Research*. 154(1). ISSN 0971-5916. Dostupné z: doi:10.4103/ijmr.IJMR_1402_18
- Schuck, Patrícia F., Gustavo C. Ferreira, Alana P. Moura, Estela N.B. Busanello, Anelise M. Tonin, Carlos S. Dutra-Filho a Moacir Wajner, 2009. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochemistry International*. 54(8), 519-525. ISSN 01970186. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuint.2009.02.009
- Smith, Michael A., Valerie B. Weaver, David M. Young a L. Nicholas Ornston, 2003. Genes for Chlorogenate and Hydroxycinnamate Catabolism (hca) Are Linked to Functionally Related Genes in the dca-pca-qui-pob-hca Chromosomal Cluster of Acinetobacter sp. Strain ADP1. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1), 524-532. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.69.1.524-532.2003
- Staufner, Christian, Tobias B. Haack, Patrik Feyh, et al., 2016. Genetic cause and prevalence of hydroxyprolinemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 39(5), 625-632. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-016-9940-2
- Steinbusch, Laura K.M., Ping Wang, Huub W.A.H. Waterval, et al., 2021. Targeted urine metabolomics with a graphical reporting tool for rapid diagnosis of inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 44(5), 1113-1123. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1002/jimd.12385
- Strauss KA, Puffenberger EG, Carson VJ. Maple Syrup Urine Disease. 2006 Jan 30 [updated 2020 Apr 23]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023. PMID: 20301495.
- Swallow, William H. a Farid Kianifard, 1996. Using Robust Scale Estimates in Detecting Multiple Outliers in Linear Regression. *Biometrics*. 52(2). ISSN 0006341X. Dostupné z: doi:10.2307/2532894
- Sweetman, L.; Williams, J.D. Branched chain organic acidurias. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed.; Scriver, C., Beaudet, A.L., Sly, W., Valle, D., Eds.; McGraw Hill: New York, NY, USA, 2001; pp. 2125–2164
- Tanaka, K., M. A. Budd, M. L. Efron a K. J. Isselbacher, 1966. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 56(1), 236-242. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.56.1.236

- Taylor, Geoffrey Ingram, 1969. Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences.* 313(1515), 453-475. ISSN 0080-4630. Dostupné z: doi:10.1098/rspa.1969.0205
- Tucci, Sara, Christine Wagner, Sarah C. Grünert, et al., 2021. Genotype and residual enzyme activity in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: Are predictions possible?. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 44(4), 916-925. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1002/jimd.12368
- Tuchman, Mendel, Mark T Mccann, Paula E Johnson a Bernard Lemieux, 1991. Screening Newborns for Multiple Organic Acidurias in Dried Filter Paper Urine Samples: Method Development. *Pediatric Research.* 30(4), 315-321. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1203/00006450-199110000-00005
- Tuncel, Ali Tunç, Nikolas Boy, Marina A. Morath, Friederike Hörster, Ulrike Mütze a Stefan Kölker, 2018. Organic acidurias in adults: late complications and management. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 41(5), 765-776. ISSN 0141-8955. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-017-0135-2
- Ueyanagi, Yasushi, Daiki Setoyama, Daisuke Kawakami, Yuichi Mushimoto, Shinya Matsumoto, Taeko Hotta a Dongchon Kang, 2021. Fully Automated Quantitative Measurement of Serum Organic Acids via LC-MS/MS for the Diagnosis of Organic Acidemias: Establishment of an Automation System and a Proof-of-Concept Validation. *Diagnostics.* 11(12). ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics11122195
- Ventura, F. V., L. Ijlst, R. Ofman, et al., 1991. Carnitine palmitoyltransferase II specificity towards β -oxidation intermediates. *Eur. J. Biochem.* 253(3), 614-618. Dostupné z: doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2530614.x
- Victor David, 2013. *Essentials in Modern HPLC Separations.* ISBN 9780123850133.
- Villani, Guglielmo RD, Giovanna Gallo, Emanuela Scolamiero, Francesco Salvatore a Margherita Ruoppolo, 2017. "Classical organic acidurias": diagnosis and pathogenesis. *Clinical and Experimental Medicine.* 17(3), 305-323. ISSN 1591-8890. Dostupné z: doi:10.1007/s10238-016-0435-0
- Volný, M., 2020. Hmotnostní analyzátor doby letu. *Chemické listy.* 114(2), 113-1118.
- Waisbren, Susan E., Yuval Landau, Jenna Wilson a Jerry Vockley, 2013. Neuropsychological outcomes in fatty acid oxidation disorders: 85 cases detected by newborn screening. *Developmental Disabilities Research Reviews.* 17(3), 260-268. ISSN 19405510. Dostupné z: doi:10.1002/ddrr.1119
- Wajner, Moacir, 2019. Neurological manifestations of organic acidurias. *Nature Reviews Neurology.* 15(5), 253-271. ISSN 1759-4758. Dostupné z: doi:10.1038/s41582-019-0161-9
- Wajner, Moacir, Daniella de Moura Coelho, Rafaela Ingrassia, et al., 2009. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC-MS analysis in Brazil: Fifteen-year experience. *Clinica Chimica Acta.* 400(1-2), 77-81. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2008.10.007
- Worthen, H.G., A. Al Ashwal, P.T. Ozand, S. Garawi, Z. Rahbeeni, A. AL Odaib, S.B. Subramanyam a M. Rashed, 1994. Comparative frequency and severity of hypoglycemia in selected organic acidemias, branched chain amino acidemia, and disorders of fructose metabolism. *Brain and Development.* 16, 81-85. ISSN 03877604. Dostupné z: doi:10.1016/0387-7604(94)90100-7

