

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na
stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu
ve vodě pomocí LC/MS**

Bakalářská práce

Karel Hořejší

Vedoucí práce: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2016

Hořejší, K., 2016: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě pomocí LC/MS. [Development, optimization and validation of an analytical method for determination of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in water using LC/MS. Bc. Thesis, in Czech.] – 80 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This bachelor thesis deals with the development, optimization and validation of an analytical method for determination of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in water using LC/MS. At first, the development and optimization of the analytical method was performed. For the optimization of the analytical method following parameters were selected: temperature of HESI and MS capillary, gases flow rate, voltage on S-lens, F-lens and capillary, collision energy. In addition, mobile phase composition, flow rate of mobile phase and injection volume of sample were optimized too. Then, the analytical method was successfully validated. Finally, the method was applied to the analysis of real samples of surface water.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 22.4.2016

Karel Hořejší

Klíčová slova

β -N-methylamino-L-alanin, neurodegenerativní onemocnění, kapalinová chromatografie, validace, optimalizace, hmotnostní spektrometrie

Key words

β -N-methylamino-L-alanine, neurodegenerative diseases, liquid chromatography, validation, optimization, mass spectrometry

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce a cenné rady, jež mi byly během zpracování této práce poskytnuty. Oceňuji také jeho velice přátelský přístup a ochotu kdykoliv pomoci.

Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Tomáši Hauerovi, Ph.D. za dodávání reálných vzorků povrchové vody a své rodině a přítelkyni za podporu a pomoc.

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Neurotoxin BMAA	2
2.2	Spojitosť BMAA s neurodegenerativními onemocněními	3
2.2.1	Toxicita BMAA	4
2.2.2	Amyotrofická laterální skleróza	6
2.3	Analytické metody pro stanovení β -N-methylamino-L-alaninu	7
2.3.1	Kapalinová chromatografie	7
2.3.2	Hmotnostní spektrometrie	10
2.4	Možnosti stanovení β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě	11
3	MATERIÁL A METODY	14
3.1	Použité chemikálie a činidla	14
3.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál	14
3.3	Příprava roztoků standardů	15
3.3.1	Příprava zásobních roztoků	15
3.3.2	Příprava pracovních roztoků pro účely optimalizace	15
3.3.3	Příprava pracovních roztoků pro účely kalibrace	16
3.3.4	Příprava kalibračních roztoků	16
3.4	Příprava reálných vzorků	18
3.4.1	Příprava spikovaných vzorků	18
3.4.2	Příprava reálných vzorků	18
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	19
4.1	Optimalizace chromatografické separace	19
4.1.1	Testovací analýza	19
4.1.2	Optimalizace složení a průtoku mobilní fáze	20
4.1.3	Optimalizace objemu nástřiku	22
4.2	Optimalizace hmotnostní detekce	23
4.2.1	Volba MRM přechodů	23
4.2.2	Optimalizace podmínek elektrospreje	24
4.2.3	Optimalizace parametrů iontové optiky	26
4.2.4	Optimalizace kolizní energie jednotlivých MRM přechodů	27
4.2.5	Optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce - souhrn	28
4.3	Validace metody	30

4.3.1	Linearita.....	30
4.3.2	Správnost a přesnost.....	32
4.3.3	Rozsah	32
4.3.4	Instrumentální mez detekce a mez stanovitelnosti	33
4.4	Testování metody na reálném vzorku vody.....	33
4.4.1	Analýza spikovaných vzorků.....	33
4.4.2	Analýza reálných vzorků	35
5	ZÁVĚR	37
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	43
8	PŘÍLOHY	45
8.1	Příloha A.....	45
8.2	Příloha B	46
8.3	Příloha C	48
8.4	Příloha D.....	58
8.5	Příloha E	70
8.6	Příloha F.....	79

1 CÍLE PRÁCE

- vypracovat literární rešerši na dané téma
- vypracovat analytickou metodu na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí včetně provedení základní optimalizace této analytické metody
- provést validaci analytické metody
- provést základní testování vypracované analytické metody pro její plánované použití na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu v povrchových vodách

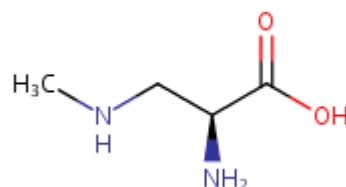
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Neurotoxin BMAA

β -N-methylamino-L-alanin, BMAA, je neurotoxická aminokyselina neproteinogenního původu produkovaná téměř všemi všudypřítomnými planktonními organismy (sinice, rozsivky a obrněnky), jež jsou běžnou součástí globálního ekosystému [1,2,3]. Neurotoxin BMAA se v přírodě vyskytuje převážně ve formě volné, přestože začlenění jiných neobvyklých aminokyselin do proteinů bylo již dříve velmi dobře popsáno [1,4]. Neznamená to však, že se nemůže vyskytovat jako BMAA vázané na proteiny (tzv. „protein-associated“) [5]. Podařilo se také uměle začlenit BMAA do syntetických polypeptidů [1].

BMAA byl poprvé objeven roku 1967, kdy byl i současně izolován ze semen cykasu *Cycas micronesica*. V té době se předpokládalo, že se jedná o rostlinný toxin, nicméně pozdější výzkumy prokázaly, že BMAA je produkováno sinicemi rodu *Nostoc* žijícími symbioticky na kořenech cykasů. Další výzkumy ukázaly na schopnost BMAA se hromadit v semenech cykasů [3].

Z chemického hlediska se jedná o vysoce polární aminokyselinu, která by se pravděpodobně neměla bioakumulovat v tukových tkáních, což však nebylo dosud předmětem výzkumu [4,6]. Strukturální vzorec této látky je uveden na Obr. 1.



Obr. 1: Strukturální vzorec BMAA.

Hlavními a velmi významnými producenty BMAA jsou zejména sinice [1]. Sinice, jakožto ubikvitární prokaryotní organismy, produkují celou řadu toxických sloučenin (tzv. cyanotoxiny) nebezpečných pro lidské zdraví [2,7]. Mezi tyto látky patří například saxitoxin, anatoxin A, ale právě také v posledních letech dosti diskutovaný neurotoxin BMAA, jehož produkce sinicemi byla poprvé zaznamenána v roce 2003 [3,7]. Dosud však není zcela jasné, zda jsou všechny druhy sinic schopné za vhodných podmínek produkovat BMAA [7]. Důvodem jsou sporné výsledky o produkci BMAA kulturami sinic publikované v posledních deseti letech, jež byly získány za pomoci různých analytických postupů a předúprav vzorků [3].

Vzhledem k všudypřítomnému rozšíření sinic ve vodních zdrojích po celém světě a k jejich předpokládanému zvýšení v důsledku klimatických změn, které zapříčiňují

poměrně intenzivní růst vodních květů, může mít BMAA nepříznivé dopady jak na živočichy, tak i na celosvětovou populaci využívající tyto zdroje jako přímý zdroj vody nebo k rekreačním účelům [5,7,8]. Rozvoj vodních květů je také do značné míry způsoben zatížením vodních ploch živinami ze zemědělských, průmyslových a odpadních odtoků [9].

Při kolapsu vodních květů sinic, může dojít k bioakumulaci (obohacení organismu o cizorodou látku) a biomagnifikaci (vzrůstající akumulace škodlivin v organismu napříč potravním řetězcem) BMAA ve vodních ekosystémech [7]. Bylo prokázáno, že BMAA je bioakumulován v korýších (krevety, raci, krabi) v množství až $6976 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, v měkkýších (modré mušle a slávky) v množství až $305 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a některých druzích ryb (losos, treska, sled' a další) v množství až $2559 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ živících se planktonem (organismy žijící na hladině) a bentosem (organismy žijící u dna) [4,7].

2.2 Spojitost BMAA s neurodegenerativními onemocněními

Počátky zkoumání BMAA jsou spojeny s extrémním výskytem neurodegenerativních onemocnění, zejména amyotrofické laterální sklerózy (ALS), u domorodých obyvatel Chamorro na ostrově Guam, jež je součástí souostroví Mariany v Tichém oceánu. Průzkumy vědců ze Spojených států roku 1954 odhadly incidenci ALS na ostrově Guam 50x až 100x vyšší než kdekoliv jinde na světě [7].

Vědci se nejprve domnívali, že tato vysoká četnost onemocnění je způsobena konzumací semen cykasů (resp. mouky z těchto semen) obsahující poměrně vysoké množství volného BMAA [5], jimiž se tito lidé živi. Tato hypotéza však byla později zamítnuta, neboť bylo zjištěno, že semena jsou před úpravou důkladně omývána, což vede ke značnému zredukování ($\sim 90\%$, u více než $\frac{1}{2}$ vzorků došlo ke zredukování $\geq 99\%$ BMAA) jeho obsahu [5,10]. Přijaté množství BMAA v podobě potravin vyrobených ze semen cykasů je tedy poměrně nízké, nikoliv však zanedbatelné, a to z důvodu schopnosti BMAA se vázat na proteiny [1,7].

Lidé Chamorro pravděpodobně také přijímají BMAA do organismu prostřednictvím konzumace různých zdrojů potravy, včetně tradiční pochoutky (maso, kůže, vnitřnosti z kaloňů) a jiných zvířat živících se semeny cykasů [1,7]. Bylo prokázáno, že BMAA se v potravním řetězci, počínaje sinicemi a konče lidmi, může zakonzentrovat až 10 000x [2]. Pravidelnou konzumací potravin obsahujících BMAA tedy zřejmě dochází k jeho akumulaci v mozku člověka, což může později vést k rozvoji neurodegenerativních onemocnění [2,7].

Objev BMAA v mozkové tkáni domorodých obyvatel Chamorro s ALS, a dle nedávných studií i u pacientů s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou ze Severní

Ameriky, poukázal na možné působení BMAA na člověka. Tato zjištění vedla k nezávislým studiím zabývajících se možností rozšíření BMAA mimo Guamský ekosystém [1].

Problémem také může být konzumace potravin nebo vody obsahující BMAA, což může mít za následek navázání BMAA na proteiny. Takto kontaminované proteiny mohou být v průběhu několika let v organismu postupně metabolizovány, což má za následek jeho pomalé uvolňování [2,5]. Z toho plyne, že proteiny mohou hrát roli jakéhosi rezervoáru pro opakovanou expozici člověka BMAA a mít tak potenciální vliv na lidské zdraví [1,3].

Výzkumy naznačily, že incidence (počet nových případů v dané populaci za určité časové období) ALS na ostrově Guam za posledních pět desetiletí značně poklesla (odhad v letech 1950-1954: 114/100 000, v roce 1999 pokles pod 3/100 000) v důsledku etnografických, sociálních a ekologických změn způsobených přizpůsobením životního stylu západní kultury [7,11]. V současné době se incidence ALS ve světě pohybuje okolo 2 nových případů na 100 000 obyvatel za rok [12].

Vzhledem k nedostatku dostupných toxikologických informací o BMAA není v současné době možné odhadnout vztah mezi dávkou toxinu a rozvojem neurodegenerativních onemocnění. Existuje mnoho teorií, které se zabývají mechanismy toxicity BMAA a spojitostí mezi BMAA a neurodegenerativními poruchami, žádná však dosud nebyla jednoznačně prokázána [4].

V evropské populaci představuje riziko pro zdraví člověka zejména konzumace kontaminovaných mořských plodů (důležitý zdroj bílkovin na celém světě) pocházejících z oblasti Baltského moře, kde jsou masivní květy sinic zcela běžným jevem [7,8]. Navíc může docházet k již zmíněnému začlenění BMAA do proteinů a jeho následné bioakumulaci. V konečném důsledku může iniciovat rozvoj neurodegenerativního onemocnění [4]. Možnými mechanismy intoxikace organismu BMAA jsou: konzumace kontaminovaných mořských živočichů, konzumace již zmíněných kaloňů, požití kontaminované vody, pronikání kontaminované vody do studní nebo vdechnutí aerosolu toxinů [7].

2.2.1 Toxicita BMAA

Studie provedené v 90. letech 20. století ukázaly, že BMAA vykazuje řadu toxických účinků, jak *in vivo*, tak *in vitro*, zejména na motorické neurony [5]. Experimentálně bylo zjištěno, že BMAA indikuje v roztoku smíšených míšních kultur selektivní ztrátu motorických neuronů již v koncentraci přibližně 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Tato skutečnost navíc podporuje hypotézu, že by BMAA mohlo zapříčinit rozvoj ALS, Alzheimerovy choroby

nebo Parkinsonovy choroby [7]. Dále bylo prokázáno, že BMAA může již ve velmi nízkých koncentracích (přibližně $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) zesilovat účinky jiných neurotoxinů *in vitro* [5,7].

Vzhledem k možnosti začlenění BMAA do proteinů je vysoce pravděpodobné, že může také docházet k problémům ve formování struktury proteinů (tzv. protein misfolding) – typický znak neurodegenerace. Dále bylo zjištěno, že některé analogy aminokyselin mohou být také začleněny do proteinů a mohou tak pozměnit některé funkce buněk. Mechanismus začlenění BMAA do proteinu však dosud nebyl popsán [7]. Kromě toho nemusí samotný BMAA způsobovat neurologické problémy, ale kombinace nízké hladiny BMAA a přirozeně se vyskytujících poruch nebo genetických predispozic k různým chorobám by mohlo vést k jejich rozvoji [5].

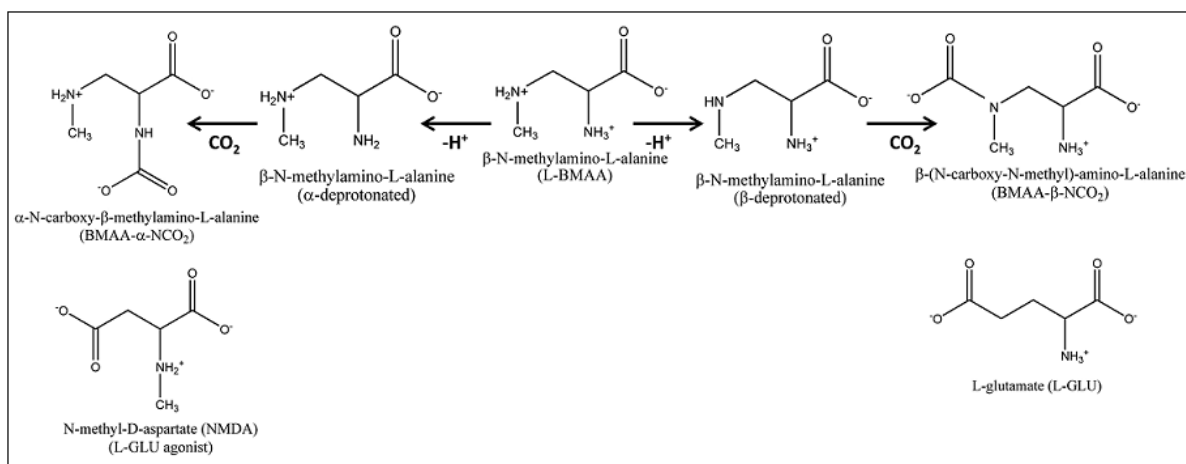
Ačkoliv v současnosti existují různé teorie o degeneraci motorických neuronů, nejpravděpodobnější se jeví teorie nadbytku glutamátu v synapsi. Pro správný přenos nervových vzruchů mezi neurony je zapotřebí specifická chemická látka zvaná neurotransmitter. Jedním z významných neurotransmiterů je právě glutamát. Aby mohly neurony mezi sebou vzájemně komunikovat, je zapotřebí určitého množství glutamátu v synaptické štěrbině (synapsi). Na druhé straně může nadbytečné množství glutamátu působit toxicky na těla nervových buněk. Bylo zjištěno, že u lidí trpících ALS se vyskytuje v jejich mozku a míše velké množství glutamátu pravděpodobně zodpovědné za poškození motorických neuronů [12].

Nadbytečné množství glutamátu v synaptické štěrbině je způsobeno účinky BMAA [12]. V první řadě se jedná o přímou vazbu BMAA na ionotropní glutamátové receptory NMDA a AMPA a metabotropní receptor mGluR5. Vazba může být navíc zesílena v případě, kdy je BMAA vázán v podobě karbamátového aduktu (tj. molekuly podobné glutamátu) [13,14]. Tyto receptory mají významnou roli v buněčných procesech jako je například excitotoxicita. Excitotoxicita je vlastnost látky mající za následek nadměrnou aktivaci těchto receptorů, což vede ke kolapsu iontových gradientů v neuronu. Dochází k masivnímu uvolnění glutamátu a jeho následnému hromadění v synapsi. Výsledkem je buněčná smrt neuronu [13,15].

Za vychytávání glutamátu ze synaptické štěrbiny jsou zodpovědné glutamátové transportery EAAT1 a EAAT2 lokalizované na gliových buňkách, které chrání a vyživují neurony. Jestliže však dojde k poškození těchto buněk, příslušné transportery nejsou schopny správně fungovat, což vede k nedostačujícímu vychytávání glutamátu ze synapse a hromadící se glutamát působí neurotoxicky na motorické neurony. Gliové buňky tedy hrají významnou roli ve vychytávání glutamátu a zabraňují tak jeho chronickému působení [14].

V druhé řadě jde o indukci oxidativního stresu. Přítomnost BMAA může způsobit zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku, která může vést dalšími reakcemi k tvorbě silných oxidačních látek schopných pozměnit nebo poškodit proteiny nebo dokonce i nukleové kyseliny. Bylo prokázáno, že reaktivní formy kyslíku (např. superoxidový radikál, hydroxylový radikál nebo peroxid vodíku) vedou k poškození neuronů *in vivo* [15].

Vzhledem ke struktuře BMAA je možná reakce s CO₂ při fyziologickém pH za vzniku α- a β- karbamátových aduktů, které jsou strukturně podobné neurotransmiteru glutamátu a jeho selektivního agonisty (látka mající stejný účinek) N-methyl-D-aspartátu (NMDA). Bylo zjištěno, že v přítomnosti 5% CO₂ způsobuje BMAA *in vivo* selektivní ztrátu motorických neuronů v míšních kulturách [8].



Obr. 2: Karbamátové adukty BMAA a jejich podobnost s glutamátem a NMDA [8].

Bylo zjištěno, že BMAA vyvolává u myšího modelu neurotoxické účinky na neurony v mozku v přítomnosti fyziologické koncentrace HCO₃⁻ v extracelulárním prostoru. Důvodem jsou možné nekovalentní interakce s molekulou BMAA, které umožňují tvorbu molekulární konformace podobné glutamátu, jež aktivuje glutamátové receptory [16].

2.2.2 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je progresivní neurodegenerativní onemocnění charakteristické postoupnou degenerací až smrtí motorických neuronů, jež hrají důležitou roli v komunikaci mezi nervovým systémem a příčně pruhovaným svalstvem [17]. V pozdějších stádiích nemoci tedy dochází k postupnému ochabování svalstva, výsledkem je celková paralýza těla [12]. Smrt nastává z velké většiny v důsledku zástavy dechu [17].

Přibližně 90 % všech případů je způsobeno zcela náhodně (sporadická forma), zatímco zbylých 10 % je způsobeno mutací či vadou v genu (familiární forma) [12,17]. S ohledem

na tyto mutace a vady může dojít k pozměnění funkce různých proteinů, jako jsou například glutamátové transportní proteiny nezbytné pro odstranění glutamátu ze synapse [17,18].

V současné době na tuto nemoc neexistuje účinná léčba, k dispozici jsou pouze přípravky zmírňující a oddalující progresi nemoci o zhruba 2 až 3 měsíce. Takovýmto přípravkem je lék Rilutek, jež potlačuje uvolňování glutamátu. Cena jedné tablety se pohybuje okolo 200 Kč [12].

2.3 Analytické metody pro stanovení β -N-methylamino-L-alaninu

Volba vhodné analytické metody vždy záleží na charakteru analyzovaných sloučenin. Vzhledem k chemickým vlastnostem β -N-methylamino-L-alaninu se pro jeho stanovení využívá z velké většiny kapalinová chromatografie, obvykle ve spojení s hmotnostní detekcí.

Chromatografie je významná separační technika, při níž se separují složky obsažené ve vzorku, který se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Pohybem mobilní fáze je vzorek unášen přes nepohyblivou stacionární fázi, na níž dochází k zachycování složek vzorku. Složky vzorku se od sebe postupně separují zejména na základě síly interakcí se stacionární fází [19]. Stacionární fáze (obecně též sorbent) může mít v chromatografii velmi odlišnou formu. Může se jednat o částice tuhé látky velké řádově jednotky až stovky mikrometru, v jiném případě se jedná o velmi tenkou vrstvu kapaliny nanesené na tuhých částicích nebo tenký film kapaliny nanesený na vnitřní stěně kapiláry [20].

2.3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační technika, při níž dochází k rovnovážné distribuci složek mezi dvě heterogenní fáze – mobilní a stacionární fází [21]. Mobilní fází je kapalina (nejčastěji směs rozpouštědel), jejíž volba závisí na použité stacionární fází [19].

V kapalinové chromatografii se využívají výhradně náplňové kolony [19]. Vysoké účinnosti separace je dosaženo v důsledku použití chromatografických kolon plněných stacionární fází o velmi malé a přesně definované zrnitosti. Tato stacionární fáze se vyznačuje vysokou hustotou a homogenitou, tedy i velkým odporem vůči mobilní fází [21]. Velký průtok mobilní fáze přes velmi malé částice stacionární fáze v chromatografické koloně vytváří vysoký tlak (řádově jednotky až desítky MPa) [20,21].

O průběhu separace rozhodují vzájemné interakce stacionární fáze se separovanými látkami a také typ použité mobilní fáze [19]. Na základě těchto interakcí je možné rozlišit následující separační mechanismy: adsorpční, rozdělovací, iontově výměnné, specifické nebo mechanismus molekulového síta [19,21].

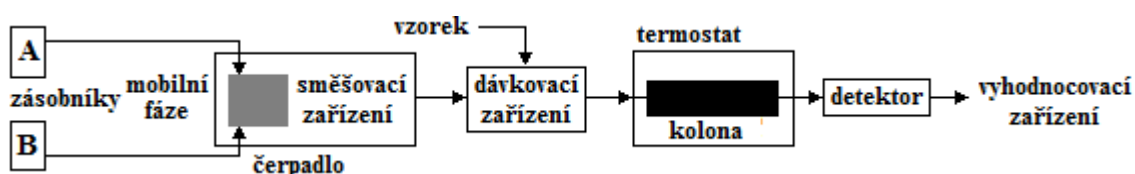
Během separace přechází molekula analytu mnohokrát z mobilní fáze do stacionární fáze a zpět, čímž dochází k porušování fázové rovnováhy a okamžitému ustavení jiné rovnováhy. Doba zdržení analytu v koloně závisí na počtu a velikost interakcí, přičemž s rostoucí velikostí interakcí se stacionární fází roste hodnota retenčního času analytu. Výše zmíněnou rovnováhu lze popsat pomocí distribuční konstanty K_D [22].

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

Distribuční konstanta vyjadřuje poměr koncentrace analytu A ve stacionární fázi ($[A]_s$) a koncentrace analytu A v mobilní fázi ($[A]_m$). Z uvedeného vztahu plyne, že čím větší je hodnota distribuční konstanty, tím více je analyt vázán na stacionární fázi a v důsledku toho dochází k delšímu zadržování v koloně [22].

Chromatogram je grafický záznam odezvy detektoru na retenčním čase, který poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o separovaných sloučeninách. Kvalitativní vyhodnocení probíhá na základě určení retenčních časů daných analytů a případně i dalších charakteristik (absorpční spektrum, hmotnostní spektrum aj.). Pro kvantitativní vyhodnocení se nejčastěji využívá plocha píku analytu, popř. jeho výška [19,23].

Na Obr. 3 jsou znázorněny základní části kapalinového chromatografu: zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, směšovací zařízení, dávkovací zařízení, kolona (popř. i předkolonka), termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení.



Obr. 3: Schéma kapalinového chromatografu.

Čerpadlo mobilní fáze je zařízení, které čerpá mobilní fázi ze zásobníků. Běžné čerpadlo disponuje nejčastěji průtokem v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s minimálním kolísáním průtoku. Materiál čerpadla nesmí nijak interagovat s mobilní fází nebo ji kontaminovat [19].

Směšovací zařízení je ve většině případů ovládáno automaticky a slouží k nastavení složení mobilní fáze přiváděné čerpadlem ze zásobníků. Složení mobilní fáze může být v průběhu analýzy stálé (izokratická eluce) nebo v případě analýz složitých směsí se může během separace plynule měnit (gradientová eluce) [20].

Dávkovací zařízení je nejčastěji tvořeno automaticky ovládanou mikrostříkačkou napojenou na šesticečný ventil s dávkovací smyčkou přesně definovaného objemu sloužící k nadávkování vzorku do proudu mobilní fáze přicházející ze směšovacího zařízení do kolony, kde dochází k separaci. Většina dnešních moderních přístrojů je již vybavena zařízením pro automatické dávkování vzorku (autosampler) [19,21].

Chromatografická kolona je část, kde dochází k separaci složek vzorku. Základním požadavkem je odolnost vůči vysokému tlaku mobilní fáze, proto jsou kolony nejčastěji vyráběny z nerezové oceli či tlustostěnného skla. Existují však i kolony vyrobené z plastu [21]. Kolony jsou plněny stacionární fází o velikosti 3 až 10 μm [19]. Nejčastější stacionární fází je oxid křemičitý (silikagel), jež bývá často chemicky modifikován vázáním různých funkčních skupin určujících její výslednou polaritu [21]. Délka kolon se nejčastěji pohybuje od 10 do 25 cm s vnitřním průměrem od 2 do 5 mm [19,21]. Velice často se také využívají předkolony, které chrání chromatografické kolony před nečistotami a nerozpustnými částicemi. Výhodou předklonek je jejich výrazně nižší cena oproti drahým separačním kolonám [22].

Termostat je dnes téměř běžnou součástí kapalinových chromatografů. Jeho úkolem je udržovat teplotu kolony konstantní, neboť teplota separace ovlivňuje retenční časy analytů. V případě použití zvýšené teploty dochází k poklesu hodnot distribučních konstant a zvýšení hodnot difuzních koeficientů (resp. snížením viskozity mobilní fáze). Dále dochází i ke vždy žádanému snížení tlakového spádu na chromatografické koloně [19,21].

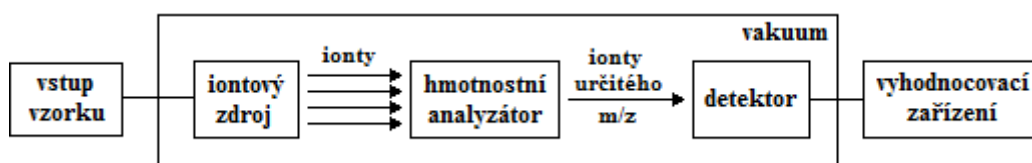
Detektor je poslední částí kapalinového chromatografu, do níž vstupuje mobilní fáze s analyty z chromatografické kolony. Na základě změny fyzikální či fyzikálně-chemické veličiny poskytuje informace o přítomnosti a množství separovaných složek [19]. Výsledkem je záznam závislosti odezvy signálu detektoru na čase, tzv. chromatogram, který slouží k vyhodnocení kvalitativních a kvantitativních údajů týkajících se analytů ve vzorku [23]. Kvalitní detektor by měl disponovat vysokou citlivostí, rychlou odezvou, zároveň by měl být univerzální, ale na druhou stranu i co nejvíce selektivní, měl by vykazovat dobrou stabilitu signálu a disponovat širokým dynamickým lineárním rozsahem [19].

Mezi běžně používané detektory patří fotometrický detektor, který umožňuje sledovat absorpenci složek eluovaných z kolony. Detektor diodového pole umožňuje snímat záznam celého spektra ve zvolené oblasti vlnových délek. Pro látky vykazující fluorescenci se využívá fluorimetrický detektor založený na měření fluorescenčního záření ve směru kolmém na paprsek budícího záření. Jedním z nejuniverzálnějších a nejselektivnějších detektorů v kapalinové chromatografii je hmotnostní detektor umožňující detekci jednotlivých analytů vycházejících z kolony na základě jejich poměru hmotnosti a náboje [21].

2.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Pro stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu se často využívá spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Hmotnostní spektrometrie je separační analytická metoda založená na převodu molekul na ionty, jejichž rozlišení probíhá na základě poměru jejich hmotnosti a náboje m/z . Výsledkem je záznam relativních intenzit těchto vzniklých iontů – hmotnostní spektrum [22,24]. Základními kroky této techniky jsou: odpaření vzorku, ionizace, urychlení iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů a detekce iontů [19].

Na Obr. 4 jsou znázorněny základní části hmotnostního spektrometru: vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor, vakuum a vyhodnocovací zařízení.



Obr. 4: Schéma hmotnostního spektrometru.

Celý proces začíná přivedením molekul analytu do *iontového zdroje*, kde jsou molekuly ionizovány (vzniklé částice nesou náboj). Konstrukce se liší podle používané ionizační techniky. Nejčastěji používanou ionizační technikou ve spojení LC-MS jsou API techniky (ionizace za atmosférického tlaku). Nejvýznamnější a nejvíce používanou API technikou vhodnou také pro vysoce polární látky jako BMAA je elektrosprejová ionizační technika (ESI). Principem této ionizační techniky je zmlžení analytu rozpuštěného ve vhodné mobilní fázi, který je přiveden kovovou kapilárou, na níž je vloženo vysoké napětí (3 až 5 kV), na velmi malé kapičky (aerosol) pomocí zmlžujícího plynu. Postupným odpařováním rozpouštědla se zvyšuje hustota povrchového náboje. Při překročení její kritické hodnoty dojde k rozpadu kapiček (Coulombická exploze) na ještě menší kapičky a k rozdělení původních nábojů. Tento proces se několikrát opakuje až do vzniku molekulárního iontu analytu [24].

