

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

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

Diplomová práce

Bc. Karel Hořejší

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

České Budějovice 2018

Hořejší, K., 2018: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě a sinicích pomocí LC/MS. [Development, optimization and validation of an analytical method for determination of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in water and cyanobacteria using LC/MS. Mgr. Thesis, in Czech.] – 95 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This master thesis deals with the development, optimization and validation of an analytical method for determination of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in pond water and cyanobacteria using LC/MS. Firstly, basic parameters of the analytical method developed within authors's bachelor thesis were verified. Following parameters were selected for verification: selection of suitable MRM transitions, voltage applied to S-lens and F-lens and standardized collision energy. Secondly, the system suitability testing was performed. Thirdly, the analytical method was successfully validated. Then, the testing and optimization of solid phase extraction for analysis of water samples were carried out. The pH of sample solution and composition of elution solution were chosen for the optimization. In addition, the trichloroacetic acid extraction with acid hydrolysis for cyanobacterial samples was carried out too. Finally, both solid phase extraction and trichloroacetic acid extraction were evaluated and applied to the analysis of real samples.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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.

Klíčová slova

β -N-methylamino-L-alanin, extrakce kyselinou trichlorooctovou, extrakce tuhou fází, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, neurodegenerativní onemocnění, optimalizace, testování vhodnosti systému, validace

Key words

β -N-methylamino-L-alanine, trichloroacetic acid extraction, solid phase extraction, mass spectrometry, liquid chromatography, neurodegenerative diseases, optimization, system suitability testing, validation

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé diplomové 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 dodání reálných vzorků povrchové vody a sinic, a své rodině a přítelkyni za podporu a pomoc.

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	β -N-methylamino-L-alanin (BMAA)	2
2.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti	2
2.1.2	Tvorba karbamátů	4
2.1.3	Výskyt, produkce a bioakumulace	5
2.1.4	Toxicita BMAA	7
2.1.5	Neurotoxicita BMAA – <i>in vitro</i> studie	8
2.1.6	Neurotoxicita BMAA – <i>in vivo</i> studie	9
2.2	Extrakce na tuhé fázi (SPE)	11
2.2.1	Sorbenty vhodné pro stanovení BMAA	12
2.2.2	Obecný postup extrakce bazických analytů na MCX sorbentu	14
2.3	Extrakce trichloroctovou kyselinou (TCA)	15
2.4	Porovnání metod na stanovení β -N-methylamino-L-alaninu (BMAA)	16
2.4.1	Možnosti stanovení BMAA ve vodě	16
2.4.2	Možnosti stanovení BMAA v sinicích	19
3	MATERIÁL A METODY	21
3.1	Použité chemikálie a činidla	21
3.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál	21
3.3	Příprava činidel, roztoků standardů, obohacených a reálných vzorků	24
3.3.1	Příprava zásobních roztoků standardů	24
3.3.2	Příprava pracovních roztoků standardů	24
3.3.3	Příprava referenčního roztoku standardů	24
3.3.4	Příprava kalibračních roztoků standardů	25
3.3.5	Příprava obohaceného roztoku standardů pro účely testování výtěžnosti extrakce	27
3.3.6	Příprava obohacených roztoků standardů pro účely optimalizace pH vzorku	27
3.3.7	Příprava obohaceného roztoku standardů pro optimalizaci elučního činidla	28
3.3.8	Příprava elučních činidel pro účely optimalizace složení elučního činidla	28
3.3.9	Příprava obohaceného vzorku rybníční vody – optimalizace objemu vzorku	28
3.3.10	Příprava roztoku kyseliny trichloroctové	29
3.3.11	Příprava obohacených vzorků sinic	29
3.4	Příprava SPE kolonek	30
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1	Ověření vybraných podmínek hmotnostní detekce	31

4.1.1	Hodnocení ionizace, fragmentace a volba molekulárních a fragmentových iontů	31
4.1.2	Elektrické napětí na S-čočkách a F-čočkách	34
4.1.3	Energie kolizně indukované disociace	35
4.1.4	Souhrn optimálních podmínek	37
4.2	Test vhodnosti systému.....	39
4.3	Validace analytické metody	41
4.3.1	Linearita.....	42
4.3.2	Správnost a přesnost	43
4.3.3	Rozsah	44
4.3.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti	44
4.4	Optimalizace SPE extrakce.....	45
4.4.1	Testování výtěžnosti extrakce dle obecného postupu výrobce.....	46
4.4.2	Optimalizace pH vzorku	47
4.4.3	Optimalizace složení elučního činidla	48
4.4.4	Optimalizace objemu vzorku	53
4.5	Optimalizace extrakce kyselinou trichloroctovou s kyselou hydrolyzou	55
4.5.1	Testování výtěžnosti extrakce – volná frakce BMAA.....	56
4.5.2	Optimalizace hydrolyzy vzorku – vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové	58
4.6	Testování metody na reálných vzorcích	61
4.6.1	Analýza obohacených vzorků rybníční vody	61
4.6.2	Analýza obohacených vzorků sinic	62
4.6.3	Mez detekce (MDL) a mez stanovitelnosti (MQL) metody	63
4.6.4	Analýza reálných vzorků rybníční vody.....	64
4.6.5	Analýza reálných vzorků sinic	65
5	ZÁVĚR	66
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	73
8	PŘÍLOHY	75
8.1	Příloha A	75
8.2	Příloha B	76
8.3	Příloha C	80
8.4	Příloha D	85
8.5	Příloha E	88
8.6	Příloha F	94

1 CÍLE PRÁCE

- vypracovat literární rešerši na dané téma
- provést testování alespoň dvou různých způsobů extrakce neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu z vody a sinic, provést jejich základní optimalizaci a jejich následné hodnocení
- použít analytickou metodu na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí vypracovanou v rámci bakalářské práce autora a v případě potřeby provést její vhodnou modifikaci
- provést validaci analytické metody
- provést základní testování vypracované analytické metody pro její plánované použití na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě a sinicích.

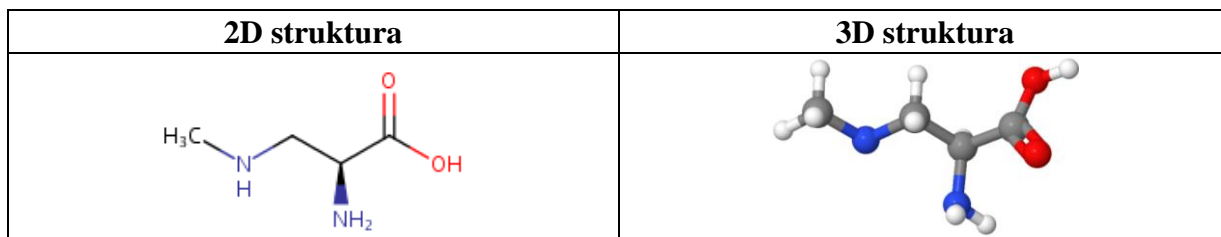
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 β -N-methylamino-L-alanin (BMAA)

2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

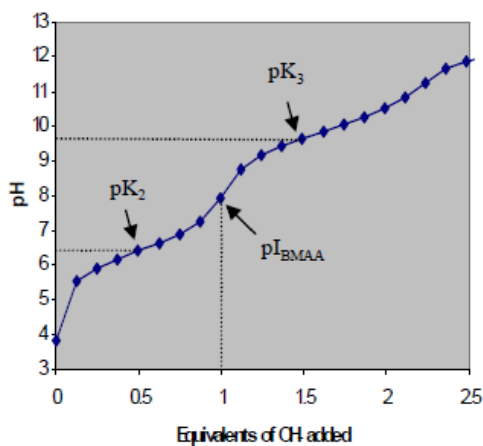
β -N-methylamino-L-alanin, resp. (2S)-2-amino-3-(methylamino)propionová kyselina, je bílá krystalická látka dobře rozpustná ve vodě (viz Tab. 1) [1]. Z chemického hlediska se jedná o polární bazickou aminokyselinu [2] neproteinogenního původu [3], která byla poprvé objevena roku 1967 (Vega a Bell) v extraktech ze semen cykasu *Cycas circinalis* [1,3] v rámci pátrání po příčině vysokého výskytu neurodegenerativního onemocnění amyotrofické laterální sklerózy v domorodé populaci Chamorro na ostrově Guam [4]. V přírodě se vyskytuje především ve volné formě [A5].

Tab. 1: 2D a 3D struktura BMAA.



Ve snaze vyvinout vhodné extrakční a přečišťující metody pro analýzu aminokyseliny BMAA, je důležité pochopit její chemickou povahu, jež je výrazně závislá na pH. Znalost chemické povahy je důležitá pro pochopení mechanismu chemických reakcí, které by mohly nastat, a ovlivnit tak např. biologickou aktivitu jiných sloučenin [1].

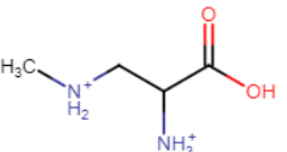
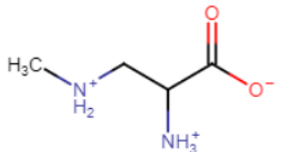
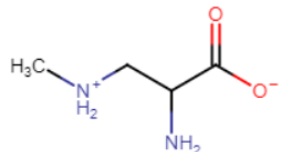
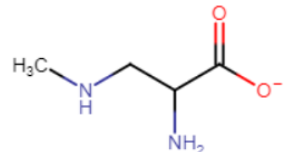
Laboratoř Národní správy potravin ve Švédsku vytvořila titrační křivku BMAA (viz Obr. 1), která ukazuje zastoupení jednotlivých forem BMAA v závislosti na pH [1].



Obr. 1: Titrační křivka BMAA [1].

Grafické vyhodnocení výsledků titrační křivky BMAA ukázalo, že zjištěné hodnoty disociačních konstant ($pK_2 = 6,48$ a $pK_3 = 9,70$) jsou v souladu s předchozími zjištěními (tj. Vega, 1968: $pK_1 = 2,1$; $pK_2 = 6,5$; $pK_3 = 9,8$; Nunn, 1989: $pK_2 = 6,63$; $pK_3 = 9,76$). Z výše uvedeného textu a s ohledem na strukturu molekuly BMAA uvedenou v Tab. 1 je zřejmé, že molekula obsahuje jednu karboxylovou skupinu a dvě aminoskupiny (1° a 2°), jež mohou být v závislosti na pH různě protonovány a/nebo deprotonovány (viz Tab. 2) [1].

Tab. 2: Vliv pH na celkový náboj molekuly BMAA [1].

pH < 2,1 (celkový náboj +2)	pH 2,1 - 6,6 (celkový náboj +1)	pH 6,6 - 9,8 (celkový náboj 0)	pH > 9,8 (celkový náboj -1)
			

Z Tab. 2 je tedy zřejmé, že při fyziologickém pH (7,4) se molekula BMAA vyskytuje jako amfoterní ion s nulovým celkovým nábojem, tzv. zwitterion. Zároveň je nutné podotknout, že molekula se ve vodném prostředí nikdy nevyskytuje jako nenabitá [1].

Detailnější průzkum disociačních konstant založený na výpočetních metodách ukázal, že při neutrálním pH mohou být deprotonovány obě aminoskupiny BMAA (Obr. 2) [1].

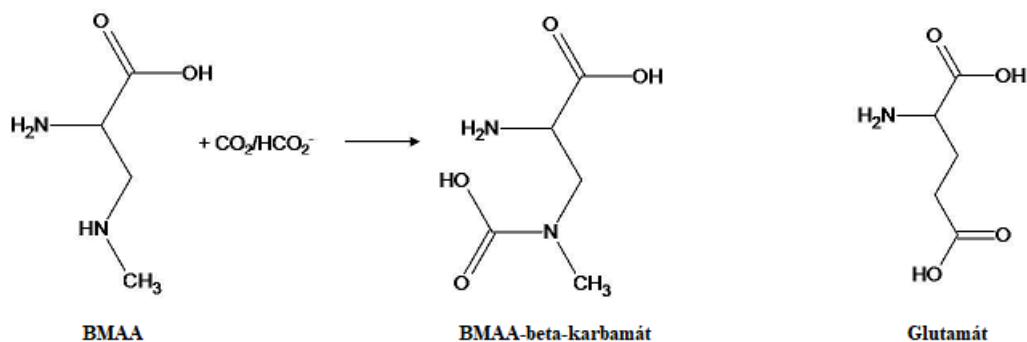
α -deprotonated	β -deprotonated
$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_2^+ \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ 86\% \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ {}^+\text{H}_3\text{N} - \text{CH} - \text{COO}^- \\ 14\% \end{array} $

Obr. 2: Formy deprotonované molekuly BMAA při pH 7,4 [1].

Další publikace zabývající se studiem chemických vlastností BMAA dospěly k závěru, že sloučeniny obsahující primární a sekundární aminoskupinu a vyskytující se v biologických vzorcích, včetně BMAA, mohou být přítomny i ve formě karbamátů [1].

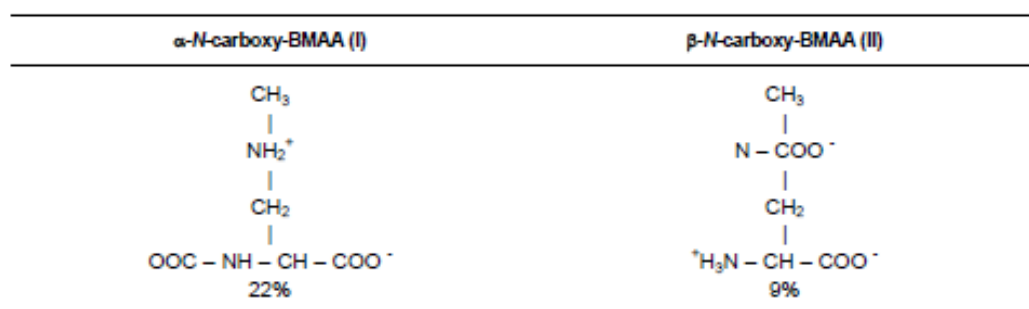
2.1.2 Tvorba karbamátů

Karbamáty BMAA mohou vznikat ve vodných roztocích za fyziologických podmínek, a to reverzibilní reakcí molekuly BMAA s oxidem uhličitým (CO_2) rozpuštěným v roztoku, resp. v roztoku obsahující hydrogenuhličitany (HCO_3^-) – viz Obr. 3 [6].



Obr. 3: Reakce tvorby karbamátů [7].

Ve vodných roztocích byly detekovány 2 karbamátové produkty BMAA (viz Obr. 4), které svojí chemickou strukturou připomínají neurotransmitter glutamát (viz Obr. 3) [2,7]. α -N-karboxy-BMAA byl přítomen z 22 % a β -N-karboxy-BMAA byl přítomen z 9 %. Pokud by tyto nálezy byly relevantní v biologických vzorcích, karbamátové formy by tvořily 31 % celkového BMAA a 69 % celkového BMAA by zůstalo v přirozené formě [1].



Obr. 4: α - a β - karbamátová forma BMAA [1].

Studie prokázaly, že molekula BMAA v karbamátové formě je schopna interagovat s glutamátovými receptory, v důsledku čehož může dojít k jejich hyperaktivaci a následnému poškození neuronů prostřednictvím excitotoxického mechanismu [2,7]. Přímá vazba BMAA karbamátu na receptor je nepravděpodobná, mnohem reálnější je vznik komplexu BMAA-karbamát-receptor, jenž se strukturně podobá komplexu glutamát-receptor [1].

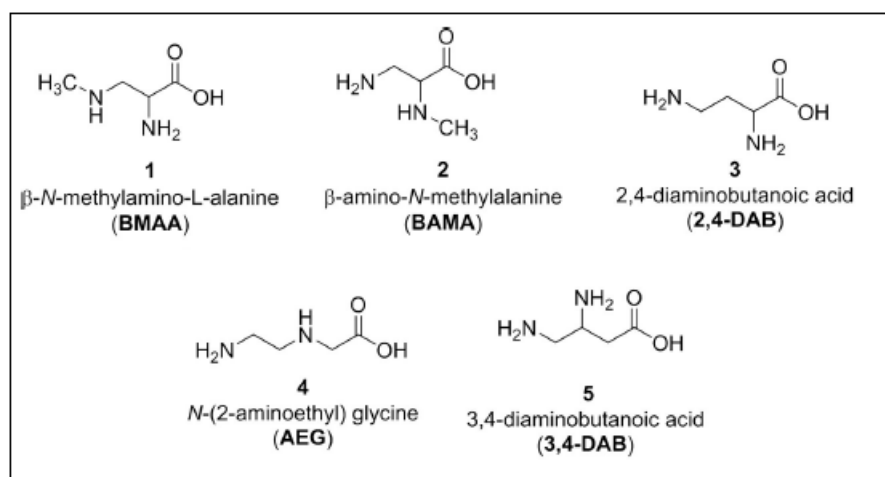
Novější studie však ukazují, že při reakci BMAA s rozpuštěným CO_2 , resp. HCO_3^- , vznikají spíše nové sloučeniny než příslušné komplexy BMAA karbamátů s receptory [1].