- Yunus, Z.M., Kamaludin, D.A., Mamat, M., Choy, Y.S., Ngu, L. (2011). Clinical and Biochemical Profiles of Maple Syrup Urine Disease in Malaysian Children. In: JIMD Reports - Case and Research Reports, 2012/2. JIMD Reports, vol 5. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/8904_2011_105
- Zhang, Hong, Yanyun Wang, Yali Qiu a Chao Zhang, 2022. Expanded newborn screening for inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry in a northern Chinese population. *Frontiers in Genetics*. 13. ISSN 1664-8021. Dostupné z: [doi:10.3389/fgene.2022.801447](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.801447)
- Zivak Technologies [online], 2023. USA: Zivak Technologies USA [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://www.zivak.com/>

8 Zoznam použitých skratiek

2D SDS PAGE – dvojrozmerná denaturačná akrylamidová elektroforéza

BCKDH - dehydrogenáza alfa-ketokyselín s rozvetveným reťazcom

C5-kar – karnitín s 5 uhlíkovými acylovými zbytkami

CPT1 – karnitínacyltransferáza 1

CPT2 - karnitínacyltransferáza 2

DBS – suchá krvná škvrna

DMP – dedičné metabolické poruchy

DPT – program účinnosti testovania

EI – elektrónová ionizácia

EMA – Európska lieková agentúra

ERNDIM – program externého hodnotenia kvality laboratórií zaoberajúcich sa diagnostikou DMP

ESI – ionizácia elektrosprejom

FDA - Správa potravín a liečív

GC – plynová chromatografia

GlyAT – glycín-N-transferáza

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

HSD10 - deficit 2-metyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenázy

IMDs – inherited metabolic disorders

IS – interný štandard

IVA – izovalerová acidúria

LCAD - acyl-CoA dehydrogenáza mastných kyselín s dlhým reťazcom

LLOQ - lower limit of quantification – najnižší limit kvantifikácie

LDMP – Laboratórium dedičných metabolických porúch

LIP – lipáza

LOD – limit detekcie

LOQ – limit kvantifikácie

MALDI – Laserová desorpcia/ionizácia za účasti matrice

MCAD - acyl-CoA dehydrogenáza mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom

MCADD - deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselín so stredne dlhým reťazcom

MF – mobilná fáza

MHBD - 2-metyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenáza

MRM - multiple reaction monitoring mode

MS – hmotnostná spektrometria

MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria

MSUD – choroba javorového sirupu, leucinóza

NBS – novorodenecký skrining

NP – normálna fáza

NRM – nukleárna magnetická rezonancia

NÚDCH BA – Národný ústav detských chorôb v Bratislave

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man

p.o. – orálna aplikácia

Q – kvadrupólový analyzátor

QC – vzorky kontroly kvality (HQC, MQC a LQC– high, medium and low concentration quality control)

QLOU - program kvantitatívnej analýzy organických kyselín v moči

QqQ – trojitý kvadрупól

RP – reverzná fáza

RS – robustne škálované

STATIM vzorky – vzorky určené pre rýchlu analýzu

TA – transamináza

TLC – tenkovrstvová chromatografia

TOF – analyzátor doby letu

UPHLC – ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

9 Prílohy

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušný retenčný čas, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín	Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	MQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Interný štandard	
Mono- karboxylové	kyselina valproová	13,83	6	75	25	5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N	
	amino-	glycylprolín	1,6	5	165	55	2,2	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 4-aminobutánová	0,8	4	75	25	5	kyselina metyl-D3-malonová
	aromatické	kyselina fenylactová	11,47	8	7,5	2,5	2	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
	aromatické, hydroxy-	kyselina 2-hydroxyfenylactová	9,79	8	7,5	2,5	0,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina 3-hydroxyfenylactová	9,21	6	75	25	5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina 3-hydroxymandľová	5,71	2	0,75	0,25	0,05	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina 4-hydroxybenzoová	8,18	2	7,5	0,25	0,5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina 4-hydroxyfenylactová	8,66	4	75	25	10	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina 4-hydroxyfenylmlietna	7,44	3	75	25	0,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina fenylmlietna	10,44	8	7,5	2,5	0,05	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina homovanilová	9,2	6	75	25	5	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
		kyselina mandľová	7,95	6	75	25	10	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina vanilmandľová	5,22	6	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
		aromatické, hydroxy-, amino-	N-acetyltyrozín	7,85	3	75	25	10