Vzniklé částice jsou z iontového zdroje urychleny napětím 3 až 10 kV přes transferovou trubici do *hmotnostního analyzátoru*, kde dochází k rozdělení částic podle poměru jejich hmotnosti a náboje m/z [24]. K rozdělení dochází na základě různých fyzikálních principů, jež se liší dle typu použitého hmotnostního analyzátoru. Mezi běžně používané analyzátoři v LC-MS patří kvadrupólový analyzátor, iontová past (oba analyzátoři jsou založeny na rozdělení iontů na základě různé stability oscilací těchto

iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí), průletový analyzátor (rozdělení iontů na základě různé doby letu) nebo orbitrap (rozdělení iontů na základě různé frekvence harmonických oscilací) [19,24]:

Na *detektor*, který slouží k zaznamenávání dopadajícího proudu iontů a jeho převádění na proud elektronů, tedy dopadají pouze ionty s jedinou hodnotou poměru m/z [19,24]. Mezi nejběžněji používané detektory v hmotnostní spektrometrii patří elektronové násobiče obsahující elektrody, na něž dopadají elektrony vyrážející z elektrody další elektrony. Signál se postupnými nárazy elektronů zvětšuje. Zesílený proud elektronů (až $10^8 \times$) je následně vyhodnocován. Vzhledem k poměrně nízké životnosti tohoto detektoru (cca 1 rok) se využívají spíše detektory s konverzní dynodou a fotonásobičem (životnost asi 5 let), jehož principem je měnit v konverzní dynodě náraz iontu na vyražený elektron, který následně dopadá na fosforescenční stínítko. Dojde k vyražení fotonu, jež je zachycen násobičem [19]

Při analýze jsou získány dva druhy záznamů: chromatogram (viz Kap. 2.3.1) a hmotnostní spektrum [24]. *Hmotnostní spektrum* vyjadřuje závislost relativní intenzity iontového proudu (četnosti jednotlivých iontů) na poměru hmotnosti a náboje m/z [19,22]. Intenzita je vždy vztahována k iontu s nejvyšší hodnotou iontového proudu, který vytváří základní pík o intenzitě 100 % [19,24]. Molekulární pík poskytuje informaci o molekulové hmotnosti analytu a odpovídá nejvyššímu poměru m/z (bez izotopických píků). Hmotnostní spektrum tedy podává důležité informace o struktuře daného analytu, na jejichž základě lze určit strukturu látky a její molekulovou hmotnost [22].

Výhodou techniky LC-MS je spojení účinné separační techniky kapalinové chromatografie s velmi citlivou a vysoce selektivní detekční metodou hmotnostní spektrometrie. Tyto výhody umožňují použití této techniky pro stopovou analýzu organických sloučenin v komplexních přírodních vzorcích s problematickou maticí a určování struktury neznámých sloučenin.

2.4 Možnosti stanovení β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě

Stanovením neurotoxinu BMAA ve vodě se zabývalo poměrně málo studií, neboť většina zájmu je orientována na stanovení této látky v sinicích a jiných planktonních organismech tuto látku produkujících. Následující tabulky (Tab. 1 a Tab. 2) shrnují dvě různé analytické techniky, jež využívaly derivatizovaný a/nebo nederivatizovaný vzorek BMAA, s uvedenými detekčními limity, jichž bylo dosaženo ve vybraných pracích. V Tab. 2 jsou dále uvedeny hodnoty správnosti (vyjádřené jako výtěžnost) a přesnosti (vyjádřené jako opakovatelnost). V experimentální části budou hodnoty porovnány s výsledky mé práce.

Tab. 1: Přehled detekčních limitů BMAA pro různé analytické techniky.

Analytická technika	Derivatizace analytu	Extrakční technika (typ kolony)	Mez detekce [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Objem k extrakci [ml]	Citace
LC-MS/MS (QqQ)	neprovedena	SPE (Oasis MCX 3cc, 60 mg)	1	50	[25]
LC-FD	AQC	nebyla využita	2	-----	[26]
LC-MS/MS (QqQ)	AQC		1		
LC-MS/MS (QqQ)	neprovedena		2,5		
LC-FD	AQC	SPE (Oasis MCX 6cc, 150 mg)	5	100	[27]
LC-MS/MS (IT)	AQC		0,8		
LC-FD	AQC	SPE (Oasis MCX 6cc, 150 mg)	5	500	[28]
LC-MS/MS (IT)	neprovedena		0,5		

Nejnižších detekčních limitů bylo dosaženo v práci [28], kde bylo využito techniky LC-MS/MS (analyt nebyl derivatizován) v kombinaci s SPE extrakcí. Na druhé straně nejvyšší hodnoty meze detekce při využití techniky LC-MS/MS jako v práci [28], bylo dosaženo v práci [26] (rozdílem byl typ použitého hmotnostního analyzátoru: v práci [28] využita iontová past, zatímco v práci [26] využit trojitý kvadrupól). V práci [26] navíc nebylo využito SPE extrakce. V práci [25], resp. [26], kde bylo využito techniky LC-MS/MS s trojitým kvadrupólem, bylo dosaženo 2x vyšší meze detekce ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$), resp. 5x vyšší ($2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$) oproti práci [28] ($0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$), kde bylo využito prakticky stejné analytické techniky lišící se pouze v typu hmotnostního analyzátoru (iontová past). U prací [26] a [27], jež využily techniku LC-MS/MS (rozdíl opět v typu hmotnostního analyzátoru) a derivatizaci analytu, bylo dosaženo srovnatelných hodnot mezí detekcí (práce [26]: $1 \mu\text{g.l}^{-1}$, práce [27]: $0,8 \mu\text{g.l}^{-1}$), ačkoli v práci [26] nebylo využito SPE extrakční techniky. Stejných hodnot mezí detekcí ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$) bylo dosaženo u prací [27] a [28], kde bylo využito techniky LC-FD v kombinaci s SPE extrakcí. Z obecného porovnání technik uvedených v Tab. 1 je také patrné, že v případě použití kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí bylo dosaženo nižších mezí detekcí než při použití kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Zároveň je také zřejmé, že v případě použití iontové pasti jako hmotnostního analyzátoru bylo v uvedených pracích dosaženo nižších mezí detekcí než v případě použití trojitého kvadrupólu, což je poměrně překvapivé. Několik studií se také v nedávné době zabývalo stanovením BMAA za použití techniky plynové chromatografie s hmotností detekci (GC-MS) nebo kapilární elektroforézy (CE). Nicméně tyto studie se zabývaly pouze stanovením BMAA ve vzorcích sinic. Mimo to bylo také

prokázáno, že tyto dvě metody neposkytují tak nízké hodnoty meze detekce jako metody uvedené v Tab. 1.

Tab. 2: Přehled správností (výtěžností) a přesností (opakovatelností) u jednotlivých prací.

Koncentrační úroveň BMAA [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Správnost (výtěžnost) [%]	Přesnost (opakovatelnost) [%]	Citace
13,5	99,3 – 102,2	6,9 – 11,7	[25]
6,5	99,6 – 103,4	5,8 – 8,2	
2,0	98,5 – 103,9	7,7 – 7,8	
1,0	88,7	20,6	
1000	netestováno	2,8 ^a	[26]
		3,0 ^b	
		0,7 ^c	
10	neuveďeno	neuveďeno	[27]
neuveďeno	neuveďeno	neuveďeno	[28]

^ahodnota pro LC-FD (AQC), ^bhodnota pro LC-MS/MS(ACQ), ^chodnota pro LC-MS/MS

V publikaci [25] bylo dosaženo pro rozmezí koncentrací 2,0 – 13,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ velmi podobných hodnot správností (98,5 – 103,9 %). Přesnost se již v tomto rozsahu koncentrací mírně lišila (5,8 – 11,7 %). Pro koncentrační úroveň 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo v porovnání s výše uvedeným rozmezím koncentrací dosaženo nižší hodnoty přesnosti (88,7 %) a zároveň vyšší hodnoty správnosti (20,6 %). Místo koncentrační úrovně 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ byla původně zvolena hodnota 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, která byla vzhledem k nepřijatelné hodnotě výtěžnosti (145,4 %) nahrazena hodnotou 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ při níž již bylo dosaženo přijatelné hodnoty. V práci [26] bylo pro přibližně 70x vyšší koncentraci než v práci [25] dosaženo řádově až 17x nižší hodnoty přesnosti. Vzhledem k tomu, že v práci [26] nebyla testována správnost, nebylo možné porovnat hodnoty správnosti s hodnotami získanými v práci [26]. Dále absence údajů správnosti a přesnosti v pracích [27] a [28] neumožnila porovnat výsledky.

Separace a kvantifikace stopových koncentrací BMAA je vzhledem ke komplexnosti přírodních vzorků poměrně komplikovaná, neboť může docházet k eluci i jiných strukturně podobných sloučenin jako je například DAB (2,4-diaminomásečná kyselina) nebo AEG (N-(2-aminoethyl)glycin). V důsledku tohoto, bylo doporučeno použít pro identifikaci a kvantifikaci BMAA specifické techniky jako je LC-MS/MS za účelem minimalizace poskytování falešně pozitivních výsledků, které mohou být poskytovány při využití techniky LC-FD.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie a činidla

- Standard: β -N-methylamino-L-alanin hydrochlorid - čistota ≥ 97 % (Sigma-Aldrich)
- Vnitřní standard: DL-2,4-diaminomásečná-3,3,4,4-d₄ kyselina dihydrochlorid - čistota ≈ 98 % (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril – čistota pro LC-MS: $\geq 99,9$ % (Fluca Analytical a Merck)
- Kyselina mravenčí – čistota pro LC-MS: ≈ 98 % (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný – čistota p.a.: $\geq 99,5$ % (Sigma-Aldrich)
- Helium – čistota 99,99 % obj. (Linde)
- Dusík generovaný systémem Genius 1022 – čistota $\geq 99,5$ % (Peak Scientific)
- Deionizovaná voda generovaná přístrojem Water purification system (Thermo)

3.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo)
- Chromatografická kolona: ZIC[®]-HILIC; délka: 150 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; velikost částic: 3,5 μ m (Merck)
- Chromatografická předkolona: ZIC[®]-HILIC; délka: 20 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; velikost částic: 5,0 μ m (Merck)
- Hmotnostní spektrometr VelosPro vybavený vyhřívaným elektrosprejem (Thermo)
- Výrobník deionizované vody Water purification system Smart2Pure (Thermo)
- Generátor dusíku Genius 1022 (Peak Scientific)
- Analytické váhy: R200D (Santorius Research)
- Analytické váhy: BBI-31 (BOECO)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette^{PLUS} o objemu 100 – 1000 μ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette^{PLUS} o objemu 10 – 100 μ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta Transferpette[®]S o objemu 1 – 10 ml (Brand)
- Filtr 42213NP Titan3: teflonový; průměr: 17 mm; velikost částic: 0,2 μ m (Thermo)
- Odměrné baňky o objemu 10, 25, 50, 100 a 250 ml, třída přesnosti A (Fisherbrand)
- Kádinky o objemu 10, 25, 50 a 100 ml (Fisherbrand)
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 μ l (Hamilton)
- Spotřební materiál: injekční stříkačky (2 ml), špičky, ependorfky, vialky, zkumavky
- Ovládání systému LC-MS a vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programů Chromeleon, Tune plus, Xcalibur a DC MS Link. Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel 2007 a EffiValidation 3.0.

3.3 Příprava roztoků standardů

3.3.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok standardu (ST-A) byl připraven navážením 2,05 mg standardu do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Zásobní roztok vnitřního standardu (VS-A) byl připraven navážením 2,09 mg vnitřního standardu do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Shrnutí přípravy zásobních roztoků standardů a jejich příslušné koncentrace jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Shrnutí přípravy zásobních roztoků a jejich koncentrací.

Označení	Navážka [mg]	Objem [ml]	Koncentrace [mg.l^{-1}]*
ST-A	2,05	50	30,4
VS-A	2,09	50	25,7

*uvedená koncentrace platí pro čistý analyt

Připravené zásobní roztoky byly rozděleny každý do 1 plastové zkumavky (15 ml), 11 skleněných vialek (1,8 ml) a 7 plastových ependorfek (1,5 ml), jež byly následně uloženy do chladničky a mrazicích boxů po dobu nejdéle 6 měsíců. Rozložení příslušných zásobních roztoků do chladicích zařízení je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4: Rozložení uložení zásobních roztoků v chladicích zařízeních.

Zásobní roztok	Chladnička (teplota: +5 °C)	Mrazicí box (teplota: -20 °C)	Mrazicí box (teplota: -75 °C)
ST-A	3 vialky	4 vialky 3 ependorfky	4 vialky 4 ependorfky 1 plastová zkumavka
VS-A	3 vialky	4 vialky 3 ependorfky	4 vialky 4 ependorfky 1 plastová zkumavka

3.3.2 Příprava pracovních roztoků pro účely optimalizace

Směsný pracovní roztok (PR_{mix}) o koncentraci standardu a vnitřního standardu 1 mg.l^{-1} pro identifikaci píku obou látek a pro účely optimalizace byl připraven pipetováním $33 \mu\text{l}$ zásobního roztoku ST-A a $39 \mu\text{l}$ zásobního roztoku VS-A automatickou pipetou ($10 - 100 \mu\text{l}$) a pipetováním $928 \mu\text{l}$ mobilní fázi voda-acetonitril v poměru 35/65 (v/v) automatickou pipetou ($100 - 1000 \mu\text{l}$) do vialky.

3.3.3 Příprava pracovních roztoků pro účely kalibrace

Pracovní roztok standardu (ST-B) o koncentraci $200 \mu\text{g.l}^{-1}$ byl připraven pipetováním $66 \mu\text{l}$ zásobního roztoku ST-A automatickou pipetou ($10 - 100 \mu\text{l}$) do 10 ml odměrné baňky a doplněním mobilní fáze voda-acetonitril v poměru $40/60$ (v/v) po rysku.

Pracovní roztok standardu (ST-C) o koncentraci $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ byl připraven pipetováním $1000 \mu\text{l}$ pracovního roztoku ST-B automatickou pipetou ($100 - 1000 \mu\text{l}$) do 10 ml odměrné baňky a doplněním mobilní fáze voda-acetonitril v poměru $40/60$ (v/v) po rysku.

Pracovní roztok vnitřního standardu (VS-B) o koncentraci $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$ byl připraven pipetováním $975 \mu\text{l}$ zásobního roztoku VS-A automatickou pipetou ($100 - 1000 \mu\text{l}$) do 25 ml odměrné baňky a doplněním mobilní fáze voda-acetonitril v poměru $40/60$ (v/v) po rysku.

Veškeré pracovní roztoky byly zpracovány během jednoho týdne (příprava kalibračních roztoků a vzorků) a nebyly dále uchovávány. Pro každý den, kdy probíhaly analýzy, byly připraveny vždy čerstvé pracovní roztoky z roztoků zásobních.

3.3.4 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky, jejichž příprava je shrnuta v Tab. 6, byly připraveny do vialek o objemu $1,8 \text{ ml}$. Analýza kalibračních roztoků byla provedena v den jejich přípravy. Celkem bylo připraveno 13 koncentračních úrovní, každá ve třech nezávislých opakováních.

Mobilní fáze (MF) byla dávkována automatickou pipetou ($100 - 1000 \mu\text{l}$) s plastovou špičkou. Pracovní roztoky standardu (ST-B a ST-C) byly dávkovány stříkačkou Hamilton ($5, 10, 25, 50, 100, 250$ a $500 \mu\text{l}$). Pracovní roztok vnitřního standardu (VS-B) byl dávkován stříkačkou Hamilton ($100 \mu\text{l}$).

Za účelem kontroly čistoty přístroje, roztoku mobilní fáze, standardu a vnitřního standardu, vzhledem k možné kontaminaci těchto roztoků v průběhu přípravy roztoků k analýze, byly připraveny 3 kontrolní roztoky do vialek o objemu $1,8 \text{ ml}$. Jejich příprava je shrnuta v Tab. 5.

Tab. 5: Příprava vzorků pro kontrolu čistoty.

Označení roztoku	Koncentrace ST [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Koncentrace VS [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Objem ST-B [μl]	Objem VS-B [μl]	Objem MF [μl]	Objem celkový [μl]
MF	0	0	0	0	1000	1000
ST	20	0	100	0	900	1000
VS	0	100	0	100	900	1000

Tab. 6: Příprava kalibračních roztoků.

Úroveň	Označení roztoku	Konc. ST [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Konc. VS [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Objem ST-B [μl]	Objem VS-B [μl]	Objem MF [μl]	Objem celkový [μl]
K1	K1 - a	0,10	100	0,50	100	899,5	1000
	K1 - b						
	K1 - c						
K2	K2 - a	0,20	100	1,00	100	899,0	1000
	K2 - b						
	K2 - c						
K3	K3 - a	0,50	100	2,50	100	897,5	1000
	K3 - b						
	K3 - c						
K4	K4 - a	0,75	100	3,75	100	896,3	1000
	K4 - b						
	K4 - c						
K5	K5 - a	1,0	100	5,00	100	895,0	1000
	K5 - b						
	K5 - c						
K6	K6 - a	2,0	100	10,0	100	890,0	1000
	K6 - b						
	K6 - c						
K7	K7 - a	5,0	100	25,0	100	875,0	1000
	K7 - b						
	K7 - c						
K8	K8 - a	7,5	100	37,5	100	862,5	1000
	K8 - b						
	K8 - c						
K9	K9 - a	10	100	50,0	100	850,0	1000
	K9 - b						
	K9 - c						
K10	K10 - a	20	100	100	100	800,0	1000
	K10 - b						
	K10 - c						
K11	K11 - a	50	100	250	100	650,0	1000
	K11 - b						
	K11 - c						
K12	K12 - a	75	100	375	100	525,0	1000
	K12 - b						
	K12 - c						
K13	K13 - a	100	100	500	100	400,0	1000
	K13 - b						
	K13 - c						

3.4 Příprava reálných vzorků

3.4.1 Příprava spikovaných vzorků

Spikované vzorky byly připraveny pro koncentrační úrovně $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ odpovídající kalibrační křivce na nejnižších koncentracích (viz kapitola 4.3.1). Příprava byla provedena tak, aby bylo dosaženo stejného složení vzorku jako použité mobilní fáze voda-acetonitril (40/60, v/v) za účelem minimalizace ovlivnění změny retenčních časů analyzovaných látek vlivem vysokého objemu nástříku. Roztoky byly připraveny do kádinky o objemu 25 ml a jejich příprava je uvedena v Tab. 7 (pro $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$) a v Tab. 8 (pro $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$). Každý spikovaný vzorek byl dokonale promíchán a následně nasát do injekční stříkačky, na jejíž konec byl nasazen filtr Titan3 42213NP. Prvních cca 4000 μl filtrátu bylo odpuštěno do odpadu a zbylých cca 1000 μl bylo nadávkováno do vialky o objemu 1,8 ml a uzavřeno. Slepý vzorek byl připraven dle Tab. 7, avšak místo 1000 μl vzorku bylo pipetováno stejné množství mobilní fáze voda-acetonitril v poměru 40/60 (v/v).

Tab. 7: Příprava spikovaných vzorků povrchové vody - úroveň $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Roztok	Objem [μl]	Složení roztoku		Koncentrace BMAA	
		Voda	Acetonitril	V roztoku	Ve vzorku
		[μl]	[μl]	[$\mu\text{g.l}^{-1}$]	[$\mu\text{g.l}^{-1}$]
Deionizovaná voda	790	790	0	-----	-----
Vzorek	1000	1000	0	-----	-----
Pracovní roztok ST-C	25	10	15	0,10	0,50
Pracovní roztok VS-B	500	200	300	100	-----
Acetonitril (doplnění)	2685	0	2685	-----	-----
Celkový objem	5000	2000	3000	-----	-----

Tab. 8: Příprava spikovaných vzorků povrchové vody - úroveň $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Roztok	Objem [μl]	Složení roztoku		Koncentrace BMAA	
		Voda	Acetonitril	V roztoku	Ve vzorku
		[μl]	[μl]	[$\mu\text{g.l}^{-1}$]	[$\mu\text{g.l}^{-1}$]
Deionizovaná voda	700	700	0	-----	-----
Vzorek	1000	1000	0	-----	-----
Pracovní roztok ST-C	250	100	150	1,00	5,00
Pracovní roztok VS-B	500	200	300	100	-----
Acetonitril (doplnění)	2550	0	2550	-----	-----
Celkový objem	5000	2000	3000	-----	-----

3.4.2 Příprava reálných vzorků

Reálné vzorky byly připraveny dle Tab. 7 (resp. Tab. 8), kde však byla místo pracovního roztoku ST-C pipetována mobilní fáze voda-acetonitril v poměru 40/60 (v/v).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace chromatografické separace

4.1.1 Testovací analýza

Za účelem identifikace sloučenin byla provedena testovací analýza směšného roztoku standardu a vnitřního standardu. Pro tento účel byl použit směsný pracovní roztok standardu a vnitřního standardu v mobilní fázi voda-acetonitril 35/65 (v/v) o koncentraci obou analytů 1 mg.l⁻¹. Píky byly identifikovány a byly jim přiřazeny hodnoty retenčních časů. Výchozí podmínky separace převzaté z publikace [25] jsou shrnuty v následujícím přehledu.

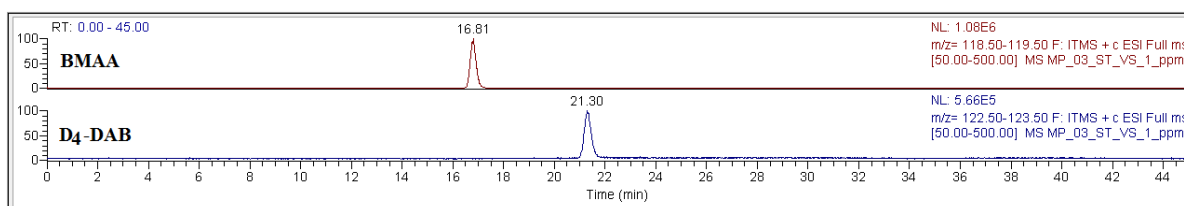
Výchozí podmínky chromatografické separace:

- Chromatografická kolona: ZIC[®]-HILIC
materiál: PEEK; délka: 150 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; velikost částic: 3,5 μm
- Chromatografická předkolonka: ZIC[®]-HILIC
materiál: PEEK; délka: 20 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; velikost částic: 5,0 μm
- Objem nástřiku: 5 μl
- Teplota kolony: 30 °C
- Průtok mobilní fáze: 0,2 ml.min⁻¹ (konstantní)
- Mobilní fáze: MF-A: deionizovaná voda + 0,1 % kyseliny mravenčí
MF-B: acetonitril + 0,1 % kyseliny mravenčí
- Gradient mobilní fáze (trvajících 45 minut) je popsán v Tab. 9.

Tab. 9: Výchozí gradient chromatografické separace.

Retenční čas [min]	0 – 25	25 – 27	27 – 30	30 – 45
MF-B [%]	65 → 55	55 → 55	55 → 65	65 → 65

Na Obr. 5 je zobrazen chromatogram testovací analýzy směšného roztoku standardu a vnitřního standardu, který posloužil k identifikaci obou analytů a přiřazení retenčních časů.



Obr. 5: Chromatogram - testovací analýza.

Vzhledem k příliš dlouhé době analýzy (45 minut) a velké hodnotě rozlišení ($R_{ST,VS} = 4,61$; výpočet viz následující kapitola) byla provedena základní optimalizace chromatografické separace. Účelem této optimalizace bylo zkrátit dobu analýzy a využít místo gradientové eluce izokratickou eluci (pokud to chromatografická separace dovoluje). Optimalizovány byly tyto parametry: složení mobilní fáze, průtok mobilní fáze a objem nástřiku. Po provedené optimalizaci chromatografické separace byla také provedena optimalizace hmotnostní detekce.

4.1.2 Optimalizace složení a průtoku mobilní fáze

Cílem této optimalizace bylo zvolit takové složení a průtok mobilní fáze, které umožní dostatečné rozdělení separovaných analytů v co nejpříjemnějším čase.

Míra kvality separace byla posuzována objektivně na základě hodnot rozlišení $R_{ST,VS}$ (viz vztah uvedený níže). Za dostatečnou se považuje taková hodnota rozlišení, která se pohybuje v rozmezí 1,5 – 2,0 (optimálně 2,0). V tomto rozmezí hodnot jsou píky od sebe dostatečně separovány. Hodnoty menší jak 1,5 (překrytí píků $\geq 0,3$ %) poukazují na nedokonalou separaci analytů, naopak při hodnotách vyšších jak 2,0 (píky rozseparované až na základní linii) dochází ke zbytečnému prodlužování doby analýzy.

$$R_{ST,VS} = 2 \frac{t_{VS} - t_{ST}}{w_{ST} + w_{VS}}$$

Legenda: $R_{ST,VS}$ je rozlišení, t_{VS} a t_{ST} je retenční čas vnitřního standardu a standardu, w_{ST} a w_{VS} je šířka píku standardu a vnitřního standardu na úrovni základní linie.

Kvalita separace byla dále hodnocena i podle symetrie píku (pík by měl mít v ideálním případě tvar Gaussovy křivky). Míra symetrie píku se hodnotí na základě faktoru asymetrie A_F (viz vztah uvedený níže), jehož hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 0,8 – 1,5. Hodnota asymetrie píku 1,0 značí dokonalou symetrii. Kritéria pro rozlišení a faktor asymetrie byla zvolena na základě publikací [29] a [30].

$$A_F = \frac{w_{0,05}}{2(t_R - t_{R1})}$$

Legenda: A_F je faktor asymetrie, $w_{0,05}$ je šířka píku v 5 % výšky, t_R je retenční čas analytu a t_{R1} je retenční čas analytu levé části píku v 5 % jeho výšky.

Průtok mobilní fáze byl testován při hodnotách 0,2 a 0,4 ml.min⁻¹ pro složení mobilní fáze voda-acetonitril v poměrech 50/50 a 40/60 (v/v) s přidavkem 100 µl kyseliny mravenčí na 100 ml mobilní fáze. Parametry hmotnostní detekce byly zvoleny na základě předběžné optimalizace. Jejich hodnoty jsou následující: teplota kapiláry 300 °C, teplota transferové trubice 250 °C, poměr průtoků plynů S/A 35/10 Arb., napětí na kapiláře 3 kV, potenciál na F-čočkách - 8,5 V, potenciál na S-čočkách 65 V. Provedeny byly dva full MS/MS skeny v rozmezí 50 až 150 m/z – pro BMAA (hodnota m/z iontu prekurzoru = 119) a pro D₄-DAB (hodnota m/z iontu prekurzoru = 123). Oba skeny byly provedeny pro normalizovanou kolizní energii 22 %. Výsledky optimalizace jsou uvedeny v Tab. 10. Primární data k Tab. 10 jsou uvedena v Příloze A.

Tab. 10: Výsledky optimalizace složení a průtoku mobilní fáze.

Složení mobilní fáze	voda (0,1 % HCOOH)/acetonitril (0,1 % HCOOH) [v/v]			
	50/50		40/60	
Průtok [ml.min ⁻¹]	0,2	0,4	0,2	0,4
Doba analýzy [min]	9,5	5,5	18	9
R _{ST,VS} [1]	4,9	2,4	7,2	6,8
A _F [1]	BMAA	1,3	1,9	1,1
	D ₄ -DAB	1,2	1,5	1,1

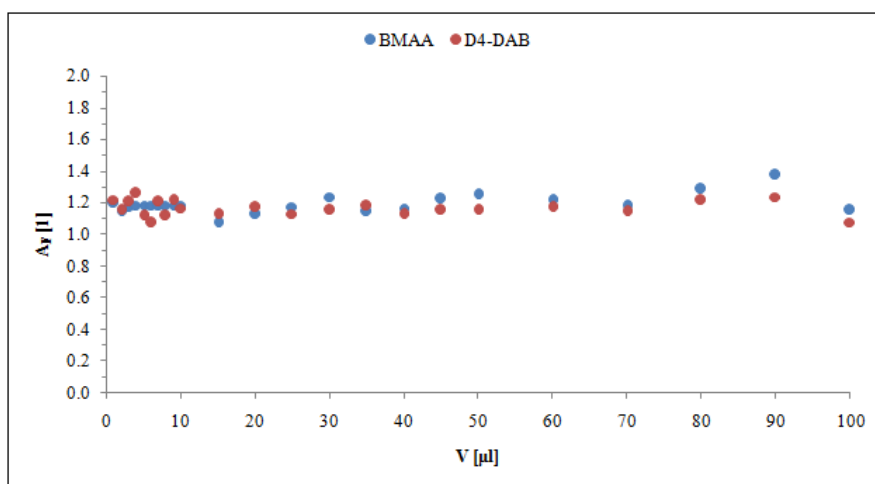
Na základě hodnot v Tab. 10 bylo zjištěno, že při obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na úrovni 50 % (v/v) dochází v případě průtoku 0,4 ml.min⁻¹ k výraznému chvostování pík obou sloučenin, což je indikováno nepříjemně vysokou hodnotou faktoru asymetrie píku. Při obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na úrovni 50 % (v/v) a průtoku 0,2 ml.min⁻¹ bylo sice dosaženo všech kritérií přijatelnosti, ale v porovnání s variantou obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na úrovni 60 % (v/v) a průtoku 0,4 ml.min⁻¹ bylo dosaženo horšího rozlišení, horšího faktoru asymetrie píku a zároveň i delší doby analýzy. Při obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na úrovni 60 % (v/v) bylo dosaženo přijatelných hodnot faktoru asymetrie pro obě sloučeniny. Vzhledem k přijatelným hodnotám rozlišení i faktorů asymetrie pro oba testované průtoky mobilní fáze (0,2 ml.min⁻¹ a 0,4 ml.min⁻¹) byl zvolen průtok 0,4 ml.min⁻¹, což umožnilo výrazné zkrácení doby analýzy. Hodnota rozlišení obou sloučenin 6,8 je sice výrazně vyšší než minimální požadovaná hodnota 2,0, což by umožňovalo provést další optimalizaci obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na úrovni 50 – 60 % (v/v), ale vzhledem k požadavku na robustnost metody (dostatečná separační účinnost a bezproblémová příprava mobilní fáze) nebyl tento parametr dále optimalizován. Obsah organického rozpouštědla v mobilní fázi na úrovni 60 % (v/v) je také dle doporučení výrobce použité chromatografické

kolony uváděn jako minimální doporučená hodnota. Pro následující kroky optimalizace bylo tedy zvoleno složení mobilní fáze voda-acetonitril okyselené 0,1 % kyseliny mravenčí v poměru 40/60 (v/v) a průtok 0,4 ml.min⁻¹.