2.1.3 Výskyt, produkce a bioakumulace

β -N-methylamino-L-alanin (BMAA) je malá neproteinogenní aminokyselina, která je pravděpodobně produkována řadou kosmopolitních organismů, zejména sinicemi [3,8]. Sinice vyskytující se nejen ve sladkých a slaných vodách, ale i ve vodách brakických [1], jsou významnými producenty širokého spektra bioaktivních látek (tzv. cyanotoxinů), včetně již zmíněné potenciální produkce BMAA [9,10]. Tyto látky mohou být produkovány za účelem ochrany organismu, jako zdroj dusíku nebo zcela náhodně a bezúčelně [8,11].

V nedávné době byla skupina organismů potenciálně produkujících BMAA rozšířena o rozsivky a obrněnky, fototrofní eukaryotní organismy [12], které spolu se sinicemi představují základní primární producenty v potravní síti vodních ekosystémů [11]. Společně tyto organismy hrají důležitou roli v globální fixaci uhlíku, regulaci křemíku, a spolu s vyššími rostlinami tak udržují rovnováhu v celém potravním řetězci [11].

BMAA a jeho strukturní izomery (Obr. 5) byly v důsledku bioakumulace detekovány v různých organismech vyskytujících se jak ve vodních, tak suchozemských ekosystémech [13,14]. Mezi tyto organismy můžeme zařadit některé měkkýše, koryše a ryby [13].



Obr. 5: Struktura BMAA a jeho izomerů – upraveno [4].

V roce 2003 byla zjištěna přítomnost BMAA v sinicích rodu *Nostoc*, které žijí v symbióze s kořeny cykasů [1]. Globální distribuce BMAA byla zaznamenána roku 2005, kdy byl tento potenciální neurotoxin detekován v relativně vysokých koncentracích [1] u 95 % testovaných volně žijících zástupců kmene sinic [3]. Výskyt BMAA u velkého procenta testovaných zástupců tohoto kmene vedl k celosvětovým průzkumům za účelem identifikace potenciálních producentů tohoto neurotoxinu [3].

Následné výzkumy ukázaly, že koncentrace BMAA v sinicích se pohybovala řádově v rozmezí 0,008 [3] až 6000 [15] $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty, v případě rozsivek se jednalo o koncentrace v rozmezí 0,32 až 0,75 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty [13]. V současné době však neexistuje žádný jednoznačný důkaz, který by potvrdil, že sinice mohou produkovat značné množství BMAA [1,11]. Výsledky také poukazují na velmi široký rozsah koncentrací BMAA zjištěných v rámci různých zástupců kmene sinic [1].

Velký problém, hlavně v Evropě, může představovat prokázaná přítomnost BMAA v potravní síti Baltského moře [12]. V Baltském moři dochází v létě, kdy je optimální teplota a voda je bohatá na živiny, k masivnímu nárůstu sinicového vodního květu. S příchodem podzimu, kdy dochází k poklesu teploty, ale množství živin je stále dostačující, se začínají rozvíjet rozsivky. Na jaře jsou pak dominantní obrněnky [11,12].

Celoroční výskyt těchto organismů může mít za následek zvýšený obsah BMAA v potravní síti Baltského moře během celého roku [11], což může zároveň vést k jeho bioakumulaci napříč potravním řetězcem [12]. V konečném důsledku by v potravním řetězci mohlo dojít k akumulaci takových koncentrací BMAA, které by již mohly iniciovat rozvoj neurodegenerativních onemocnění [9].

V souvislosti s tímto byla také prokázána přítomnost BMAA ve vyšších mořských živočiších, kteří se živí primárními producenty [13], a jenž mohou představovat důležitý zdroj potravy i pro lidi. Do této skupiny lze zařadit například některé korýše (0,11 až 6976 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty [5]), měkkýše (slávky a ústřice – 0,006 až 305 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty [5]), nebo různé druhy ryb (lokálně ulovených – 0,002 až 2559 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty [5]) tradičně prodávaných na skandinávských trzích s potravinami [12]. Tyto výsledky podporující bioakumulační potenciál BMAA, mohou vyvolat obavy zejména u pravidelných konzumentů mořských plodů a ryb [13].

V neposlední řadě by také měly být zmíněny nálezy BMAA v mozkové tkáni pacientů trpících neurodegenerativním onemocněním, ačkoli akumulace BMAA v lidském mozku je stále předmětem diskuze, a to zejména v důsledku rozporupných výsledků některých studií [8,13]. Za účelem získání podrobnějších informací o účincích BMAA byly provedeny různé výzkumy zaměřené na účinky BMAA na různých modelových organismech. Zkoumána byla také distribuce BMAA v různých organismech a možná bioakumulace v potravním řetězci, zejména ve vodním prostředí [15].

Přestože se BMAA vyskytuje nejčastěji ve formě volné [5], nelze vyloučit možnost, že by mohlo být BMAA začleněno do proteinů či peptidů. Potenciální vazba by však měla být nejprve prozkoumána, potvrzena, správně definována a vysvětlena [1].

2.1.4 Toxicita BMAA

Na základě několika studií provedených *in vivo* a *in vitro* bylo prokázáno, že BMAA může hrát významnou roli patofyziologii neurodegenerativních onemocnění [12], mezi něž řadíme např. Alzheimerovu chorobu (AD), Parkinsonovu chorobu (PD) nebo amyotrofickou laterální sklerózu (ALS) [3]. Celosvětové rozšíření organismů potenciálně produkujících BMAA, tak značně rozšiřuje možnosti vystavení se tomuto potenciálnímu neurotoxinu [14]. Přítomnost BMAA v životním prostředí tak může mít závažné důsledky [16].

Mezi možné cesty expozice pro člověka lze zařadit pitnou vodu, konzumaci ryb a jiných mořských živočichů (resp. mořských plodů), stejně tak jako konzumaci zeleniny vypěstované na půdě, která byla zavlažována z vodního systému obsahující sinice [1]. Mezi další cesty expozice patří některé rekreační aktivity jako vodní sporty, koupání (expozice kůží) nebo vdechování vodního spreje (např. při plavbě lodí) [1,6].

Na základě mnohých studií provádějících testy *in vivo* a *in vitro*, bylo navrženo a prozkoumáno několik mechanismů týkajících se neurotoxického působení BMAA [7].

Prvním možným mechanismem působení je schopnost BMAA tvořit komplexy s ionty kovů (zejména při $\text{pH} > 5$), což má za následek iontovou nerovnováhu v neuronech [2,7].

Druhým možným mechanismem působení je narušení normální funkce glutamátových receptorů NMDA, AMPA a mGluR5, kde BMAA působí jako agonista glutamátu [7]. Další možností je soutěžení BMAA s cystinem na cystein/glutamátovém antiportu, což může vést k produkci reaktivní forem kyslíku (ROS) a následnému oxidativnímu stresu [7].

V neposlední řadě může docházet k poruchám ve skládání proteinů (tzv. protein misfolding), a to v důsledku nesprávného začlenění molekuly BMAA do proteinů během proteosyntézy [3,6]. Za normálních okolností však existují kontrolní mechanismy souhrnně nazývané jako UPR (unfolded protein reaction), které jsou schopné špatně složené proteiny odstranit. UPR zvyšuje expresi genů zapojených do zpracování, skládání a přeskládání proteinů, zpomaluje translaci nebo odstraňuje špatně složené proteiny. Pokud však dojde k narušení funkcí těchto mechanismů, začnou se špatně složené proteiny akumulovat, v důsledku čehož mohou být narušeny různé biologické funkce [6,8]. Porucha ve skládání proteinů patří navíc mezi základní rysy mnohých neurodegenerativních onemocnění [6].

Pokud by došlo k dlouhodobému kontaktu s BMAA, mohly by se projevit některé z výše uvedených mechanismů vedoucích k nevratnému poškození motorických neuronů. Ačkoli výše uvedené účinky BMAA byly studovány z hlediska akutní a chronické toxicity, nejsou doposud zcela objasněny [7].

2.1.5 Neurotoxická BMAA – *in vitro* studie

V rámci *in vitro* studií bylo zjištěno, že BMAA karbamáty jsou strukturně podobné neurotransmiteru glutamátu působícího v mozku na 2 skupiny receptorů (viz Tab. 3) [7].

Tab. 3: Skupiny receptorů ovlivněné BMAA karbamáty [7].

I	Ionotropní glutamátové receptory	Např. NMDA a AMPA
	NMDA je receptor N-methyl-D-aspartát AMPA je receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolpropanová kyselina	
II	Metabotropní glutamátové receptory	Např. receptory řady mGluR
	Metabolický glutamátový receptor mGluR5	

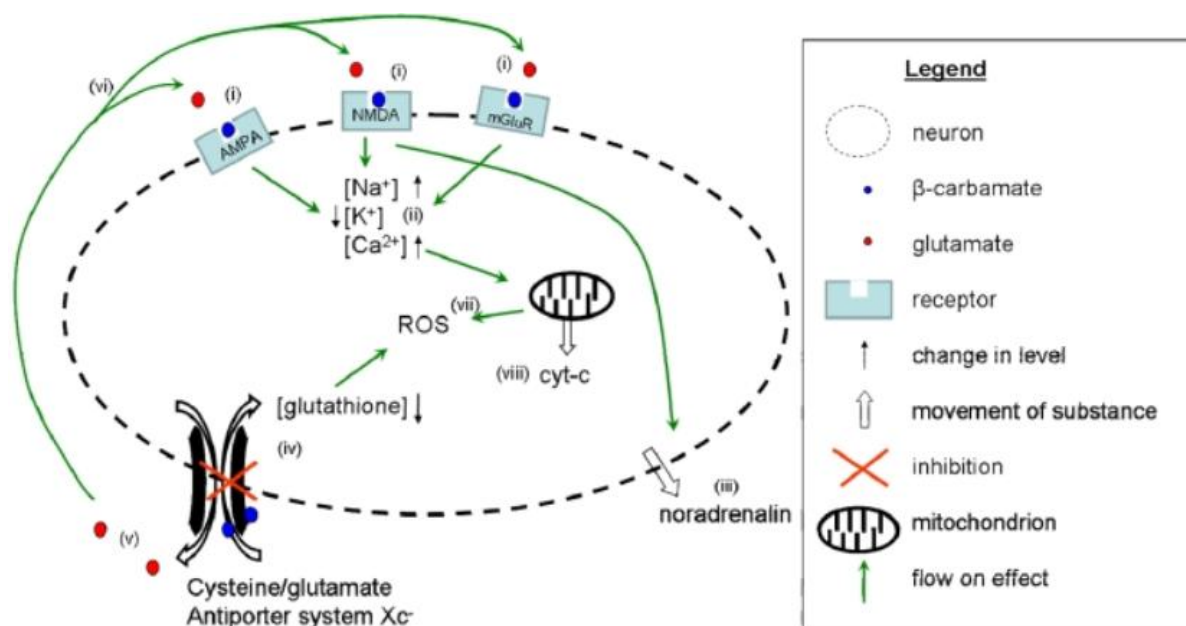
Předpokládá se, že BMAA karbamáty jsou do buňky transportovány prostřednictvím cystein/glutamátového antiporteru (tzv. Xc^- systém). Bylo prokázáno, že tyto karbamáty mohou působit jako agonisté glutamátu, a že jejich navázáním na glutamátové receptory v buňkách neuronů mohou vyvolat jejich hyperaktivaci vedoucí až neuronální smrti [7].

Hyperaktivace glutamátových receptorů byla prokázána při koncentraci BMAA řádově mmol.l^{-1} (pro NMDA receptor) a při koncentraci $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (pro AMPA receptor [9,10]).

V případě receptoru mGluR5 dochází navázáním BMAA karbamátů také ke snížení hladiny cAMP, což může ve sledu následných reakcí vést také ke smrti neuronů [7].

Mechanismy působení BMAA karbamátů v buňkách neuronů jsou shrnuty na Obr. 6: BMAA přítomné jako β -karbamát je vázán v neuronech na ionotropní a metabotropní glutamátové receptory (NMDA, AMPA a mGluR5), což má za následek jejich aktivaci. V důsledku aktivace těchto receptorů dochází ke zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} iontů, vedoucí k uvolnění cytochromu c do cytosolu buňky a zahájení procesu apoptické smrti. Dále dochází ke zvýšení hladiny Na^+ a ke snížení hladiny K^+ iontů vedoucí k depolarizaci buňky (membrána se stává propustnou) a uvolnění noradrenalinu z buňky [17].

Cystein/glutamátový antiporter je inhibován, což vede k vyčerpání zásob glutationu (antioxidant), a tudíž k nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou poškodit důležité biomolekuly, včetně lipidů, proteinů a DNA [7,10]. Za normálních podmínek jsou ROS odstraněny z buněk několika obrannými mechanismy zahrnující různé antioxidantní enzymy jako například superoxid dismutázu [10]. Všechny výše uvedené mechanismy se v buňce spojují a zvyšují tak tvorbu ROS, což může v konečném důsledku vést k poškození životně důležitých buněčných funkcí, mimo jiné vedoucí ke smrti neuronů [7,10]. Vyčerpání antioxidantu glutationu hraje významnou roli v Alzheimerově nemoci, Parkinsonově nemoci a amyotrofické laterální skleróze (ALS) [7].



Obr. 6: Mechanismy působení β -karbamátů BMAA na neurony [17].

Mimo jiné byly také v několika *in vitro* studiích zkoumány vzájemné interakce mezi proteiny a BMAA, přičemž v jedné ze studií byly objeveny známky špatného začlenění BMAA do primární struktury proteinů během proteosyntézy i v lidských buňkách [12,15].

In vitro testy také prokázaly, že BMAA může způsobit selektivní ztrátu motorických neuronů a indukovat tvorbu ROS již v koncentracích $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, a to za současné přítomnosti dalších neurotoxických sloučenin [7].

2.1.6 Neurotoxicita BMAA – *in vivo* studie

V rámci *in vivo* studií byly toxické účinky BMAA studovány u několika modelových organismů zahrnující zejména myši, potkany a primáty. Omezené množství studií zkoumající toxicitu BMAA bylo také provedeno na bezobratlých živočiších. Bylo zjištěno, že BMAA podávané modelovým organismům ve vysokých dávkách způsobilo chronickou neurotoxicitu, ačkoliv při nízkých dávkách nebyl pozorován žádný neurotoxický efekt [7].

Další studie ukázaly, že injekční podávání roztoku BMAA do dutiny břišní u myší a potkanů může v koncentracích 0,2 až 3,3 mg.g/den vyvolat křeče a svalovou slabost [11]. V případě podkožní aplikace roztoku BMAA byly zaznamenány neurochemické změny v míše potkanů vedoucí k trvalým změnám motorických funkcí, a to již při koncentracích 100 nebo 500 ng/kg [7,11].

Další 3 studie toxických účinků BMAA byly provedeny na laboratorních zvířatech (konkrétně na myších, potkanech a opicích), a to za využití orálního podání, což je relevantní cesta pro expozici člověka tomuto toxinu. Podrobnosti jsou uvedeny v Tab. 4 [11]. Pouze v případě první studie došlo u opic k rozvinutí dysfunkce pyramidové dráhy a také k projevům Parkinsonovy nemoci jako je např. křeče, ztuhlost nebo poruchy hybnosti. V mozkové kůře a míše těchto organismů také došlo k degenerativním změnám motorických neuronů [11]. Ve zbylých dvou studiích se nepodařilo u hlodavců indukovat neurochemické či neuropatologické změny a prokázat tak neurodegeneraci v přítomnosti BMAA [7,11]. Všechny tři studie byly navíc kritizovány za použití nerealistických dávek [11].

Tab. 4: Velikost dávek a doba podávání použitá v uvedených studiích [11].

Studie	Podávané množství	Doba podávání	Organismus
1	100 – 315 mg/kg/den	5 až 17 týdnů	Opice
2	500 – 1000 mg/kg/den	11 týdnů	Myši, potkani
3	23 – 28 mg/kg/den	30 dní	Myši, potkani

Ve studii [8] bylo uvedeno, že BMAA může prostřednictvím různých transportérů aminokyselin prostupovat hematoencefalickou bariérou (HEB) u novorozených krys, a odtud se rozšířit do různých oblastí mozku.

Většina zveřejněných prací zabývajících se toxickými účinky BMAA *in vivo* potvrdila jeho neurotoxicitu, ačkoliv s malými odlišnostmi způsobenými zejména využitím různých modelových organismů, expozičních roztoků o různých koncentracích a různou dobou expozice. Na základě těchto studií je zřejmé, že expozice BMAA má nepříznivé účinky na modelové organismy a může tedy představovat potenciální riziko i pro lidské zdraví [7].

Až do současné doby bylo pouze několik prací zaměřeno na hodnocení chronické toxicity BMAA, a proto toho o chronickém mechanismu působení není moc známo [6]. Aby však bylo možné určit, zda BMAA zcela jistě způsobuje nebo přispívá k rozvoji neurodegenerativních onemocnění jako je ALS, AD a PD, je nutné objasnit mechanismus účinku a toxikologické dopady BMAA při dlouhodobé expozici – tj. chronická toxicita [7]. Tím by zároveň mohla být otevřena potenciální cesta pro vývoj léků a účinné léčby neurodegenerativních onemocnění, které doposud nelze efektivně léčit [12].