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky - pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	MQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Interný štandard
Mono- karboxylové	aromatické, dihydroxy-	3,4-dihydroxyfenyloctová	7,29	2	7,5	2,5	1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		3,4-dihydroxymandľová	1,91	2	0,75	2,5	0,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina gentisová	8,57	2	7,5	2,5	0,05	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina homogentisová	6,12	2	7,5	2,5	1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
	aromatické, oxy-	kyselina fenoxyoctová	11,53	3	75	25	1	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
	aromatické, oxo-	kyselina fenylpyrohroznová A	10,05	8	7,5	2,5	0,5	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
		kyselina fenylpyrohroznová B	12,8	8	7,5	2,5	0,5	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
	aromatické, oxo-, hydroxy-	kyselina 4-hydroxyfenylpyrohroznová A	6,8	6	75	25	1	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
		kyselina 4-hydroxyfenylpyrohroznová B	10,44	6	75	25	1	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
	oxo-	kyselina 2-oxobutánová	2,4	5	165	55	44	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 2-oxoizokaproová	9,28	8	7,5	2,5	1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina glyoxylová	0,78	7	75	25	20	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina pyrohroznová	1,15	6	75	25	1	kyselina mliečna - $^{13}\text{C}_3$
	oxo-, heterocyklické	kyselina kynurénová	8,42	2	7,5	2,5	0,5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina pyroglutamová	2,48	1	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
	dioxo-	sukcinylaceton	6,51	8	7,5	2,5	1	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
	dioxo-, heterocyklické	kyselina hydantoin-5-propiónová	3,1	6	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina orotová	1,59	8	7,5	2,5	0,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
heterocyklické	kyselina 2-pikolinová	1,55	8	7,5	2,5	0,5	kyselina metyl-D3-malonová	
	kyselina pipekolová	1,52	6	75	25	0,1	kyselina metyl-D3-malonová	

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	MQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Interný štandard
Mono- karboxylové	hydroxy-	kyselina 2,3-dihydroxy-2-metylbutánová	1,86	3	75	25	0,1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 2,3-dihydroxybutánová	1,36	7	75	25	10	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 2,4-dihydroxybutánová	15	4	75	25	5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 2-hydroxybutánová	3,07	7	75	25	5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 2-hydroxyizobutánová	2,92	7	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 2-hydroxyizokaproová	9,09	2	7,5	2,5	0,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
		kyselina 2-hydroxyizovalerová	6,49	7	75	25	1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
		kyselina 3,4-dihydroxybutánová	1,1	3	75	25	0,1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 3-hydroxybutánová	2,67	4	75	25	5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 3-hydroxydekánová	13,49	8	7,5	2,5	1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
		kyselina 3-hydroxyizobutánová	2,96	6	75	25	5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 3-hydroxyizovalerová	5,66	1	75	25	1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
		kyselina 3-hydroxyoktánová	11,98	5	16,5	5,5	1,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
		kyselina 3-hydroxypropiónová	1,62	5	165	55	4,4	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
		kyselina 3-hydroxyvalerová	6,12	8	7,5	2,5	0,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
		kyselina 4-hydroxybutánová	2,13	8	7,5	2,5	2	kyselina mliečna - $^{13}\text{C}_3$
		kyselina glycerová	1,08	4	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina glykolová	1,07	3	75	25	10	kyselina mliečna - $^{13}\text{C}_3$
		kyselina mliečna	1,72	4	75	25	5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$
kyselina vanilmliečna	8,25	1	7,5	2,5	0,05	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$		

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	MQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Interný štandard
Mono- karboxylové	hydroxy-, heterocyklické	kyselina 5-hydroxyindolooctová	8,51	7	75	25	5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina indolmiečna	11,06	6	75	25	0,1	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
Dikarboxylové		kyselina 3-metyladiťpová	8,65	7	75	25	0,5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina 3-metylglutarová	7,19	7	75	25	10	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina adipová	7,15	1	75	25	5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina azealová	11,5	6	75	25	2	kyselina homovanilová - $^{13}\text{C}_6$, ^{18}O
		kyselina etylmalonová	6,25	1	75	25	5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		kyselina glutarová	5,1	7	75	25	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina jantárová	3,03	3	75	25	5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina malónová	1,24	2	7,5	2,5	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina metyljantárová	5,96	8	7,5	2,5	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina metylmalonová	3,77	1	75	25	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina pimelová	8,75	5	165	55	2,2	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina sebaková	12,17	1	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina suberová	10,47	1	75	25	2	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [μmol.l ⁻¹]	MQC [μmol.l ⁻¹]	LQC [μmol.l ⁻¹]	Interný štandard
Dikarboxy- lové	hydroxy-	kyselina 2-hydroxyglutarová	1,68	5	165	55	11	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 3-hydroxy-3-metylglutarová	4,05	4	75	25	10	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 3-hydroxyglutarová	1,87	8	7,5	2,5	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 3-hydroxysebaková	10,34	7	75	25	1	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		kyselina 4-hydroxy-2-oxoglutarová	0,9	5	165	55	1,1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 4-hydroxyglutamová	0,71	8	7,5	2,5	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina citrajablčná	2,57	7	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina jablčná	1,11	4	75	25	1	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina vínna	0,9	5	165	55	11	kyselina metyl-D3-malonová
	nenасыtené	kyselina 2-metylglutakonová	7,3	7	75	25	10	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 3-metylglutakonová	7,4	6	75	25	10	kyselina mliečna - ¹³ C3
		kyselina fumarová	2,37	1	75	25	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina glutakonová	5,72	4	75	25	10	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina maleínová	1,82	7	75	25	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
	oxo-	kyselina 2-oxoadipová	3,17	8	7,5	2,5	0,5	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		kyselina 2-oxoglutarová	1,57	6	75	25	10	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		kyselina oxaloctová	0,9	7	75	25	10	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [μmol.l ⁻¹]	MQC [μmol.l ⁻¹]	LQC [μmol.l ⁻¹]	Interný štandard
Dikarboxy- lové	amino-	kyselina 2-aminoadipová	1	6	75	25	1	kyselina mliečna - ¹³ C3
	imino-	N-acetylasparát	1,75	5	165	55	2,2	kyselina metyl-D3-malonová
Trikarboxy- lové	hydroxy-	kyselina 2-metylcitrónová A	4,1	5	165	55	2,2	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina 2-metylcitrónová B	5,71	5	165	55	2,2	kyselina metyl-D3-malonová
		kyselina citrónová	2,71	3	150	50	10	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		kyselina izocitrónová	1,42	7	75	25	5	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
	nenasýtené	kyselina akonitová	3,36	4	75	25	0,5	kyselina metyl-D3-malonová