4.1.3 Optimalizace objemu nástřiku

Pro účely optimalizace objemu nástřiku byl použit kalibrační roztok o koncentraci standardu a vnitřního standardu 100 µg.l⁻¹, jež byl následně testován v celém rozsahu autosampleru vybaveného stříkačkou Hamilton (1 až 100 µl).

Cílem optimalizace bylo dosáhnout co možná nejvyššího objemu nástřiku za účelem získání co nejnižších instrumentálních mezí detekce při současném dodržení dostatečné symetrie píku. Jako hodnotící kritérium byl použit faktor asymetrie (A_F). Primární data pro výpočet faktoru asymetrie jsou uvedena v Příloze B. Následující obrázek shrnuje výsledky optimalizace objemu nástřiku.



Obr. 6: Závislost faktoru asymetrie pro BMAA a D₄-DAB na objemu nástřiku.

Bylo zjištěno, že při objemu nástřiku v celém rozsahu autosampleru (0 až 100 µl) se faktor asymetrie pohyboval pro BMAA v rozmezí 1,07 – 1,38 a pro D₄-DAB v rozmezí 1,07 – 1,26. V porovnání získaných hodnot s kritériem převzatým z publikace [27] (hodnota faktoru asymetrie v rozmezí 0,8 – 1,5) bylo dosaženo přijatelných hodnot při všech testovaných objemech nástřiku.

Aby byly splněny příslušné požadavky (faktor asymetrie v rozmezí 0,8 – 1,5), bylo dosaženo co nejnižších mezí detekce a zároveň byla zajištěna přiměřená robustnost metody, byl pro další analýzy zvolen objem nástřiku 90 µl. Vysoký objem nástřiku byl také zvolen na základě nemožného provedení prekoncentrace vzorků povrchových vod na SPE kolonkách z důvodu omezeného množství objemu těchto vzorků k analýze (cca 1 ml).

4.2 Optimalizace hmotnostní detekce

Pro účely optimalizace hmotnostní detekce byl použit směsný pracovní roztok (PR_{mix}) standardu a vnitřního standardu o koncentraci obou analytů 1 mg.l^{-1} .

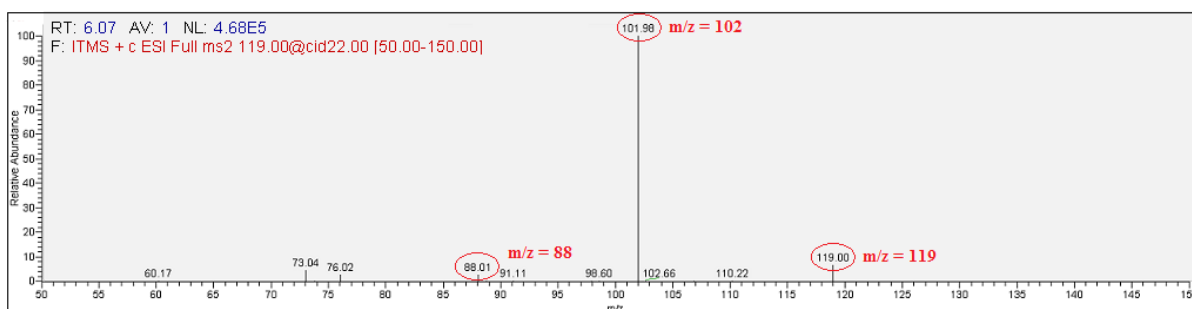
4.2.1 Volba MRM přechodů

Pro detekci standardu (BMAA), vnitřního standardu (D_4 -DAB) a jejich fragmentů byly zvoleny na základě publikace [25] MRM přechody uvedené v Tab. 11. Zvolené přechody byly následně ověřeny za účelem potvrzení vhodnosti volby těchto přechodů ke kvantitativnímu stanovení obou standardů. Pro standard byly vybrány dva přechody. Jeden přechod určený ke kvantifikaci, druhý přechod určený k potvrzení identity analytu. Pro vnitřní standard byl zvolen pouze přechod ke kvantifikaci.

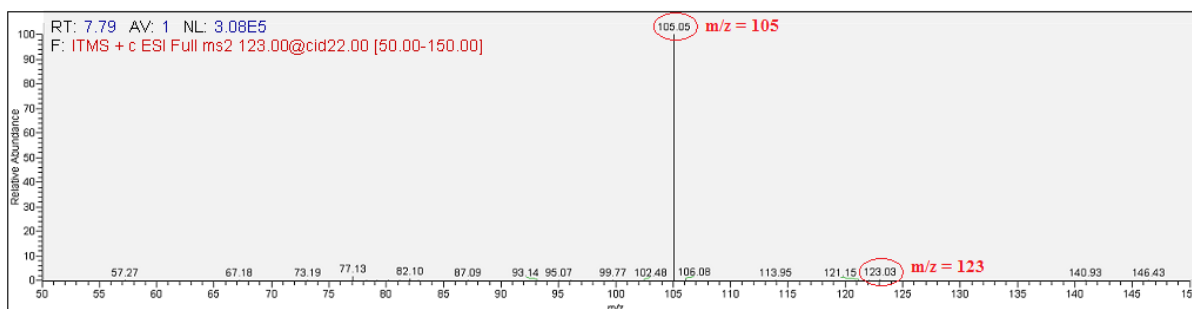
Tab. 11: Vybrané MRM přechody.

Sloučenina	Přechod ke kvantifikaci [m/z]	Přechod k ověření [m/z]
BMAA	119 → 102	119 → 88
D_4 -DAB	123 → 105	-----

Na Obr. 7 a 8 jsou zobrazeny hmotnostní spektra, kde jsou zvýrazněny příslušné přechody (viz Tab. 11) pro BMAA a D_4 -DAB v rozmezí 50 – 150 m/z.



Obr. 7: Hmotnostní spektrum BMAA se zvýrazněnými MRM přechody.



Obr. 8: Hmotnostní spektrum D_4 -DAB se zvýrazněným MRM přechodem.

4.2.2 Optimalizace podmínek elektrospreje

Cílem této optimalizace bylo nastavit vhodnou kombinaci teploty kapiláry, teploty transferové trubice a průtoků plynu tak, aby plocha píku standardu byla co největší a aby byla zároveň zajištěna dostatečná stabilita iontového zdroje.

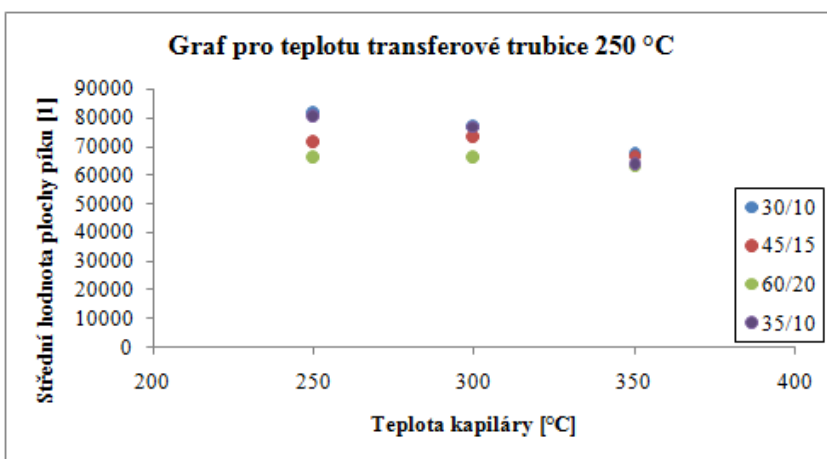
Míra vhodnosti těchto parametrů byla testována na základě hodnoty plochy píku standardu, která závisí na efektivitě zmlžení a následném přenosu vzniklých iontů do analyzátoru. Vhodná kombinace výše uvedených parametrů je nezbytná k dosažení maximální plochy píku a stability elektrospreje. Plocha byla vyhodnocena jako rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou plochy píku (střední hodnota) pro danou kombinaci parametrů na základě primárních dat uvedených v Příloze C. Rozdíl ploch píku byl měřen až po stabilizaci teploty kapiláry.

Teplota kapiláry byla testována při teplotách 250, 300 a 350 °C. Při stejných teplotách byla testována i teplota transferové trubice. Průtok plynu byl testován jako poměr S/A (sheath gas/auxiliary gas) pro následující poměry: 30/10, 45/15, 60/20 a 35/10. Poslední hodnota poměru 35/10 byla zvolena na základě doporučení pro rozmezí teploty kapiláry 250 – 350 °C dle publikace [31]. Výsledky těchto měření jsou shrnuty v Tab. 12.

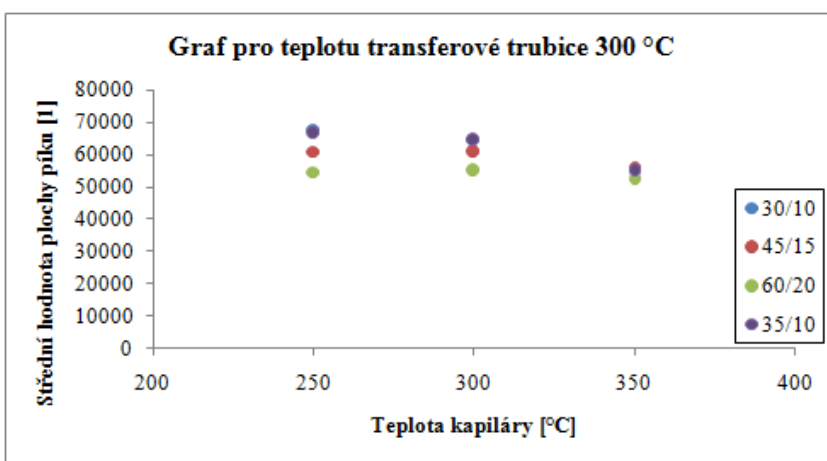
Tab. 12: Výsledky optimalizace podmínek elektrospreje.

Teplota trubice	Teplota kapiláry	Střední hodnota plochy píku pro poměr průtoků plynu S/A				Graf
		30/10	45/15	60/20	35/10	
[°C]	[°C]	[Arb.]				
250	250	81 500	71 250	65 750	80 250	Obr. 9
	300	76 750	73 250	66 000	77 000	
	350	67 000	66 900	63 200	63 400	
300	250	68 000	61 100	54 700	66 600	Obr. 10
	300	64 700	60 900	55 100	64 500	
	350	55 200	56 400	52 400	55 000	
350	250	51 100	46 200	41 600	50 600	Obr. 11
	300	48 600	43 300	39 300	47 300	
	350	40 425	39 100	36 600	37 850	

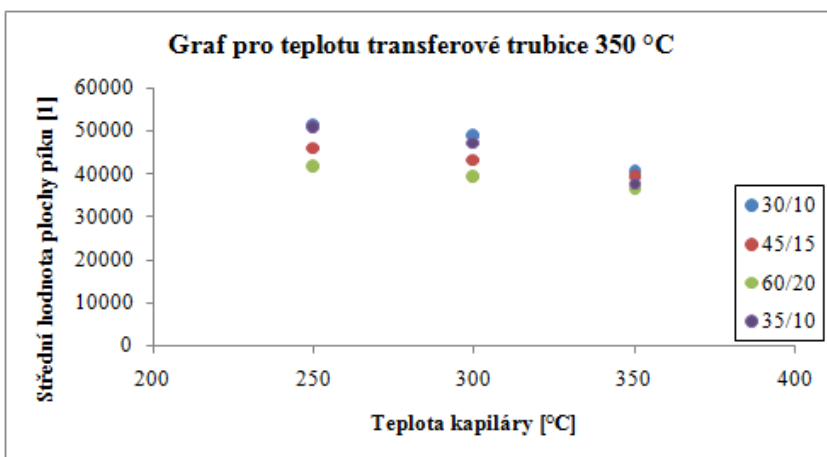
Na Obr. 9 – 11 jsou zobrazeny závislosti střední hodnoty plochy píku standardu na teplotě kapiláry pro různé poměry průtoků plynu (poměry jsou uvedeny v legendě v grafu) a různé teploty transferové trubice.



Obr. 9: Závislost střední hodnoty plochy píku standardu na teplotě kapiláry pro různé poměry průtoků plynu při teplotě transferové trubice 250 °C.



Obr. 10: Závislost střední hodnoty plochy píku standardu na teplotě kapiláry pro různé poměry průtoků plynu při teplotě transferové trubice 300 °C.



Obr. 11: Závislost střední hodnoty plochy píku standardu na teplotě kapiláry pro různé poměry průtoků plynu při teplotě transferové trubice 350 °C.

Na základě hodnot uvedených v Tab. 12 bylo zjištěno, že nejvyšší střední hodnoty plochy píku standardu 81 500 bylo dosaženo při teplotě transferové trubice a kapiláry 250 °C a poměru průtoků plynu 30/10 Arb. Naopak nejnižší střední hodnoty plochy píku standardu 36 600 bylo dosaženo při teplotě transferové trubice a kapiláry 350 °C a poměru průtoků plynu 60/20 Arb. Všeobecně nejnižších středních hodnot plochy píku standardu bylo dosaženo při teplotě transferové trubice 350 °C. Pro poměry průtoků plynu 30/10 Arb. a 35/10 Arb. bylo dosaženo podobných výsledků.

Dále bylo optimalizováno napětí na kapiláře. Napětí kapiláry bylo optimalizováno až po výše zmíněných optimalizacích při hodnotách 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 a 4,0 kV, přičemž bylo zjištěno, že napětí na kapiláře nemá prakticky žádný vliv na hodnotu plochy píku.

Jako optimální parametry pro elektrosprejovou ionizaci byly zvoleny následující hodnoty: teplota transferové trubice 250 °C, teplota kapiláry 250 °C, poměr průtoků plynu 30/10 Arb. Napětí kapiláry bylo zvoleno 3,0 kV na základě publikace [25].

4.2.3 Optimalizace parametrů iontové optiky

Cílem této optimalizace bylo nastavit hodnoty potenciálů na F-čočkách a S-čočkách tak, aby bylo dosaženo co nejvyššího celkového iontového proudu (TIC). F-čočky a S-čočky nejsou klasická optická zařízení, nýbrž se jedná o kruhové elektrody, na něž je aplikován určitý potenciál, umožňující zaostření svazku iontů do úzkého paprsku a také zvýšení citlivosti [32]. Měření potenciálu na F-čočkách bylo provedeno v rozmezí od -30 do -4 V, pro S-čočky v rozmezí od 0 do 70 V. Každé měření bylo provedeno třikrát (celkem tedy 12 grafů). Grafy příslušných měření jsou k nahlédnutí v Příloze D. Hodnoty naměřených potenciálů na F-čočkách a S-čočkách jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 13: Naměřené hodnoty potenciálů na F-čočkách a S-čočkách.

Měření		F-čočky			S-čočky		
		1	2	3	1	2	3
Potenciál [V]	BMAA	-8,5	-8,5	-8,5	68	61	69
	D ₄ -DAB	-9,0	-9,0	-9,0	64	69	65

Na základě naměřených dat uvedených v Tab. 13 bylo zjištěno, že optimální hodnota potenciálu na F-čočkách je pro BMAA -8,5 V a D₄-DAB -9,0 V. Na základě těchto hodnot a s ohledem na primární data (resp. grafy) uvedené v Příloze C, byla jako optimální zvolena hodnota pro -8,5 V, ačkoliv optimální hodnota pro D₄-DAB byla -9,0 V. Důvodem je jednak skutečnost, že pro D₄-DAB byly při hodnotě potenciálu -8,5 V oproti hodnotě -9,0 V poskytovány srovnatelné hodnoty TIC a dále také fakt, že nebylo nutné docílit vysoké

citlivost pro D₄-DAB, neboť tento analyt byl v roztocích přítomen vždy v poměrně vysokých koncentracích. Vzhledem k mírné variabilitě hodnot potenciálů na S-čočkách, která neumožnila zcela jasnou volbu optimální hodnoty potenciálu, byl zvolen kompromis. Jako optimální byla zvolena hodnota potenciálu 65 V, která poskytovala v případě všech šesti měření srovnatelné hodnoty TIC.

4.2.4 Optimalizace kolizní energie jednotlivých MRM přechodů

Cílem této optimalizace bylo nastavit hodnotu kolizní energie příslušných MRM přechodů v retenčních časech odpovídajících oběma analytům tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší intenzity iontového proudu. Kolizní energie byla testována jako normalizovaná kolizní energie v rozmezí 0 – 100 %. Celkem bylo provedeno devět měření, jež jsou k nahlédnutí v Příloze E. Výsledky měření shrnuje Tab. 14.

Tab. 14: Naměřené hodnoty normalizované kolizní energie jednotlivých MRM přechodů.

MRM přechod	Jednotky	Měření		
		1	2	3
119 → 102	[%]	22	22	22
119 → 88	[%]	23	24	23
123 → 105	[%]	21	21	22

Bylo zjištěno, že optimální hodnota normalizované kolizní energie pro přechod určený ke kvantifikaci BMAA (119 → 102) je 22 % a pro přechod určený k ověření (119 → 88) je 23 až 24 %. Pro přechod určený ke kvantifikaci D₄-DAB (123 → 105) je optimální hodnota 21 až 22 %. Na základě výsledků uvedených v Tab. 14 a s ohledem na primární data (resp. grafy), která jsou k nahlédnutí v Příloze D, byla jako optimální zvolena hodnota 22 %. Hodnota byla zvolena na základě snahy docílit co nejnižší instrumentální meze detekce a také z důvodu poskytování srovnatelných hodnot intenzit iontového proudu pro zbylé dva přechody při výše uvedených hodnotách normalizované kolizní energie.

4.2.5 Optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce - souhrn

Na základě výsledků optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce sledovaného neurotoxinu BMAA byly získány podmínky nastavení přístroje umožňující použití dané metody a její instrumentace pro co nejúčinnější separaci a co nejlepší detekci.

Souhrn finálních podmínek chromatografické separace:

- Chromatografická kolona: ZIC[®]-HILIC (délka: 150 mm, vnitřní průměr: 2,1 mm, velikost částic: 3,5 μm, materiál: PEEK)
- Předkolonka: ZIC[®]-HILIC (délka: 20 mm, vnitřní průměr: 2,1 mm, velikost částic: 5,0 μm materiál: PEEK)
- Objem nástřiku: 90 μl
- Teplota kolony: 30 °C
- Použitá mobilní fáze: MF-A: deionizovaná voda + 0,1 % kyseliny mravenčí
MF-B: acetonitril + 0,1 % kyseliny mravenčí
- Složení mobilní fáze: 40/60 (v/v) MF-A/MF-B
- Průtok mobilní fáze: 0,4 ml.min⁻¹ (konstantní)

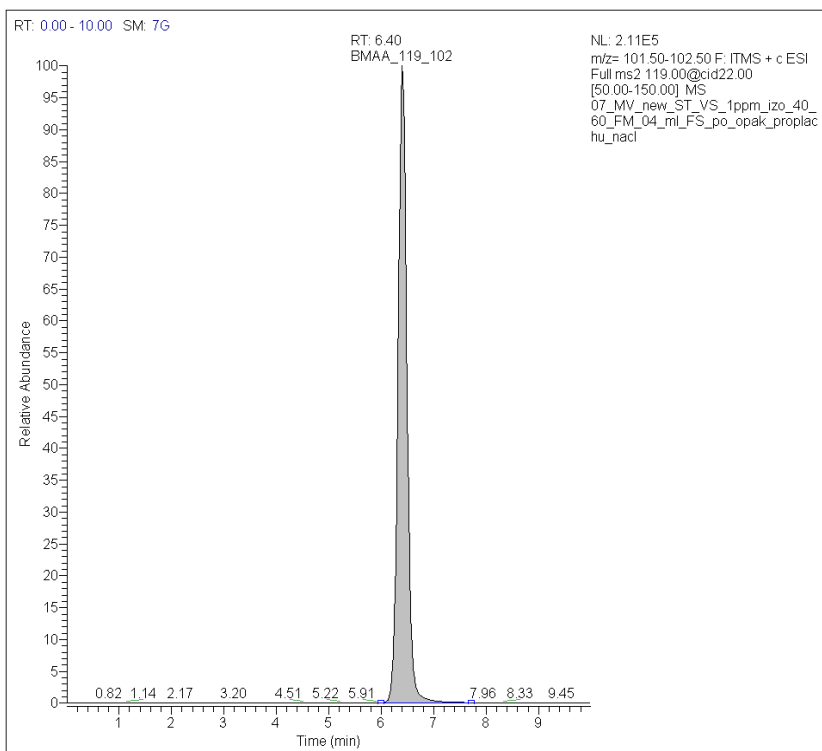
Souhrn finálních podmínek hmotnostní detekce:

- Teplota transferové trubice: 250 °C
- Teplota kapiláry: 250 °C
- Poměr průtoků plynu (S/A): 30/10 Arb.
- Potenciál na F-čočkách: -8,5 V
- Potenciál na S-čočkách: 65 V
- Napětí na kapiláře: 3,0 kV

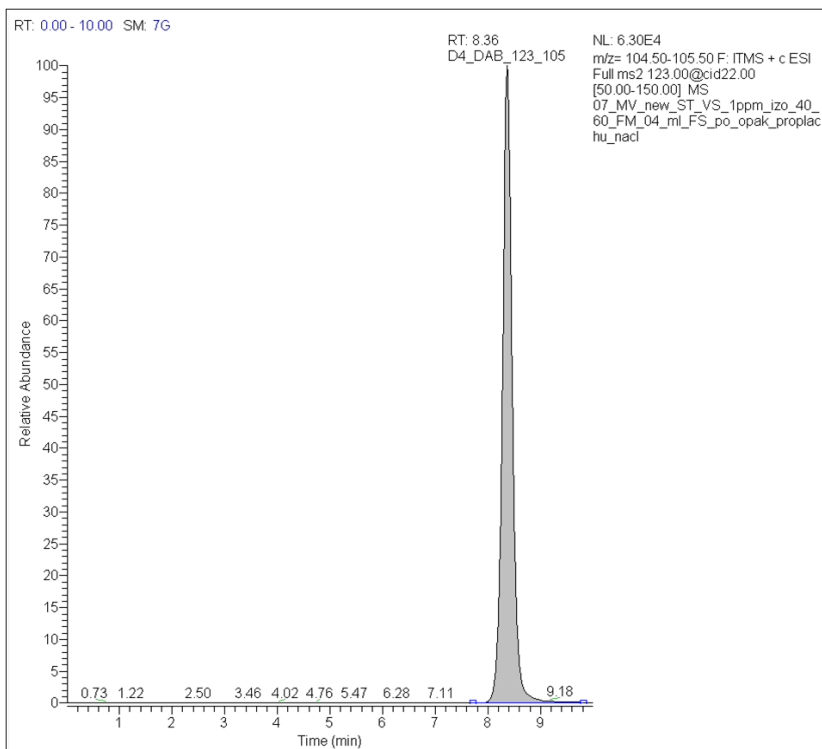
- BMAA
 - kolizní energie: 22 %
 - typ skenu: Full MS/MS (v rozmezí 50 – 150 m/z)
 - doba plnění pasti: 100 ms
 - počet mikroskenů: 1

- D₄-DAB
 - kolizní energie: 22 %
 - typ skenu: Full MS/MS (v rozmezí 50 – 150 m/z)
 - doba plnění pasti: 100 ms
 - počet mikroskenů: 1

Na Obr. 12 je uveden chromatogram standardu a na Obr. 13 chromatogram vnitřního standardu po provedené optimalizaci chromatografické separace a hmotnostní detekce. Chromatogramy byly získány na základě analýzy směsného pracovního roztoku (PR_{mix}).



Obr. 12: Chromatogram standardu změřený za optimálních podmínek.



Obr. 13: Chromatogram vnitřního standardu změřený za optimálních podmínek.

4.3 Validace metody

Po provedené optimalizaci chromatografické separace a hmotnostní detekce byla provedena validace vyvinuté analytické metody, jejímž účelem bylo prokázat její vhodnost pro zamýšlenou kvantitativní analýzu neurotoxinu BMAA ve vodě na základě objektivního posouzení pomocí validačních parametrů. Vyvinutá analytická metoda byla validována na modelu kalibrační křivky.

Základními hodnocenými validačními parametry byly linearita (korelační koeficient a QC koeficient), přesnost, správnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti.

4.3.1 Linearita

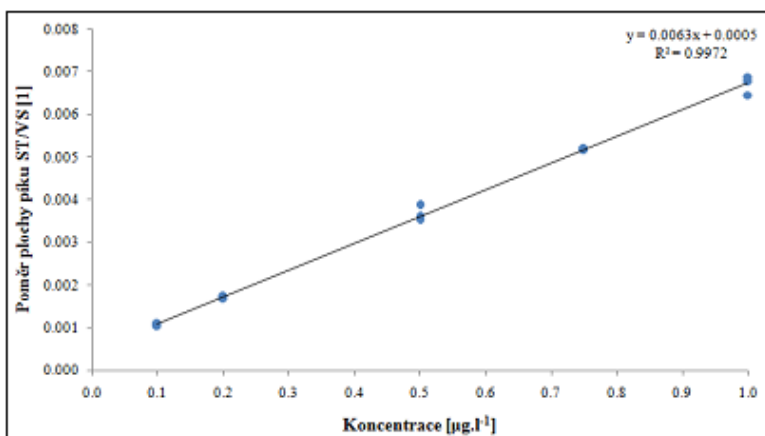
Prvním hodnoceným validačním parametrem byla linearita vyhodnocená dle požadavků uvedených v publikaci *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)* [33]. Pracovní rozsah analytu byl zvolen na koncentrační úrovni 0,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ až 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Vzhledem ke skutečnosti, že přímka jako kalibrační model ve výše uvedeném rozmezí koncentrací nevyhovovala z důvodu nepřijatelných hodnot QC koeficientu, správnosti a přesnosti, bylo využito modelu segmentované lineární regrese navrhané Greenlandem (1995) [34,35]. Tato metoda popisuje modely nelineární závislosti s různými alternativami zadávání uzlových bodů vytvářejících lineární regresi z lineárních segmentů těmito body vzájemně spojenými (nelineární závislost je aproximována lineárními segmenty) [34,36,37]. Lineární regresi tedy tvoří křivka (spline křivka) skládající se z úseků vyjádřených polynomy prvního stupně (přímkami), jež na sebe v uzlových bodech spojitě navazují [36,37]. Spline křivka s několika uzlovými body je obecně hladší než s mnoha uzly, nicméně s rostoucím počtem uzlových bodů se obvykle zlepšuje fit k datům [35,37].

Validační parametry týkající se linearity jsou shrnuty v Tab. 15. Rovnice kalibračních přímk jsou uvedeny ve tvaru $y = k \cdot x + q$, kde: k je směrnice kalibrační přímky, q je intercept, y je poměr plochy píku standardu k ploše píku vnitřního standardu a x je koncentrace standardu v $\mu\text{g.l}^{-1}$.

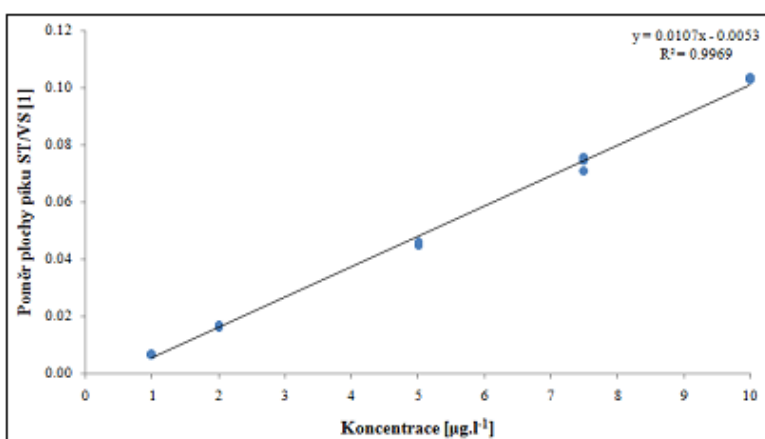
Tab. 15: Shrnutí validačních parametrů – linearita.

Parametr	Kritérium přijatelnosti	Koncentrační úroveň		
		0,1 – 1,0 [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	1,0 – 10 [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	10 – 100 [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
Směrnice [$\text{l.}\mu\text{g}^{-1}$]	-----	0,0063	0,0107	0,0138
Intercept [1]	-----	0,0005	-0,0053	-0,0436
Korelační koeficient [1]	$\geq 0,9950$	0,9986	0,9984	0,9993
QC koeficient [%]	$\leq 5,00$	3,14	4,24	2,63

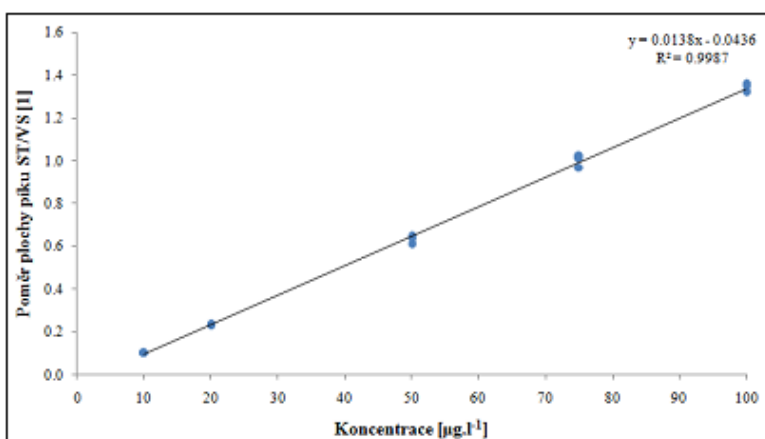
Podle publikace Linearity of calibration curves [38] byla pro všechny tři lineární úseky kalibračního modelu, vytvořené na základě metody segmentované lineární regrese, splněna kritéria přijatelnosti, jež byla vyhodnocena v programu EffiValidation 3.0. Na Obr. 14 až 16 jsou zobrazeny kalibrační závislosti pro všechny tři lineární úseky.



Obr. 14: Kalibrační závislost pro koncentrační úroveň 0,1 – 1,0 µg.l⁻¹.



Obr. 15: Kalibrační závislost pro koncentrační úroveň 1,0 - 10 µg.l⁻¹.



Obr. 16: Kalibrační závislost pro koncentrační úroveň 10 – 100 µg.l⁻¹.