2.2 Extrakce na tuhé fázi (SPE)

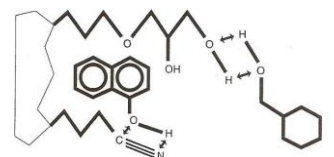
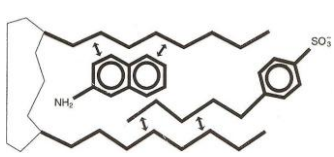
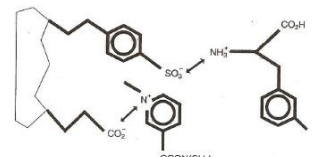
Extrakce na tuhé fázi (SPE) je separační proces, při němž dochází k distribuci analytu mezi kapalinu (vzorek) a tuhou fází (sorbent) umístěnou v podobě sloupce v malé kolonce [18]. Při SPE tedy dochází k interakci celkem 3 složek: tuhé fáze, analytu a kapaliny [19].

Distribuce analytu je charakterizována rozdělovacím koeficientem (K_D), který je definován jako poměr rovnovážné koncentrace analytu adsorbovaného na povrchu sorbentu a rovnovážné koncentrace analytu přítomného ve vzorku kapaliny (viz vzorec níže) [18].

$$K_D = \frac{[\text{analyt}]_{\text{sorbent}}}{[\text{analyt}]_{\text{vzorek}}}$$

Adsorpce analytu na tuhou fází (sorbent) je zprostředkována různými interakcemi, které jsou uvedeny v Tab. 5, a to v závislosti na chemické povaze analytu a sorbentu [19].

Tab. 5: Možné interakce mezi tuhou fází (sorbentem) a analytem - upraveno [19,20].

Typ sorbentu	Polární (normální fáze)	Nepolární (reverzní fáze)	Iontoměnič
Interakce	<p>Hydrofilní</p> 	<p>Hydrofobní</p> 	<p>Elektrostatické</p> 

SPE technika se nejčastěji uplatňuje při izolaci netěkavých a málo těkavých analytů z kapalných vzorků, ale lze ji také použít na izolaci analytů z pevných vzorků, jež byly předem extrahovány do vhodných extrakčních rozpouštědel. V současnosti lze SPE techniku využít ve 3 základních provedeních (tzv. módech), které jsou popsány v Tab. 6 [20].

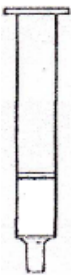

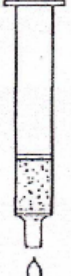
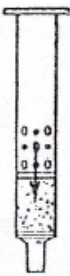

Tab. 6: Možnosti aplikace SPE techniky (extrakční módy) [19,20].

Extrakční mód	Selektivní extrakce		Selektivní eluce	Selektivní promývání
Analyty	zachyceny	nezachyceny	zachyceny	zachyceny
Nečistoty	nezachyceny	zachyceny	zachyceny	zachyceny
Promývání	nevyžadováno		nevyžadováno	vymytí nečistot
Eluce	analytů	nečistot	pouze analytů	pouze analytů

SPE technika je nejčastěji pěti fázový proces sestávající z následujících kroků [19,20]:

1. Výběr vhodné SPE kolonky
2. Kondicionace/Ekvilibrace – příprava kolonky k použití
3. Nanesení vzorku, včetně úpravy podmínek pro ideální retenci analytu
4. Promývání – odstranění interferujících látek
5. Eluce analytu

Tab. 7: Znázornění průběhu pěti fázového procesu SPE [19].

Výběr	Kondicionace/Ekvilibrace	Nanesení vzorku	Promytí	Eluce
				

V současné době je SPE technika čím dál více přínosnější z hlediska přípravy reálných vzorků, neboť řeší mnoho problémů spojených s analýzou těchto vzorků [20]. Každý vzorek určený pro analýzu by měl být připraven ve formě kompatibilní s analytickým systémem, čehož lze docílit pomocí SPE techniky například odstraněním matrice či interferujících látek nebo změnou rozpouštědla [18].

Cílem SPE je tedy může být např. odstranění některých nežádoucích látek ze vzorku, odstranění matrice vzorku, změna rozpouštědla a/nebo zakonzentrování analytu za účelem získání co nejčistšího a co nejvíce koncentrovaného extraktu umožňujícího dosáhnout nižších mezí detekce [18,20]. Mezi další aplikace SPE techniky patří skupinová frakcionace analytů nebo odsolování [19].

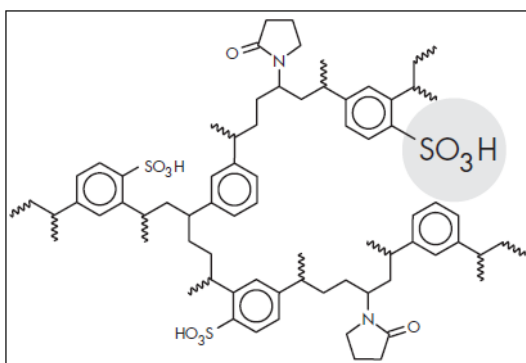
2.2.1 Sorbenty vhodné pro stanovení BMAA

Před samotným započítím vývoje SPE techniky je nezbytné vybrat vhodný sorbent na základě chemické povahy analytu, matrice vzorku a typu interferencí, neboť nejlepší retence analytu je dosaženo v případě, kdy je polarita analytu podobná polaritě sorbentu [19]. Jak již bylo uvedeno v Kap. 2.1.1, BMAA (β -N-methylamino-L-alanin) je polární bazická aminokyselina, která se ve vodném prostředí vyskytuje jako nabitá molekula v závislosti na pH roztoku. Z tohoto důvodu se pro stanovení BMAA používají polární sorbenty či iontoměniče. Řadíme sem zejm. sorbenty SCX, MCX a HLB.

V případě SCX se jedná o sorbent na bázi silikagelu, na nějž jsou navázány silně kyselé ($pK_A < 1$) skupiny kyseliny sulfonové ($-\text{SO}_3\text{H}$), tj. silný kationtový iontoměnič [20]. Zásadní nevýhodou těchto sorbentů je jejich omezená stabilita v závislosti na pH, která umožňuje jejich používání pouze v rozmezí pH 2 až 8 [19]. Při vyšších hodnotách pH může docházet k rozpouštění silikagelu, naopak při nižších hodnotách pH může docházet k hydrolyze a následnému odštěpení vázaných funkčních skupin od silikagelu [19,20].

V případě HLB (hydrofilně-lipofilního) sorbentu se jedná o vysoce stabilní kopolymer divinylbenzenu a N-vinylpyrrolidonu, který neobsahuje silanolové skupiny, což zajišťuje výbornou stabilitu v rozmezí pH 0 až 14, lepší retenci polárnějších analytů a zároveň zamezuje snížení výtěžnosti v případě vyschnutí kolonky (možnost automatizace) [19,21].

Mezi nejběžněji používané sorbenty však patří MCX sorbent (viz Obr. 7), který představuje vylepšenou verzi HLB sorbentu, jenž je modifikován navázáním silného kationtového iontoměniče obsahující silně kyselé skupiny kyseliny sulfonové [20,22]. Tento typ sorbentu je vysoce selektivní zejména pro bazické organické sloučeniny [22].



Obr. 7: Struktura sorbentu MCX – upraveno [22].

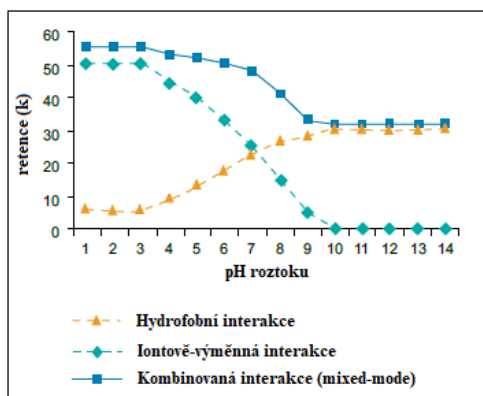
Výhodou MCX sorbentu je navíc možnost kombinovat dva retenční mechanismy, kterými jsou iontově-výměnné interakce a hydrofobní interakce (tzv. smíšený mód) [23].

Obr. 8 znázorňuje modelový příklad retence bazického organického analytu (resp. molekuly BMAA) na MCX sorbentu v závislosti na pH roztoku [21].

Při nižších hodnotách pH roztoku vzorku je primární a sekundární aminoskupina molekuly BMAA protonizována (tj. molekula BMAA vykazuje celkový kladný náboj + 2). Převládajícím retenčním mechanismem jsou tedy iontově-výměnné interakce založené na elektrostatickém přitahování kladně nabitých aminoskupin molekuly BMAA se záporně nabitými skupinami kyseliny sulfonové vázanými na organickém kopolymeru [19,20]. Kromě toho je zde také malý příspěvek hydrofobních interakcí, které jsou však v porovnání s iontově-výměnnými interakcemi výrazně slabší [21].

Při vyšších hodnotách pH je protonizována pouze primární aminoskupina a navíc dochází k deprotonizaci karboxylové skupiny molekuly BMAA, což se projevuje výrazným poklesem iontově-výměnných interakcí a postupným nárůstem hydrofobních interakcí [20].

Při pH roztoku > 10 již není protonizována ani jedna aminoskupina molekuly BMAA (tj. molekula nenese žádný kladný náboj), tudíž jediným možným retenčním mechanismem jsou hydrofobní interakce zprostředkované nepolární částí organického kopolymeru [20,21].



Obr. 8: Modelový příklad retence analytu na MCX sorbentu - upraveno [21].

Je důležité také podotknout, že při nižších hodnotách pH mohou být na MCX sorbentu zadržovány i jiné složky komplexní matrice vzorku, které jsou taktéž při nízkých hodnotách pH kladně nabitě. Z tohoto důvodu hraje důležitou roli také celková koncentrace iontů ve vzorku (tj. iontová síla), neboť v případě vysoké iontové síly může docházet k soutěžení těchto sloučenin s molekulami BMAA o vazebná místa na iontoměničce a v důsledku toho může dojít ke snížení vazebné kapacity sorbentu vůči molekulám BMAA [20].

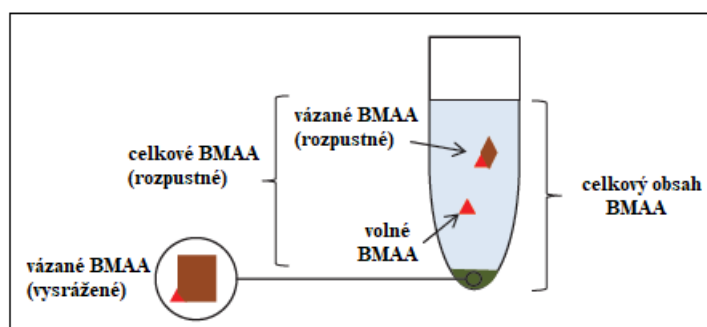
2.2.2 Obecný postup extrakce bazických analytů na MCX sorbentu

Bazické analyty lze podle publikace [22] extrahovat na MCX sorbentu níže uvedeným postupem. SPE kolonka je nejdříve kondicionována 1 ml metanolu a následně ekvilibrována 1 ml deionizované vody. V této fázi je SPE kolonka připravena k použití. Poté je nanesen 1 ml vzorku v 0,1M HCl. Okyselení zajišťuje, že daný analyt bude kladně nabitý, a tudíž se bude na základě iontově-výměnných interakcí interagovat se sorbentem. V dalším kroku je SPE kolonka propláchnuta HCl o koncentraci 0,1 mol.l⁻¹ a následně 1 ml metanolu za účelem odstranění nežádoucích látek. V poslední fázi je analyt zachycený na sorbentu eluován 1 ml roztoku směsi NH₄OH/MeOH (5 obj. % / 95 obj. %). Výsledný extrakt je odpařen proudem dusíku při teplotě 45°C a vzniklý odparek je rekonstituován v 1 ml vhodné mobilní fáze. Schéma extrakce s popisem účelu jednotlivých kroků je uvedeno v Příloze 8.1.

2.3 Extrakce trichloroctovou kyselinou (TCA)

Na základě několika studií, zabývajících se stanovením BMAA ve vzorcích sinic za využití kyseliny trichloroctové, lze očekávat přítomnost BMAA v nízkých koncentracích (řádově $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ až $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$ suché hmoty vzorku). V důsledku předpokládaných nízkých koncentrací BMAA ve vzorcích sinic je před vlastní analýzou vzorku nezbytné provést jeho řádnou předúpravu. Předúprava vzorku nejčastěji zahrnuje lyzi buněk, precipitaci proteinů a kyselou hydrolýzu. Dodatečně mohou být také provedeny extrakce typu kapalina-kapalina (LLE), extrakce na tuhou fázi (SPE) nebo derivatizace analytu. Výše uvedené předúpravy vzorku jsou prováděny jednak za účelem zakoncentrování analytu a jednak za účelem odstranění nežádoucích sloučenin z komplexní matrice vzorku, které by mohly interferovat s analytem nebo by mohly poškodit chromatografickou kolonu [11].

V přírodních vzorcích se může BMAA nacházet jako volná molekula a/nebo ve formách vázaných na proteiny či peptidy, popř. na jiné rozpuštěné částice (viz Obr. 9) [2].



Obr. 9: Frakce BMAA přítomné v přírodních vzorcích - upraveno [2].

Volné BMAA představuje frakci, kterou lze získat extrakcí polárním rozpouštědlem. Pro tento účel je využíván roztok kyseliny trichloroctové (TCA) o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, který vysráží proteiny přítomné v roztoku a volné BMAA se stanoví analýzou supernatantu. Vázané formy BMAA mohou zůstat přítomny v roztoku (tj. rozpustné vázané BMAA) nebo mohou být vysráženy v průběhu extrakce roztokem TCA (tj. vysrážené vázané BMAA). BMAA lze z vázaných forem, přítomných v podobě peletu, uvolnit kyselou hydrolýzou, jež je nejčastěji prováděno roztokem kyseliny chlorovodíkové (HCl) o koncentraci $6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 24 hodin, a to inkubací ve vyhříváném bloku při teplotě $110 \text{ }^\circ\text{C}$. Celkový obsah BMAA zahrnující všechny formy uvedené na Obr. 9 lze získat kyselou hydrolýzou celkového vzorku [2]. Podrobnější popis extrakce BMAA pomocí kyseliny trichloroctové převzatý z publikace [3] je uvedeno v Kap. 4.6.

2.4 Porovnání metod na stanovení β -N-methylamino-L-alaninu (BMAA)

Vzájemné srovnávání různých analytických technik určených pro stanovení BMAA je v současné době relativně často probírané téma, jelikož volba vhodné analytické techniky hraje důležitou roli při vysvětlování pozorovaných rozdílů ve zjištěných koncentracích. Neurotoxin BMAA může být tedy spolehlivě detekován pouze za použití vhodných analytických technik, proto je zcela nebytné, aby metody a výsledky byly odpovídajícím způsobem prezentovány a výsledky byly tudíž zcela jasné a vzájemně porovnatelné. Ve většině publikací jsou také poměrně zřídka kdy diskutovány limitace studií, což přispívá k pochybnostem ohledně spolehlivosti některých výsledků. Kromě toho nejsou ve velké části publikací uvedeny hodnoty mezi detekcí (MDL) a mezi stanovitelností (MQL) metody, popř. nejsou uvedeny hodnoty správnosti a přesnosti metody, což také zvyšuje nedůvěryhodnost uvedených výsledků.

V následujících kapitolách jsou shrnuty a uvedeny výsledky dosažené v rámci několika publikací využívající různé analytické techniky a úpravy vzorků k analýze.

2.4.1 Možnosti stanovení BMAA ve vodě

V Tab. 8 jsou shrnuty různé analytické techniky zabývající se stanovením BMAA ve vodě ve formě derivatizované nebo nederivatizované, a za využití SPE extrakce. V tabulce jsou také uvedeny meze stanovení, kterých bylo dosaženo v rámci vybraných prací.

Tab. 8: Přehled mezi detekce a mezi stanovitelnosti BMAA pro různé analytické techniky.

Analytická technika	Derivatizace analytu	Extrakční technika	Objem vzorku	MDL	MQL	Zdroj
				[$\mu\text{g.l}^{-1}$]		
LC-FLD	AQC	SPE-Oasis MCX (6 cc, 150 mg)	100 ml	5	NS	[24]
LC-MS/MS (IT)				0,8	NS	
LC-FLD	AQC	SPE-Oasis MCX (6 cc, 150 mg)	500 ml	5	NS	[25]
LC-MS/MS (IT)				0,5	NS	
LC-MS/MS (TQ)	neprovedena	SPE-Oasis MCX (3 cc, 60 mg)	NS	NS	2	[26]
LC-HRMS (TQ-orbitrap)	DNS	SPE-Strata-X-C (200 mg)	100 ml	0,008	0,02	[9]
LC-MS (SQ)	EZ:faast	SPE-Strata-X-C (33 μm , póry 85 Å)	20 litrů	NS	NS	[27]

Nejnižší hodnoty meze detekce metody bylo dosaženo v práci [9], kde bylo využito kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem s vysokým rozlišením (LC-HRMS) využívající hybridní systém trojitého kvadrupólu s orbitální iontovou pastí (TQ-Orbitrap). Naopak nejvyšších hodnot meze detekce metody bylo dosaženo v pracích [24] a [25], v nichž byly využity identické analytické techniky (LC-FLD) se stejnou derivatizací analytu a taktéž stejnou extrakční technikou a za použití stejných SPE kolonek. Jediným rozdílem bylo použití různých objemů vzorků k extrakci. V pracích [24] a [25] bylo také dosaženo podobných meze detekcí metody, při použití techniky LC-MS/MS s iontovou pastí a stejné extrakční techniky, které jsou v porovnání s metodou využívající LC-FLD řádově 10x nižší.