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	MQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Interný štandard
Acylglycíny		acetylglycín	1,43	9	37,5	12,5	0,1	kyselina metyl-D3-malonová
		propionylglycín	2,66	9	37,5	12,5	0,05	kyselina metyl-D3-malonová
		butyrylglycín	5,87	9	37,5	12,5	0,01	kyselina metyl-D3-malonová
		izobutyrylglycín	5,66	9	37,5	12,5	0,05	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		glutarylgylicín	4,11	9	37,5	12,5	0,05	kyselina metyl-D3-malonová
		valerylgylicín	7,94	9	37,5	12,5	0,05	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		izovalerylgylicín	7,38	9	37,5	12,5	0,01	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		2-metylbutyrylglycín	7,13	9	37,5	12,5	0,05	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		pivaloylglycín	7,45	9	37,5	12,5	1	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		hexanoylglycín	10,41	9	37,5	12,5	0,01	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		heptanoylglycín	11,81	9	37,5	12,5	0,005	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		suberylgylicín	8,7	9	37,5	12,5	0,05	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		aromatické	fenylpropionylglycín	10,98	9	37,5	12,5	0,005
	nenasýtené	3-metylakrotonylglycín	7,4	9	37,5	12,5	0,05	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
		tiglylglycín	7,23	9	37,5	12,5	0,1	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N
Arylglycíny		kyselina hipurová	8,59	3	75	25	1	hexanoylglycín- ¹³ C2 ¹⁵ N

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	MQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Interný štandard
Acyl- karnitíny		karnitín	0,84	10	15	5	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
		acetylkarnitín	1,93	10	7,5	2,5	0,1	kyselina metyl-D3-malonová
		propionylkarnitín	5,43	10	0,75	0,25	0,5	kyselina metyl-D3-malonová
		butyrylkarnitín	6,78	10	0,75	0,25	0,025	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}2$ ^{15}N
		hexanoylkarnitín	10,61	10	0,75	0,25	0,005	izovaleryl-D9-L-karnitín
		oktanoylkarnitín	12,09	10	0,75	0,25	0,0025	izovaleryl-D9-L-karnitín
		dekanoylkarnitín	12,99	10	0,75	0,25	0,002	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}2$ ^{15}N
		lauroylkarnitín	13,81	11	0,075	0,025	0,001	izovaleryl-D9-L-karnitín
		myristoylkarnitín	14,62	11	0,075	0,025	0,001	izovaleryl-D9-L-karnitín
		palmitoylkarnitín	15,41	11	0,075	0,025	0,0001	izovaleryl-D9-L-karnitín
	stearoylkarnitín	16,16	11	0,075	0,025	0,0001	izovaleryl-D9-L-karnitín	
	monokarboxylové	2-metylbutyryl-L-karnitín	8,3	11	0,75	0,25	0,01	izovaleryl-D9-L-karnitín
		izovaleryl-L-karnitín	8,47	11	0,75	0,25	0,02	izovaleryl-D9-L-karnitín
		3-metylkrotonyl-L-karnitín	8,01	11	0,75	0,25	0,05	izovaleryl-D9-L-karnitín
		tigloyl-L-karnitín	7,89	11	0,75	0,25	0,05	izovaleryl-D9-L-karnitín
		izobutyryl-L-karnitín	6,6	10	7,5	2,5	0,1	izovaleryl-D9-L-karnitín
		trans-2-oktenoyl-L-karnitín	11,87	10	0,75	0,25	0,005	izovaleryl-D9-L-karnitín
		arachidonyl-L-karnitín	15,09	11	0,75	0,25	0,001	izovaleryl-D9-L-karnitín
		valeryl-L-karnitín	8,68	11	0,75	0,25	0,005	izovaleryl-D9-L-karnitín
trans-2-dekanoyl-L-karnitín		12,8	11	0,75	0,25	0,001	izovaleryl-D9-L-karnitín	

Tab. 4 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné retenčné časy, interný štandard, číslo zmesi a koncentrácie pre HQC, MQC a LQC vzorky – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	RT [min]	Zmes	HQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	MQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LQC [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Interný štandard
Acyl- karnitíny	monokarboxylové, hydroxy-	(3R)-3-hydroxyhexanoyl-L-karnitín	7,47	10	0,75	0,25	0,005	izovaleryl-D9-L-karnitín
		(3R)-3-hydroxytetradekanoyl-L-karnitín	13,77	11	0,075	0,025	0,0001	izovaleryl-D9-L-karnitín
		(3R)-3-hydroxyhexadekanoyl-L-karnitín	14,55	11	0,075	0,025	0,0001	izovaleryl-D9-L-karnitín
		(3R)-3-hydroxyoktadecanoyl-L-karnitín	15,35	11	0,075	0,025	0,0001	izovaleryl-D9-L-karnitín
	dikarboxylové	adipoyl-L-karnitín	6,42	10	7,5	2,5	0,5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		3-metylglutaryl-L-karnitín	6,47	10	7,5	2,5	0,5	hexanoylglycín- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N
		suberoyl-L-karnitín	8,94	11	0,75	0,25	0,001	izovaleryl-D9-L-karnitín
		malonylkarnitín	1,3	10	0,75	0,25	0,1	kyselina metyl-D3-malonová
		sebakoyl-L-karnitín	11,05	10	0,75	0,25	0,025	izovaleryl-D9-L-karnitín
		glutarylkarnitín	5,74	10	7,5	2,5	0,1	izovaleryl-D9-L-karnitín