4.3.2 Správnost a přesnost

Správnost metody (vyjádřená jako výtěžnost pomocí procent) a přesnost metody (vyjádřená jako opakovatelnost pomocí RSD) byly validovány dle požadavků uvedených v publikaci Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) [33].

Testování validačních parametrů správnosti a přesnosti bylo aplikováno na kalibračním modelu rozděleného pomocí dvou uzlových bodů ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $10 \mu\text{g.l}^{-1}$) metodou segmentované lineární regrese na tři lineární úseky (tři kalibrační závislosti) vyhovující požadavkům na linearitu. Vyhodnocení bylo provedeno v programu EffiValidation 3.0. Výsledky byly porovnány s kritérii přijatelnosti na příslušných koncentračních úrovních a jsou uvedeny v Tab. 16.

Tab. 16: Vyhodnocení správnosti a přesnosti.

Koncentrační úroveň [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Kritérium přijatelnosti		Experimentálně zjištěné hodnoty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]
0,10	40 – 120	≤ 30	92	5,2
0,20			96	2,8
0,50			100	5,8
0,75			99	0,4
1,0			99	3,6
1,0	60 – 115	≤ 21	112	1,9
2,0			102	3,4
5,0			94	1,5
7,5			98	3,2
10			101	0,4
10	80 – 110	≤ 15	106	0,3
20			100	1,2
50			98	2,8
75			101	2,7
100			100	1,4

Na základě zjištěných hodnot bylo zjištěno, že správnost metody se pohybuje v rozmezí 92 – 112 % a přesnost metody se pohybuje v rozmezí 0,3 – 5,8 %. Všechny hodnoty také vyhovovaly uvedeným kritériím přijatelnosti převzatých z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F, p. 9 [39].

4.3.3 Rozsah

Na základě výsledků linearity, správnosti a přesnosti bylo potvrzeno, že vyvinutá analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou správností a přesností v rozsahu koncentrací analytu $0,1 - 100 \mu\text{g.l}^{-1}$.

4.3.4 Instrumentální mez detekce a mez stanovitelnosti

Posledními validačními parametry byly instrumentální mez detekce (IDL) a instrumentální mez stanovitelnosti (IQL). Tyto parametry byly zjištěny experimentálně postupným snižováním koncentrace analytu v kalibračním roztoku K13, až do okamžiku, kdy bylo přibližně dosaženo odezvy trojnásobku výšky píku analytu (IDL) a desetinásobku výšky píku analytu (IQL) oproti výšce šumu základní linie dle požadavků uvedených v publikaci *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)* [33].

Zjištěné hodnoty poměru signálu k šumu (S/N) byly použity z vyhodnocovacího programu Xcalibur. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 17.

Tab. 17: Vyhodnocení IDL a IQL.

	Koncentrace								
	10 ng.l ⁻¹			20 ng.l ⁻¹			50 ng.l ⁻¹		
série	a	b	c	a	b	c	a	b	c
S/N [1]	5	3	2	9	7	6	97	77	41

Bylo zjištěno, že IDL je 10 ng.l⁻¹. Aby bylo zajištěno, že IQL bude odpovídat minimálně hodnotě poměru S/N 10, bylo IQL zvoleno na úrovni 30 ng.l⁻¹, neboť pro úroveň 20 ng.l⁻¹ nebylo ani v jednom ze tří případů dosaženo požadovaného poměru.

4.4 Testování metody na reálném vzorku vody

4.4.1 Analýza spikovaných vzorků

Vzhledem k zamýšlenému použití metody pro kvantitativní stanovení neurotoxinu BMAA v reálných vzorcích bylo zcela nezbytné provést i hodnocení správnosti (vyjádřené jako výtěžnost), přesnosti (vyjádřené jako opakovatelnost), meze detekce metody a meze kvantifikace metody, které zahrnují vliv matrice vzorku a postupu přípravy vzorku k analýze. Za tímto účelem byly připraveny tzv. spikované vzorky (celkový objem každého spikovaného vzorku byl 5 ml), jež byly obohaceny známým objem pracovního roztoku standardu (ST-C) o známé koncentraci (příprava viz kapitola 3.4.2). Každý spikovaný vzorek byl nasát do injekční stříkačky a na injekční stříkačku byl následně nasazen filtr Titan3 42213NP (PTFE membrána, hydrofobní). Prvních cca 4000 µl filtrátu bylo odpuštěno do odpadu a zbylých cca 1000 µl filtrátu bylo nadávkováno do vialky o objemu 1,8 ml a vialka byla uzavřena. Pro kontrolu čistoty přípravy vzorků a přístroje byla provedena analýza slepého vzorku.

Filtr byl použit za účelem ochrany přístroje vůči nežádoucím částicím, které by mohly upcat chromatografickou kolonu. K dispozici byly celkem 3 různé filtry. Filtr Titan3 42213NP s PTFE hydrofobní membránou, filtr Titan3 42213NPL s PTFE hydrofilní membránou a filtr F2504-8RC s hydrofilní membránou z regenerované celulózy. Na základě doporučení výrobce byl použit filtr Titan3 42213NP, jenž je určen převážně pro roztoky založené na organické bázi, zatímco zbylé dva filtry pro roztoky na vodné bázi.

Spikované vzorky byly analyzovány dle optimalizované a validované metody. Každá koncentrační úroveň byla provedena ve třech nezávislých opakováních. V Tab. 18 jsou uvedeny hodnoty správnosti (výťažnosti) a přesnosti (opakovatelnosti) analýz na obou koncentračních úrovních spikovaných vzorků.

Tab. 18: Správnost (výťažnost) a přesnost (opakovatelnost, RSD) – spikované vzorky.

Koncentrační úroveň [µg.l ⁻¹]	Kritérium přijatelnosti		Zjištěná koncentrace BMAA [µg.l ⁻¹]	Experimentálně zjištěné hodnoty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]		Správnost [%]	Přesnost [%]
0,1	40 - 120	≤ 30	0,117	116	1,5
			0,114		
			0,117		
1,0			0,767	76	1,4
			0,747		
			0,751		

Výsledky hodnocení správnosti metody vykazují širší rozmezí hodnot výťažností (76 – 116 %) než v případě výsledků získaných analýzami kalibračních roztoků na příslušných koncentračních úrovních (92 – 99 %). Změna hodnoty tohoto validačního parametru byla očekávána, neboť matrice vzorku ve většině případů obsahuje nějaké interferující látky, jež mohou mít vliv na účinnost procesu ionizace. Zejména přítomnost netěkavých nebo málo těkavých látek může pozměnit vlastnosti kapky vznikající při ionizaci, čímž může dojít ke změně účinnosti vytváření kapky či jejího odpařování. Nejvyšší hodnoty správnosti bylo dosaženo v případě koncentrační úrovně 0,1 µg.l⁻¹ (průměrná hodnota 116 %). Nejnížší hodnoty správnosti vykazovaly spikované vzorky na koncentrační úrovni 1,0 µg.l⁻¹ (průměrná hodnota 76 %).

Výsledky hodnocení přesnosti metody (1,4 – 1,5 %) jsou téměř shodné s výsledky přesnosti získanými analýzami kalibračních roztoků na příslušných koncentračních úrovních (3,6 – 5,2 %). Nejvyšší hodnoty RSD bylo dosaženo na koncentrační úrovni 1,0 µg.l⁻¹ (1,5 %), naopak nejnižší hodnoty RSD bylo dosaženo u spikovaných vzorků na koncentrační úrovni 0,1 µg.l⁻¹ (1,4 %). Výsledky přesnosti metody též vykazují užší rozmezí hodnot RSD.

Ve všech případech byla splněna uvedená kritéria přijatelnosti převzatá z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F, p. 9 [39], čímž bylo prokázáno, že vyvinutá analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou přesností a správností.

Mez detekce metody (MDL) a mez stanovitelnosti metody (MQL) spikovaných vzorků byly vypočítány na základě poměru signálu k šumu s ohledem na použité ředění vzorku. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 19.

Tab. 19: MDL a MQL spikovaných vzorků vod.

Parametr	MDL	MQL
Koncentrace BMAA [ng.l ⁻¹]	82	270

V této práci bylo dosaženo nižší hodnoty MDL v porovnání s pracemi, jež jsou uvedeny v Tab. 1. Ve srovnání s prací [28], která využívala techniku LC-MS/MS (IT) v kombinaci s SPE, bylo dosaženo přibližně 6x nižší hodnoty MDL. Metoda vyvinutá v této práci dosahovala 30x nižší hodnoty MDL oproti práci [26], jež využívala techniku LC-MS/MS (3Q) bez použití extrakční techniky a derivatizace analytu. Oproti technice LC-FD v kombinaci s SPE extrakcí, která byla využita v pracích [27] a [28] bylo dosaženo dokonce až 60x nižší hodnoty MDL.

4.4.2 Analýza reálných vzorků

Pro testování metody na reálném vzorku vody byly použity vzorky vodného živného média, v němž byly kultivovány sinice z třeboňské sbírky autotrofních organismů (CCALA, Culture Collection of Autotrophic Organism) a jež byly poskytnuty RNDr. Tomášem Hauerem, Ph.D. Do tohoto roztoku mohou výše zmíněné organismy uvolňovat kromě BMAA i různé další sekundární metabolity, což poskytuje matici blízkou reálným vzorkům vod. Seznam těchto vzorků včetně charakterizace je uveden v Tab. 20.

Tab. 20: Seznam reálných vzorků včetně charakterizace.

Vzorek	Kmen	Sinice (rod + druh)	Původ	Výskyt
BG 8	CCALA 008	<i>Aphanizomenon gracile</i>	Irsko, Lough Neagh	Sladká voda
BG 989	CCALA 989	<i>Cylindrospermum pellucidum</i>	ČR, Dlouhá Ves	Půda
BG 114	CCALA 114	<i>Nodularia sphaerocarpa</i>	Francie, Dax	Termální pramen
BG 943	CCALA 943	<i>Nostoc linckia</i>	ČR, Třeboň	Rybník
Z 796	CCALA 796	<i>Microcystic aeruginosa</i>	ČR, neuvedeno	Nádrž
K4	voda z rybníka Svět v Třeboni (souřadnice: 49°0'6.438"N, 14°45'50.581"E)			

Zkratky BG a Z označují typy médií, v nichž jsou organismy udržovány. Zkratka BG značí médium vhodné zejména pro kultivaci sinic, zatímco zkratka Z značí médium vhodné pro kultivaci téměř všech typů sinic a řas (jedná se patrně o nejuniverzálnější médium). Recepty na přípravu obou médií jsou uvedeny v Příloze F.

Analýza reálných vzorků byla provedena bezprostředně po předání a to vždy ve třech nezávislých opakováních. Pro kontrolu čistoty přípravy vzorků, čistoty chemikálií a přístroje byla rovněž provedena analýza slepého vzorku. V Tab. 21 jsou uvedeny výsledky analýz reálných vzorků.

Tab. 21: Výsledky analýz reálných vzorků.

Vzorek	BG 8	BG 114	BG 989	BG 943	Z 796	K4
Koncentrace [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	<MQL	<MDL	<MQL	<MDL	<MDL	<MQL

Bylo zjištěno, že vzorky BG 8, BG 989 a K4 obsahují stopová množství BMAA. Konkrétní hodnoty koncentrací však nemohou být uvedeny, neboť výsledky se pohybovaly v oblasti mezi MDL a MQL. Obsahy BMAA v ostatních vzorcích (BG 114, BG 943 a Z 796) se pohybovaly pod mezí detekce metody.

5 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly shrnuty základní informace o vlastnostech, výskytu a možných rizicích neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu. Dále byly popsány metody kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. V závěru této části byly porovnány analytické metody, jež se zabývaly stanovením tohoto neurotoxinu ve vodě.

V rámci praktické části byla nejprve provedena optimalizace chromatografické separace. Nejlepších podmínek bylo dosaženo při teplotě chromatografické kolony 30 °C, složení mobilní fáze voda-acetonitril s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí v poměru 40/60 (v/v), konstantním průtoku mobilní fáze 0,4 ml.min⁻¹ a objemu nástřiku 90 μ l. Volba takto vysokého objemu nástřiku byla zvolena jednak za účelem zvýšení citlivosti metody (resp. snížení instrumentální meze detekce) a dále z důvodu nemožné realizace postupu extrakce vzhledem k omezenému množství (cca 1 ml) reálných vzorků vod. Následně byla provedena optimalizace hmotnostní detekce. Nejlepších podmínek bylo dosaženo při teplotě transferové trubice 250 °C, teplotě kapiláry 250 °C, poměru průtoku plynu (S/A) 30/10 Arb., napětí na F-čočkách -8,5 V, napětí na S-čočkách 65 V, napětí na kapiláře 3,0 kV a normalizované kolizní energie 22 %.

Po zoptimalizování metody byla provedena její validace, v rámci níž byly hodnoceny následující validační parametry: linearita, přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost), správnost (vyjádřená jako výtěžnost), rozsah, instrumentální mez detekce a instrumentální mez stanovitelnosti. Bylo zjištěno, že vyvinutá analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou přesností a správností v rozsahu koncentrací 0,1 – 100 μ g.l⁻¹. Instrumentální mez detekce byla 10 ng.l⁻¹ a instrumentální mez stanovitelnosti 30 ng.l⁻¹.

Na závěr byla metoda testována na reálném vzorku povrchové vody, která byla obohacena přidavkem BMAA na koncentrační úrovni 0,1 a 1,0 μ g.l⁻¹. Výsledky správnosti vyjádřené jako výtěžnost se pohybovaly v rozmezí 76 – 116 % a výsledky přesnosti vyjádřené jako opakovatelnost poskytovaly hodnoty v rozmezí 1,4 – 1,5 %. Mez detekce metody, resp. mez stanovitelnosti metody vyjádřená na základě poměru signálu k šumu byla 82 ng.l⁻¹, resp. 270 ng.l⁻¹. V porovnání s diskutovanými pracemi, které využívaly techniku LC-MS/MS nebo LC-FD s/nebo bez použití extrakční techniky, bylo v této práci využívající techniku LC-MS dosaženo celkově nižšího detekčního limitu metody, avšak za cenu širšího rozmezí správností (76 – 116 %) oproti diskutovaným pracím (88,7 – 103,9 %). S ohledem na všechny dosažené výsledky správnosti, přesnosti i meze stanovitelnosti, bylo zjištěno, že vyvinutá metoda je vhodná pro zamýšlené využití a tudíž byla provedena analýza několika

reálných vzorků vodného živného média, v němž byly kultivovány sinice z třeboňské sbírky autotrofních organismů. Analýzou bylo zjištěno, že vzorky BG 8, BG 989 a K4 obsahovaly stopová množství BMAA, jehož konkrétní hodnoty nemohly být uvedeny, neboť výsledky se pohybovaly v oblasti mezi mezí detekce metody a mezí stanovitelnosti metody. Hodnoty ostatních vzorků (BG 114, BG 943 a Z 796) se pohybovaly pod mezí detekce metody.

Další práce by mohla být zaměřena na využití této metody pro stanovení neurotoxinu BMAA v sinicích a jiných planktonních organismech spolu s vyvinutím a optimalizací extrakční techniky, jež je zcela nezbytná pro stanovení celkového obsahu tohoto analytu (volný + vázaný) ve výše zmíněných organismech.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **Pablo, J., a další.** Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2009, Sv. 120, 4, stránky 216-225. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01150.x.
- [2] **Cox, Paul A., a další.** Diverse taxa of cyanobacteria produce Beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceeding of the National Academy of Sciences of The United States of America*. 2005, Sv. 102, 14, stránky 5074-5078. doi: 10.1073/pnas.0501526102.
- [3] **Jiang, Liying, a další.** Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments. *PLoS ONE*. 2014, Sv. 9, 1. doi: 10.1371/journal.pone.0084578.
- [4] **Jiang, Liying, a další.** Quantification of neurotoxin BMAA (Beta-N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. *Scientific Reports*. 2014, Sv. 4, 6931. doi: 10.1038/srep06931.
- [5] **Lobner, D., a další.** Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease*. 2007, Sv. 25, 2, stránky 360-366. doi: 10.1016/j.nbd.2006.10.002.
- [6] **Murch, Susan J., Cox, Paul A. a Banack, Sandra A.** A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, Sv. 101, 33, stránky 12228-12231. doi: 10.1073/pnas.0404926101.
- [7] **Banack, Sandra A., a další.** The Cyanobacteria Derived Toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxins*. 2010, Sv. 2, 12, stránky 2837-2850. doi: 10.3390/toxins2122837.
- [8] **Christensen, Stephanie J., a další.** Detection and quantification of Beta-methylamino-L-alanine in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography: Methods*. 2012, Sv. 10, 11, stránky 891-898. doi: 10.4319/lom.2012.10.891.
- [9] **Mondo, K., a další.** Cyanobacterial Neurotoxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) in Shark Fins. *Marine Drugs*. 2012, Sv. 10, 2, stránky 509-520. doi: 10.3390/md10020509.
- [10] **Duncan, Mark W., a další.** 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology*. 1990, Sv. 40, 5, str. 767. doi 10.1212/WNL.40.5.767.

- [11] **Plato, Chris C., a další.** Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinsonism-Dementia Complex of Guam: Changing Incidence Rates during the Past 60 Years. *American Journal of Epidemiology*. 2003, Sv. 157, 2, stránky 149-157. doi: 10.1093/aje/kwf175
- [12] **Forsheew, D. a Hulihan, S.** The ALS Association. *Living with ALS. What's it all about?* [Online] 2007. [Citace: 5. 9 2015.] <http://www.alsa.org/als-care/resources/publications-videos/manuals/?referrer=https://www.google.cz/>.
- [13] **Cais, O., a další.** Neurosteroidy: účinné modulátory NMDA receptorů. *Psychiatrie*. 2009, Sv. 13, 4, stránky 148-152. ISSN 1211-7579.
- [14] **Skřenková, K.** Iontropní glutamátové receptory a excitotoxicita. *Bakalářská práce*. Praha : Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra fyziologie živočichů, 2012. Vedoucí bakalářské práce Ladislav Vyklický.
- [15] **Chiu, Alexander S., a další.** Gliotoxicity of the cyanotoxins Beta-methyl-amino-L-alanin (BMAA). *Scientific Reports*. 2013, Sv. 3. doi: 10.1038/srep01482.
- [16] **Weiss, John H. a Choi, Dennis W.** Beta-N-Methylamino-L-Alanine Neurotoxicity: Requirement for Bicarbonate as a Cofactor. *Science*. 1988, Sv. 241, 4868, stránky 973-975. doi: 10.1126/science.3136549.
- [17] **Nationa Institute of Health.** National Institute of Neurological Disorders and Stroke. *Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Fact Sheet*. [Online] 2013. [Citace: 5. 9 2015.] http://www.ninds.nih.gov/disorders/amyotrophiclateralsclerosis/detail_ALS.htm.
- [18] **Ambler, Z.** Amyotrofická laterální skleróza. *Neurologie pro Praxi*. 2006, Sv. 1, stránky 9-12. ISSN 1803-5280.
- [19] **Klouda, P.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Klouda Pavel, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [20] **Jančářová, I. a Jančář, L.** *Analytická chemie*. Brno : Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008. ISBN 978-80-7157-647-1.
- [21] **Opekar, F., a další.** *Základní analytická chemie*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0553-8.
- [22] **Drbal, K. a Křížek, M.** *Analytická chemie*. České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích - Zemědělská fakulta, 1999. ISBN 80-7040-352-7.
- [23] **Pěničková, H.** *Analytická chemie a chemická laboratorní cvičení: Učební text pro 4. ročník*. Brno : Střední průmyslová škola chemická Brno, 2006.
- [24] **Holčapek, M.** Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. [Online] 2016. [Citace: 3. 2 2016.] <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>.

- [25] **Combes, A., a další.** Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin Beta-N-methylamino-L-alanine in complex environmental samples. *Analytica Chimica Acta*. 2013, Sv. 771, stránky 42-49. doi: 10.1016/j.aca.2013.02.016.
- [26] **Faassen, Elisabeth J., Gillissen, F. a Lürling, M.** A Comparative Study on Three Analytical Methods for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Cyanobacteria. *PLoS ONE*. 2012, Sv. 7, 5. doi: 10.1371/journal.pone.0036667.
- [27] **Al-Sammak, Maitham A., a další.** Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples. *Toxicon*. 2013, Sv. 76, stránky 316-325. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.10.015.
- [28] **Al-Sammak, Maitham A., a další.** Co-occurrence of the Cyanotoxins BMAA, DABA and Anatoxin-a in Nebraska Reservoirs, Fish, and Aquatic Plants. *Toxins*. 2014, Sv. 6, 2, stránky 488-508. doi: 10.3390/toxins6020488.
- [29] **Ermer, J. a Miller, John H.** *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practise*. Darmstadt : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. ISBN 3-527-31255-2.
- [30] **CHROMacademy.** *The Theory of HPLC - Chromatographic Parameters*. [Online] 2016. [Citace: 23. 1 2016.]
http://www.chromacademy.com/lms/sco2/Theory_Of_HPLC_Chromatographic_Parameters.pdf.
- [31] **Thermo Fisher Scientific.** HESI-II Probe - User Guide (70005-97000 Revision C). Waltham, Massachusetts, USA : Thermo Fisher Scientific, 2009.
- [32] **Thermo Fisher Scientific.** Product Support Bulletin. *Improved Sensitivity Through Enhanced Ion Transmission Using an S-Lens on the LTQ Velos Linear Ion Trap (PSB63058_E05/09S)*. [Online] 2009. [Citace: 5. 2 2016.]
<http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/cmd-support/orbitrap-velos-pro/operations-and-maintenance/technical-bulletins/PSB-128-Improved-Sensitivity-Through-Enhanced-Ion-Transmission-Using-an-S-Lens.pdf>.
- [33] **International Conference on Harmonisation.** ICH harmonisation for better health. *Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)*. [Online] 1996. [Citace: 10. 10 2015.] <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- [34] **Oosterbaan, R. J.** Frequency and Regression Analysis of Hydrologic Data. [autor knihy] H. P. Ritzema. *Drainage Principles and Applications*. Wageningen : International Institute for Land Reclamation and Improvement, 1994, stránky 175-223.

- [35] **Hurley, Deborah M., a další.** An Evaluation of Splines in Linear Regression. California : SAS Users Group International, 2003. Paper 147-31.
- [36] **Meloun, M. a Militký, J.** *Kompendium ze statistického zpracování dat: Metody a řešené úlohy včetně CD.* Praha : Academia, 2002. ISBN 80-200-1008-4.
- [37] **Massart, Desiré L., a další.** *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A.* Amsterdam : Elsevier, 1997. ISBN 0-444-89724-0.
- [38] **Van Looc, J., a další.** Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance.* 2002, Sv. 7, 7, stránky 281-285. doi: 10.1007/s00769-002-0487-6.
- [39] **Association of Analytical Communities.** Official Methods of Analysis. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F.* [Online] 2009. [Citace: 15. 1 2016.] <http://www.eoma.aoac.org/>.

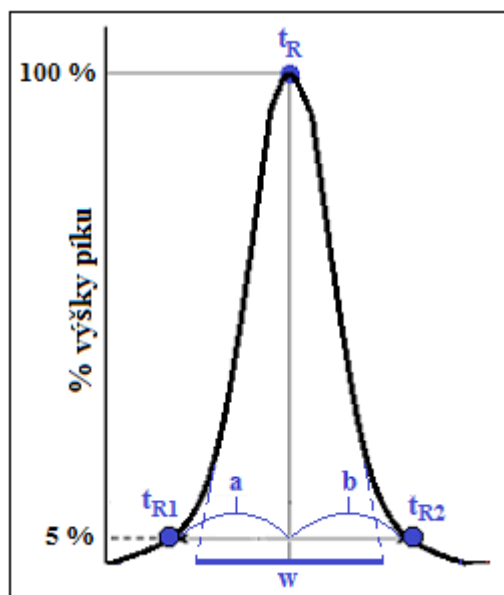
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	„auxiliary gas“ – plyn napomáhající odpaření rozpouštědla
ALS	amyotrofická laterální skleróza
AMPA	receptor pro α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionovou kyselinu
API	ionizace za atmosférického tlaku
AQC	fluorescenční látka 6-aminoquinolil-N-hydroxysukcinimidyl karbamát
Arb	relativní veličina určená referenčním měřením
BMAA	β -N-methylamino-L-alanin
BG	médium vhodné zejména pro kultivaci sinic
CE	kapilární elektroforéza
D ₄ -DAB	DL-2,4-diaminomásečná kyselina obsahující 4 deuterované vodíky
EAAT	transportér excitačních aminokyselin
ESI	ionizace elektrosprejem
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
IT	iontová past
LC-FD	kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotností detekcí
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
MRM	přechod pro monitorování vícenásobné reakce
m/z	poměr hmotnosti a náboje
NMDA	receptor pro N-methyl-D-asparagovou kyselinu
PEEK	polyetheretherketon
PR	pracovní roztok
PTFE	polytetrafluorethylen
QC	koeficient kvality lineární regrese
QqQ	trojitý kvadrupól
RSD	relativní směrodatná odchylka
S	„sheath gas“ – plyn sloužící k odpaření rozpouštědla a vytvoření aerosolu
SPE	extrakce na tuhou fázi
ST	standard

S/A	poměr sheath gas/auxilliary gas
S/N	poměr signál k šumu
TIC	celkový iontový proud
VS	vnitřní standard
v/v	objemová procenta
Z	médium vhodné pro kultivaci téměř všech typů sinic a řas

8 PŘÍLOHY

8.1 Příloha A



Obr. 17: Vysvětlení veličin t_R , t_{R1} , t_{R2} , a , b , w pro výpočet faktoru asymetrie.

Tab. 22: Optimalizace složení a průtoku mobilní fáze – primární data.

S. *	Složení MF [v/v]	Průtok [ml.min ⁻¹]	t_{R1}	t_R	t_{R2}	a	b	w	A_F [1]	R^{**} [1]
			[min]							
B	50/50	0,2	7,22	7,40	7,68	0,18	0,28	0,27	1,28	4,9
D			8,62	8,79	9,01	0,17	0,22	0,30	1,15	
B		0,4	3,49	3,62	3,99	0,13	0,37	0,26	1,92	2,4
D			4,12	4,28	4,60	0,16	0,32	0,28	1,50	
B	40/60	0,2	12,64	12,95	13,32	0,31	0,37	0,51	1,10	7,2
D			16,55	16,92	17,36	0,37	0,44	0,60	1,09	
B		0,4	6,22	6,40	6,60	0,18	0,20	0,28	1,06	6,8
D			8,15	8,38	8,69	0,23	0,31	0,30	1,17	

* S = sloučenina, B = BMAA, D = D₄-DAB, ** R rozlišení

8.2 Příloha B

Tab. 23: Primární data pro výpočet faktoru asymetrie pro BMAA.

Objem nástríku [μl]	t_{R1} [min]	t_R [min]	t_{R2} [min]	a [min]	b [min]	A_F [1]
1	5,92	6,12	6,40	0,20	0,28	1,20
2	5,92	6,13	6,40	0,21	0,27	1,14
3	5,92	6,12	6,39	0,20	0,27	1,18
4	5,93	6,12	6,38	0,19	0,26	1,18
5	5,93	6,12	6,38	0,19	0,26	1,18
6	5,93	6,12	6,38	0,19	0,26	1,18
7	5,93	6,12	6,38	0,19	0,26	1,18
8	5,92	6,11	6,37	0,19	0,26	1,18
9	5,92	6,11	6,37	0,19	0,26	1,18
10	5,92	6,11	6,37	0,19	0,26	1,18
15	5,92	6,13	6,37	0,21	0,24	1,07
20	5,93	6,13	6,38	0,20	0,25	1,13
25	5,93	6,13	6,40	0,20	0,27	1,18
30	5,93	6,12	6,40	0,19	0,28	1,24
35	5,93	6,14	6,41	0,21	0,27	1,14
40	5,93	6,14	6,42	0,21	0,28	1,17
45	5,94	6,14	6,43	0,20	0,29	1,23
50	5,94	6,14	6,44	0,20	0,30	1,25
60	5,95	6,16	6,46	0,21	0,30	1,21
70	5,96	6,18	6,48	0,22	0,30	1,18
80	5,97	6,18	6,51	0,21	0,33	1,29
90	5,98	6,18	6,53	0,20	0,35	1,38
100	6,00	6,23	6,53	0,23	0,30	1,15

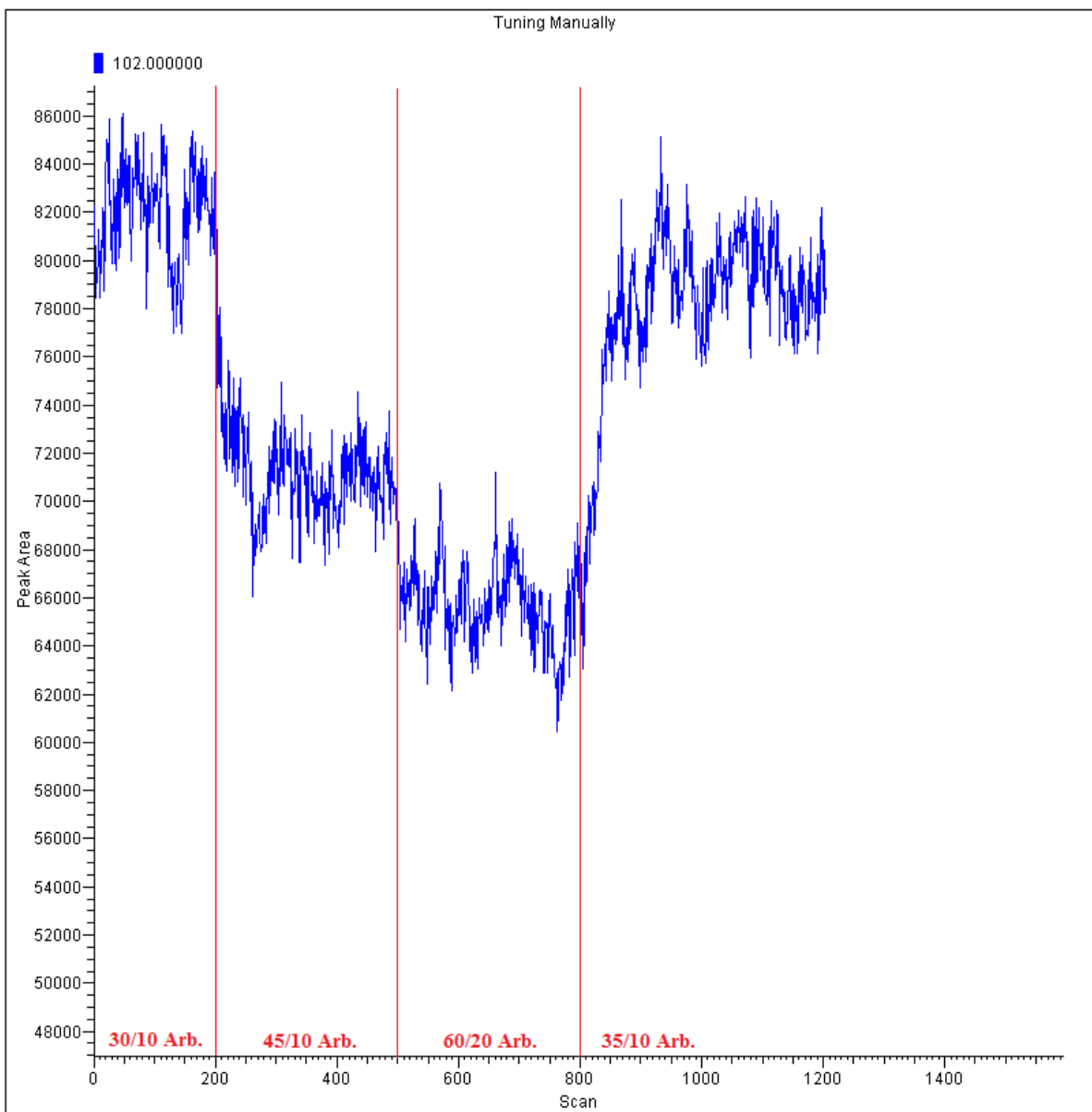
Tab. 24: Primární data pro výpočet faktoru asymetrie pro D₄-DAB.