V práci [26] využívající techniku LC-MS/MS s trojitým kvadrupólem bez použití derivatizace analytu bylo dosaženo hodnoty meze stanovitelnosti metody srovnatelné s hodnotami meze detekcí dosažených v pracích [24] a [25], jež využívaly derivatizaci analytu a techniku LC-MS/MS s iontovou pastí. Srovnatelných hodnot bylo dosaženo i přesto, že v uvedených pracích bylo využito stejných extrakčních metod, ale v případě práce [26] byla použita menší SPE kolonka. Nevýhodou při porovnávání výsledků s prací [26] je neuvedení objemu vzorku použitého k extrakci.

V práci [9], kde bylo využito kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem s vysokým rozlišením (LC-HRMS) využívající hybridní systém TQ-Orbitrap, a v níž byla provedena derivatizace analytu pomocí DNS, bylo dosaženo 100x nižší meze stanovitelnosti než v práci [26] využívající techniku kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (trojitý kvadrupól) bez využití derivatizace analytu, a za použití stejné extrakční techniky avšak s jiným typem SPE kolonky, která také obsahovala větší množství sorbentu.

V práci [26] bylo dosaženo relativně nízké meze detekce metody ($2 \mu\text{g.l}^{-1}$), a to za využití techniky LC-MS/MS s trojitým kvadrupólem, bez využití derivatizace analytu a zároveň při použití SPE kolonky s nejmenší sorpční kapacitou.

V práci [27] využívající techniku kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem (LC-MS) s jednoduchým kvadrupólem (SQ), v níž bylo navíc využito neobvykle velkého objemu vzorku k extrakci, nebyl uveden ani jeden z parametrů meze detekce metody a meze stanovitelnosti metody, což znemožňuje vzájemná porovnání s jinými pracemi.

Z obecného porovnání analytických technik uvedených v Tab. 8 je zřejmé, že nižší meze detekce je dosaženo v případě použití techniky LC-MS/MS než při použití techniky LC-FLD. Zároveň je patrné, že při využití kapalinové chromatografie s vysokorozlišovacím hmotnostním detektorem (LC-HRMS) s hybridním systémem TQ-Orbitrap lze dosáhnout výrazně nižších meze detekcí a meze stanovitelností v porovnání s jinými publikacemi.

Na následující stránce jsou dále v Tab. 9 uvedeny hodnoty správnosti, resp. přesnosti (vyjádřené jako výtěžnost, resp. opakovatelnost) pro jednotlivé koncentrační úrovně BMAA ve vybraných publikacích využívající různé analytické techniky a SPE extrakční techniku.

Tab. 9: Přehled správností a přesností u vybraných prací.

Koncentrační úroveň [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Správnost (výtěžnost) [%]	Přesnost (opakovatelnost) [%]	Zdroj
50	neuveďeno	neuveďeno	[24]
neuveďeno	neuveďeno	neuveďeno	[25]
13,5	99,3 – 102,2	6,9 – 11,7	[26]
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	
50	92	5	[9]
250	96	2	
1250	97	2	
0,12	neuveďeno	neuveďeno	[27]

V publikaci [26] bylo v rozmezí koncentrací 2,0 až 13,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ dosaženo velmi podobných hodnot správnosti (98,5 – 103,9 %) a přesnosti (5,8 – 11,7 %). Mimo jiné bylo v této práci dosaženo nižší hodnoty správnosti (88,7 %) a vyšší hodnoty přesnosti (20,6 %), a to pro koncentrační úroveň 1,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$. V publikaci [9] bylo v porovnání s publikací [26] dosaženo srovnatelných hodnot správnosti (92 – 97 %) a nižších hodnot přesnosti (2 – 5 %), avšak na několikanásobně vyšších koncentračních úrovních (50 – 1250 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Publikace [24], [25] a [27] neuvádí hodnoty správnosti a přesnosti, což neumožňuje jejich porovnání s ostatními uvedenými publikacemi.

Vzhledem k rozmanitému a komplexnímu složení vzorků přírodních vod je separace a kvantifikace stopových a ultrastopových koncentrací neurotoxinu BMAA relativně komplikovaná, a to i vzhledem k možné koeluci strukturních izomerů BMAA. Za účelem dosažení co možná nejpřesnějších a nejsprávnějších výsledků, a s cílem eliminovat falešně pozitivní výsledky, je doporučeno pro identifikaci a kvantifikaci BMAA používat výhradně techniky LC-MS/MS.

2.4.2 Možnosti stanovení BMAA v sinicích

V Tab. 10 jsou shrnuty různé analytické techniky zabývající se stanovením BMAA v sinicích, a za využití různých extrakčních postupů. V tabulce jsou také uvedeny meze stanovení, kterých bylo dosaženo v rámci vybraných prací.

Tab. 10: Přehled mezi detekce a mezi stanovitelnosti BMAA pro různé analytické techniky.

Analytická technika	Derivatizace analytu	Extrakční technika	Vzorek	MDL	MQL	Zdroj
				[ng.g ⁻¹]		
LC-MS/MS (TQ)	neprovedena	0,1M TCA + přečištění na SPE	10 mg	NS	600	[26]
LC-MS/MS (TQ)	neprovedena	0,1M TCA (6M HCl) + přečištění na SPE	10 mg	230	NS	[13]
LC-MS/MS (TQ)	AQC	0,1M TCA (6M HCl) + přečištění na SPE	2 mg	0,8 ng.ml ⁻¹		[3]
LC-MS/MS (TQ)	AQC	80% MeOH (6M HCl) + přečištění na SPE	NS	NS	NS	[16]
LC-MS/MS (TQ)	AQC	80% MeOH (6M HCl) + přečištění na SPE	NS	100	NS	[28]
LC-MS/MS (TQ)	AQC	80% MeOH (6M HCl)	2 mg	100	100	[29]

V práci [13] bylo dosaženo přibližně 2x vyšší hodnoty meze detekce metody než v pracích [28] a [29], a to za využití stejné analytické techniky LC-MS/MS. V práci [13] však nebyla provedena derivatizace analytu, navíc bylo v porovnání s pracemi [28] a [29] využito jiné extrakční techniky. V práci [29], která využila derivatizace analytu a extrakce 80% metanolem s hydrolyzou vzorku, bylo dosaženo 6x nižší hodnoty meze stanovitelnosti metody než v práci [26], kde nebyl analyt derivatizován a zároveň bylo využito extrakce kyselinou trichloroctovou s hydrolyzou vzorku. V práci [29] bylo zároveň použito 5x menší množství vzorku k extrakci než v práci [26], na základě čehož lze předpokládat dosažení nižší hodnoty meze detekce metody. Z Tab. 10 je také patrné, že všechny uvedené publikace, vyjma publikace [29], využily techniku extrakce na tuhou fázi jako přečišťovací krok.

Výsledky dosažené v práci [3] nemohly být porovnány s ostatními pracemi z důvodu uvedení meze detekce a meze stanovitelnosti metody v jiných jednotkách. Taktéž práce [16] nemohla být porovnána, neboť neuvádí ani jeden z parametrů MDL a MQL.

Z obecného porovnání metod uvedených v Tab. 10 je zřejmé, že nižších detekčních limitů bylo dosaženo v případě využití derivatizace analytu a za využití extrakční techniky 80% metanolem s hydrolyzou vzorku. Toto zjištění je poměrně překvapivé, neboť bylo prokázáno, že nejlepších a nejsprávnějších výsledků je dosaženo při použití extrakce kyselinou trichloroctovou s hydrolyzou vzorku.

V Tab. 11 jsou dále uvedeny hodnoty správnosti (vyjádřené jako výtěžnost) a přesnosti (vyjádřené jako opakovatelnost) pro různé koncentrační úrovně BMAA ve vybraných pracích využívající různé analytické a extrakčních techniky (viz Tab. 10).

Tab. 11: Přehled správností a přesností u vybraných prací.

Koncentrační úroveň [ng.mg ⁻¹]	Správnost (výtěžnost) [%]	Přesnost (opakovatelnost) [%]	Zdroj
0,3	95,4	11,8	[26]
0,6	98,2	13,8	
2	102,8	11,7	
4	101,2	4,8	
neuveďeno	neuveďeno	neuveďeno	[13]
2 ng.ml ⁻¹	76,5 – 92,5	2,4 – 3,4	[3]
13 ng.ml ⁻¹	82,8 – 94,3	2,7 – 15,7	
100 ng.ml ⁻¹	98,6	12,9	
neuveďeno	neuveďeno	neuveďeno	[16]
0,2 ng na vzorek	neuveďeno	neuveďeno	[28]
1,0 ng na vzorek			
4,0 ng na vzorek			
0,25	103	6	[29]
2,5	103	4	
4	105	3	

V práci [26], kde nebyla využita derivatizace analytu a bylo použito 10 mg vzorku, bylo v porovnání s prací [29] využívající derivatizaci analytu a množství vzorku 2 mg dosaženo srovnatelných hodnot správnosti, a to na podobných koncentračních úrovních. Avšak hodnoty přesnosti uvedené v práci [26] byly přibližně 2x – 3x vyšší. V práci [3] bylo ve srovnání s prací [26] dosaženo jak srovnatelných hodnot správnosti, tak i přesnosti. Bližší porovnání však nemohlo být provedeno z důvodu uvedení příslušných koncentračních úrovní v jiných jednotkách než v práci [26]. Práce [13], [16] a [28] nemohly být s ostatními uvedenými pracemi porovnány, neboť zde nebyly uvedeny hodnoty správnosti a přesnosti.

Závěrem lze říci, že parametry MDL a MQL spolu s hodnotami správnosti a přesnosti jsou nezbytné pro vzájemné porovnání dosažených výsledků. Tyto parametry by tudíž měly být uvedeny v každé publikaci zabývající se kvantitativním stanovením látek v biologických vzorcích. Neuvedení těchto validačních parametrů může také vést k pochybnostem o spolehlivosti analytické metody a důvěryhodnosti dosažených výsledků.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie a činidla

- Analyt: β -N-methylamino-L-alanin hydrochlorid (dále jen „BMAA“)
 - $M_r(\text{BMAA.HCl}) = 154,60 \text{ g/mol}$, $M_r(\text{BMAA}) = 118,14 \text{ g/mol}$
 - čistota $\geq 97 \%$ (Sigma-Aldrich)
- Vnitřní standard: DL-2,4-diaminomásečná-3,3,4,4-d₄ kyselina dihydrochlorid (dále jen „d₄-DAB“)
 - $M_r(\text{d}_4\text{-DAB.2HCl}) = 195,08 \text{ g/mol}$, $M_r(\text{d}_4\text{-DAB}) = 122,16 \text{ g/mol}$
 - čistota $\approx 98 \%$ (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril – čistota pro LC-MS $\geq 99,9 \%$ (Merck)
- Metanol – čistota pro LC-MS $\geq 99,9 \%$ (Sigma-Aldrich)
- Vodný roztok amoniaku – čistota 28 – 30 % (Merck)
- Kyselina mravenčí – čistota pro LC-MS $\approx 98 \%$ (Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková – čistota 36 % (Merck)
- Kyselina trichloroctová – čistota $\geq 99,5 \%$ (Merck)
- Chlorid sodný – čistota $\geq 99,9 \%$ (Penta s.r.o.)
- Helium – čistota 99,99 % obj. (Linde)
- Dusík – 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 (Merck)
 - parametry: délka: 150 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; velikost částic: 3,5 μm
- Chromatografická předkolona: ZIC[®]-HILIC (Merck)
 - parametry: délka: 20 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; velikost částic: 5,0 μm
- Hmotnostní spektrometr VelosPro vybavený vyhřívaným elektrosprejem (Thermo)
- Analytické váhy MS105DU (Mettler Toledo)
 - maximální váživost: 120 g s odečitelností 0,1 mg (42 g s odečitelností 0,01 mg)
- Výrobník deionizované vody Water purification system Smart2Pure (Thermo)
- Generátor dusíku Genius 1022 (Peak Scientific)

- SPE kolony Oasis MCX 3cc, 60 mg, šarže: 011735085A (Waters)
- Analogový vortexový mixér 945304 (VWR)
- Ultrazvuková vodní lázeň USC600THD (VWR)
- Ultrazvukový sonikátor UP100H (Hielscher, Ultrasound Technology)
 - parametry: cyklus 0 až 1 (dělení po 0,1), amplituda 0 až 100 % (dělení po 10 %)
- SpeedVac lyofilizátor s cold trap (Labconco[®])
- Vyhřívaný blok SBH 130DI3 na odpařování vzorků proudem dusíku (Stuart[®])
- Automatický výrobce zrnkového šupinového ledu VLTZ 150 (Breno Ice Makers)
- Centrifuga s rotorem a krytem 12154H, max. 30 000 RFC (Sigma)
- AP-1: Automatická dávkovací pipeta BioPette^{PLUS} šarže 440930360 (Labnet)
 - parametry: objem 2 – 20 µl s dělením 0,02 µl
- AP-2: Automatická dávkovací pipeta BioPette^{PLUS} šarže 440940205 (Labnet)
 - parametry: objem 10 – 100 µl s dělení 0,20 µl
- AP-3: Automatická dávkovací pipeta BioPette^{PLUS} šarže 440950485 (Labnet)
 - parametry: objem 20 – 200 µl s dělením 0,20 µl
- AP-4: Automatická dávkovací pipeta BioPette^{PLUS} šarže 440960561 (Labnet)
 - parametry: objem 100 – 1000 µl s dělením 2,0 µl
- AP-5: Automatická dávkovací pipeta eppendorf šarže M41865F (Research plus)
 - parametry: objem 1 – 10 ml s dělením 10 µl
- AP-6: Automatická dávkovací pipeta Transferpette[®]S (Brand)
 - parametry: objem 1 – 10 ml s dělením 10 µl
- Skleněná nádoba (manifold) na SPE kolonky s příslušenstvím
- Plastové nádoby tvaru injekční stříkačky o objemu 70 ml pro SPE
- Skleněné láhve s uzávěrem o objemu 100, 250 a 500 ml (Fisherbrand)
- Odměrné baňky o objemu 10, 25, 50, 100, 250 a 500 ml, třída A (Fisherbrand)
- Kádinky o objemu 10, 25, 50, 100 a 250 ml (Fisherbrand)
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl (Hamilton)
- Skleněná nedělená pipeta o objemu 100 ml s přesností ± 0,08 ml (Qualicolor[®])
- Skleněná nedělená pipeta o objemu 50 ml s přesností ± 0,05 ml (Qualicolor[®])
- Parafilm PM-992 (Bemis)
- Plastové stojánky na krimpovací vialky (National Science)
- Skleněná filtrační nálevka
- Třecí miska s tloučkem

- Stříčka s destilovanou vodou a stříčka s etanolem
- Krimpovací a odkrimpovací kleště (11 mm)
- Polystyrenový termobox na led
- Pipetovací balonek
- Plastové zkumavky typu eppendorf (dále jen eppendorf) o objemu 1,5 ml
- Skleněné krimpovací vialky o objemu 1,8 ml (Agilent Technologies)
- Skleněné šroubovací vialky o objemu 4, 8 a 24 ml (Agilent Technologies)
- Crimpovací a šroubovací víčka na vialky (Agilent Technologies)
- Skleněné inserty o objemu 400 μ l do krimpovacích vialek (Agilent Technologies)
- Pipetovací špičky pro automatické pipety o objemech 200 μ l, 1000 μ l a 10 ml
- Ostatní pomůcky: popisovače, stopky, kopistka, míchací tyčinky, buničitá vata
- Ovládání systému LC-MS a vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programů Chromeleon, Tune plus, Xcalibur a DC MS Link.
- Program Marvin JS byl použit na tvorbu struktur uvedených v této práci
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel 2007 a EffiValidation 3.0.

3.3 Příprava činidel, roztoků standardů, obohacených a reálných vzorků

Pro účely ověření vhodných separačních a detekčních podmínek systému LC-MS byly použity zásobní roztoky standardů připravené v rámci bakalářské práce autora, jež byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě v rozmezí -75 až -80 °C. Pro ostatní účely uvedené v této práci byly připraveny nové zásobní roztoky.

3.3.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztok BMAA (koncentrační úroveň ST-A) o koncentraci 30,39 mg.l⁻¹ byl připraven navážením 2,05 mg standardu do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Zásobní roztok d₄-DAB (koncentrační úroveň VS-A) o koncentraci 30,19 mg.l⁻¹ byl připraven navážením 2,46 mg standardu do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Zásobní roztoky BMAA a d₄-DAB byly rozpipetovány do plastových ependorfeek (1,5 ml) a uchovány v mrazicím boxu při teplotě v rozmezí -75 až - 80 °C pro další použití.