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Mono-karboxylové	amino-	kyselina valproová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,30x10 ⁻⁷	7,66x10 ⁻⁷	0,9988	0,9973
		glycylprolín	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,14x10 ⁻⁸	3,78x10 ⁻⁸	0,9990	0,9982
		kyselina 4-aminobutánová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	6,99x10 ⁻⁸	2,33x10 ⁻⁷	0,9989	0,9978
	aromatické	kyselina fenylactová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	1,98x10 ⁻⁷	6,59x10 ⁻⁷	0,9935	0,9708
	aromatické, hydroxy-	kyselina 2-hydroxyfenylactová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	7,70x10 ⁻⁸	2,56x10 ⁻⁷	0,9972	0,9934
		kyselina 3-hydroxyfenylactová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	6,99x10 ⁻⁷	2,33x10 ⁻⁶	0,9991	0,9971
		kyselina 3-hydroxymandľová	2	1,00x10 ⁻⁶	1,95x10 ⁻⁹	6,24x10 ⁻⁸	2,08x10 ⁻⁷	0,9968	0,9822
		kyselina 4-hydroxybenzoová	2	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	8,12x10 ⁻⁸	2,71x10 ⁻⁷	0,9950	0,9849
		kyselina 4-hydroxyfenylactová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,52x10 ⁻⁶	5,08x10 ⁻⁶	0,9914	0,9829
		kyselina 4-hydroxyfenylmliečna	3	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,51x10 ⁻⁸	8,36x10 ⁻⁸	0,9984	0,9967
		kyselina fenylmliečna	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	4,89x10 ⁻⁹	1,63x10 ⁻⁸	0,9996	0,9991
		kyselina homovanilová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,22x10 ⁻⁷	1,07x10 ⁻⁶	0,9959	0,9917
		kyselina mandľová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,64x10 ⁻⁶	5,46x10 ⁻⁶	0,9953	0,9907
		kyselina vanilmandľová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	9,11x10 ⁻⁹	3,03x10 ⁻⁸	0,9980	0,9961
		aromatické, hydroxy-, amino-	N-acetyltyrozín	3	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	7,08x10 ⁻⁷	2,36x10 ⁻⁶	0,9992

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Mono-karboxylové	aromatické, dihydroxy-	3,4-dihydroxyfenyloctová	2	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$1,31 \times 10^{-7}$	$4,36 \times 10^{-7}$	0,9858	0,9621
		3,4-dihydroxymandľová	2	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$6,33 \times 10^{-7}$	$2,11 \times 10^{-6}$	0,9413	0,8665
		kyselina gentisová	2	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$6,84 \times 10^{-9}$	$2,28 \times 10^{-8}$	0,9891	0,9690
		kyselina homogentisová	2	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$5,64 \times 10^{-8}$	$1,88 \times 10^{-7}$	0,9216	0,8391
	aromatické, oxy-	kyselina fenoxyoctová	3	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$1,57 \times 10^{-9}$	$5,24 \times 10^{-9}$	0,9969	0,9939
	aromatické, oxo-	kyselina fenylpyrohroznová	8	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$1,74 \times 10^{-7}$	$5,8 \times 10^{-7}$	0,9886	0,9774
	aromatické, oxo-, hydroxy-	kyselina 4-hydroxyfenylpyrohroznová	6	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$2,78 \times 10^{-7}$	$9,25 \times 10^{-7}$	0,9539	0,8889
	oxo-	kyselina 2-oxobutánová	5	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$4,12 \times 10^{-6}$	$1,37 \times 10^{-5}$	0,9917	0,9834
		kyselina 2-oxoizokaproová	8	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$1,01 \times 10^{-6}$	$3,35 \times 10^{-6}$	0,9869	0,9604
		kyselina glyoxylová	7	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-6}$	$4,16 \times 10^{-6}$	0,9901	0,9803
		kyselina pyrohroznová	6	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$3,87 \times 10^{-6}$	$1,29 \times 10^{-5}$	0,9936	0,9872
	oxo-, heterocyklické	kyselina kynurénová	2	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$1,77 \times 10^{-7}$	$5,90 \times 10^{-7}$	0,9974	0,9943
		kyselina pyroglutamová	1	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$3,14 \times 10^{-8}$	$1,05 \times 10^{-7}$	0,9994	0,9989
	dioxo-	sukcinylaceton	8	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$2,63 \times 10^{-7}$	$8,76 \times 10^{-7}$	0,9798	0,9598
	dioxo-, heterocyklické	kyselina hydantoin-5-propiónová	6	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$2,48 \times 10^{-7}$	$8,27 \times 10^{-7}$	0,9995	0,9990
		kyselina orotová	8	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$1,98 \times 10^{-8}$	$6,58 \times 10^{-8}$	0,9972	0,9941
	heterocyklické	kyselina 2-pikolinová	8	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$5,33 \times 10^{-8}$	$1,78 \times 10^{-7}$	0,9988	0,9975
		kyselina pipekolová	6	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$5,36 \times 10^{-9}$	$1,79 \times 10^{-8}$	0,9992	0,9984