Objem nástríku [μl]	t_{R1} [min]	t_R [min]	t_{R2} [min]	a [min]	b [min]	A_F [1]
1	7,75	8,00	8,36	0,25	0,36	1,22
2	7,74	8,00	8,34	0,26	0,34	1,15
3	7,76	8,00	8,34	0,24	0,34	1,21
4	7,76	7,99	8,34	0,23	0,35	1,26
5	7,75	8,01	8,33	0,26	0,32	1,12
6	7,74	8,01	8,32	0,27	0,31	1,07
7	7,74	7,98	8,32	0,24	0,34	1,21
8	7,74	8,00	8,32	0,26	0,32	1,12
9	7,74	7,97	8,30	0,23	0,33	1,22
10	7,73	7,97	8,29	0,24	0,32	1,17
15	7,74	7,98	8,28	0,24	0,30	1,13
20	7,74	7,97	8,28	0,23	0,31	1,17
25	7,75	7,98	8,27	0,23	0,29	1,13
30	7,74	7,97	8,27	0,23	0,30	1,15
35	7,75	7,97	8,27	0,22	0,30	1,18
40	7,74	7,98	8,28	0,24	0,30	1,13
45	7,75	7,98	8,28	0,23	0,30	1,15
50	7,75	7,98	8,28	0,23	0,30	1,15
60	7,76	7,99	8,30	0,23	0,31	1,17
70	7,76	8,00	8,31	0,24	0,31	1,15
80	7,76	7,99	8,32	0,23	0,33	1,22
90	7,76	7,99	8,33	0,23	0,34	1,24
100	7,78	8,04	8,34	0,26	0,30	1,08

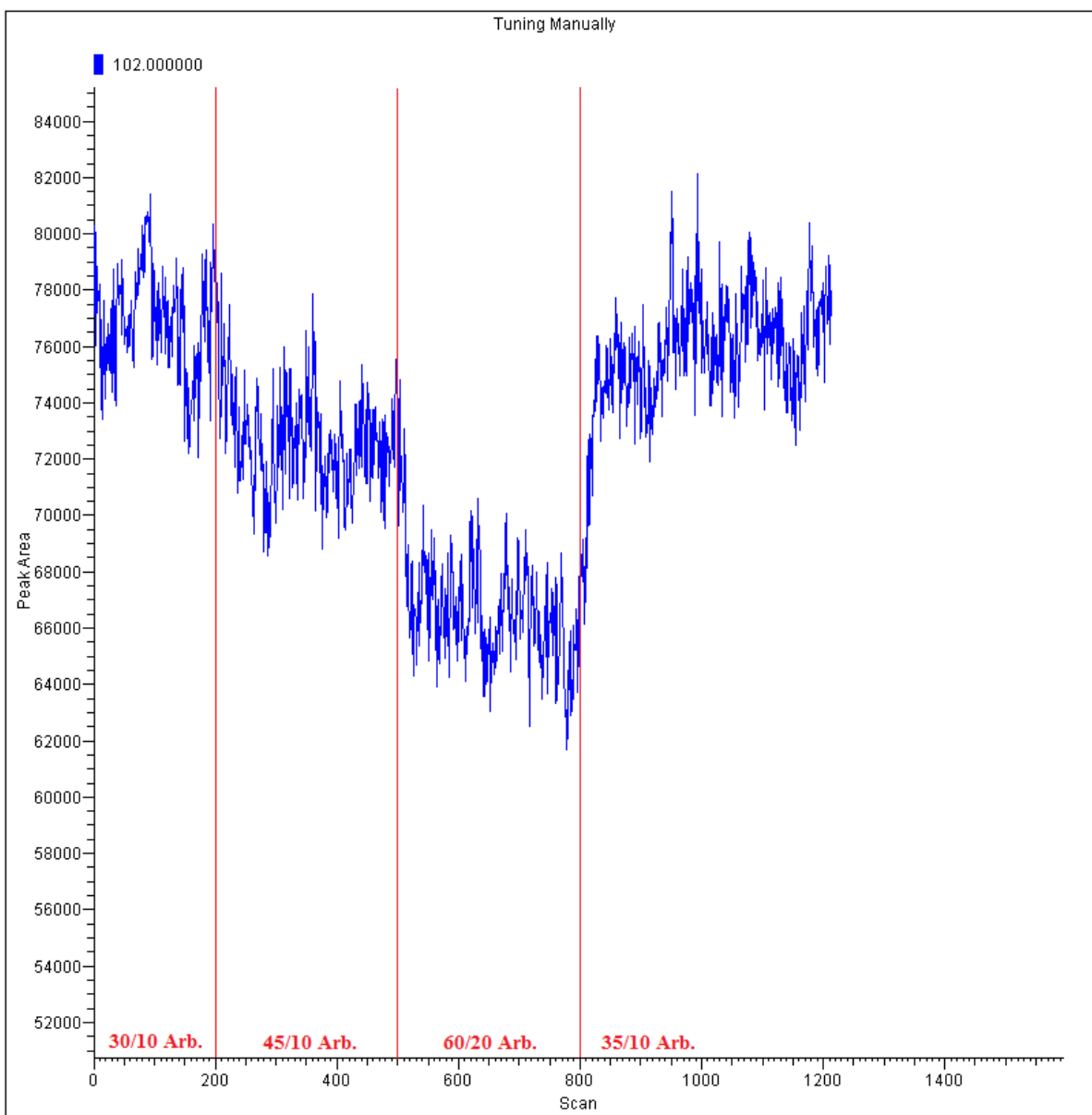
8.3 Příloha C

Tab. 25 : Optimalizace parametrů elektrospreje – primární data.

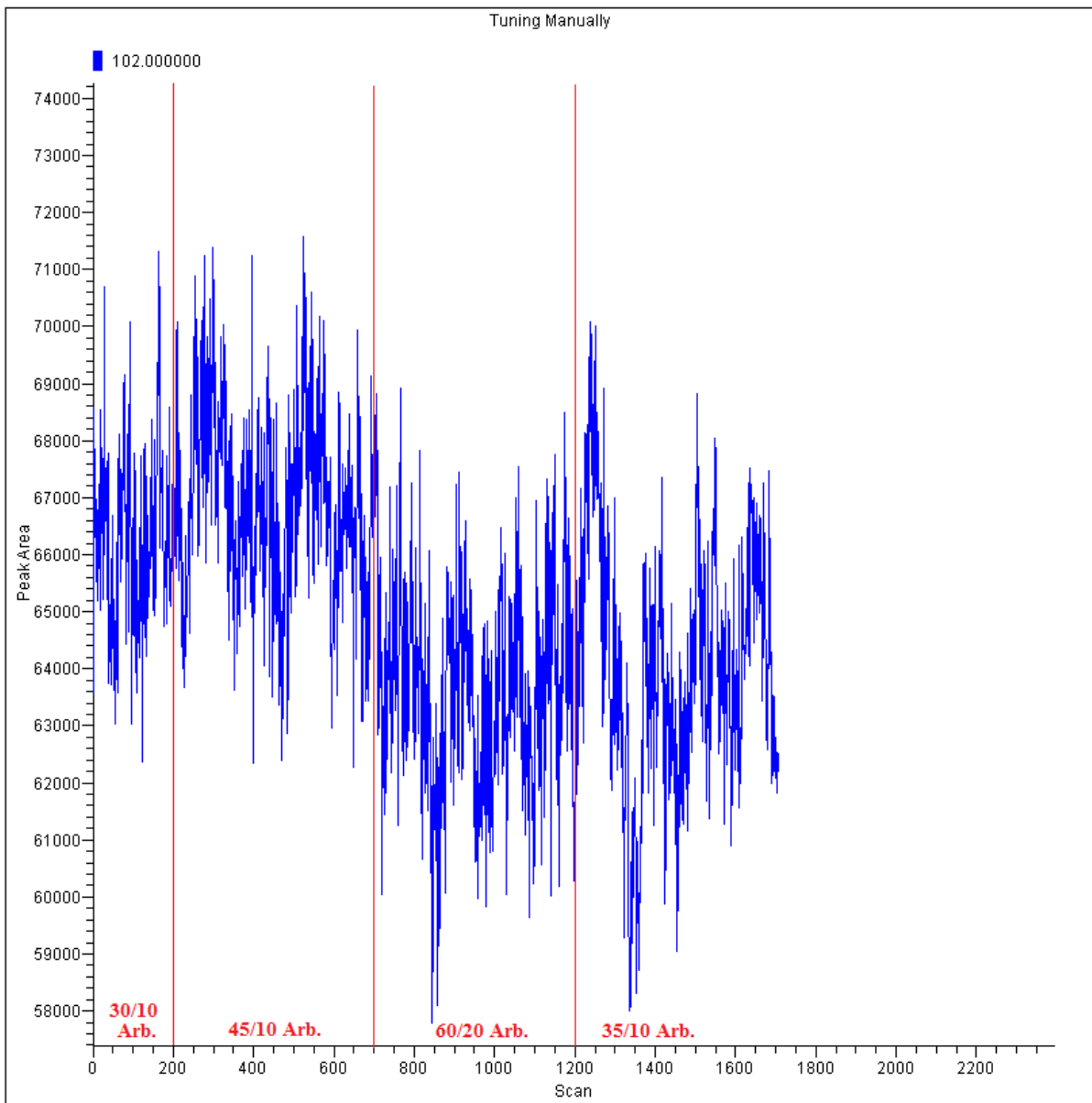
Teplota trubice [°C]	Teplota kapiláry [°C]	Průtok plynu S/A [Arb.]	Počátek skenu [1]	Plocha píku [1]			Graf	
				Dolní hranice	Horní hranice	Střední hodnota		
250	250	30/10	0	77 000	86 000	81 500	Obr. 18 v příloze C	
		45/15	200	67 500	75 000	71 250		
		60/20	500	60 500	71 000	65 750		
		35/10	800	75 500	85 000	80 250		
	300	300	30/10	0	72 000	81 500	76 750	Obr. 19 v příloze C
			45/15	200	68 500	78 000	73 250	
			60/20	500	61 500	70 500	66 000	
			35/10	800	72 000	82 000	77 000	
	350	350	30/10	0	62 400	71 600	67 000	Obr. 20 v příloze C
			45/15	200	62 200	71 600	66 900	
			60/20	700	57 800	68 600	63 200	
			35/10	1200	58 000	68 800	63 400	
300	250	30/10	0	64 600	71 400	68 000	Obr. 21 v příloze C	
		45/15	200	56 400	65 800	61 100		
		60/20	600	50 400	59 000	54 700		
		35/10	1000	62 200	71 000	66 600		
	300	300	30/10	0	60 400	69 000	64 700	Obr. 22 v příloze C
			45/15	200	56 000	65 800	60 900	
			60/20	600	50 800	59 400	55 100	
			35/10	1000	59 400	69 600	64 500	
	350	350	30/10	0	51 200	59 200	55 200	Obr. 23 v příloze C
			45/15	200	52 600	60 200	56 400	
			60/20	600	48 400	56 400	52 400	
			35/10	1000	51 400	58 600	55 000	
350	250	30/10	0	47 800	54 400	51 100	Obr. 24 v příloze C	
		45/15	200	42 800	49 600	46 200		
		60/20	600	38 400	44 800	41 600		
		35/10	1000	47 400	53 800	50 600		
	300	300	30/10	0	45 400	51 800	48 600	Obr. 25 v příloze C
			45/15	200	40 200	46 400	43 300	
			60/20	600	36 200	42 400	39 300	
			35/10	1000	44 000	50 600	47 300	
	350	350	30/10	0	37 750	43 100	40 425	Obr. 26 v příloze C
			45/15	200	36 100	42 100	39 100	
			60/20	600	33 500	39 700	36 600	
			35/10	1000	34 700	41 000	37 850	



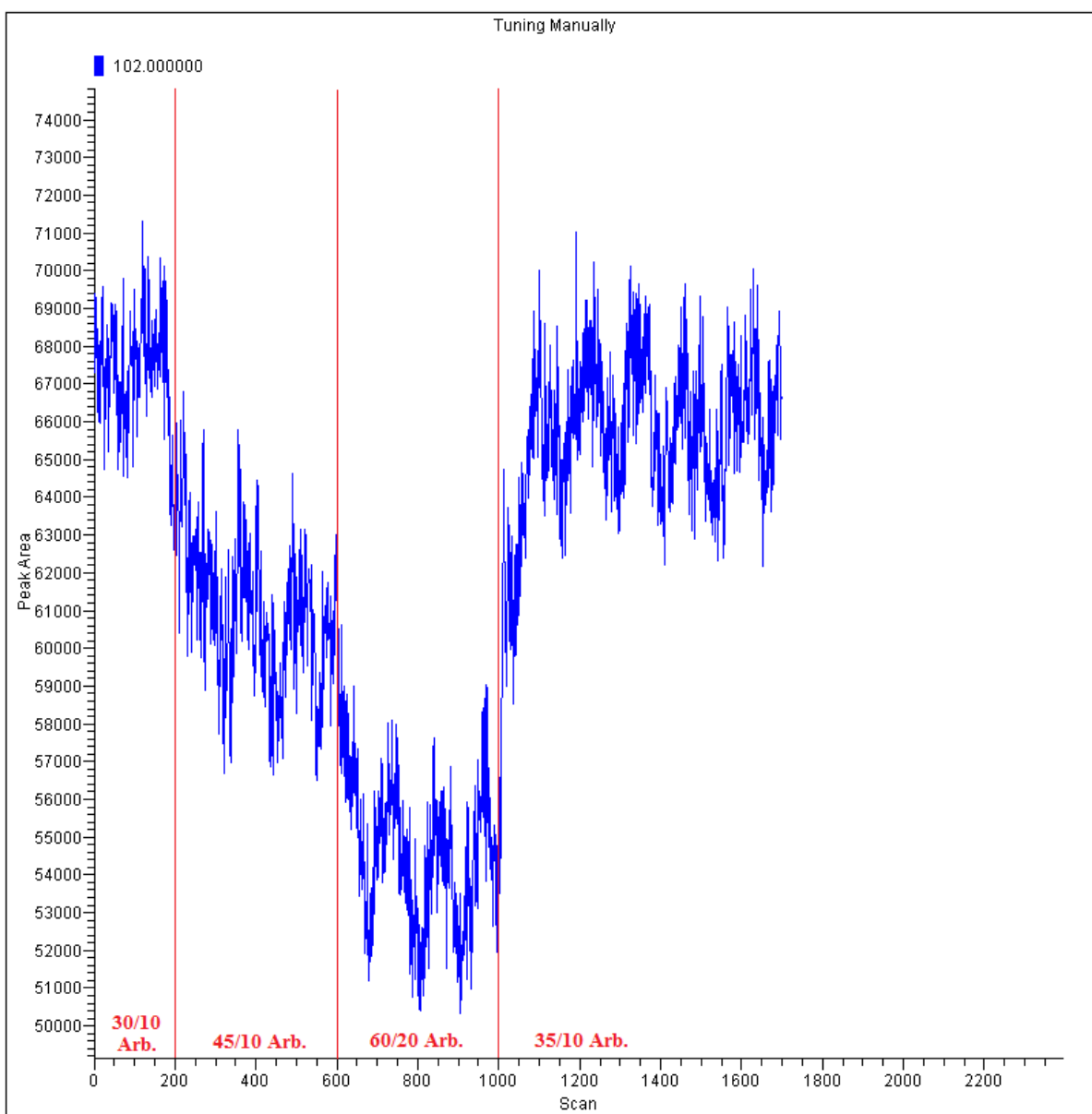
Obr. 18: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 250 °C a teplotě kapiláry 250 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).



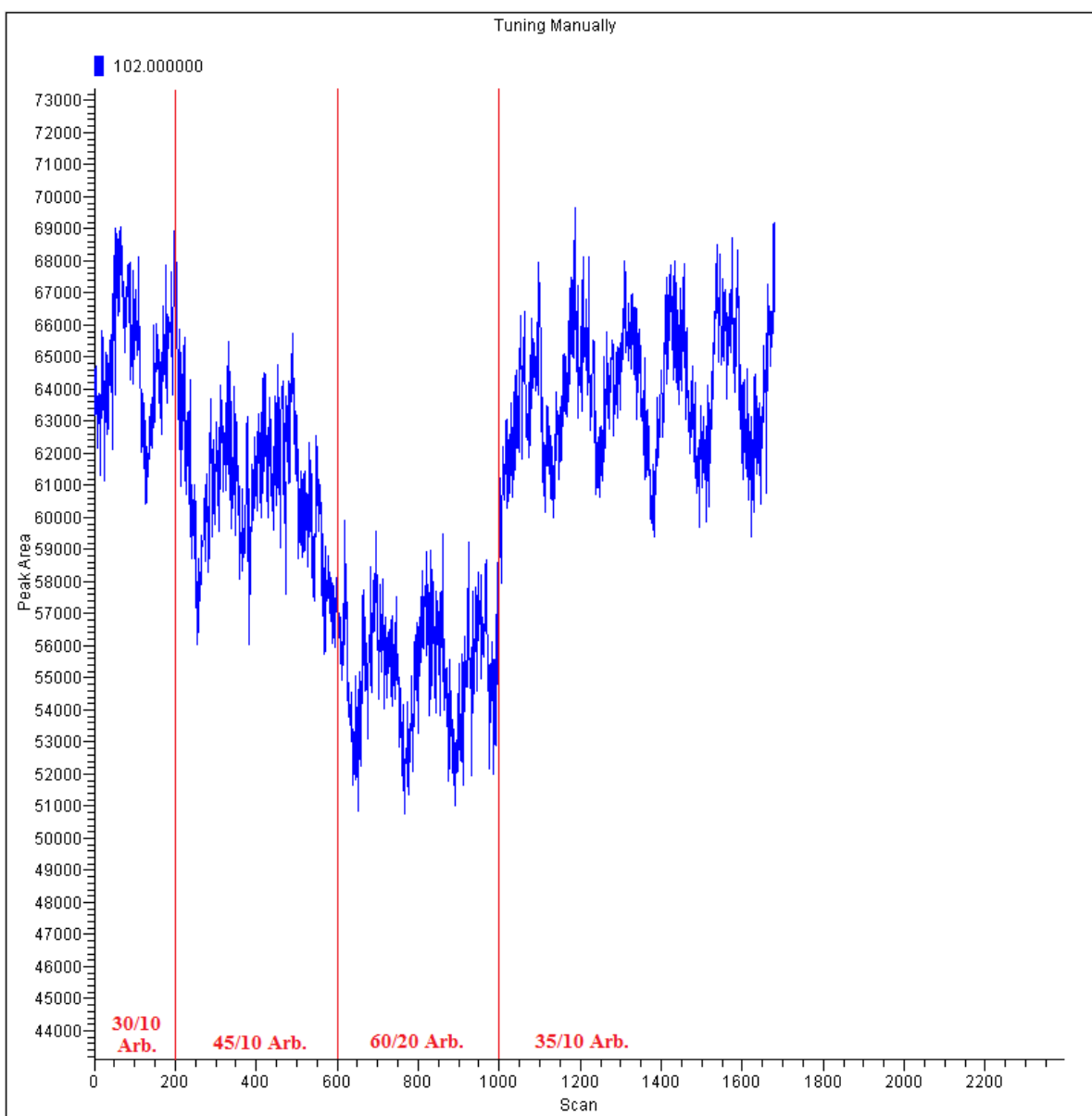
Obr. 19: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 250 °C a teplotě kapiláry 300 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).



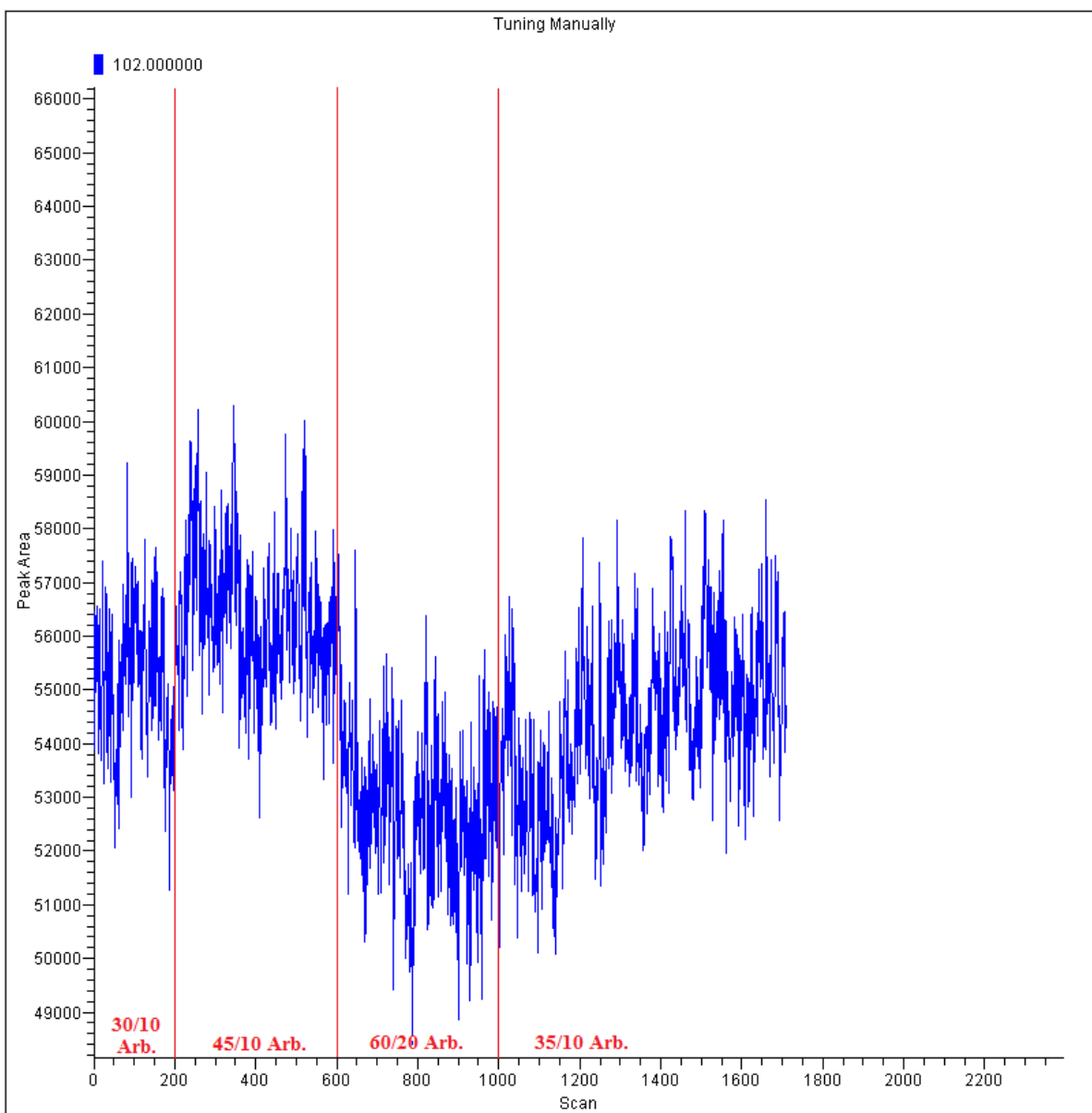
Obr. 20: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 250 °C a teplotě kapiláry 350 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).



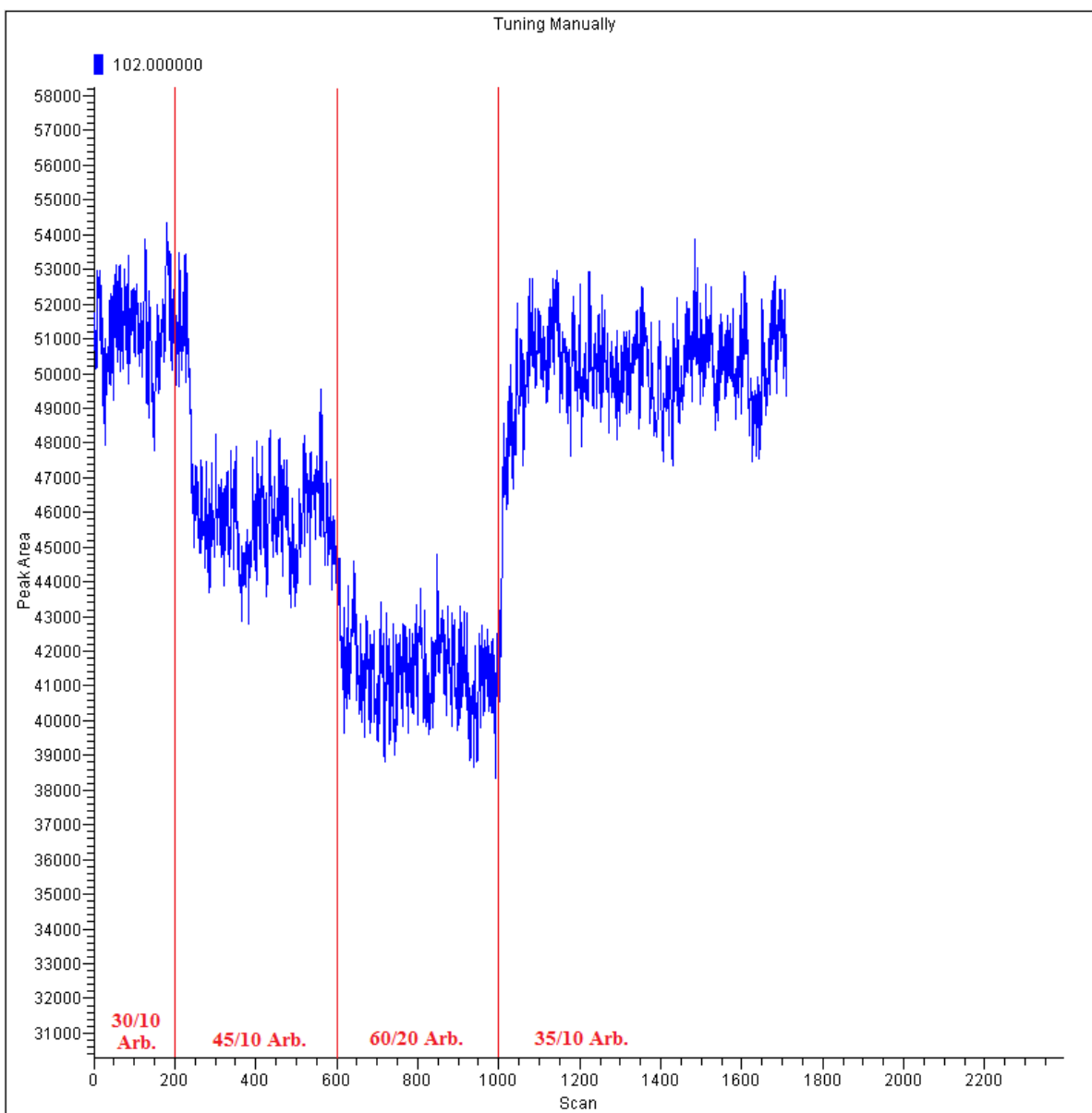
Obr. 21: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 300 °C a teplotě kapiláry 250 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).