3.3.2 Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztok BMAA (koncentrační úroveň ST-B) o koncentraci 20 µg.l⁻¹ byl připraven pipetováním 33 µl zásobního roztoku BMAA (ST-A) automatickou pipetou (viz AP-2) do 50 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Pracovní roztok d₄-DAB (koncentrační úroveň VS-B) o koncentraci 1000 µg.l⁻¹ byl připraven pipetováním 828 µl zásobního roztoku d₄-DAB (VS-A) automatickou pipetou (viz AP-4) do 25 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Pracovní roztoky BMAA (ST-B) a d₄-DAB (VS-B) byly používány maximálně po dobu dvou týdnů ode dne jejich přípravy.

3.3.3 Příprava referenčního roztoku standardů

Referenční roztok standardů byl připraven do skleněné vialky (1,8 ml) pipetováním 250 µl pracovního roztoku BMAA (ST-B) a 100 µl pracovního roztoku d₄-DAB (VS-B) a doplněním deionizovanou vodou na celkový objem 1000 µl.

3.3.4 Příprava kalibračních roztoků standardů

Kalibrační roztoky standardů, jejichž příprava je shrnuta v Tab. 12, byly připraveny do čirých skleněných vialek o objemu 1,8 ml a zanalyzovány bezprostředně po jejich přípravě. Celkem bylo připraveno 9 koncentračních úrovní, každá ve třech nezávislých opakováních.

Mobilní fáze (MF) byla dávkována automatickou pipetou (AP-4) s plastovou špičkou. Pracovní roztoky BMAA (ST-B) a d₄-DAB (VS-B) byly dávkovány stříkačkami Hamilton o objemech 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl.

Tab. 12: Příprava kalibračních roztoků.

Úroveň	Označení roztoku	c _{ST} [µg.l ⁻¹]	c _{VS} [µg.l ⁻¹]	V _{ST-B} [µl]	V _{VS-B} [µl]	V _{MF} [µl]	V _{celkový} [µl]
K1	K1 _a	0,10	100	5	100	895	1000
	K1 _b						
	K1 _c						
K2	K2 _a	0,20	100	10	100	890	1000
	K2 _b						
	K2 _c						
K3	K3 _a	0,50	100	25	100	875	1000
	K3 _b						
	K3 _c						
K4	K4 _a	0,75	100	37,5	100	862,5	1000
	K4 _b						
	K4 _c						
K5	K5 _a	1,0	100	50	100	850	1000
	K5 _b						
	K5 _c						
K6	K6 _a	2,0	100	100	100	800	1000
	K6 _b						
	K6 _c						
K7	K7 _a	5,0	100	250	100	650	1000
	K7 _b						
	K7 _c						
K8	K8 _a	7,5	100	375	100	525	1000
	K8 _b						
	K8 _c						
K9	K9 _a	10	100	500	100	400	1000
	K9 _b						
	K9 _c						

Za účelem kontroly čistoty přístroje, roztoku mobilní fáze, roztoků standardů BMAA (ST-B) a d₄-DAB (VS-B) a vzhledem k možné kontaminaci roztoků v průběhu jejich přípravy a manipulací s nimi, byly připraveny před každým měřením vždy 3 kontrolní roztoky do skleněných vialek o objemu 1,8 ml. Příprava těchto roztoků je shrnuta v Tab. 13.

Tab. 13: Příprava vzorků pro kontrolu čistoty.

Označení roztoku	c _{ST} [μg.l ⁻¹]	c _{VS} [μg.l ⁻¹]	V _{ST-B} [μl]	V _{VS-B} [μl]	V _{MF} [μl]	V _{celkový} [μl]
MF	0	0	0	0	1000	1000
ST	5	0	100	0	900	1000
VS	0	100	0	100	900	1000

3.3.5 Příprava roztoku standardů pro účely testování výtěžnosti extrakce

Roztok standardů určený pro účely testování výtěžnosti extrakce dle obecného postupu výrobce byl připraven pipetováním 171,7 μl koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl), 5,0 ml pracovního roztoku BMAA (ST-B) a 2,0 ml pracovního roztoku d₄-DAB (VS-B) do skleněné šroubovací vialky (24 ml) a doplněním deionizovanou vodou na objem 10 ml.

3.3.6 Příprava roztoků standardů pro účely optimalizace pH vzorku

Pro přípravu roztoků standardů určených pro účely optimalizaci pH vzorku bylo potřeba nejprve připravit různě koncentrované roztoky kyseliny chlorovodíkové (HCl). Roztoky různě koncentrované kyseliny chlorovodíkové byly připraveny do skleněných šroubovacích vialek (8 ml) desítkovým ředěním zásobního roztoku kyseliny chlorovodíkové (ZR-HCl) o koncentraci 1,0 mol.l⁻¹, který byl připraven pipetováním 2146 μl koncentrované HCl do odměrné baňky (25 ml) a doplněním deionizovanou vodou po rysku. Postup přípravy různě koncentrovaných roztoků kyseliny chlorovodíkové je uveden v Tab. 14.

Tab. 14: Shrnutí přípravy různě koncentrovaných roztoků kyseliny chlorovodíkové (HCl).

Roztok	Koncentrace H ⁺ iontů [mol.l ⁻¹]						
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
	HCl-1	HCl-2	HCl-3	HCl-4	HCl-5	HCl-6	HCl-7
HCl	800 μl ZR-HCl	800 μl HCl-1	800 μl HCl-2	800 μl HCl-3	800 μl HCl-4	800 μl HCl-5	0 μl
H ₂ O [μl]	7200	7200	7200	7200	7200	7200	8000
Celkem [μl]	8000						

Příslušné roztoky standardů pro účely optimalizace pH vzorku byly připraveny do skleněných šroubovacích vialek (8 ml) dle postupu uvedeného v Tab. 15.

Tab. 15: Shrnutí přípravy roztoků určených pro optimalizaci pH vzorku.

Roztok	pH roztoku						
	1	2	3	4	5	6	7
ST-B [μl]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
VS-B [μl]	400	400	400	400	400	400	400
HCl	43 μl ZR-HCl	400 μl HCl-1	400 μl HCl-2	400 μl HCl-3	400 μl HCl-4	400 μl HCl-5	0 μl
H ₂ O [μl]	2557	2200	2200	2200	2200	2200	2600
Celkem [μl]	4000						

3.3.7 Příprava roztoku standardů pro optimalizaci elučního činidla

Roztok standardů pro účely dvoufázové optimalizace složení elučního činidla byl připraven pipetováním 171,7 μl koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl), 5,0 ml pracovního roztoku BMAA (ST-B) a 2,0 ml pracovního roztoku d₄-DAB (VS-B) do skleněné šroubovací vialky (24 ml) a doplněním deionizovanou vodou na objem 10 ml.

3.3.8 Příprava elučních činidel pro účely optimalizace složení elučního činidla

Eluční činidla určená pro první fázi optimalizace složení elučního činidla byla připravena pipetováním vypočteného objemu metanolu a konc. roztoku amoniaku do skleněných šroubovacích vialek (8 ml) tak, aby výsledný objem elučního činidla byl 5 ml. Shrnutí přípravy elučních činidel o různém obsahu roztoku amoniaku je uvedeno v Tab. 16.

Tab. 16: Shrnutí přípravy elučních činidel pro první fázi optimalizace.

Roztok	Obsah NH ₄ OH [obj. %]						
	0	1	3	5	10	15	20
Metanol [μl]	5000	4950	4850	4750	4500	4250	4000
NH ₄ OH [μl]	0	50	150	250	500	750	1000

Eluční činidla určená pro druhou fázi optimalizace složení elučního činidla byla připravena pipetováním vypočteného objemu metanolu, deionizované vody a konc. roztoku amoniaku do skleněných šroubovacích vialek (8 ml) tak, aby výsledný objem byl 5 ml. Shrnutí přípravy elučních činidel o různém obsahu směsi MeOH/H₂O je uvedeno v Tab. 17.

Tab. 17: Shrnutí přípravy elučních činidel pro druhou fázi optimalizace.

Roztok	Obsah MeOH/H ₂ O [obj. % / obj. %]					
	0 / 100	20 / 80	40 / 60	60 / 40	80 / 20	100 / 0
Metanol [μl]	0	900	1800	2700	3600	4500
NH ₄ OH [μl]	500	500	500	500	500	500
Voda [μl]	4500	3600	2700	1800	900	0

3.3.9 Příprava obohaceného vzorku rybníční vody – optimalizace objemu vzorku

Obohacený vzorek rybníční vody určený pro optimalizaci objemu vzorku byl připraven pipetováním 41,13 μl zásobního roztoku BMAA (ST-A) a 2146 μl konc. HCl do odměrné baňky (250 ml) a doplněním vzorkem rybníční vody po rysku.

3.3.10 Příprava roztoku kyseliny trichloroctové

Roztok kyseliny trichloroctové o koncentraci $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven navážením 1,6420 g kyseliny trichloroctové do odměrné baňky (50 ml), rozpuštěním a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

3.3.11 Příprava obohacených vzorků sinic

Obohacené vzorky sinic byly připraveny pro koncentrační úroveň $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ takovým způsobem, aby bylo zachováno stejné složení roztoku. Ke vzorku sinice (přesně asi 2 mg) bylo přidáno 1000 μl obohaceného roztoku, jehož příprava je shrnuta v Tab. 18 (analýza volného BMAA) nebo v Tab. 19 (analýza celkového obsahu BMAA). Obdobným způsobem byly také připraveny obohacené vzorky bez přítomnosti vzorku sinice.

Tab. 18: Příprava obohaceneých vzorků sinic – analýza volného BMAA.

Roztok	Objem [μl]	Koncentrace [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
TCA ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$)	500	-----
Deionizovaná voda	150	-----
Pracovní roztok ST-B	250	5
Pracovní roztok VS-B	100	100
Celkový objem	1000	-----

Tab. 19: Příprava obohacených vzorků sinic – analýza celkového obsahu BMAA

Roztok	Koncentrace HCl v obohaceném vzorku [mol.l^{-1}]					
	0,1	0,3	0,5	1	3	6
Pracovní roztok ST-B [μl]	250	250	250	250	250	250
Pracovní roztok VS-B [μl]	100	100	100	100	100	100
Deionizovaná voda [μl]	135,0	392,5	564,2	607,1	624,2	641,4
Koncentrovaná HCl [μl]	515,0	257,5	85,8	42,9	25,8	8,6
Celkový objem [μl]	1000	1000	1000	1000	1000	1000

3.3.12 Příprava reálných vzorků sinic

Reálné vzorky sinic byly připraveny obdobným způsobem jako obohacené vzorky sinic. Místo pracovního roztoku BMAA (ST-B) však byla pipetována deionizovaná voda.

3.4 Příprava SPE kolonek

Příprava SPE kolonek byla provedena na základě obecného postupu SPE extrakce bazických analytů na MCX sorbentu, který je uveden v Kap. 2.2.2. S ohledem na publikace, využívající SPE techniku pro extrakci neurotoxinu BMAA a jeho izomerů (viz Kap. 2.4), a vzhledem k maximálním objemům doporučených pro jednotlivé kroky SPE extrakce dle výrobce (viz Příloha 8.1), byl tento obecný extrakční postup trochu pozměněn. Podrobný popis SPE extrakčních postupů uvedených v Kap. 2.4 je k nahlédnutí v Příloze 8.5.

Před samotnou extrakcí byly SPE kolonky připraveny k použití kondicionací 2 x 1 ml metanolu a následnou ekvilibrací 2 x 1 ml 0,1M HCl. Aby bylo zajištěno, že SPE kolonka nebude mezi kondicionací/ekvilibrací a nanesením vzorku vysušena, byla nad horní fritou ponechána přibližně 1mm vrstva daného kondicionačního/ekvilibračního roztoku. Tím bylo zabráněno vysušení SPE kolonky dříve, než přijde vzorek do styku se sorbentem. Následně byl nanesen 1 ml obohaceného vzorku standardů v 0,1M HCl, a byla provedena extrakce na sorbent. Dále byla kolonka propláchnuta 1 ml 0,1M HCl a 1 ml metanolu za účelem vymytí nežádoucích interferencí. Poté byly do stojanu určeného pro komoru na SPE extrakci umístěny skleněné krimpovací vialky (1,8 ml) a spolu se stojanem byly vloženy do příslušné komory. Následně byla provedena eluce analytů 3 x 0,6 ml 5 obj. % NH₄OH v MeOH. Výsledný eluát byl jímán do skleněných krimpovacích vialek (1,8 ml) a odpařen proudem dusíku do sucha při teplotě 45°C. Vzniklý odparek byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze ACN/H₂O (60 obj. % / 40 obj. %), důkladně promíchán a na závěr analyzován na LC-MS.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Ověření vybraných podmínek hmotnostní detekce

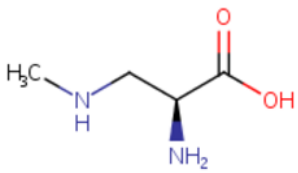
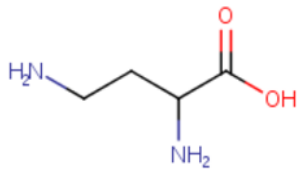
Vzhledem ke skutečnosti, že analytická metoda, vyvinutá v rámci bakalářské práce autora, nebyla po dobu 12 měsíců používána a přístroj byl v průběhu této doby aktivně využíván pro jiné analýzy a navíc bylo v rámci servisní údržby provedeno jeho důkladné čištění zahrnující mj. i čištění vnitřních částí iontové optiky, bylo nezbytné provést ověření některých parametrů, zda nedošlo ke změně jejich optimálních hodnot.

4.1.1 Hodnocení ionizace, fragmentace a volba molekulárních a fragmentových iontů

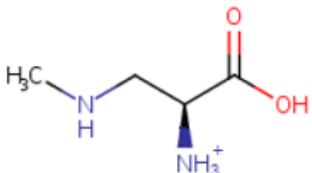
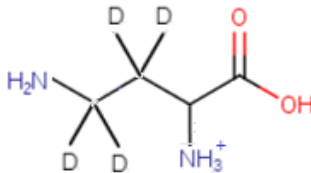
Ačkoli nebyl důvod předpokládat, že by mělo dojít k zásadním změnám v ionizaci či fragmentaci, byla tato měření provedena, a to zejména za účelem důkladnějšího rozboru a diskuse těchto zásadních částí této analytické techniky.

Na základě publikací [30] a [31] a vzhledem k použití metody ionizace vyhřívaným elektrosprejem v pozitivním módu byly pro molekuly obou sloučenin (viz Tab. 20) sestaveny struktury příslušných molekulárních iontů (viz Tab. 21).

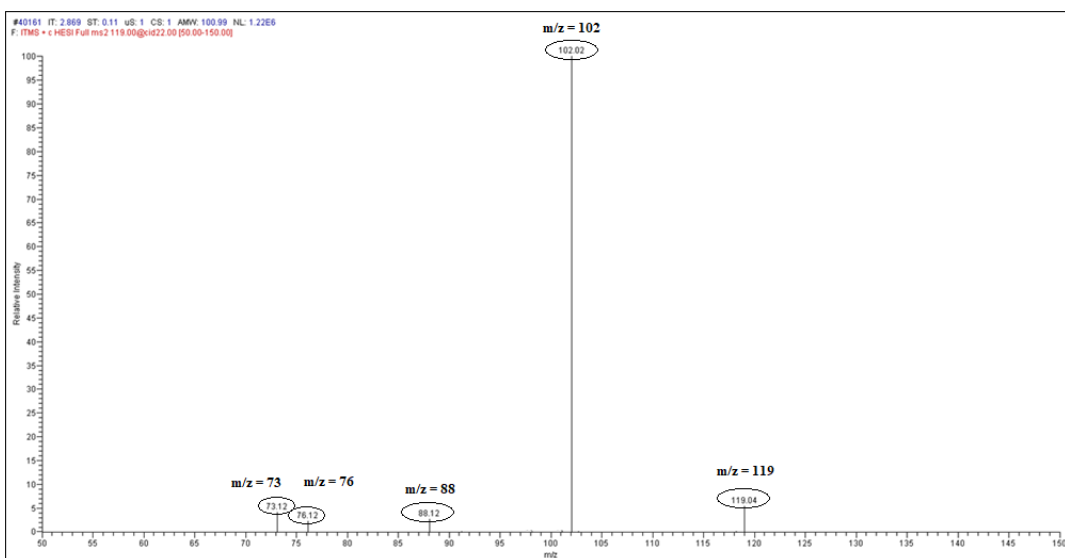
Tab. 20: Struktury molekul sloučenin.