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Mono-karboxylové	hydroxy-	kyselina 2,3-dihydroxy-2-metylbutánová	3	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,39x10 ⁻⁸	7,97x10 ⁻⁸	0,9996	0,9993
		kyselina 2,3-dihydroxybutánová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,99x10 ⁻⁷	9,94x10 ⁻⁷	0,9982	0,9965
		kyselina 2,4-dihydroxybutánová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,28x10 ⁻⁷	4,27x10 ⁻⁷	0,9975	0,9951
		kyselina 2-hydroxybutánová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	9,59x10 ⁻⁷	3,19x10 ⁻⁶	0,9995	0,9990
		kyselina 2-hydroxyizobutánová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,30x10 ⁻⁷	7,67x10 ⁻⁷	0,9994	0,9988
		kyselina 2-hydroxyizokaproová	2	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	1,80x10 ⁻⁸	5,99x10 ⁻⁸	0,9973	0,9942
		kyselina 2-hydroxyizovalerová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,35x10 ⁻⁸	1,11x10 ⁻⁷	0,9992	0,9983
		kyselina 3,4-dihydroxybutánová	3	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,32x10 ⁻⁸	4,38x10 ⁻⁸	0,9987	0,9975
		kyselina 3-hydroxybutánová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	8,65x10 ⁻⁷	2,88x10 ⁻⁶	0,9964	0,9928
		kyselina 3-hydroxydekanová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	6,11x10 ⁻¹⁰	2,03x10 ⁻⁹	0,9996	0,9992
		kyselina 3-hydroxyizobutánová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,36x10 ⁻⁷	7,84x10 ⁻⁷	0,9992	0,9984
		kyselina 3-hydroxyizovalerová	1	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,90x10 ⁻⁸	1,30x10 ⁻⁷	0,9993	0,9987
		kyselina 3-hydroxyoktánová	5	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	7,19x10 ⁻⁹	2,40x10 ⁻⁸	0,9995	0,9989
		kyselina 3-hydroxypropiónová	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	5,41x10 ⁻⁷	1,80x10 ⁻⁶	0,9988	0,9927
		kyselina 3-hydroxyvalerová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	3,00x10 ⁻⁸	9,99x10 ⁻⁸	0,9972	0,9946
		kyselina 4-hydroxybutánová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	9,65x10 ⁻⁷	3,21x10 ⁻⁶	0,9885	0,9772
		kyselina glycerová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,17x10 ⁻⁸	7,23x10 ⁻⁸	0,9951	0,9903
		kyselina glykolová	3	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	6,68x10 ⁻⁷	2,22x10 ⁻⁶	0,9816	0,9636
kyselina mliečna	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,24x10 ⁻⁷	1,08x10 ⁻⁶	0,9967	0,9933		
kyselina vanilmliečna	1	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	5,43x10 ⁻⁹	1,81x10 ⁻⁸	0,9975	0,9950		

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Mono-karboxylové	hydroxy-, heterocyklické	kyselina 5-hydroxyindolactová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,56x10 ⁻⁸	5,20x10 ⁻⁸	0,9972	0,9941
		kyselina indolmiečna	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	4,05x10 ⁻⁹	1,35x10 ⁻⁸	0,9995	0,9989
Dikarboxylové		kyselina 3-metyladipová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,07x10 ⁻⁸	6,91x10 ⁻⁸	0,9992	0,9984
		kyselina 3-metylglutarová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,42x10 ⁻⁶	4,73x10 ⁻⁶	0,9954	0,9868
		kyselina adipová	1	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	8,11x10 ⁻⁸	2,70x10 ⁻⁷	0,9979	0,9958
		kyselina azealová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,91x10 ⁻⁹	6,35x10 ⁻⁹	0,9983	0,9960
		kyselina etylmalonová	1	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,20x10 ⁻⁷	4,00x10 ⁻⁷	0,9978	0,9965
		kyselina glutarová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,88x10 ⁻⁷	6,26x10 ⁻⁷	0,9967	0,9935
		kyselina jantárová	3	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	9,71x10 ⁻⁷	3,24x10 ⁻⁶	0,9976	0,9953
		kyselina malónová	2	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	6,28x10 ⁻⁸	2,09x10 ⁻⁷	0,9954	0,9851
		kyselina metyljantárová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	3,29x10 ⁻⁸	1,09x10 ⁻⁷	0,9963	0,9926
		kyselina metylmalonová	1	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,93x10 ⁻⁸	1,31x10 ⁻⁷	0,9995	0,9991
		kyselina pimelová	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,70x10 ⁻⁷	8,99x10 ⁻⁷	0,9970	0,9939
		kyselina sebaková	1	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	8,38x10 ⁻⁹	2,79x10 ⁻⁸	0,9983	0,9966
kyselina suberová	1	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	5,62x10 ⁻⁹	1,87x10 ⁻⁸	0,9991	0,9984		