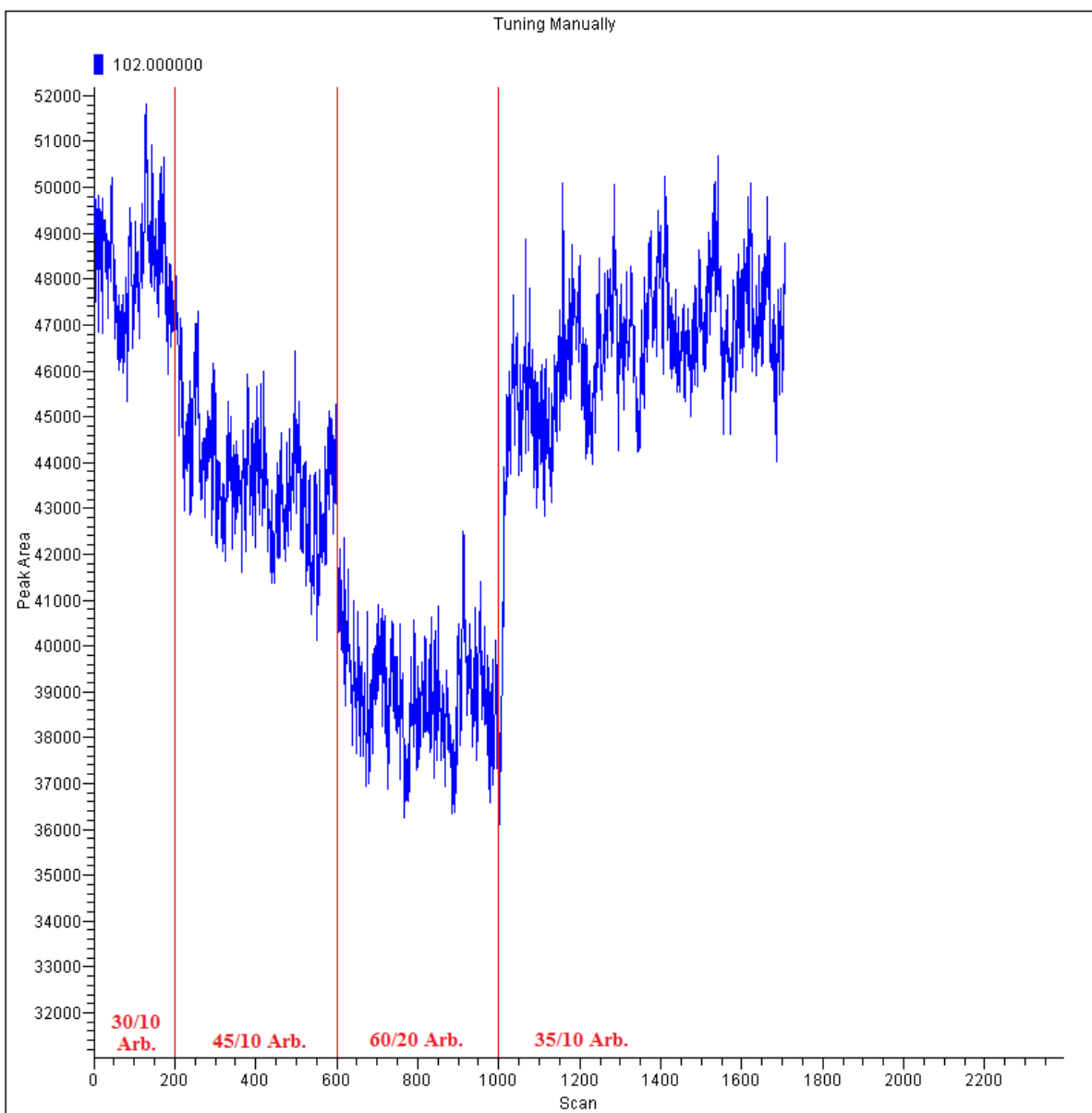
Obr. 22: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 300 °C a teplotě kapiláry 300 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).



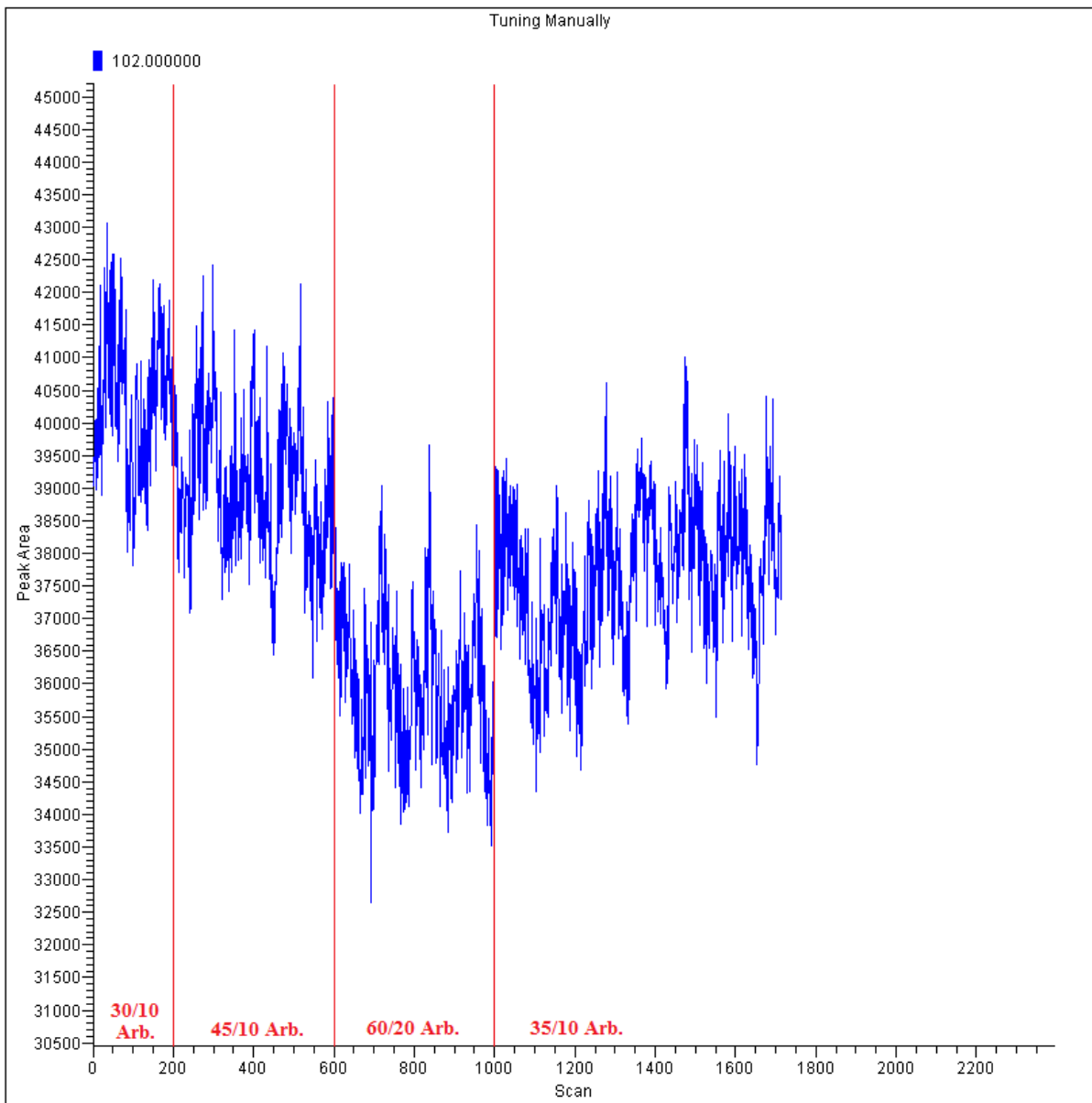
Obr. 23: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 300 °C a teplotě kapiláry 350 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).



Obr. 24: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 350 °C a teplotě kapiláry 250 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).

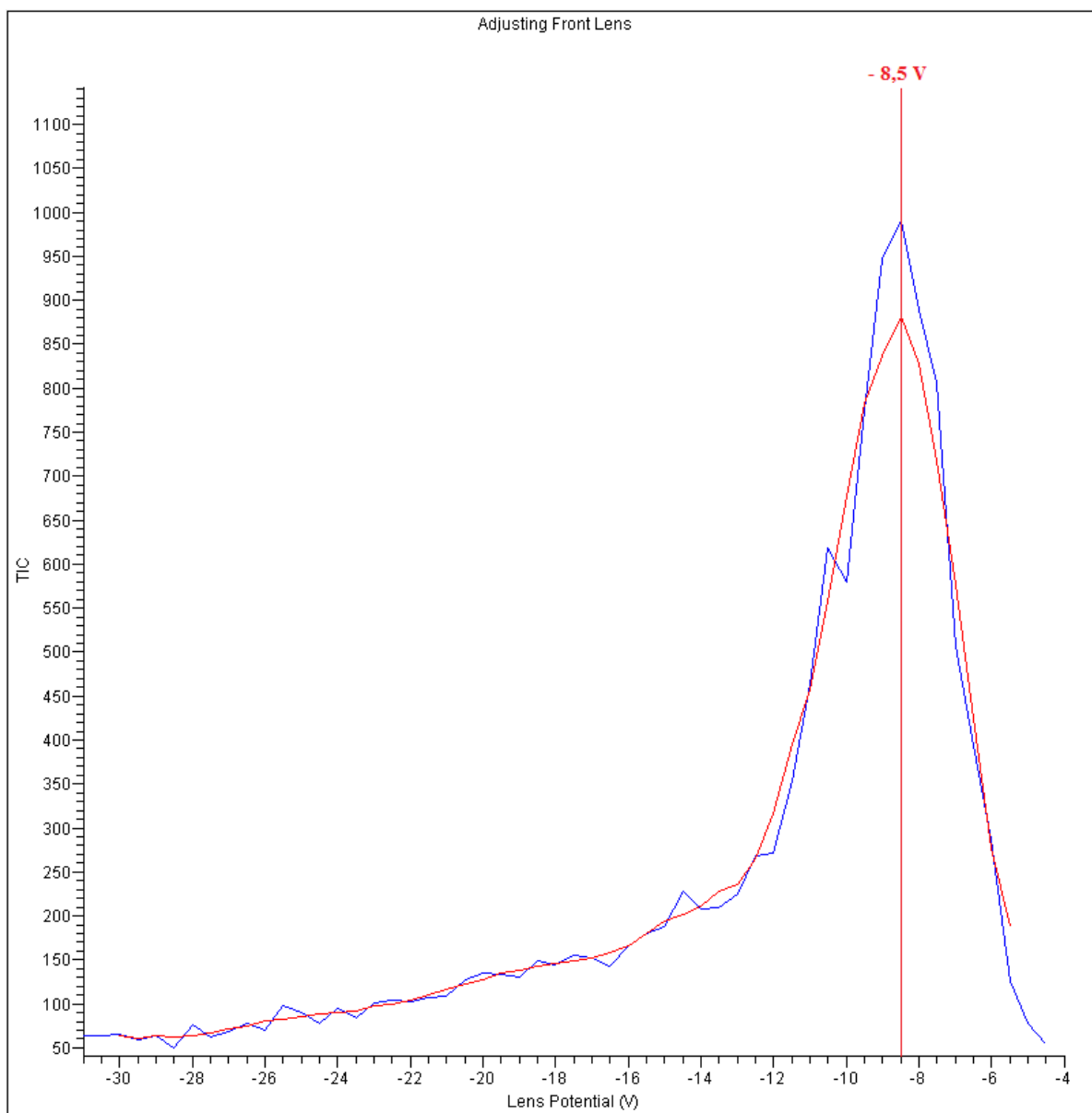


Obr. 25: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 350 °C a teplotě kapiláry 300 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).

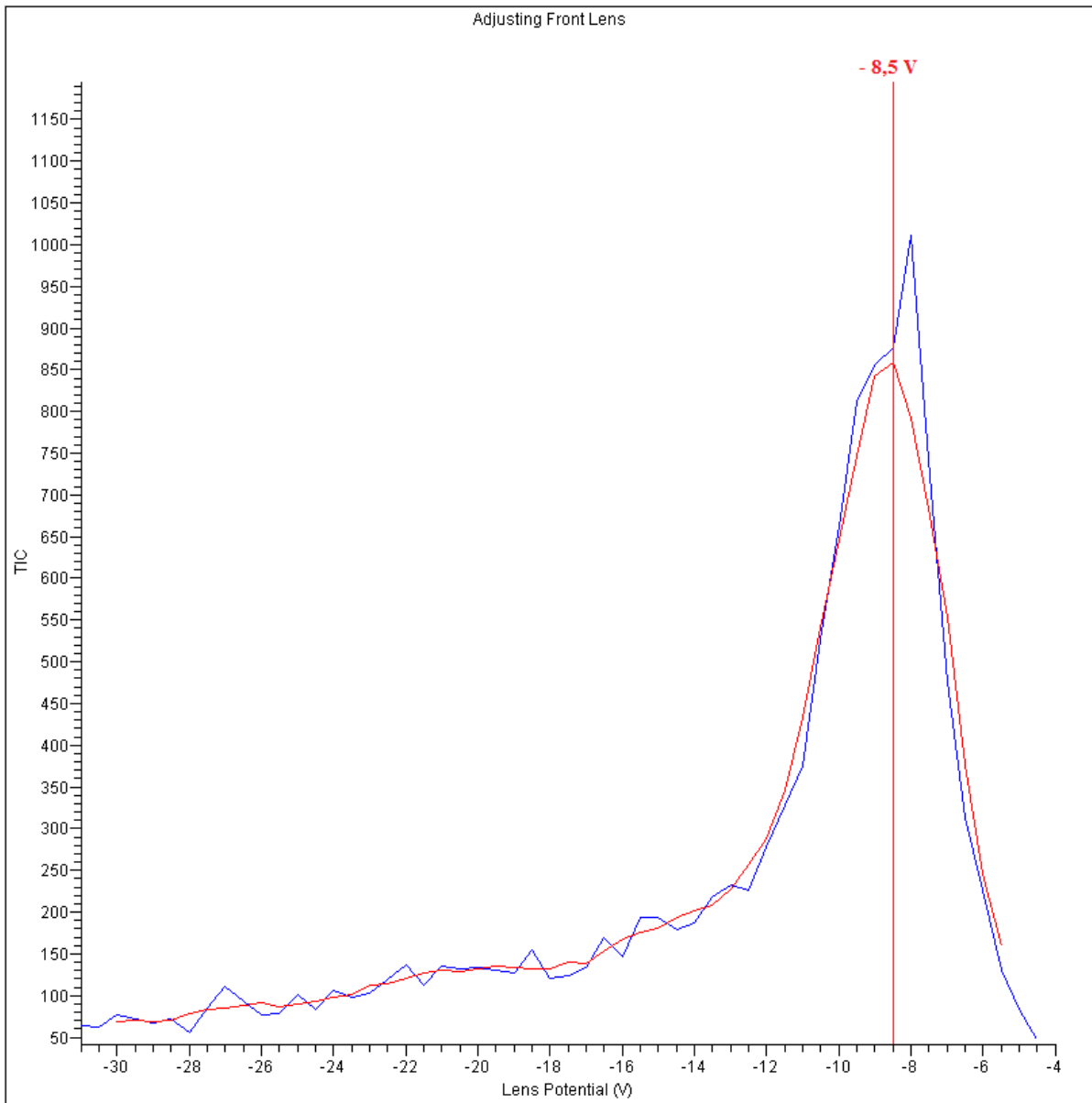


Obr. 26: Závislost plochy píku při teplotě transferové trubice 350 °C a teplotě kapiláry 350 °C na průběhu změn průtoků plynu S/A (poměry pro dané části jsou uvedeny v grafu).

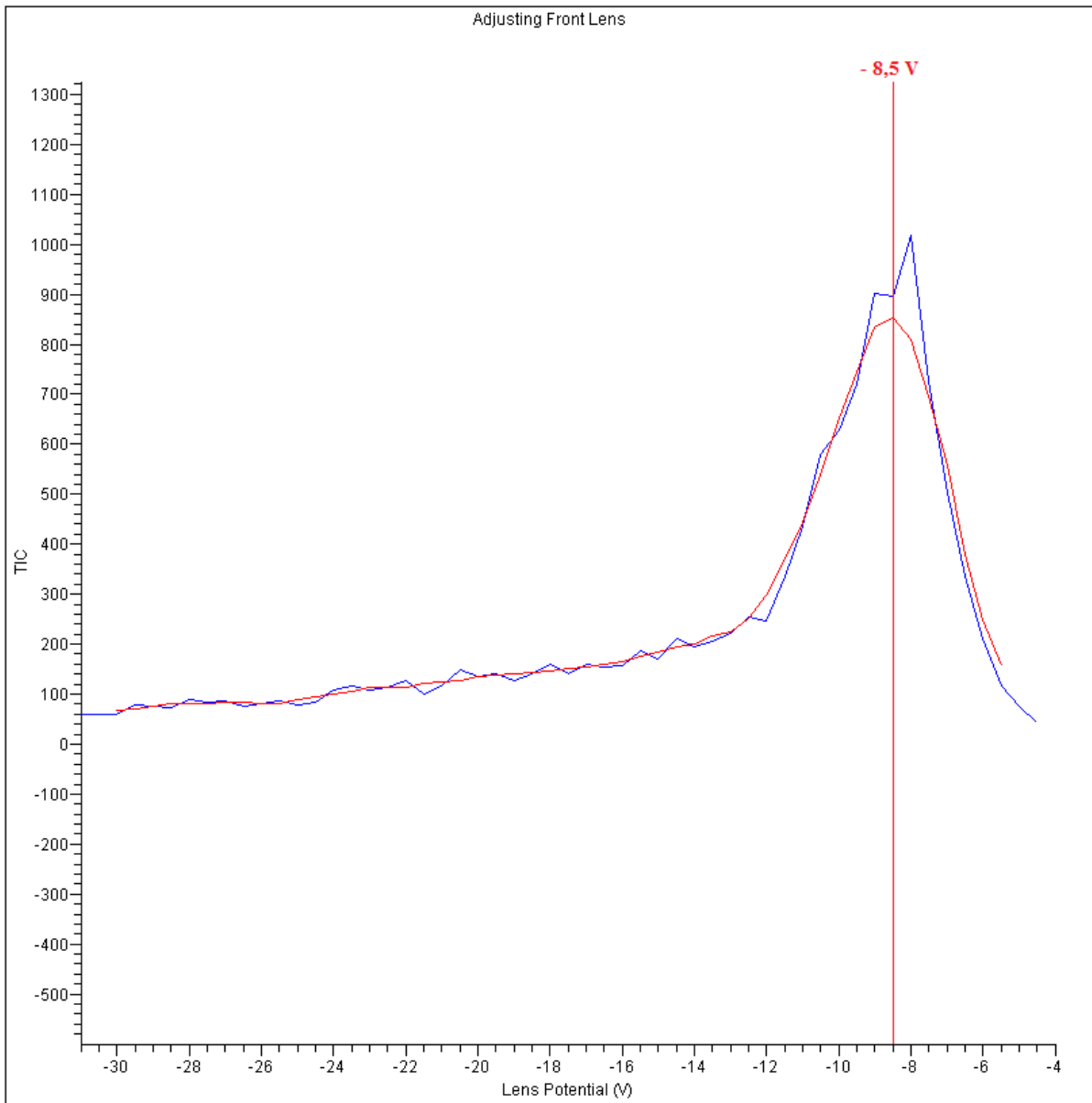
8.4 Příloha D



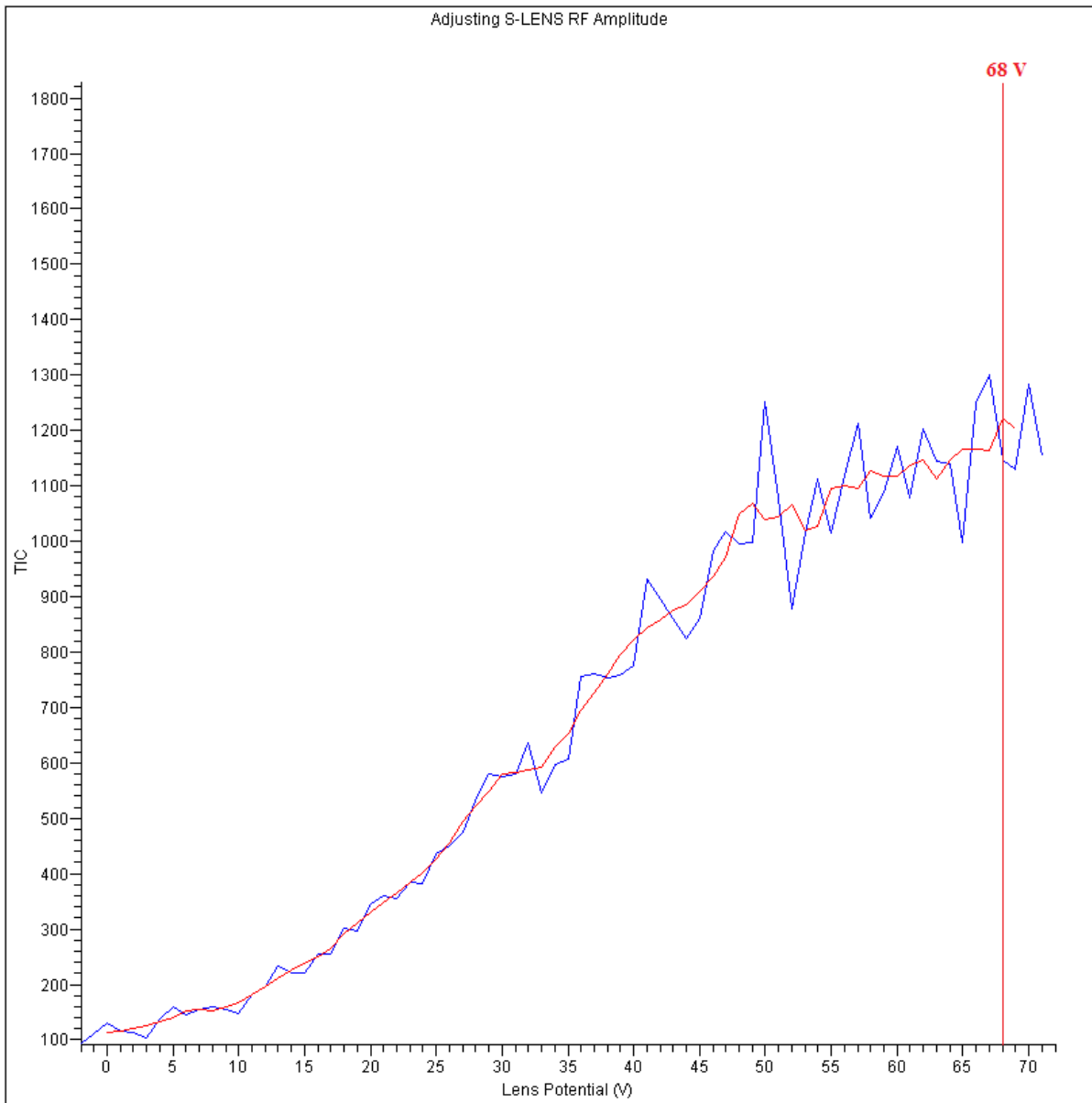
Obr. 27: Optimalizace potenciálu na F-čočkách pro BMAA (měření č. 1)



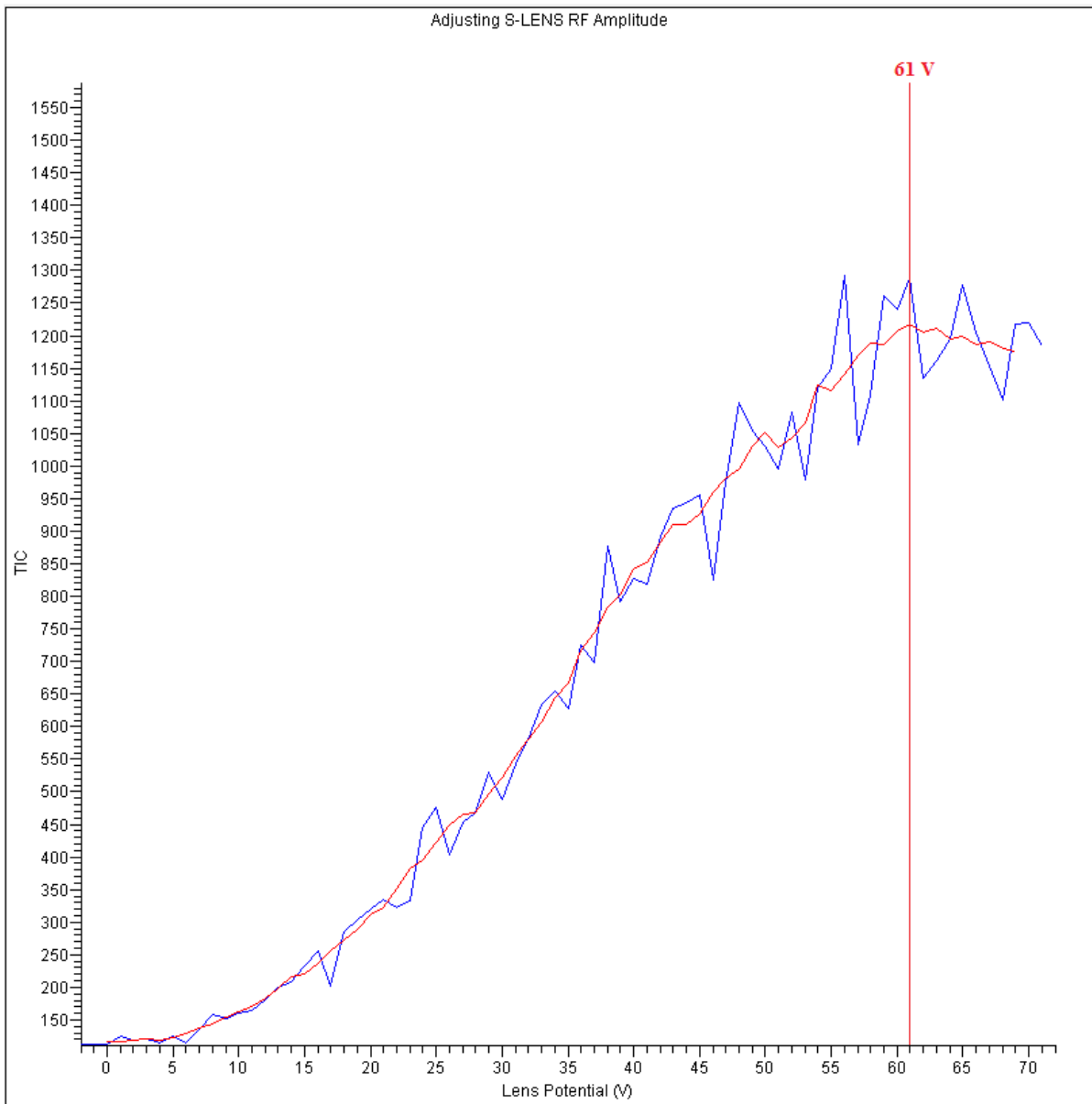
Obr. 28: Optimalizace potenciálu na F-čočkách pro BMAA (měření č. 2)



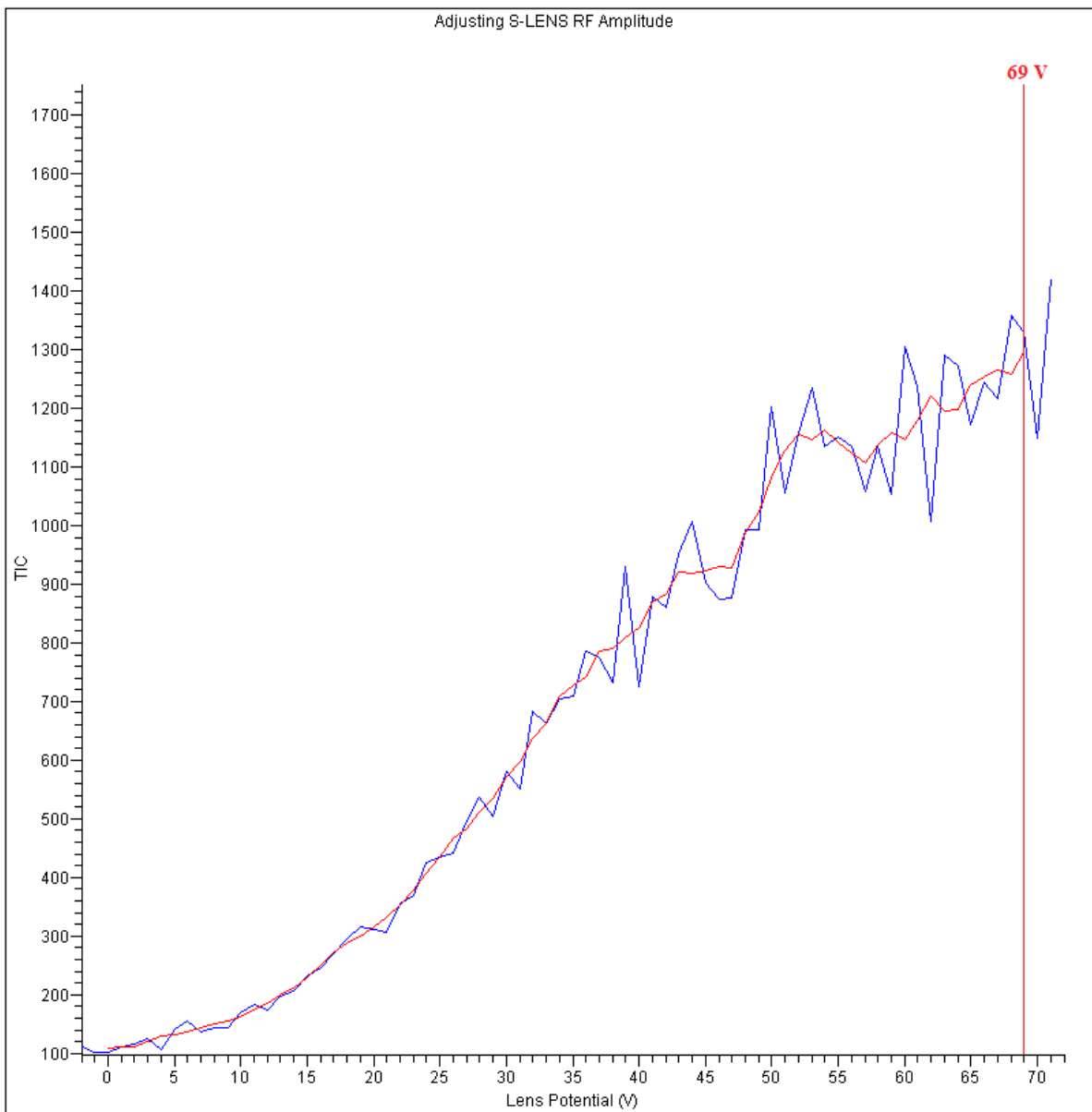
Obr. 29: Optimalizace potenciálu na F-čočkách pro BMAA (měření č. 3)