BMAA ($M_r = 118 \text{ g.mol}^{-1}$)	d_4 -DAB ($M_r = 122 \text{ g.mol}^{-1}$)
	

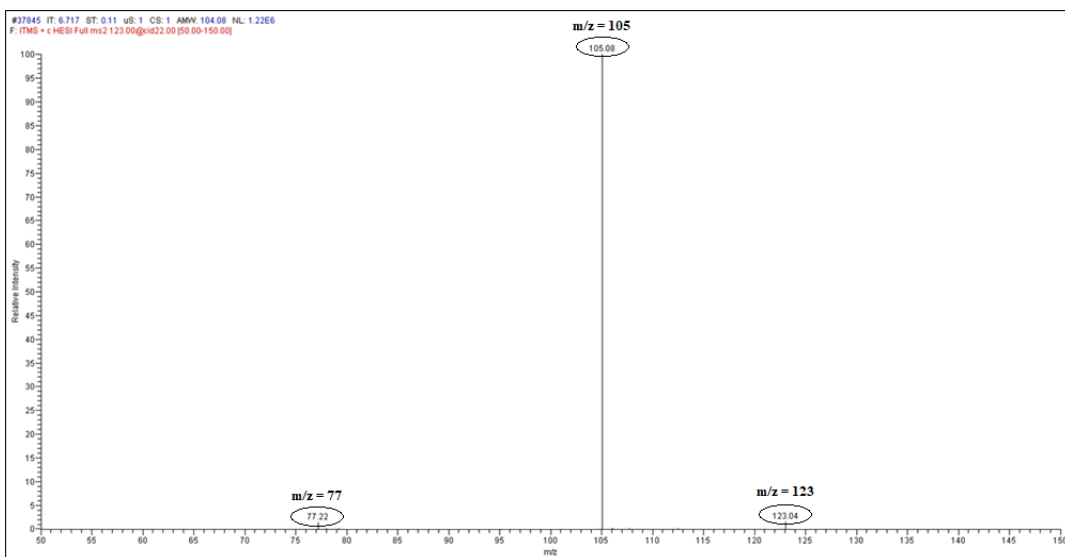
Tab. 21: Struktury molekulárních iontů sloučenin.

Molekulární iont $[M+H]^+$ pro BMAA $m/z = 119$	Molekulární iont $[M+H]^+$ pro d_4 -DAB $m/z = 123$
	

S ohledem na dodatečné seznámení s publikacemi [30] a [31] a na základě znalosti příslušných molekulárních iontů byly sestaveny struktury pravděpodobných fragmentových iontů pro dané MRM přechody uvedené na Obr. 10 a Obr. 11.



Obr. 10: Hmotnostní spektrum BMAA v MS² módu.



Obr. 11: Hmotnostní spektrum d₄-DAB v MS² módu.

Přehled zvolených MRM přechodů a pravděpodobné struktury fragmentových iontů jsou uvedeny v Tab. 22. Uvedené hodnoty relativních intenzit těchto iontů byly získány po aplikaci normalizované kolizní energie 22 % (tj. dle optimálních podmínek uvedených v bakalářské práci autora). Z důvodu omezení skenovacího rozsahu hmotnostní spektrometru nebyl přechod 119 → 44 pozorován.

Vzhledem ke komplexnosti matrice vzorků zamýšlených k analýze byl, oproti bakalářské práci autora, počet monitorovaných MRM přechodů rozšířen s cílem minimalizace rizika chybné identifikace. Pro každou z obou sloučenin byl tedy přiřazen jeden přechod ke kvantifikaci (základní pík spektra) a všechny ostatní přechody byly použity k ověření identity. Přehled zvolených přechodů je uveden v Tab. 23.

Tab. 22: Přehled zvolených MRM přechodů a pravděpodobné struktury fragmentových iontů

Slouč.	Přechod [m/z]	Intenzita [% rel.]	Pravděpodobný fragmentový iont	
BMAA	119 → 102	100	$[M+H-NH_3]^+$	
	119 → 88	3,0	$[M+H-CH_3-NH_2]^+$	
	119 → 76	2,5	$[M+H-CH_2=N-CH_3]^+$	
	119 → 73	4,0	$[M+H-HCOOH]^+$	
	119 → 44	mimo rozsah přístroje	$[CH_3-N=CH_2]^+$	
d4-DAB	123 → 105	100	$[M+H-H_2O]^+$	
	123 → 77	1,5	$[M+H-HCOOH]^+$	

Tab. 23: Přehled zvolených MRM přechodů.

Slouč.	Ion pro kvantifikaci	Ionty pro ověření		
BMAA	119 → 102	119 → 88	119 → 76	119 → 73
d4-DAB	123 → 105	123 → 77		

4.1.2 Elektrické napětí na S-čočkách a F-čočkách

S-čočky a F-čočky jsou kovové kruhové elektrody tvořící část vnitřní iontové optiky hmotnostního spektrometru, na něž je aplikována určitá hodnota elektrického napětí. Jejich funkce spočívá v zaostření iontů do úzkého svazku (S-čočky) a v regulaci rychlosti iontů při vstupu do iontové pasti (F-čočky). To je prováděno za účelem minimalizace ztrát iontů při jejich transportu z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru. V průběhu používání přístroje totiž dochází k postupnému znečišťování elektrod iontové optiky, což tyto procesy negativně ovlivňuje, protože optimální hodnoty elektrického napětí jsou na tomto znečištění závislé. Cílem tohoto hodnocení tedy bylo zjistit, zda nedošlo ke změnám optimálních hodnot elektrického napětí, při nichž bylo dosaženo nejvyššího iontového proudu (TIC).

Hodnocení bylo provedeno vždy pro MRM přechod iontu určeného pro kvantifikaci, a to ve 3 nezávislých opakováních. Byly testovány hodnoty elektrických napětí v rozmezí 0 V až 70 V pro S-čočky a -30 V až -4 V pro F-čočky. Hodnoty naměřených optim elektrických napětí pro obě části iontové optiky jsou uvedeny v Tab. 24.

Tab. 24: Optimální hodnoty elektrických napětí pro S-čočky a F-čočky.

MRM přechod [m/z]	S-čočky [V]			F-čočky [V]		
	Opak. 1	Opak. 2	Opak. 3	Opak. 1	Opak. 2	Opak. 3
119 → 102	65	66	68	-9,0	-9,0	-9,0
123 → 105	63	66	61	-9,0	-9,0	-9,0

V případě hodnocení elektrického napětí na S-čočkách bylo pro všechny uvedené přechody dosaženo různých optimálních hodnot elektrického napětí v rozmezí 61 až 68 V. V důsledku této mírné variability neumožňující zcela jednoznačnou volbu optimální hodnoty byly podrobněji prozkoumány příslušné optimalizační grafy uvedené v Příloze 8.2, přičemž bylo zjištěno, obdobně jako v bakalářské práci autora, že v oblasti přibližně od 60 do 70 V bylo dosaženo srovnatelných hodnot celkového iontového proudu. Hodnota elektrického napětí na S-čočkách byla tedy ponechána na hodnotě 65 V.

V případě hodnocení elektrického napětí na F-čočkách bylo pro všechny uvedené přechody dosaženo stejných optimálních hodnot elektrického napětí, a to -9,0 V. Na základě naměřených hodnot získaných z příslušných optimalizačních grafů elektrického napětí a uvedených v Tab. 24 (resp. v Příloze 8.2) došlo k nepatrné úpravě hodnoty elektrického napětí na F-čočkách z -8,5 na -9,0 V.

4.1.3 Energie kolizně indukované disociace

Volba vhodné hodnoty energie kolizně indukované disociace je důležitá pro zajištění dostatečné a reprodukovatelné fragmentace iontu prekurzoru na produktové (fragmentové) ionty, jež jsou důležité pro správnou identifikaci a kvantifikaci. Nezbytné je také dbát na to, aby nebyla aplikována příliš nízká, resp. příliš vysoká energie, v důsledku čehož by mohlo docházet k nežádoucím jevům ovlivňující kvantifikaci analytů.

Cílem tohoto hodnocení tedy bylo zjistit, zda nedošlo ke změnám optimálních hodnot kolizní energie, při nichž bylo dosaženo nejvyššího iontového proudu (TIC). Měření energie kolizně indukované disociace, kterou výrobce přístroje vyjadřuje jako normalizovanou kolizní energii (NCE), bylo provedeno vždy třikrát pro každý MRM přechod, a to v rozmezí od 0 % do 100 %. Hodnoty naměřených optim NCE jsou uvedeny v Tab. 25.

Tab. 25: Naměřené hodnoty optim NCE pro jednotlivé přechody.

Měření		MRM přechod [m/z]					
		119 - 102	119 - 88	119 - 76	119 - 73	123 - 105	123 - 77
NCE [%]	1	22	25	24	24	21	23
	2	22	25	26	24	21	23
	3	22	24	24	22	22	22

Na základě hodnot NCE uvedených v Tab. 25 bylo zjištěno, že se optimální hodnota pro všechny výše uvedené přechody pohybovala v rozmezí od 21 % do 26 %. Detailnější prozkoumání příslušných optimalizačních grafů uvedených v Příloze 8.2 prokázalo, že v širší oblasti NCE cca od 20 % do 40 % bylo u výše uvedených MRM přechodů dosaženo velmi podobné intenzity celkového iontového proudu (TIC). Při vyšších hodnotách NCE pak docházelo k postupnému poklesu intenzity iontového proudu. S ohledem na tyto skutečnosti a s cílem zajistit maximální odezvu MRM přechodů určené ke kvantifikaci, byla jako optimální ponechána hodnota 22 %.

Optimální hodnota NCE byla ovšem později upravena na hodnotu 35 %, neboť v průběhu validace metody bylo prokázáno snížení účinnosti a reprodukovatelnosti fragmentace molekulových iontů analytu jak u roztoků čistých standardů, tak následně i u reálných vzorků s obsahem matrice. Jedním z možných důvodů mohla být fluktuační hodnota NCE kolem optimální hodnoty 22 %, jež vykazovala maxima na optimalizačních grafech kvantifikačních přechodů, ale zároveň se nacházela v těsné blízkosti části prudkého poklesu intenzity iontového proudu.

V Příloze 8.2 jsou znázorněny změny relativní intenzity molekulárního iontu analytu i jeho příslušných fragmentových iontů po aplikaci obou hodnot NCE. Z naměřených spekter je patrné, že v případě demonstrace výše uvedeného problému na kalibrační křivce dochází k výraznému zvýšení účinnosti a reprodukovatelnosti fragmentace molekulárního iontu analytu při hodnotě NCE 35 % oproti hodnotě NCE 22 %. V případě účinnosti fragmentace molekulárního iontu vnitřního standardu samozřejmě nedošlo k žádným nežádoucím změnám. Hodnota NCE byla tedy pro obě sloučeniny zvýšena z 22 % na 35 %.

4.1.4 Souhrn optimálních podmínek

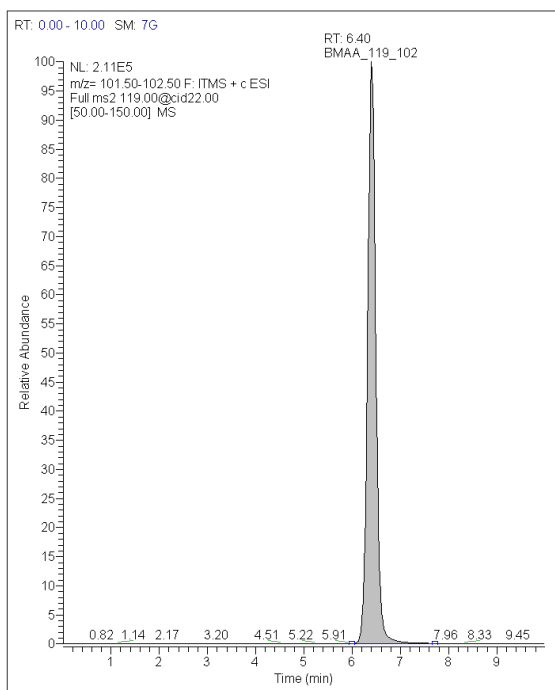
Chromatografická separace:

- 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: 25 μl
- Teplota kolony: 30 °C
- Teplota autosampleru: 6 °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)
- Celková doba analýzy: 9 min

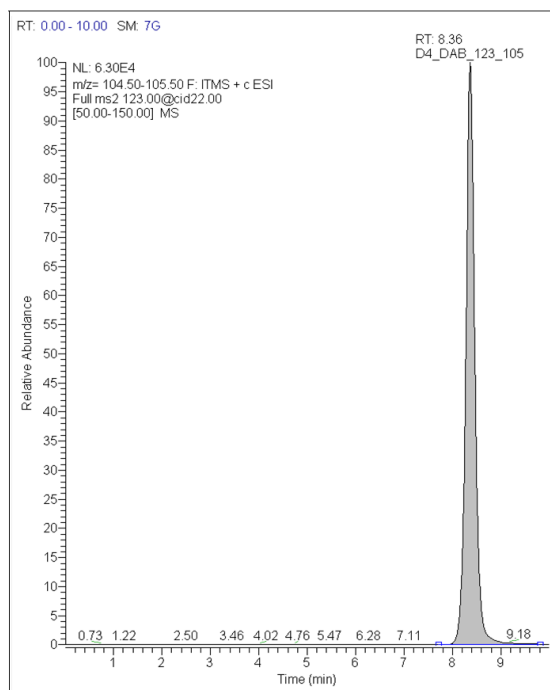
Hmotnostní detekce:

- Teplota transferové trubice: 250 °C
- Teplota kapiláry: 250 °C
- Poměr průtoků plynu (S/A): 30/10 Arb.
- Elektrické napětí na F-čočkách: - 9,0 V
- Elektrické napětí na S-čočkách: + 65 V
- Napětí na kapiláře: 3,0 kV
- BMAA
 - MRM přechod pro kvantifikaci: m/z 119 → 102
 - kolizní energie: 22 %, později přenastaveno na 35 %
 - typ skenu: Full MS/MS (v rozmezí 50 – 150 m/z)
 - doba plnění pasti: 100 ms
 - počet mikroskenů: 1
- d₄-DAB
 - MRM přechod pro kvantifikaci: m/z 123 → 105
 - kolizní energie: 22 %, později přenastaveno na 35 %
 - typ skenu: Full MS/MS (v rozmezí 50 – 150 m/z)
 - doba plnění pasti: 100 ms
 - počet mikroskenů: 1

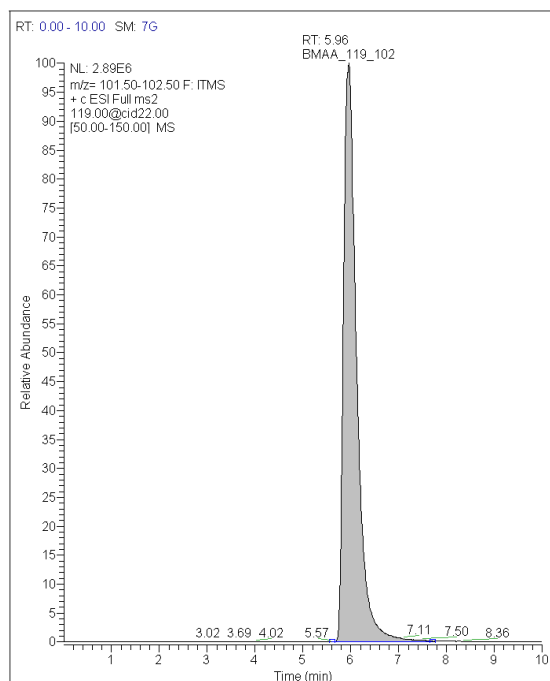
Na následujících obrázcích jsou pro porovnání uvedeny chromatogramy obou sloučenin o koncentraci 1 mg.l^{-1} získané za optimálních podmínek v rámci bakalářské (Obr. 12 a 13) a diplomové (Obr. 14 a 15) práce autora [32]. Posun retenčních časů pík standardů je způsoben již mírnou degradací stacionární fáze kolony.



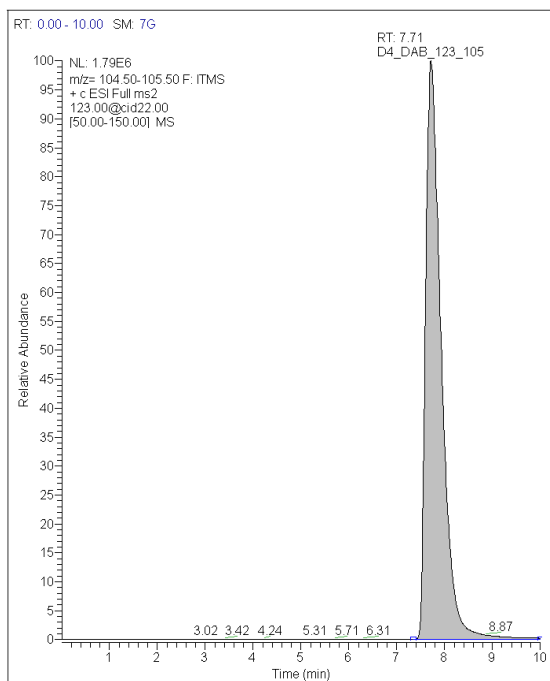
Obr. 12: Chromatogram BMAA (dle BP).



Obr. 13: Chromatogram d₄-DAB (dle BP).



Obr. 14: Chromatogram BMAA (dle DP).



Obr. 15: Chromatogram d₄-DAB (dle DP).

4.2 Test vhodnosti systému

Testy vhodnosti systému (System Suitability Test, SST) by měly být nedílnou součástí dlouhodobého monitoringu při používání chromatografických metod, protože nikdy nelze předpokládat vždy způsobilé chování analytického systému. Tyto testy mají být prováděny pravidelně po celé období aktivního používání analytické metody a slouží k ověření analytického systému, zda v daném čase splňuje základní požadavky pro spolehlivé provedení aktuálně zamýšlených analýz. SST je tedy jedním ze základních rysů všech analytických postupů vycházející z koncepce, že zařízení, elektronika, analytické operace a analyzované vzorky, představují jednotný systém, jenž lze hodnotit jako celek. SST se provádí provedením opakovaných analýz standardních roztoků a následným porovnáním experimentálně zjištěných hodnot monitorovaných parametrů s požadovanými hodnotami kritérií přijatelnosti, pokud není uvedeno jinak [33-35].