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Dikarboxy- lové	hydroxy-	kyselina 2-hydroxyglutarová	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,01x10 ⁻⁸	6,68x10 ⁻⁸	0,9982	0,9964
		kyselina 3-hydroxy-3-metylglutarová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,70x10 ⁻⁸	5,66x10 ⁻⁸	0,9993	0,9985
		kyselina 3-hydroxyglutarová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	4,46x10 ⁻⁸	1,49x10 ⁻⁷	0,9988	0,9975
		kyselina 3-hydroxysebaková	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,89x10 ⁻⁹	6,29x10 ⁻⁹	0,9999	0,9984
		kyselina 4-hydroxy-2-oxoglutarová	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	6,32x10 ⁻⁷	2,10x10 ⁻⁶	0,9910	0,9822
		kyselina 4-hydroxyglutamová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	1,58x10 ⁻⁷	5,27x10 ⁻⁷	0,9986	0,9973
		kyselina citrajablčná	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	5,99x10 ⁻⁸	2,00x10 ⁻⁷	0,9987	0,9975
		kyselina jablčná	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,34x10 ⁻⁸	7,78x10 ⁻⁸	0,9983	0,9967
	kyselina vínna	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,02x10 ⁻⁷	3,39x10 ⁻⁷	0,9957	0,9915	
	nenasýtené	kyselina 2-metylglutakonová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	4,55x10 ⁻⁶	1,52x10 ⁻⁵	0,9726	0,9332
		kyselina 3-metylglutakonová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,44x10 ⁻⁶	1,14x10 ⁻⁵	0,9917	0,9214
		kyselina fumarová	1	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	4,15x10 ⁻⁷	1,38x10 ⁻⁶	0,9994	0,9981
		kyselina glutakonová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,81x10 ⁻⁶	6,03x10 ⁻⁶	0,9936	0,9873
		kyselina maleínová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	7,36x10 ⁻⁸	2,45x10 ⁻⁷	0,9989	0,9976
	oxo-	kyselina 2-oxoadipová	8	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	3,35x10 ⁻⁷	1,11x10 ⁻⁶	0,9642	0,9141
		kyselina 2-oxoglutarová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,29x10 ⁻⁵	1,10x10 ⁻⁴	0,9982	0,9965
		kyselina oxaloctová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	8,40x10 ⁻⁷	2,80x10 ⁻⁶	0,9855	0,9713

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Dikarboxy- lové	amino-	kyselina 2-aminoadipová	6	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,13x10 ⁻⁸	7,10x10 ⁻⁸	0,9972	0,9945
	imino-	N-acetylasparát	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,52x10 ⁻⁸	8,40x10 ⁻⁸	0,9961	0,9921
Trikarboxy- lové	hydroxy-	kyselina 2-metylcitrónová	5	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	2,72x10 ⁻⁸	9,06x10 ⁻⁸	0,9987	0,9975
		kyselina citrónová	3	2,00x10 ⁻⁴	3,91x10 ⁻⁷	5,88x10 ⁻⁸	1,96x10 ⁻⁷	0,9950	0,9897
		kyselina izocitrónová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,53x10 ⁻⁷	5,09x10 ⁻⁷	0,9936	0,9863
	nenasýtené	kyselina akonitová	4	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	3,56x10 ⁻⁸	1,19x10 ⁻⁷	0,9993	0,9986
Estery	oxo-	kyselina acetocetová	7	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,30x10 ⁻⁵	4,33x10 ⁻⁵	0,9789	0,8973
		kyselina etylacetocetová	3	1,00x10 ⁻⁴	1,95x10 ⁻⁷	1,12x10 ⁻⁶	3,72x10 ⁻⁶	0,9982	0,9965
	hydroxy-	mevalonolaktón	2	1,00x10 ⁻⁵	1,95x10 ⁻⁸	1,36x10 ⁻⁸	4,52x10 ⁻⁸	0,9977	0,9957

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Acylglycíny		acetylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$1,19 \times 10^{-8}$	$3,95 \times 10^{-8}$	0,9994	0,9988
		propionylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$4,07 \times 10^{-9}$	$1,35 \times 10^{-8}$	0,9996	0,9993
		butyrylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$1,26 \times 10^{-9}$	$4,20 \times 10^{-9}$	0,9990	0,9980
		izobutyrylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$2,59 \times 10^{-9}$	$8,63 \times 10^{-9}$	0,9986	0,9973
		glutarylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$5,19 \times 10^{-9}$	$1,73 \times 10^{-8}$	0,9996	0,9993
		valerylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$2,08 \times 10^{-9}$	$6,94 \times 10^{-9}$	0,9979	0,9956
		izovalerylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$1,78 \times 10^{-9}$	$5,92 \times 10^{-9}$	0,9990	0,9979
		2-metylbutyrylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$1,72 \times 10^{-9}$	$5,74 \times 10^{-9}$	0,9972	0,9944
		pivaloylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$1,24 \times 10^{-7}$	$4,14 \times 10^{-7}$	0,9994	0,9988
		hexanoylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$5,60 \times 10^{-10}$	$1,87 \times 10^{-9}$	0,9992	0,9985
		heptanoylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-10}$	$3,99 \times 10^{-10}$	0,9986	0,9972
		suberylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$1,46 \times 10^{-9}$	$4,85 \times 10^{-9}$	0,9982	0,9964
		aromatické	fenylpropionylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$2,35 \times 10^{-10}$	$7,83 \times 10^{-10}$	0,9993
	nenasýtené	3-metylkrotonylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$2,87 \times 10^{-9}$	$9,55 \times 10^{-9}$	0,9985	0,9970
		tiglylglycín	9	$5,00 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$2,42 \times 10^{-8}$	$8,07 \times 10^{-8}$	0,9981	0,9963
Arylglycíny		kyselina hipurová	3	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$4,04 \times 10^{-9}$	$1,34 \times 10^{-8}$	0,9975	0,9951