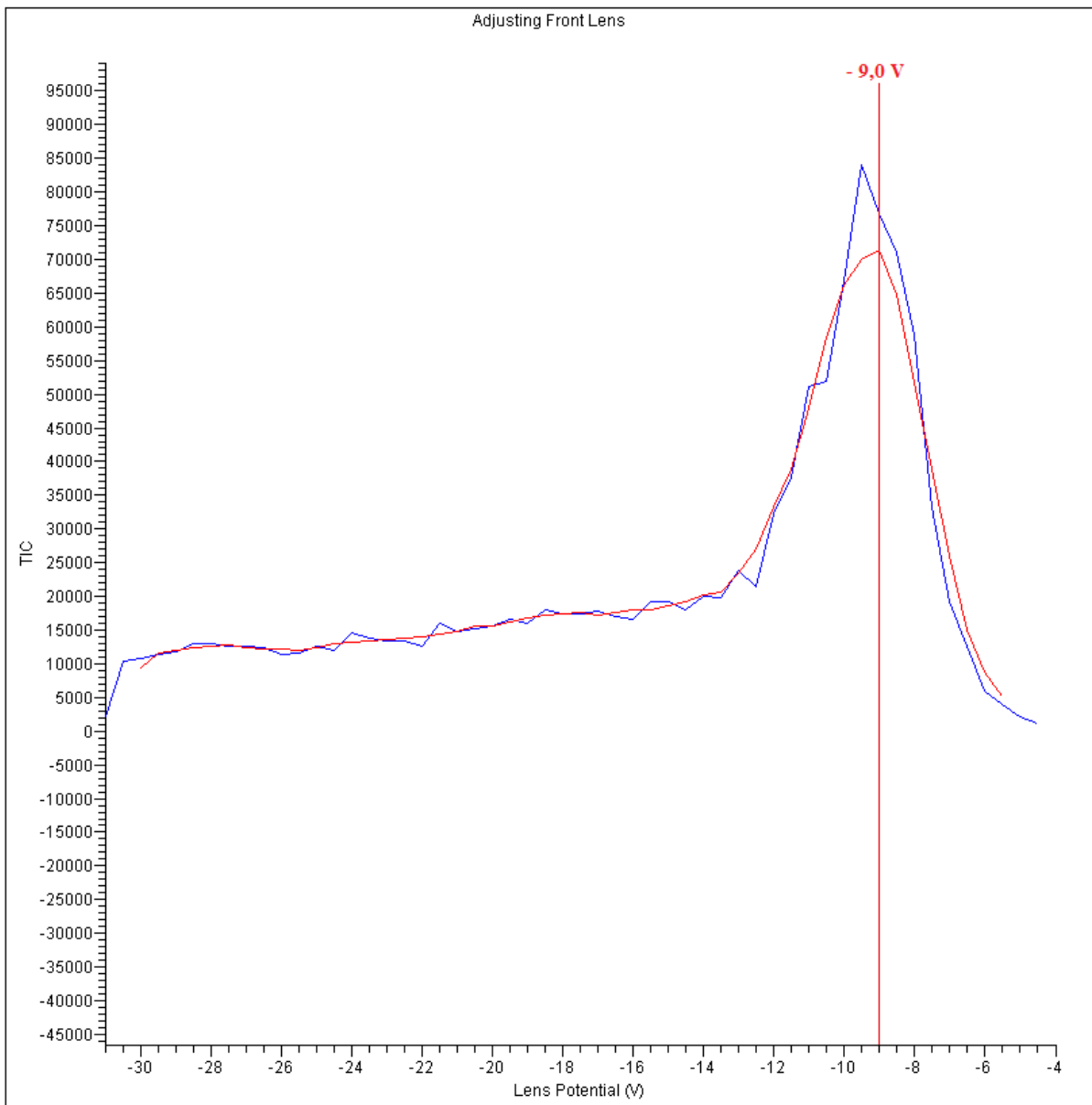
Obr. 30: Optimalizace potenciálu na S-čočkách pro BMAA (měření č. 1)



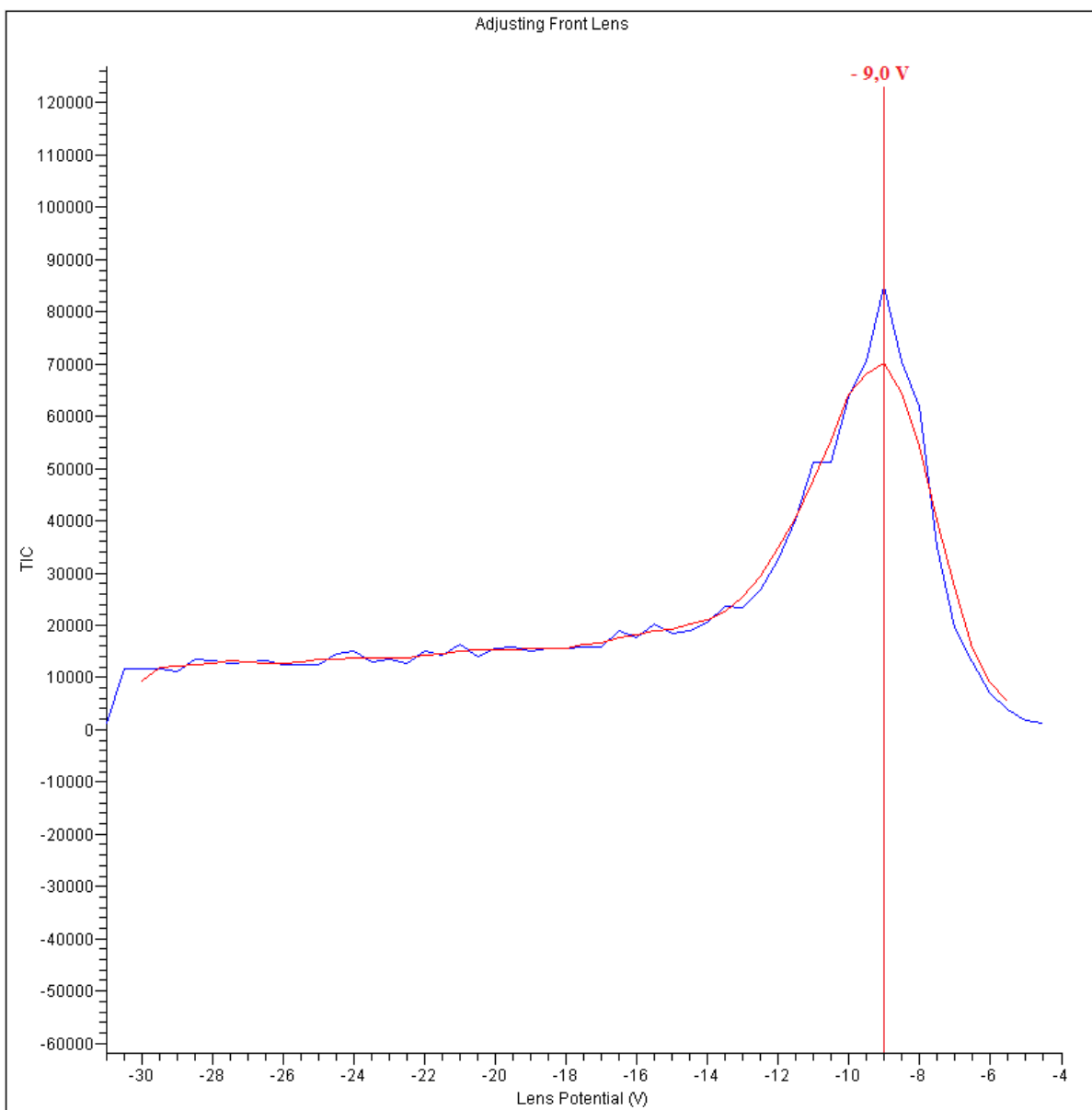
Obr. 31: Optimalizace potenciálu na S-čočkách pro BMAA (měření č. 2)



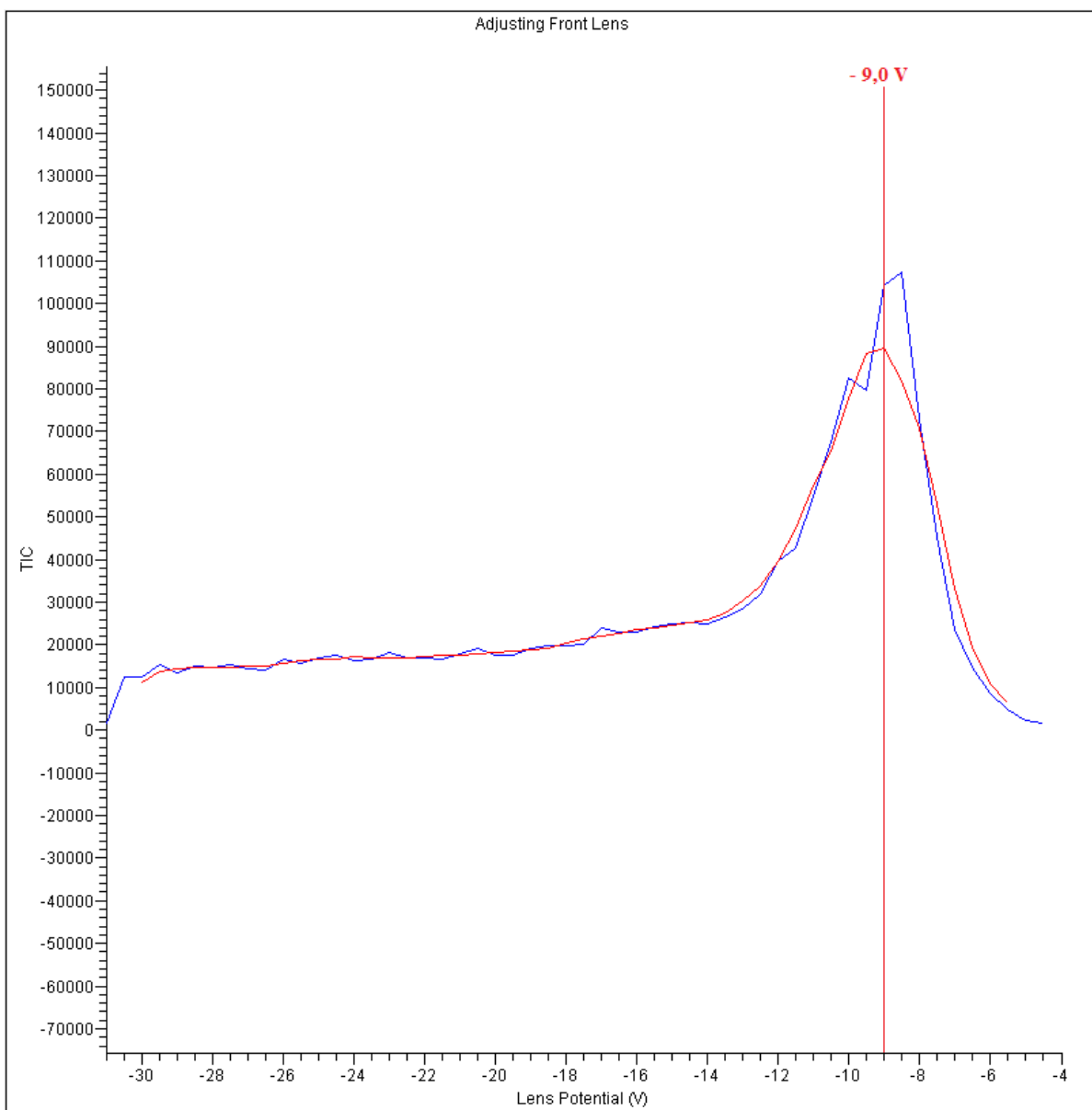
Obr. 32: Optimalizace potenciálu na S-čočkách pro BMAA (měření č. 3)



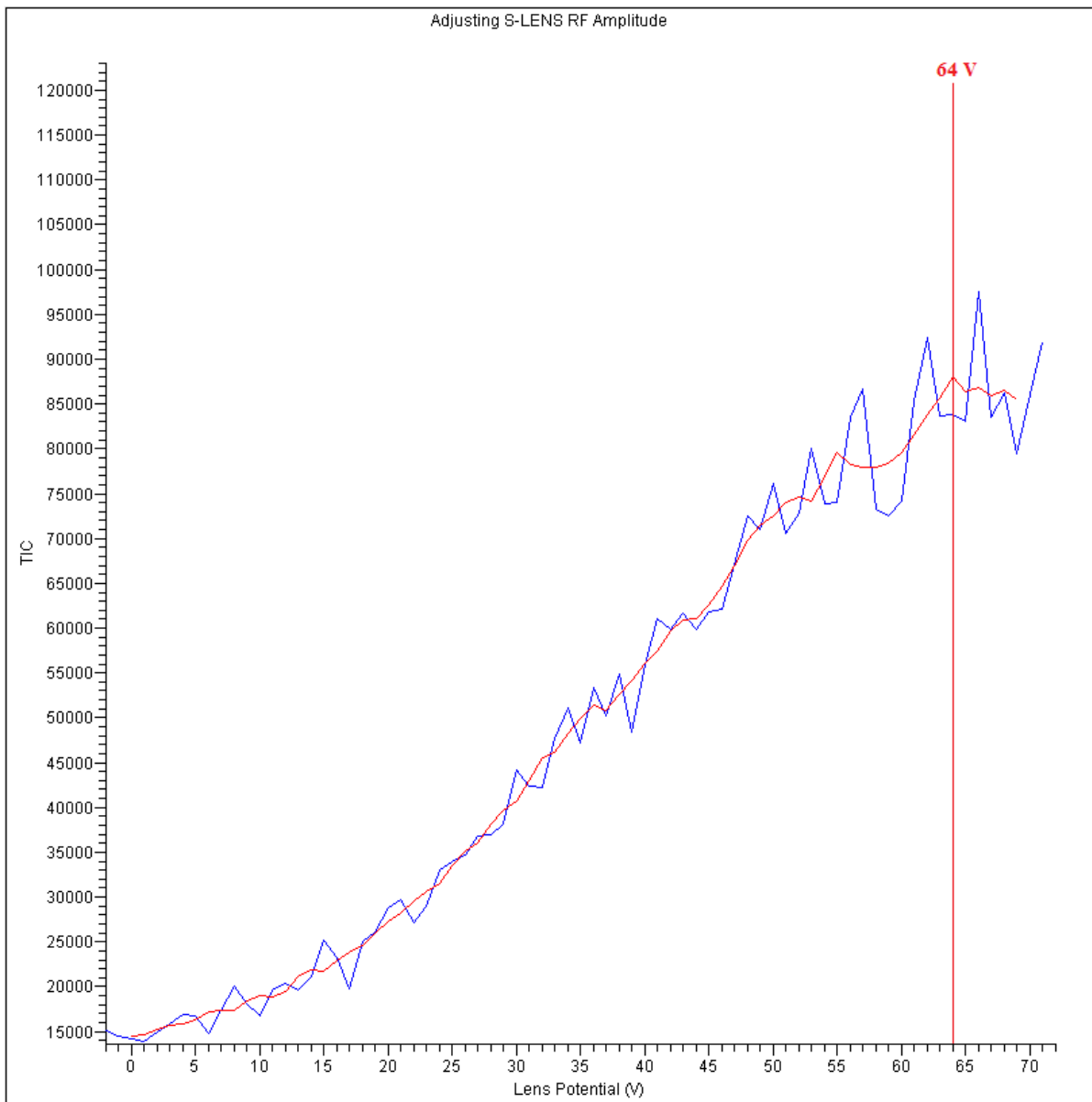
Obr. 33: Optimalizace potenciálu na F-čočkách pro D₄-DAB (měření č. 1)



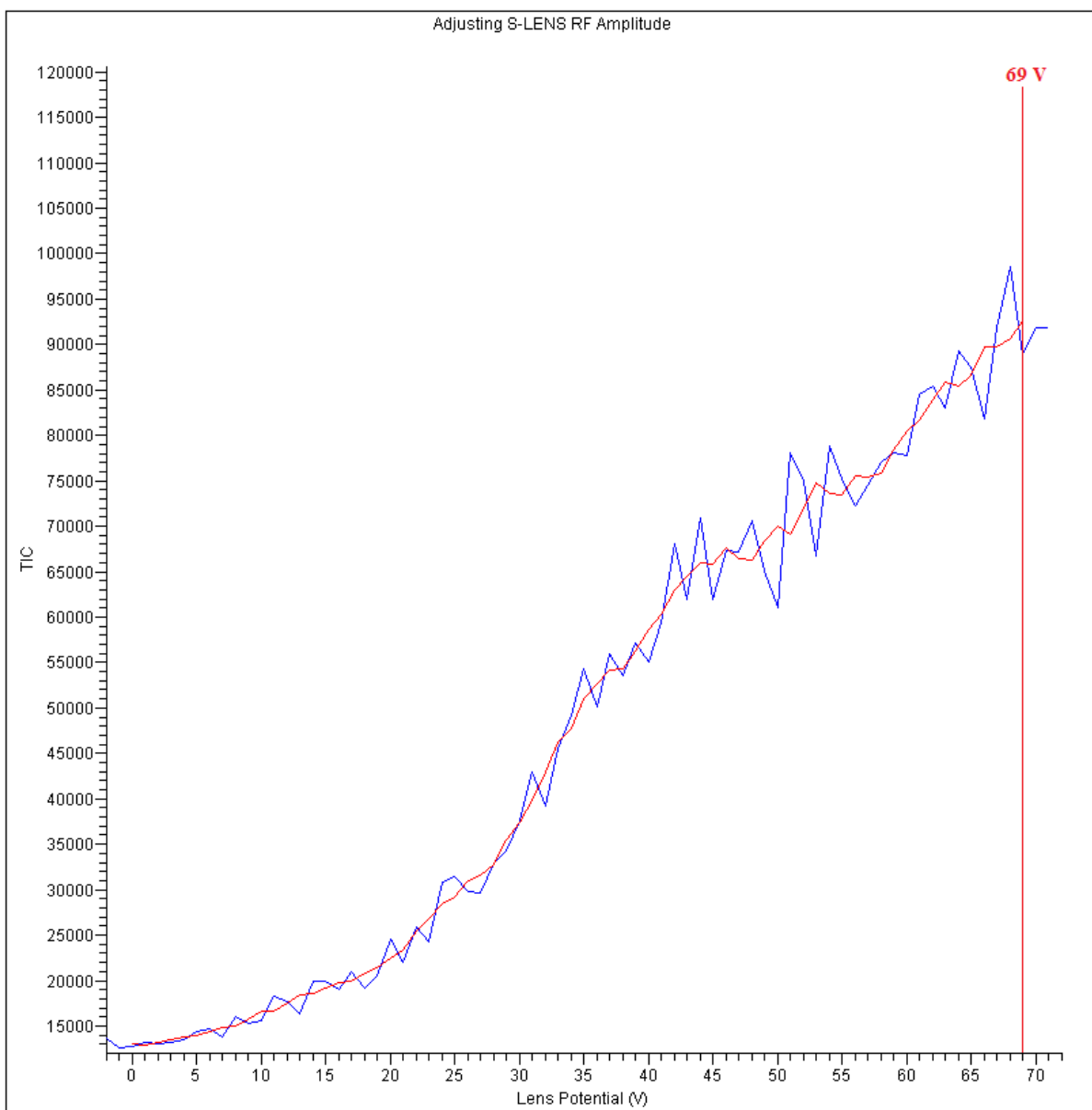
Obr. 34: Optimalizace potenciálu na F-čočkách pro D₄-DAB (měření č. 2)



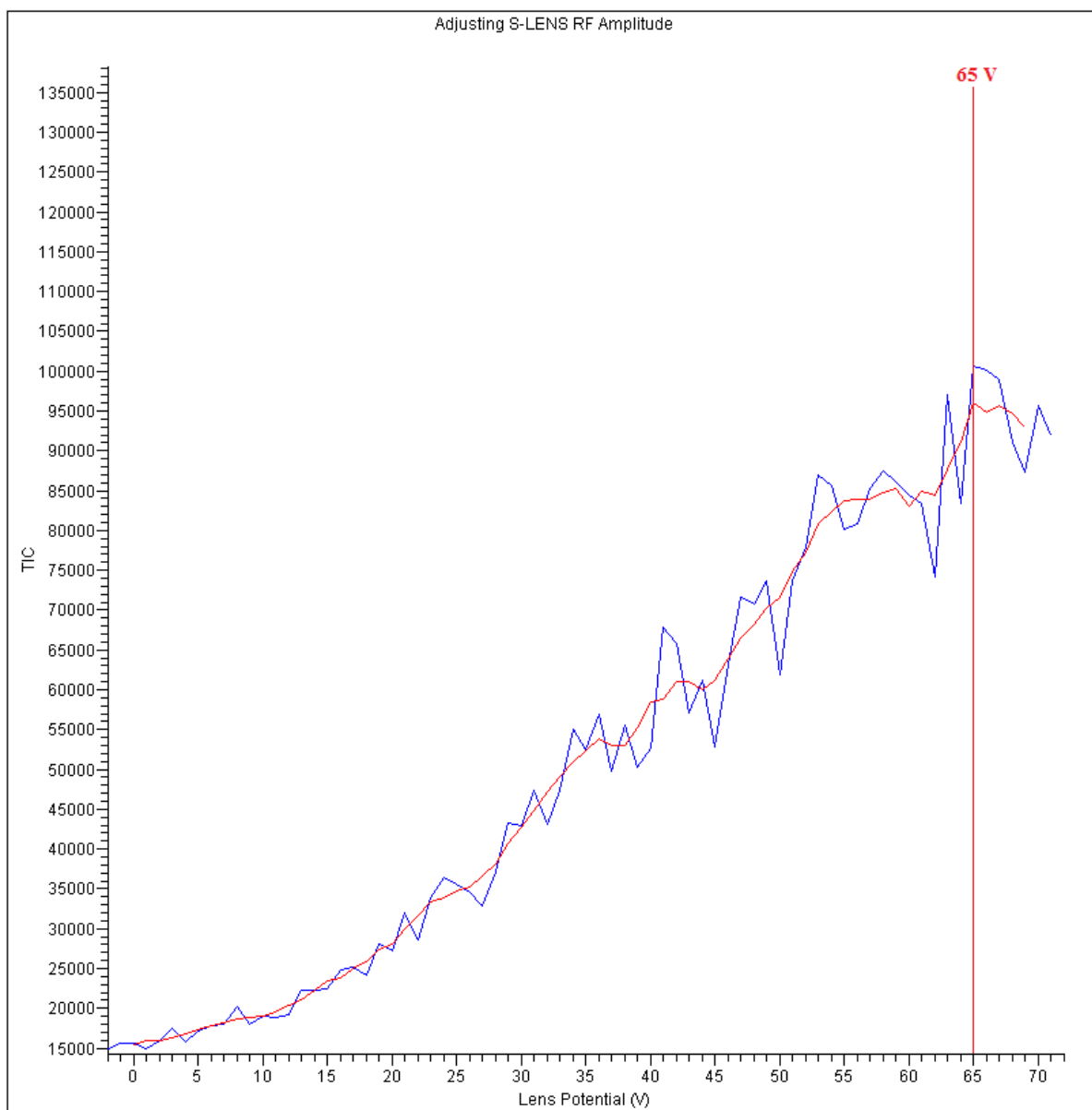
Obr. 35: Optimalizace potenciálu na F-čočkách pro D₄-DAB (měření č. 3)



Obr. 36: Optimalizace potenciálu na S-čočkách pro D₄-DAB (měření č. 1)

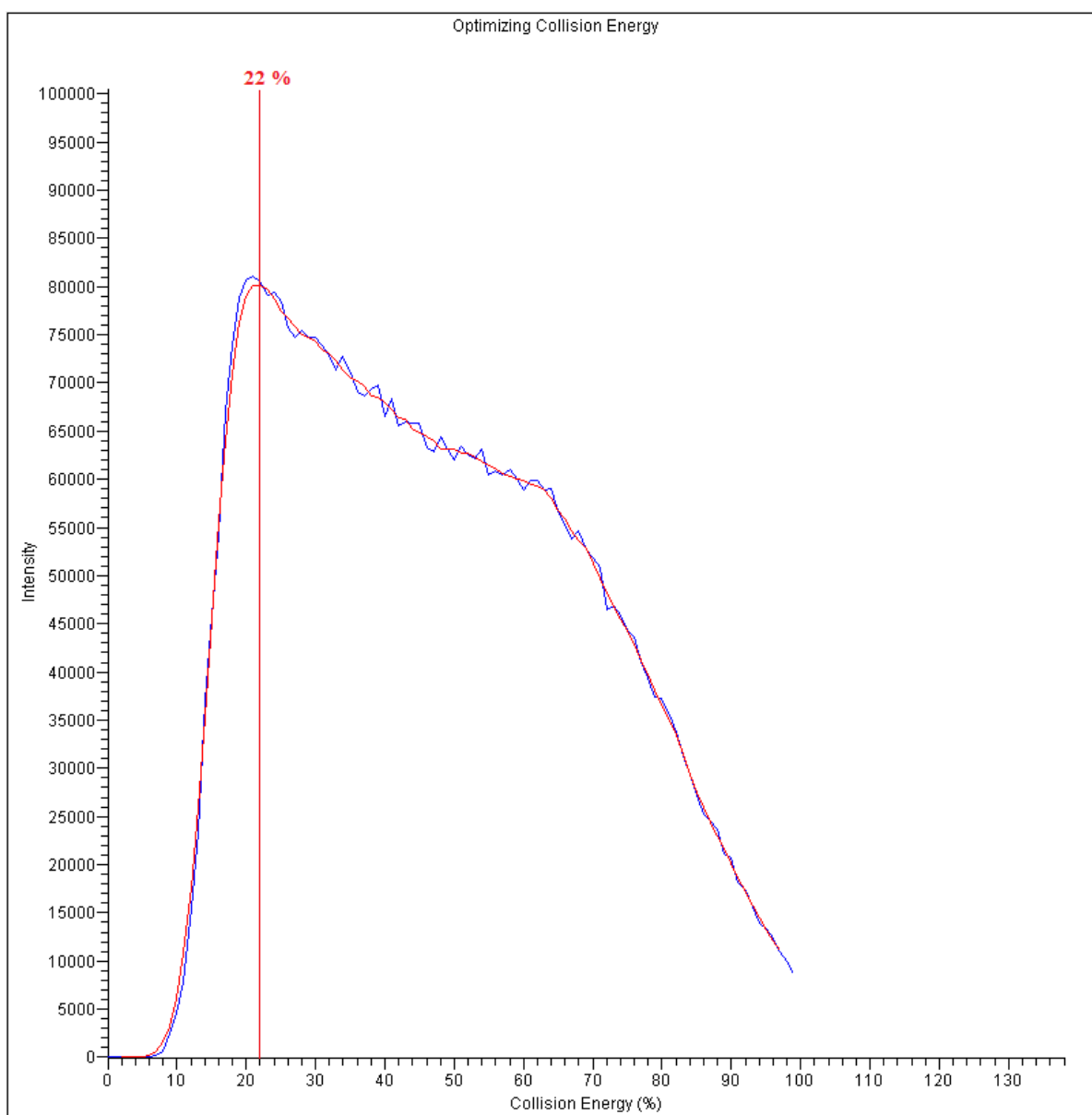


Obr. 37: Optimalizace potenciálu na S-čočkách pro D₄-DAB (měření č. 2)

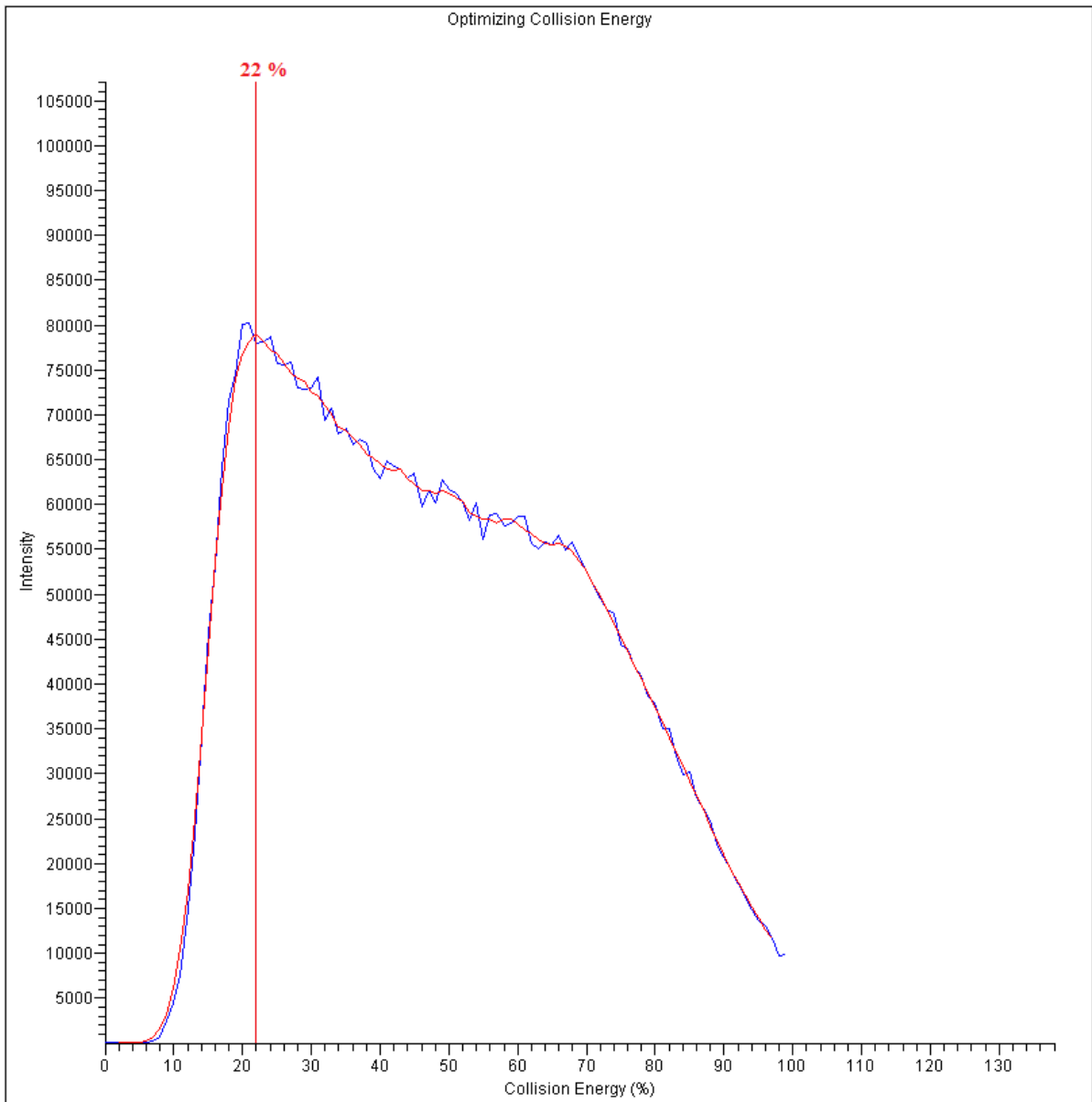


Obr. 38: Optimalizace potenciálu na S-čočkách pro D₄-DAB (měření č. 3)