Minimálními doporučenými parametry hodnocenými v rámci SST určených pro chromatografické metody jsou opakovatelnost (RSD retenčního času, nástřiku – resp. plochy/výšky píku), rozlišení (popř. separační faktor), kapacitní faktor, faktor symetrie a účinnost kolony (resp. počet teoretických pater) [33]. Popis a vyhodnocování výše uvedených parametrů (viz též Tab. 26) je uveden v Příloze 8.3.

V Tab. 26 jsou uvedeny parametry a jejich kritéria přijatelnosti ze dvou různých dokumentů. Je však důležité si uvědomit, že daná kritéria neudávají optimální hodnoty, ale minimální akceptovatelné hodnoty. Většina analytických metod přijímá obecná kritéria z pokynů v dokumentu CDER [33,36].

Tab. 26: Porovnání SST kritérií na základě různých doporučení [33,36].

Parametr	Symbol	Doporučení dle CDER	Doporučení dle Hsu a Chien
Opakovatelnost	RSD	$\leq 1,0 \%$ (pro $n \geq 5$)	$\leq 1,5 \%$
Rozlišení	R	$> 2,0$	$> 2,0$
Separací faktor	α	nedefinováno*	nedefinováno*
Kapacitní faktor	K	> 2	2 až 8
Faktor symetrie	A	$\leq 2,0$	1,5 až 2,0
Účinnost kolony	N	> 2000	nedostupné

Pozn.: Pokud je hodnoceno rozlišení, není nutné hodnotit separační faktor [34]; n = počet měření

SST této analytické metody bylo prováděno zejména za účelem kontroly, zda nezačalo docházet k významným změnám v chromatografické separaci, a to v důsledku možnosti degradace stacionární fáze chromatografické kolony, resp. vlivem jejího postupného stárnutí.

Pro účely SST byly použity kalibrační roztoky standardů K1 a K5, přičemž většina parametrů byla vyhodnocena na základě 10 po sobě jdoucích nástřiků roztoku standardu K5. V případě opakovatelnosti nástřiku bylo vyhodnocování prováděno na základě 8 nástřiků pro 2 různé koncentrační úrovně roztoků standardů (tj. kalibrační body K1, K5). V následujících tabulkách (Tab. 27 a Tab. 28) jsou uvedeny výsledky vyhodnocení SST parametrů, primární data jsou uvedena v Příloze 8.3.

Tab. 27: Vyhodnocení parametrů pro roztok standardů K5.

Nástřik	Parametr							
	$R_{ST,VS}$	K_{ST}	K_{VS}	α	N_{ST}	N_{VS}	A_{ST}	A_{VS}
	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]
1	3,1	3,1	4,3	1,4	3800	5146	1,36	1,39
2	3,6	3,1	4,3	1,4	3786	5146	1,45	1,39
3	3,8	3,1	4,3	1,4	3450	5609	1,48	1,43
4	3,8	3,1	4,3	1,4	3463	5609	1,48	1,43
5	3,7	3,1	4,2	1,4	3168	5625	1,43	1,39
6	3,8	3,1	4,3	1,4	3450	5132	1,48	1,43
7	3,8	3,2	4,3	1,4	3842	4835	1,43	1,32
8	3,7	3,2	4,3	1,4	3551	5294	1,50	1,43
9	3,8	3,2	4,3	1,4	2358	5294	1,48	1,45
10	3,9	3,2	4,3	1,4	3551	5279	1,43	1,45
Průměr	3,7	3,1	4,3	1,4	3442	5297	1,46	1,41

Tab. 28: Vyhodnocení opakovatelnosti pro roztok standardů K1 a K5.

Parametr	Jednotky	Slouč.	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	
			0,1	1,0
Opakovatelnost nástřiku	[%]	BMAA	0,7	1,0
		d ₄ -DAB	0,9	0,9
Opakovatelnost retenčního času	[%]	BMAA	nehodnoceno	0,6
		d ₄ -DAB	nehodnoceno	0,7

Opakovatelnost retenčního času vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (RSD) pro 10 nástřiků kalibračního roztoku standardu K5 byla 0,6 % (BMAA) a 0,7 % (d₄-DAB). Opakovatelnost nástřiku vyjádřená jako RSD pro 8 nástřiků kalibračních roztoků K1 a K5 dosahovala hodnot od 0,7 do 1,0 % (BMAA) a 0,9 % (d₄-DAB) v rozmezí 0,1 – 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Na základě výsledků uvedených v Tab. 27 a Tab. 28 bylo u všech SST parametrů dosaženo akceptovatelných hodnot kritérií přijatelnosti požadovaných dle dokumentu CDER uvedených v Tab. 26. Tím bylo prokázáno, že analytický přístroj je způsobilý pro provádění zamýšlených analýz.

4.3 Validace analytické metody

Po provedeném testování vhodnosti systému (SST) byla provedena validace analytické metody, jejíž výsledky by měly sloužit k ověření spolehlivosti poskytovaných výsledků. Validace analytické metody je také často vyžadována většinou regulačních předpisů [37]. Primárním zdrojem obsahující doporučení a definice validačních parametrů např. pro oblast farmaceutického průmyslu je dokument Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) [38].

Požadavky na rozsah provedení validace, volbu hodnocených validačních parametrů, hodnot kritérií přijatelnosti apod., které jsou pro daný typ analytické metody vyžadovány, jsou vždy dány požadavky systému kvality, ve kterém daná laboratoř pracuje nebo požadavky jiných autorit [37,38]. Typickými hodnocenými validačními parametry většiny analytických metod jsou specifická, linearita, přesnost, správnost, rozsah, mez detekce (DL), mez stanovitelnosti (QL) a robustnost [38].

Tato analytická metoda byla validována na modelu kalibrační křivky, a to na základě objektivního posouzení experimentálně zjištěných hodnot příslušných validačních parametrů. Účelem validace bylo definovat analytické požadavky spolu s uvedením jejich kritérií přijatelnosti a zároveň demonstrovat, že uvažovaná analytická metoda je vhodná pro její zamýšlené použití pro kvantitativní analýzu neurotoxinu BMMA ve vodě a v biomase.

Základními hodnocenými validačními parametry byly:

- linearita
- přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost i jako mezilehlá přesnost)
- správnost (vyjádřená jako výtěžnost)
- rozsah
- mez detekce
- mez stanovitelnosti

4.3.1 Linearita

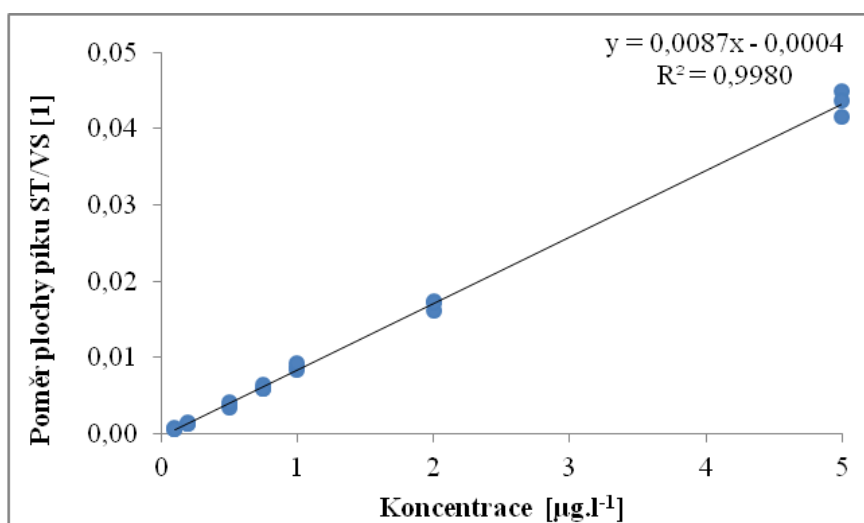
Prvním hodnoceným validačním parametrem byla linearita analytické metody, jejímž cílem bylo prokázat, že odezva detektoru vyjádřená jako poměr plochy analytu ku poměru plochy vnitřního standardu je přímo úměrná koncentraci (resp. množství) analytu ve vzorku [37,39]. Kalibrační křivka je pro účely kvantitativní analýzy považována za dostatečně lineární, jestliže je hodnota koeficientu korelace (R) $\geq 0,99$ [40] a zároveň je hodnota koeficient kvality (QC) $\leq 5,00\%$ a zároveň by rovnice kalibrační křivky měla mít intercept blízký nule, jinak by mělo být ověřeno, že to nemá vliv na přesnost metody [37,40].

Na základě publikací [37] a [39], doporučující použít pro sestavení kalibrační křivky minimálně 5 koncentračních úrovní ve 3 nezávislých opakováních, bylo pro účely této práce připraveno celkem 7 kalibračních bodů pokrývajících pracovní rozsah na koncentrační úrovni $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ až $5,0 \mu\text{g.l}^{-1}$. Vyhodnocení validačních parametrů linearity je uvedeno v Tab. 29.

Tab. 29: Shrnutí vyhodnocení validačních parametrů – linearita.

Parametr	Symbol	Kritérium přijatelnosti	Hodnota
Směrnice - citlivost [$\text{l}.\mu\text{g}^{-1}$]	k	neuveďeno	0,0087
Intercept [1]	q	neuveďeno	-0,0004
Koeficient korelační [1]	R	$\geq 0,99$	0,9980
Koeficient kvality [%]	QC	$\leq 5,00$	1,89

Podle publikace Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient [40] byla splněna všechna kritéria přijatelnosti, jež byla vyhodnocena v programu EffiValidation 3.0 a MS Office Excel. Na Obr. 16 lze vidět příslušnou kalibrační křivku s regresní rovnicí ve tvaru $y = kx + q$.



Obr. 16: Kalibrační křivka.

4.3.2 Správnost a přesnost

Správnost a přesnost analytické metody byly validovány dle požadavků uvedených v publikaci Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [39].

Správnost analytické metody vyjadřující těsnost shody mezi hodnotou referenční a hodnotou zjištěnou byla vyjádřena jako výtěžnost analytické metody pomocí procent [39].

Přesnost analytické metody vyjadřující těsnost shody mezi výsledky měření získaných opakovaným nástřikem vzorku byla vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky [39].

Oba výše zmíněné validační parametry byly testovány na dvou různých úrovních za stejných pracovních podmínek, avšak v různých časových intervalech (viz níže) [37,39]:

- intra-day tj. přesnost a správnost dosažená v rámci jednoho dne
- inter-day tj. přesnost a správnost dosažená v rámci několika dní (1., 2. a 14. den)

Testování validačních parametrů správnosti a přesnosti bylo aplikováno na modelu kalibrační křivky vyhovující požadavkům na linearitu v rozmezí koncentrací 0,1 až 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno v programu EffiValidation 3.0 a MS Office. Hodnoty kritérií přijatelnosti byly převzaty z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F [41]. Shrnutí výsledků správnosti a přesnosti je uvedeno v Tab. 30 a Tab. 31., primární data jsou uvedena v Příloze 8.4.

Tab. 30: Vyhodnocení správnosti a přesnosti – intra-day (v rámci 1 dne).

C _{teor.} [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	C _{exp.} [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Kritéria přijatelnosti		Hodnoty	
		Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]
0,10	0,118	40 – 120	≤ 30	118	2,7
0,20	0,197			98	10,4
0,50	0,473			95	8,5
0,75	0,736			98	3,9
1,0	1,044			104	5,3
2,0	1,977	60 – 115	≤ 21	99	3,8
5,0	5,005			100	3,8

Tab. 31: Vyhodnocení správnosti a přesnosti – inter-day (v rámci 2 týdnů).

C _{teor.} [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	C _{exp.} [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Kritéria přijatelnosti		Hodnoty	
		Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]
0,10	0,082	40 – 120	≤ 30	82	2,8
0,20	0,196			98	10,3
0,50	0,487			97	18,4
0,75	0,787			105	6,8
1,0	0,967			97	7,8
2,0	2,059	60 – 115	≤ 21	103	8,9
5,0	4,987			100	1,4

Cílem hodnocení intra-day a inter-day správnosti a přesnosti bylo ověřit, že analytická metoda poskytuje i v průběhu několika dní správné a přesné výsledky. Reprodukovatelnost, přesnost analytické metody v rámci různých laboratoří, nebyla v této práci testována.

Na základě výsledků správnosti a přesnosti uvedených v Tab. 30 a Tab. 31, bylo zjištěno, že intra-day správnost a přesnost se pohybuje v rozmezí 95 – 118 % a 2,7 – 10,4 % a že inter-day správnost a přesnost se pohybuje v rozmezí 82 – 105 % a 1,4 – 18,4 %.

S ohledem na výše uvedené výsledky správnosti a přesnosti bylo zjištěno, že pro všechny koncentrační úrovně byla splněna příslušná kritéria přijatelnosti, čímž bylo prokázáno, že metoda poskytuje výsledky s dostatečnou správností a přesností.

4.3.3 Rozsah

Dalším validačním parametrem byl rozsah analytické metody udávající rozmezí koncentrací analytu, v němž poskytuje příslušná analytická metoda výsledky s dostatečnou správností a přesností [37,39]. Rozsah analytické metody je vždy omezený [40].

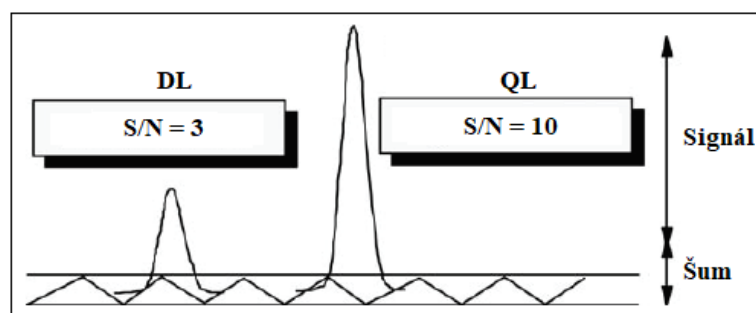
Na základě vyhodnocení výsledků linearity, správnosti a přesnosti bylo potvrzeno, že analytická metoda použitá v rámci této práce poskytuje výsledky s dostatečnou správností a přesností v rozsahu koncentrací analytu 0,1 – 5,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

4.3.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Posledními hodnocenými validačními parametry byly DL a QL, jejichž uvádění je obecně vyžadováno při vývoji analytických metod určených pro stopovou analýzu [42].

Mez detekce (DL) a mez stanovitelnosti (QL) byly stanoveny postupným snižováním koncentrace analytu [43] v roztoku K1, až do okamžiku, kdy bylo dosaženo požadovaného poměru signálu k šumu S/N dle požadavků uvedených v publikaci Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) [39],

Za přijatelný odhad DL a QL je považován poměr S/N odpovídající hodnotě 3 pro DL a hodnotě 10 pro QL (viz Obr. 17), jak také uvádí publikace [39], [43] a [44].



Obr. 17: Odhad DL a QL - upraveno [37].

Zjištěné hodnoty poměru signálu k šumu (S/N) pro velmi nízké koncentrace analytu byly použity z vyhodnocovacího programu Xcalibur a jsou uvedeny v Tab. 32.

Tab. 32: Vyhodnocení DL a QL.

	Koncentrace analytu														
	10 ng.l ⁻¹			20 ng.l ⁻¹			40 ng.l ⁻¹			60 ng.l ⁻¹			80 ng.l ⁻¹		
Série	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
S/N [1]	3	3	3	5	5	5	10	9	10	15	11	12	17	18	16

Na základě zjištěných poměrů S/N analytu uvedených v Tab. 32 bylo zjištěno, že analytická metoda dosahuje DL při koncentraci 10 ng.l⁻¹ a QL při koncentraci 40 ng.l⁻¹.

4.4 Optimalizace SPE extrakce

V rámci této kapitoly bylo provedeno testování obecného postupu SPE pro extrakci bazických analytů uvedeného výrobcem. Dále byla také provedena základní optimalizace parametrů, které by mohly mít vliv na výtěžnost extrakce analytů. Mezi optimalizované parametry byla zařazena optimalizace pH vzorku, složení elučního činidla a objemu vzorku.

Výtěžnost extrakce byla vždy počítána vzhledem k referenčnímu vzorku, jehož příprava je uvedena v Kap. 3.3.2. Výpočet výtěžnosti extrakce byl proveden dle vzorce [45]:

$$\text{Výtěžnost} = 100 \cdot \frac{\text{EXP}}{\text{REF}} \quad [\%]$$

EXP ... plocha píku zjištěná v obohaceném vzorku

REF ... plocha píku zjištěná v referenčním vzorku

Za účelem kontroly celého extrakčního procesu byly ve většině případů jímány a analyzovány všechny frakce získané po kondicionaci a ekvilibraci kolonky s cílem zjistit, zda nedochází v průběhu extrakčního procesu k některému z nežádoucích procesů jako je například překročení sorpční kapacity sorbentu, špatně zvolené podmínky přípravy vzorku, vymývání analytů během promývacích kroků nebo ke špatně zvolenému objemu elučního činidla, který není dostačující pro eluci většinového podílu analytů. Mezi tyto frakce patřily frakce získané po nanesení vzorku, po promytí okyseleným roztokem, po promytí metanolem a po provedené eluci. Frakce získaná po nanesení vzorku byla analyzována za účelem zjištění, zda bylo vhodně zvoleno pH roztoku a zajištěna maximální retence analytu, popř. zda nebyla překročena sorpční kapacita sorbentu.