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Acyl-karnitíny		karnitín	10	$2,00 \times 10^{-5}$	$3,91 \times 10^{-8}$	$5,64 \times 10^{-8}$	$1,88 \times 10^{-7}$	0,9985	0,9970
		acetylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$1,48 \times 10^{-9}$	$4,93 \times 10^{-9}$	0,9997	0,9994
		propionylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$1,24 \times 10^{-9}$	$4,14 \times 10^{-9}$	0,9996	0,9992
		butyrylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$4,65 \times 10^{-10}$	$1,55 \times 10^{-9}$	0,9945	0,9904
		hexanoylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$7,71 \times 10^{-11}$	$2,57 \times 10^{-10}$	0,9991	0,9982
		oktanoylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$3,07 \times 10^{-11}$	$1,02 \times 10^{-10}$	0,9993	0,9986
		dekanoylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$4,55 \times 10^{-11}$	$1,51 \times 10^{-10}$	0,9999	0,9998
		lauroylkarnitín	11	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-10}$	$4,69 \times 10^{-10}$	$1,56 \times 10^{-9}$	0,9922	0,9845
		myristoylkarnitín	11	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-10}$	$4,57 \times 10^{-10}$	$1,52 \times 10^{-9}$	0,9834	0,9670
		palmitoylkarnitín	11	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-10}$	$4,57 \times 10^{-10}$	$1,52 \times 10^{-9}$	0,9834	0,9670
	stearoylkarnitín	11	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-10}$	$3,26 \times 10^{-10}$	$1,09 \times 10^{-9}$	0,9853	0,9708	
	monokarboxylové	2-metylbutyryl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$1,27 \times 10^{-10}$	$4,22 \times 10^{-10}$	0,9994	0,9987
		izovaleryl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$1,11 \times 10^{-10}$	$3,69 \times 10^{-10}$	0,9991	0,9983
		3-metylkrotonyl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$8,60 \times 10^{-11}$	$2,86 \times 10^{-10}$	0,9980	0,9960
		tigloyl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$2,35 \times 10^{-10}$	$7,81 \times 10^{-10}$	0,9993	0,9985
		izobutyryl-L-karnitín	10	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$3,58 \times 10^{-10}$	$1,19 \times 10^{-9}$	0,9963	0,9926
		trans-2-oktenoyl-L-karnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$3,61 \times 10^{-11}$	$1,20 \times 10^{-10}$	0,9997	0,9994
		arachidonoyl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$8,58 \times 10^{-10}$	$2,86 \times 10^{-9}$	0,9902	0,9806
		valeryl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$1,12 \times 10^{-10}$	$3,73 \times 10^{-10}$	0,9974	0,9947
trans-2-dekanoyl-L-karnitín		11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$5,81 \times 10^{-11}$	$1,93 \times 10^{-10}$	0,9995	0,9991	

Tab. 5 Zoznam organických kyselín a ich konjugátov (acylkarnitíny, acylglycíny a arylglycíny) zoradené podľa funkčných skupín. K jednotlivým analytom sú uvedené príslušné číslo zmesi a rozmedzie koncentrácie pre kalibračné roztoky, limit detekcie, limit kvantifikácie, korelačný koeficient a koeficient determinácie – pokračovanie

Skupina organických kyselín a konjugátov podľa funkčných skupín		Organická kyselina/konjugát	Zmes	c_{KAL1} [mol.l ⁻¹]	c_{KAL10} [mol.l ⁻¹]	LOD [mol.l ⁻¹]	LOQ [mol.l ⁻¹]	R	R ²
Acyl-karnitíny	monokarboxylové, hydroxy-	(3R)-3-hydroxyhexanoyl-L-karnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$1,79 \times 10^{-10}$	$5,95 \times 10^{-10}$	0,9982	0,9963
		(3R)-3-hydroxytetradekanoyl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-10}$	$1,21 \times 10^{-10}$	$4,04 \times 10^{-10}$	0,979	0,959
		(3R)-3-hydroxyhexadekanoyl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-10}$	$3,35 \times 10^{-10}$	$1,12 \times 10^{-9}$	0,9742	0,9729
		(3R)-3-hydroxyoktadecanoyl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-10}$	$6,74 \times 10^{-10}$	$2,24 \times 10^{-9}$	0,9780	0,9566
	dikarboxylové	adipoyl-L-karnitín	10	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$6,23 \times 10^{-10}$	$2,07 \times 10^{-9}$	0,9994	0,9987
		3-metylglutaryl-L-karnitín	10	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$2,19 \times 10^{-9}$	$6,23 \times 10^{-10}$	0,9997	0,9994
		suberoyl-L-karnitín	11	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$2,25 \times 10^{-10}$	$7,49 \times 10^{-10}$	0,9992	0,9985
		malonylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$3,02 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-8}$	0,9949	0,9899
		sebakoyl-L-karnitín	10	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,95 \times 10^{-9}$	$1,01 \times 10^{-10}$	$3,35 \times 10^{-10}$	0,9987	0,9974
		glutarylkarnitín	10	$1,00 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-8}$	$2,86 \times 10^{-9}$	$9,51 \times 10^{-9}$	0,9990	0,9979