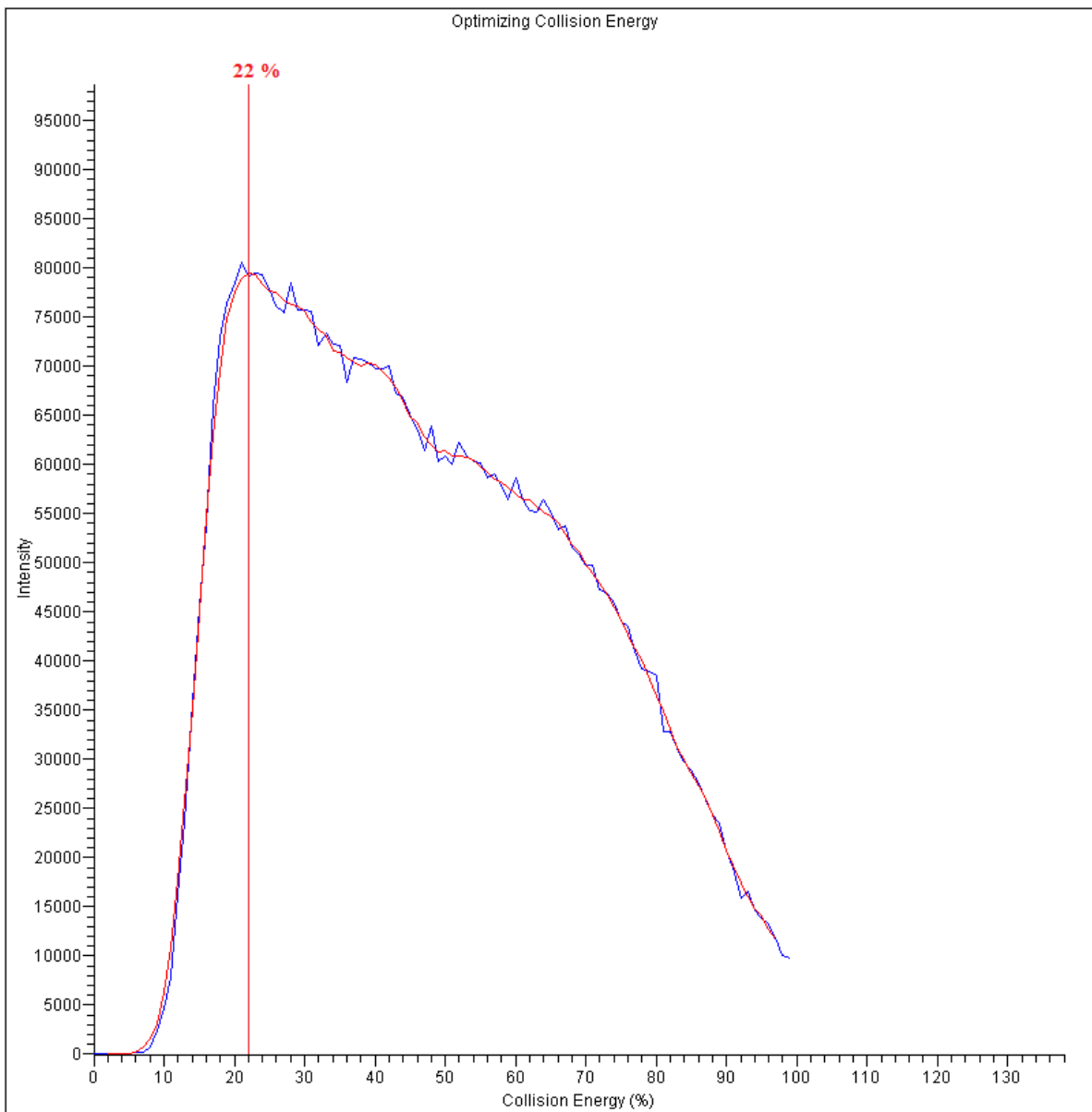
8.5 Příloha E



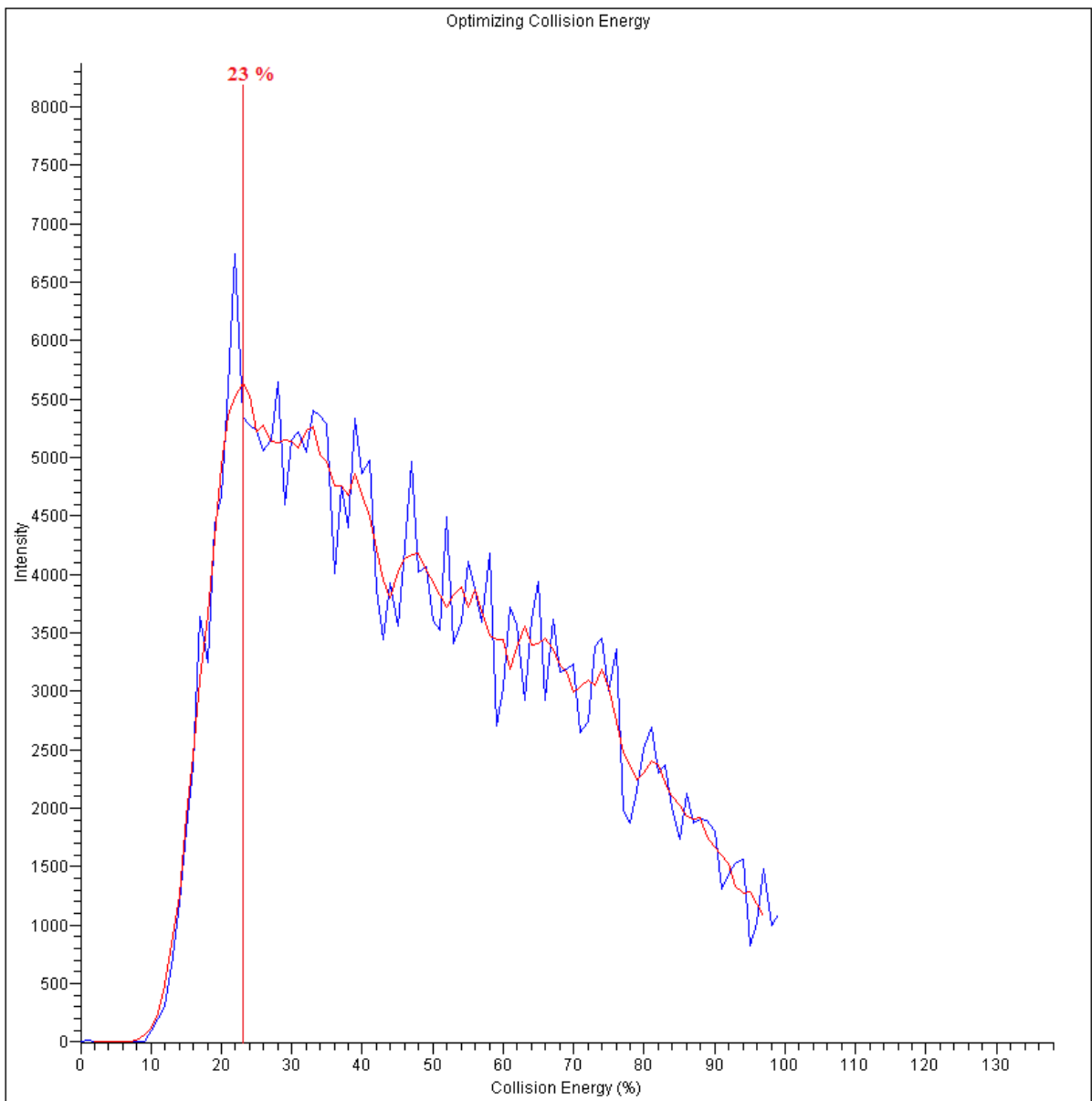
Obr. 39: Optimalizace kolizní energie pro přechod $119 \rightarrow 102$ (měření č. 1)



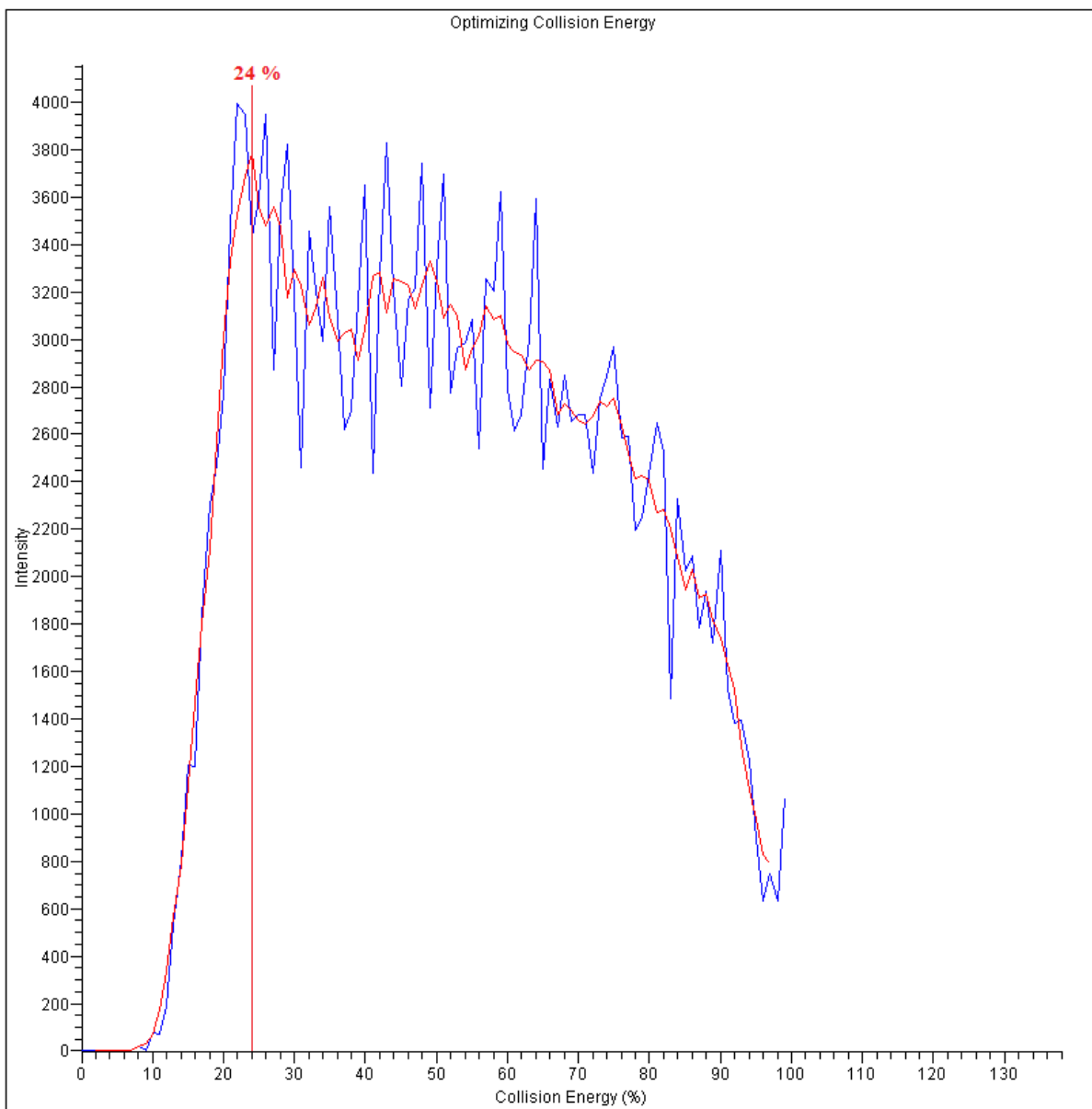
Obr. 40: Optimalizace kolizní energie pro přechod 119 → 102 (měření č. 2)



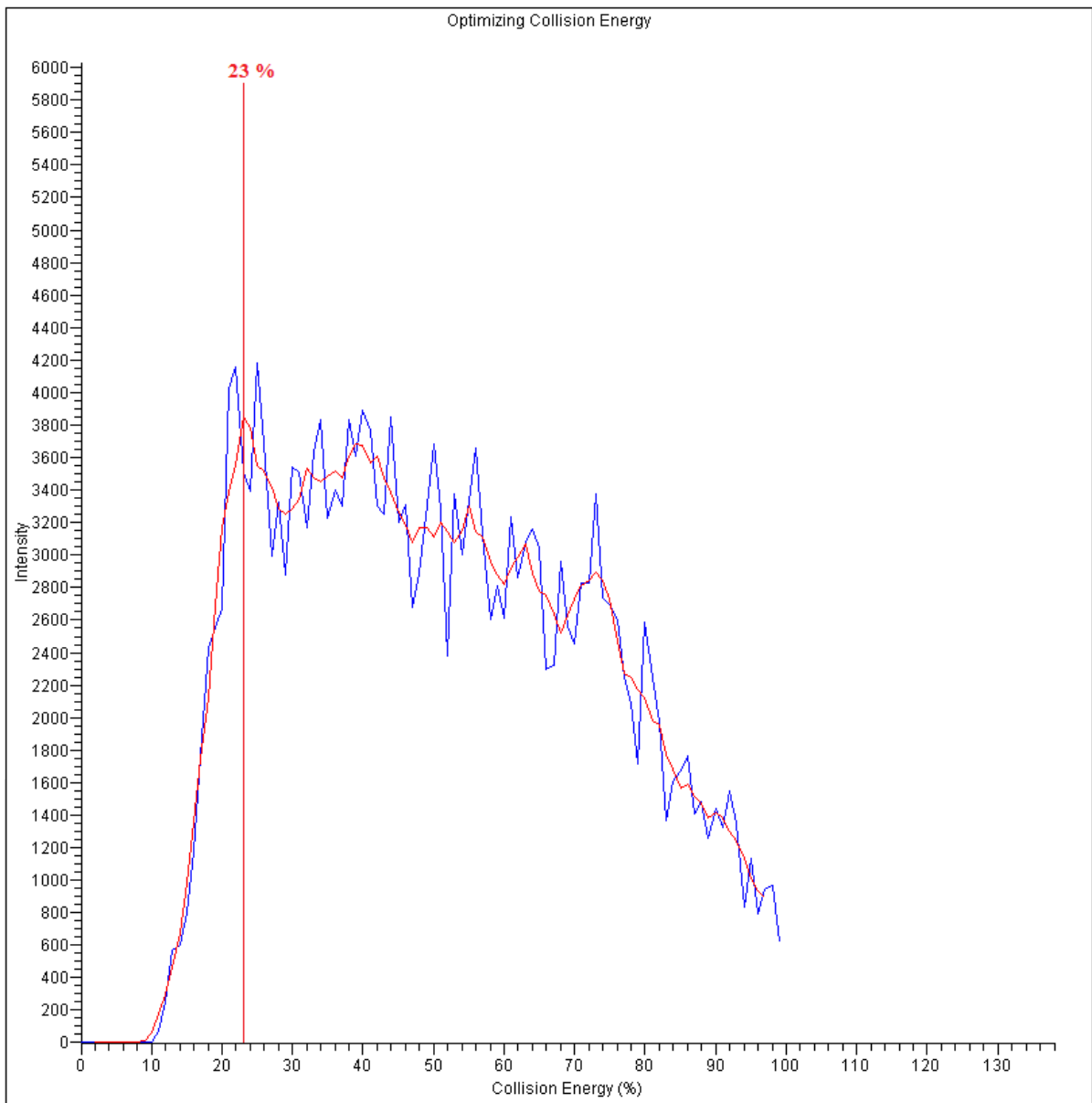
Obr. 41: Optimalizace kolizní energie pro přechod $119 \rightarrow 102$ (měření č. 3)



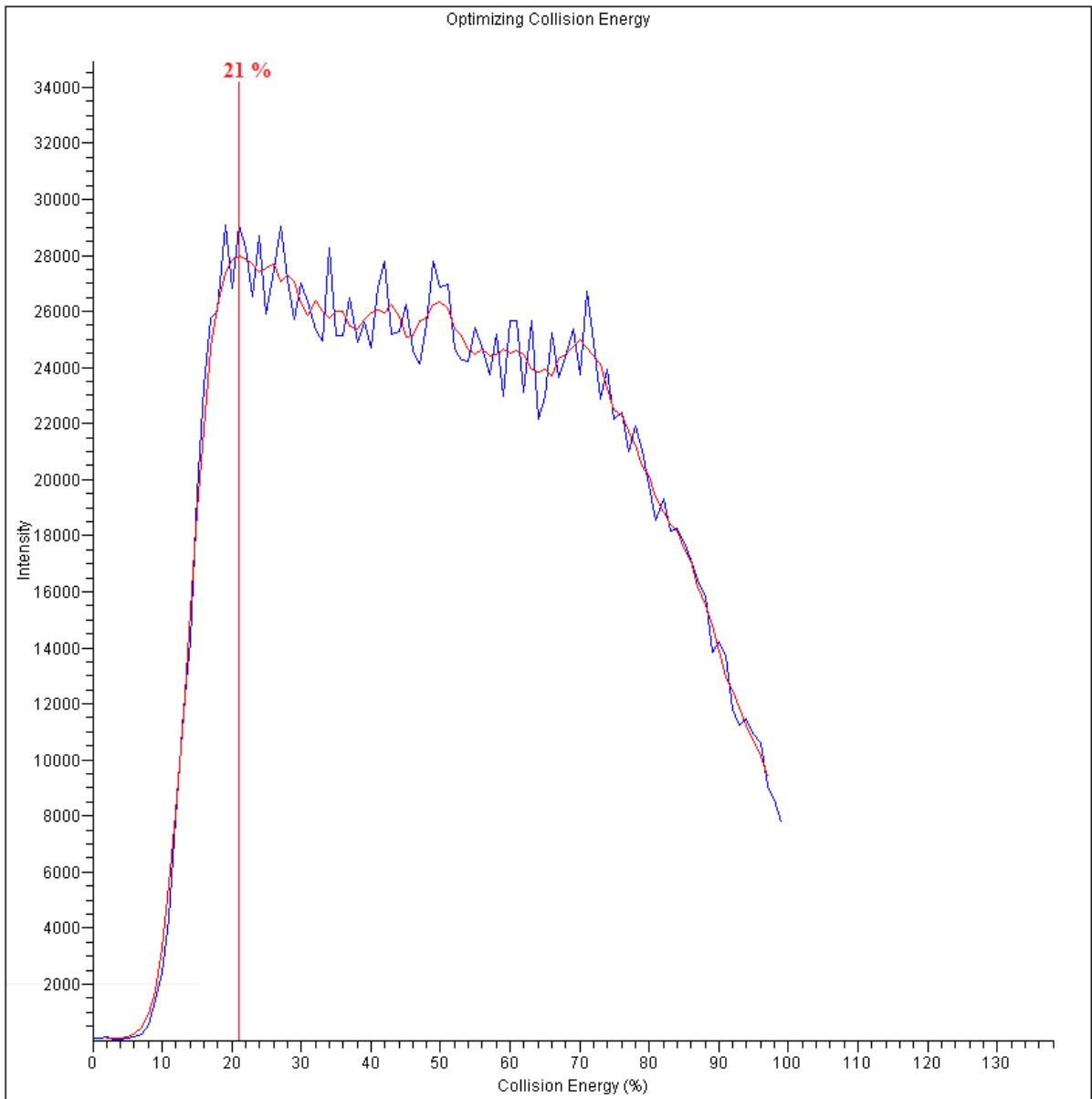
Obr. 42: Optimalizace kolizní energie pro přechod $119 \rightarrow 88$ (měření č. 1)



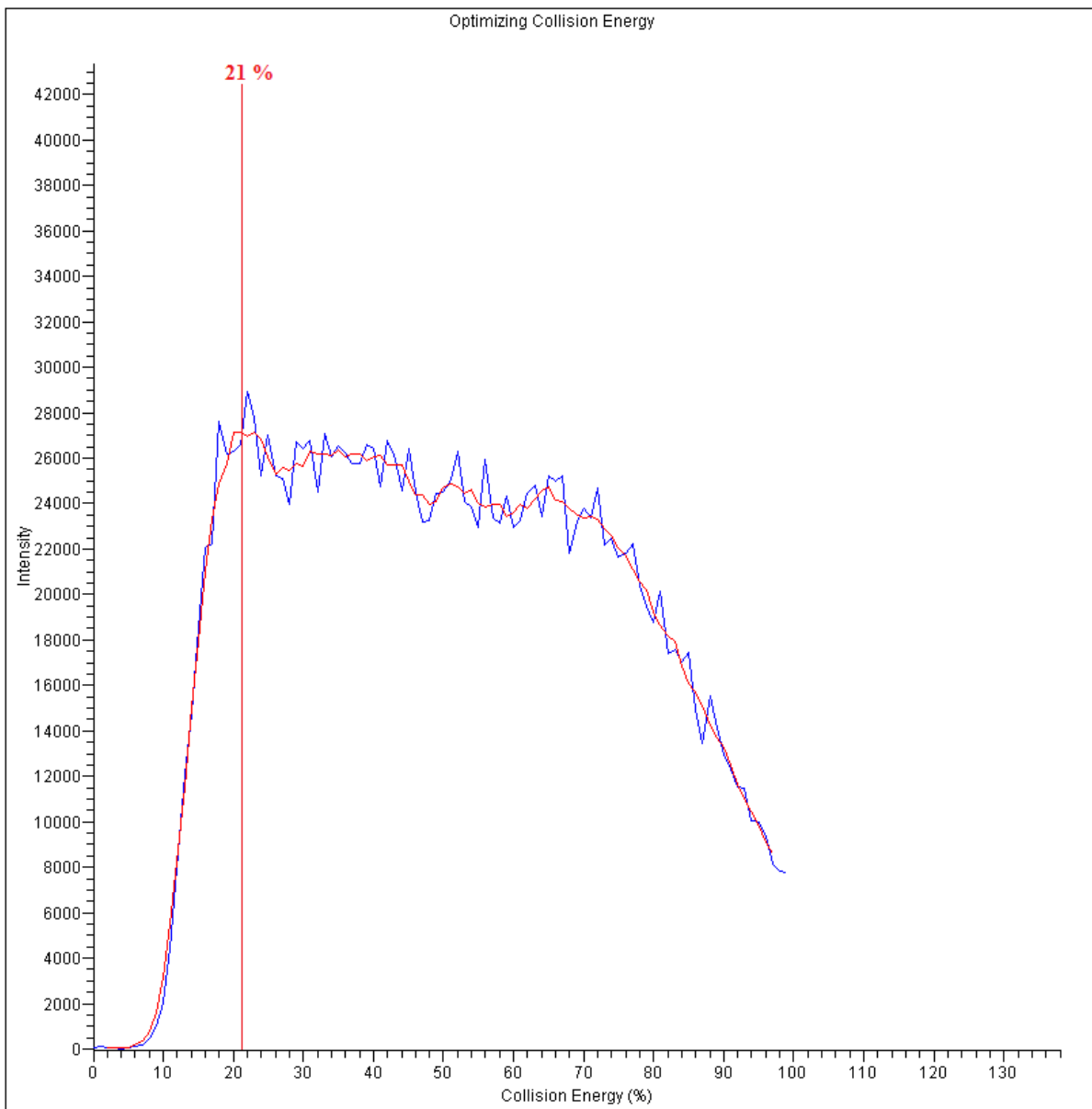
Obr. 43: Optimalizace kolizní energie pro přechod 119 → 88 (měření č. 2)



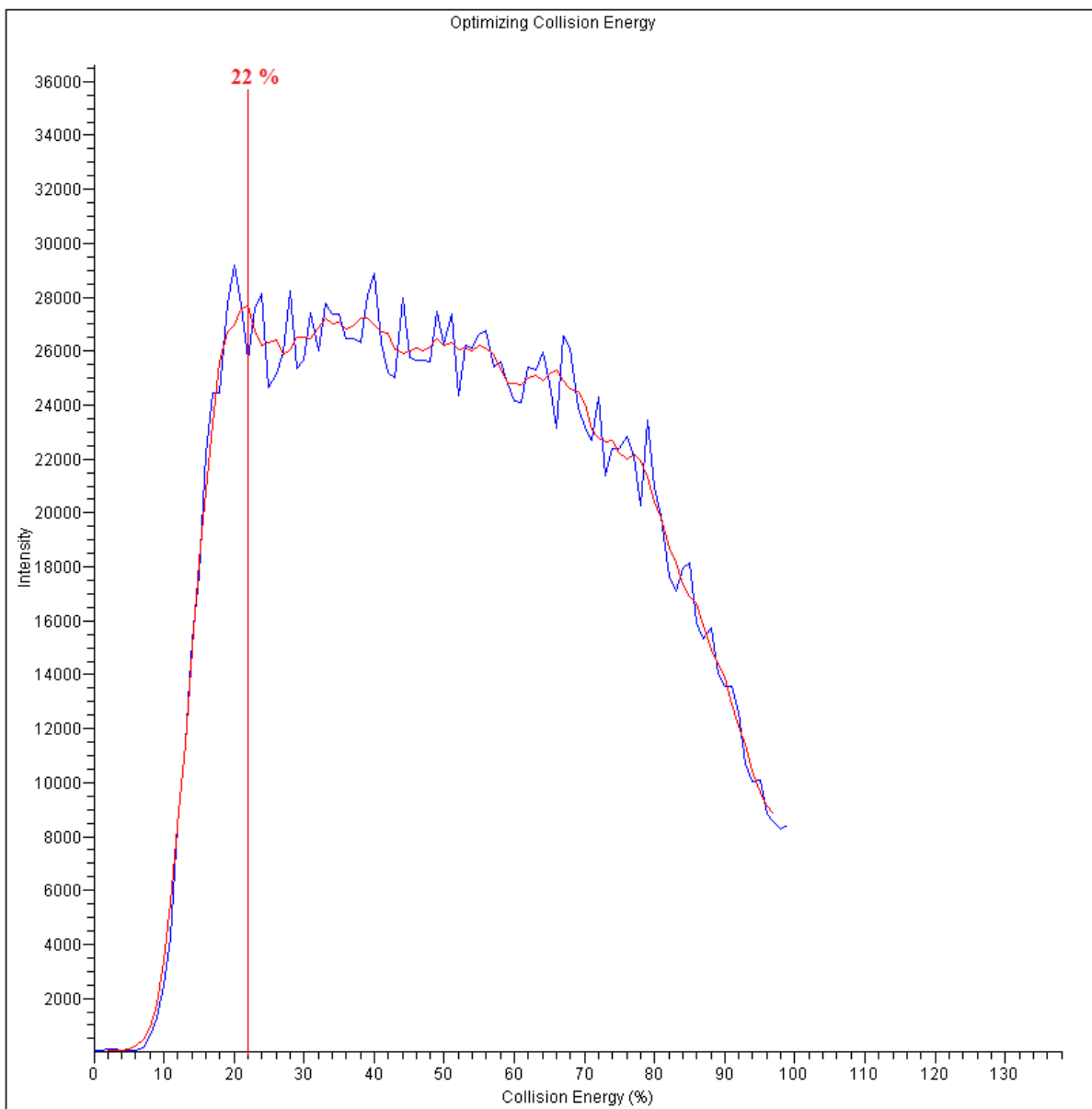
Obr. 44: Optimalizace kolizní energie pro přechod 119 → 88 (měření č. 3)



Obr. 45: Optimalizace kolizní energie pro přechod 123 → 105 (měření č. 1)



Obr. 46: Optimalizace kolizní energie pro přechod $123 \rightarrow 105$ (měření č. 2)



Obr. 47: Optimalizace kolizní energie pro přechod $123 \rightarrow 105$ (měření č. 3)

8.6 Příloha F

Tab. 26: Recept na přípravu média BG – zásobní roztoky.

č.	sloučenina	množství/objem
1	NaNO ₃	15,0 g/1000 ml
2	K ₂ HPO ₄	2,0 g/500 ml
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,75 g/500 ml
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,80 g/500 ml
5	Kyselina citrónová	0,30 g/500 ml
6	Citronan železito-amonný	0,30 g/500 ml
7	EDTA-Na ₂	0,05 g/500 ml
8	Na ₂ CO ₃	1,00 g/500 ml

Tab. 27: Recept na přípravu média BG – roztok mikroprvků (1000 ml).

č.	sloučenina	množství [g]
9	H ₃ BO ₃	2,86
	MnC ₂ ·H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,0
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,05

Roztok média BG získáme smícháním 100 ml zásobního roztoku č. 1, 10 ml každého ze zásobních roztoků č. 2 až 8 a 1 ml zásobního roztoku č. 9. Doplníme deionizovanou vodou na výsledný objem 1000 ml.

Tab. 28: Recept na přípravu média Z – zásobní roztoky.

č.	sloučenina	množství/objem
1	NaNO ₃	46,7 g/1000 ml
2	K ₂ HPO ₄	3,1 g/1000 ml
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5 g/1000 ml
4	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5,9 g/1000 ml
5	Na ₂ CO ₃	2,1 g/1000 ml
6	Fe EDTA	2,2 ml 35% HCl + 250 ml H ₂ O + 4,5 g FeCl ₃ .6H ₂ O + 4,65 g Na ₂ EDTA

Tab. 29: Recept na přípravu média Z – roztok mikroprvků (100 ml).

č.	sloučenina	množství [g]
7	H ₃ BO ₃	0,31
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,223
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0287
	Na ₂ WO ₃ .2H ₂ O	0,003
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0125
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,0146
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,0088
	KBr	0,0119
	KI	0,0083
	Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,0154
	NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	0,0198
	Cr(NO ₃) ₂ .7H ₂ O	0,0037
	V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ .16H ₂ O	0,0035
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .24H ₂ O	0,0474	

Roztok média Z získáme smícháním 10 ml každého ze zásobních roztoků č. 1 až 5; 0,2 ml zásobního roztoku č. 6 a 0,08 ml roztoku č. 7. Doplníme deionizovanou vodou na výsledný objem 1000 ml.