4.4.1 Testování výtěžnosti extrakce dle obecného postupu výrobce

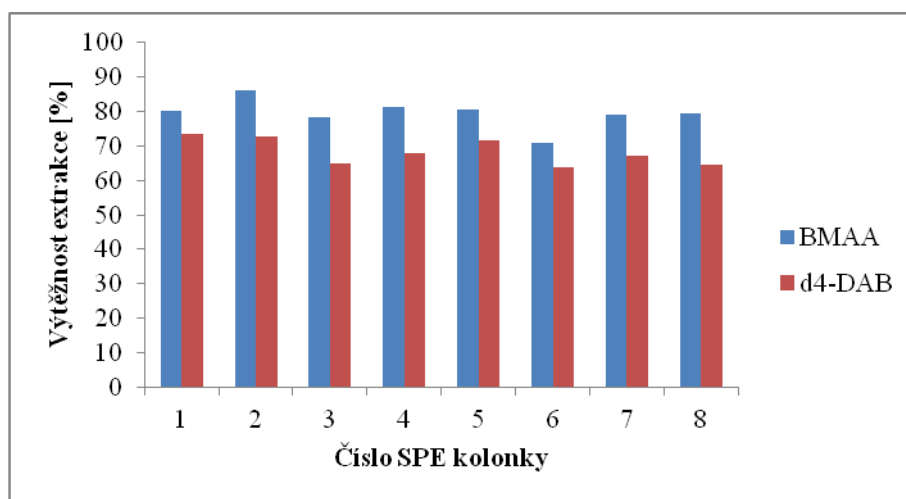
Testování výtěžnosti extrakce na základě obecného postupu výrobce (Kap. 2.2.2) bylo provedeno za účelem ověření, zda je uvedený postup vhodný pro extrakci BMAA a d₄-DAB. Testování bylo provedeno celkem pro 8 SPE kolonek.

Roztok standardů určený pro testování výtěžnosti extrakce byl připraven dle postupu uvedeného v Kap. 3.3.5. Výsledky testování výtěžnosti extrakce jsou uvedeny v Tab. 33. Pro lepší přehlednost jsou na Obr. 18 uvedeny výtěžnosti extrakce v grafické podobě. Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce jsou k nahlédnutí v Příloze 8.5.

Tab. 33: Zjištěná výtěžnost extrakce dle obecného postupu výrobce.

Slouč.	Výtěžnost extrakce [%]							
	SPE 1	SPE 2	SPE 3	SPE 4	SPE 5	SPE 6	SPE 7	SPE 8
BMAA	80,4	86,1	78,4	81,4	80,8	71,1	78,9	79,6
d₄-DAB	73,4	72,7	65,0	68,0	71,7	63,9	67,3	64,6

Na základě výsledků uvedených v Tab. 33 bylo zjištěno, že výtěžnost extrakce vyjádřená jako průměr \pm RSD je $79,6 \pm 5,3$ % (BMAA) a $66,6 \pm 5,8$ % (d₄-DAB). Z uvedených hodnot je patrné, že pro obě sloučeniny bylo překvapivě dosaženo rozdílných hodnot výtěžností, přestože se jedná o izomery. Dále byla pozorována vyšší variabilita ve výtěžnosti extrakce v rámci jednotlivých kolonek, což je indikováno vyšší hodnotou RSD.



Obr. 18: Výtěžnost extrakce dle obecného postupu výrobce.

S ohledem na výše uvedené výsledky a závěry byla provedena optimalizace klíčových parametrů. Tím by mohlo být dosaženo nižší variability a vyšší výtěžnosti extrakce, což by vedlo ke zvýšení přesnosti a snížení meze detekce metody.

4.4.2 Optimalizace pH vzorku

Jako první byla provedena optimalizace pH vzorku, které má zásadní vliv na retenci bazických analytů na MCX sorbentu. Cílem optimalizace bylo zjistit, při jaké hodnotě pH vzorku je dosaženo maximální retence sloučenin BMAA a d₄-DAB na MCX sorbentu na základě hodnocení jejich absolutní plochy píku a dále i výtěžnosti extrakce.

Pro účely optimalizace byly použity roztoky standardů o různých hodnotách pH, jejichž příprava je uvedena v Kap. 3.3.6. Každý roztok standardů byl extrahován z ekonomických důvodů pouze jednou, a to dle postupu uvedeného v Kap. 3.4.

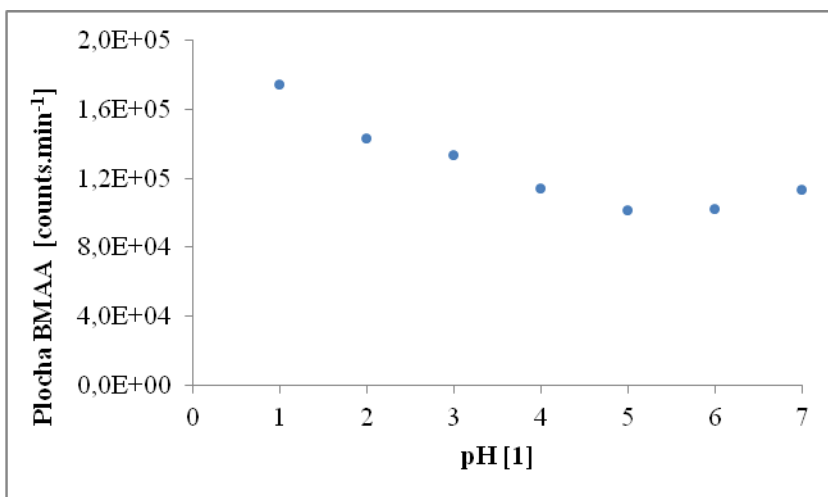
V rámci této optimalizace bylo testováno 7 různých hodnot pH v rozmezí 1 – 7. Pro každou hodnotu pH byla daná SPE kolonka ekvilibrována roztokem HCl o témže pH. Vliv pH vzorku na plochu píku je znázorněn na Obr. 19 (BMAA) a Obr. 20 (d₄-DAB). Výsledky výtěžnosti extrakce jsou uvedeny v Tab. 34, primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce jsou k nahlédnutí v Příloze 8.5.

Tab. 34: Vliv pH vzorku na výtěžnost extrakce.

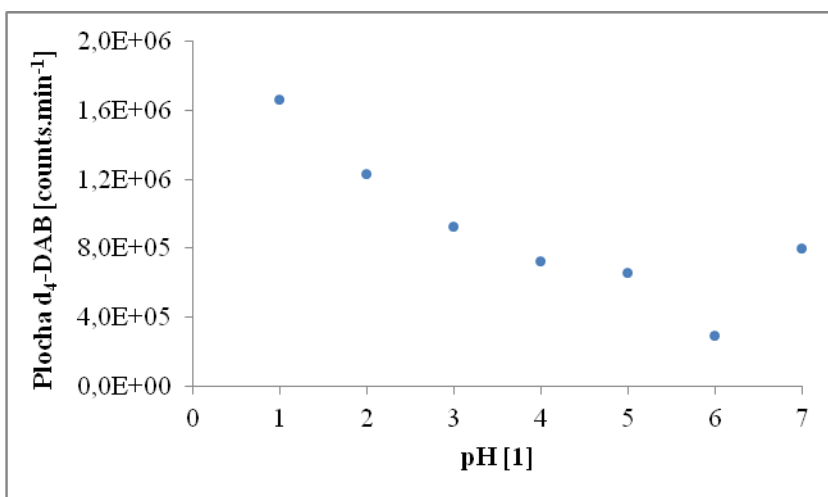
Slouč.	Výtěžnost extrakce [%]						
	pH 1	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
BMAA	80,8	66,4	61,9	53,0	47,2	47,6	52,8
d₄-DAB	75,7	56,0	42,0	33,0	29,9	13,4	36,2

Z Obr. 19 a Obr. 20 je patrné, že s rostoucí hodnotou pH vzorku postupně klesala plocha píku příslušné sloučeniny, přičemž pokles plochy píku byl mnohem výraznější u d₄-DAB. Kromě toho byl také pozorován mírný nárůst plochy píku obou sloučenin při hodnotě pH 7, což bylo zřejmě způsobeno větší převahou hydrofobních interakcí. Naopak iontově-výměnné interakce jsou při hodnotě pH 7 výrazně slabší, neboť molekuly analytů již nesou pouze jeden kladný náboj. Při hodnotě pH 6 byl také u d₄-DAB zaznamenán neobvyklý pokles plochy píku, jehož příčina však nebyla zkoumána, neboť neměla vliv na výsledky optimalizace.

Z výsledků uvedených v Tab. 34 je zřejmé, že nejvyšších hodnot výtěžnosti extrakce, 80,8 % (BMAA) a 75,7 % (d₄-DAB), bylo dosaženo pro obě sloučeniny při hodnotě pH 1, kdy na MCX sorbentu dominují iontově-výměnné interakce. Na základě výsledků a závěrů uvedených výše byla tedy pro další optimalizační kroky zvolena hodnota pH roztoku 1.



Obr. 19: Závislost plochy píku BMAA na pH vzorku.



Obr. 20: Závislost plochy píku d₄-DAB na pH vzorku.

4.4.3 Optimalizace složení elučního činidla

V dalším kroku byla provedena dvoufázová optimalizace složení elučního činidla z hlediska obsahu koncentrovaného roztoku amoniaku ve směsi rozpouštědel metanol/voda. Snížení pH alkalickým elučním činidlem je velmi důležité pro uvolnění vázaných analytů.

Cílem této optimalizace byla snaha najít optimální složení alkalického elučního činidla za účelem dosažení co nejvyšší výtěžnosti extrakce BMAA a d₄-DAB.

Pro účely optimalizace složení elučního činidla byl použit roztok standardů, jehož příprava je uvedena v Kap. 3.3.7. SPE extrakce roztoku standardů byly provedeny z ekonomických důvodů pouze jednou, a to dle extrakčního postupu uvedeného v Kap. 3.4 a za použití elučních činidel o různém složení (viz dále).

1. fáze

V první fázi byla provedena optimalizace složení elučního činidla z hlediska obsahu koncentrovaného roztoku amoniaku (resp. NH_4OH). Příprava elučních činidel použitých v rámci první fáze optimalizace složení elučního činidla je uvedena v Kap. 3.3.8.

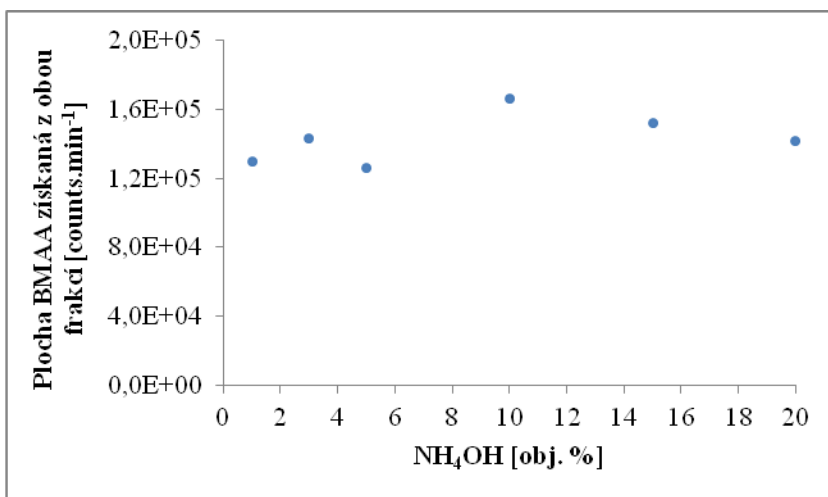
Složení elučního činidla bylo testováno v rozmezí 1 až 20 obj. % roztoku amoniaku. Pro každou hodnotu obsahu NH_4OH (viz Tab. 35) byla provedena vždy 1 SPE extrakce, tj. celkem bylo provedeno 6 SPE extrakcí. První frakce byla získána elucí 3 x 600 μl příslušného elučního činidla. Druhá frakce byla získána stejným způsobem jako první frakce, přičemž obě frakce byly jímány zvlášť.

Výsledky 1. fáze optimalizace složení elučního činidla jsou uvedeny na Obr. 21 a 22 a v Tab. 35. Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce jsou uvedena v Příloze 8.5.

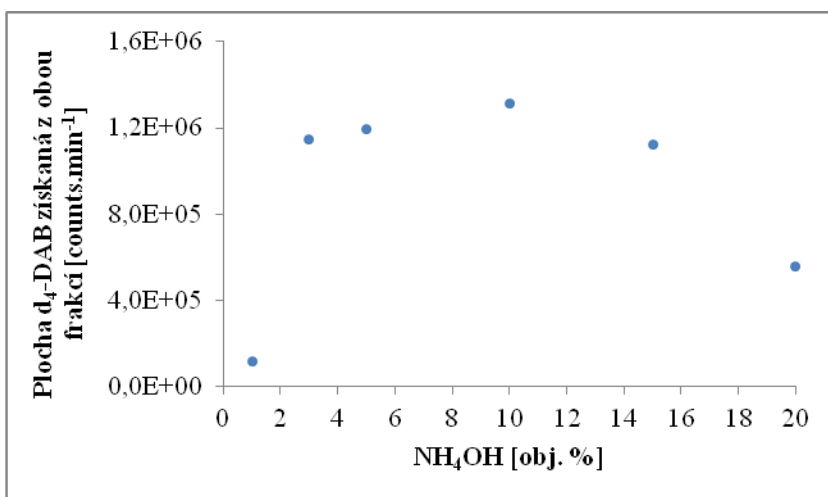
Tab. 35: Výtěžnost BMAA a $\text{d}_4\text{-DAB}$ v jednotlivých frakcích – 1. fáze.

NH_4OH [obj. %]	Výtěžnost extrakce [%]					
	BMAA			$\text{d}_4\text{-DAB}$		
	1. frakce	2. frakce	Celkem	1. frakce	2. frakce	Celkem
1	48,1	14,5	62,6	1,0	4,6	5,6
3	66,3	2,6	68,9	51,7	4,2	55,9
5	59,1	1,8	60,9	56,6	1,8	58,4
10	78,7	1,4	80,1	63,5	0,7	64,2
15	71,8	1,7	73,5	54,4	0,5	54,8
20	66,6	1,8	68,4	26,8	0,4	27,2

Na Obr. 21 a Obr. 22 je znázorněn vliv obsahu NH_4OH na plochu píku BMAA a $\text{d}_4\text{-DAB}$ získanou součtem plochy píku z obou frakcí. Z obrázků je zřejmé, že nejvyšší plochy píku BMAA i $\text{d}_4\text{-DAB}$ bylo shodně dosaženo v případě použití elučního činidla s obsahem 10 obj. % NH_4OH . Na základě výsledků uvedených v Tab. 35 bylo dále zjištěno, že při tomto složení elučního činidla bylo též dosaženo nejvyšší hodnoty výtěžnosti, a to 80,1 % (BMAA) a 64,2 % ($\text{d}_4\text{-DAB}$). Rovněž bylo prokázáno, že ve většině testovaných hodnot, byla většina množství eluovaných sloučenin přítomna v první frakci, vyjma elučního činidla s nejnižším obsahem NH_4OH . V případě plochy píku BMAA získané z obou frakcí bylo při všech testovaných hodnotách dosaženo relativně podobné plochy píku, zatímco v případě plochy píku $\text{d}_4\text{-DAB}$, bylo u elučního činidla s nejnižším a nejvyšším obsahem NH_4OH dosaženo v porovnání s ostatními testovanými hodnotami výrazně nižších ploch.



Obr. 21: Vliv obsahu NH₄OH na plochu píku BMAA získanou součtem obou frakcí.



Obr. 22: Vliv obsahu NH₄OH na plochu píku d₄-DAB získanou součtem obou frakcí.

Mimo jiné byla zaznamenána nižší hodnota plochy píku BMAA, než bylo očekáváno, a to při použití elučního činidla s 5 obj. % NH₄OH v MeOH. Tento neočekávaný pokles by pravděpodobně mohl být způsoben nedostatečnou kondicionací a ekvilibrací SPE kolonky.

2. fáze

V druhé fázi byla provedena optimalizace složení elučního činidla z hlediska obsahu směsi rozpouštědel metanol/voda (dále jen MeOH/H₂O). Příprava elučních činidel použitých v rámci druhé fáze optimalizace složení elučního činidla je uvedena v Kap. 3.3.8.

Složení elučního činidla bylo testováno v rozmezí 0 až 100 obj. % MeOH a H₂O. Pro každou hodnotu obsahu MeOH/H₂O (viz Tab. 36) byla provedena vždy 1 SPE extrakce, tj. celkem bylo provedeno 6 SPE extrakcí. První frakce byla získána elucí 3 x 600 µl příslušného elučního činidla. Druhá frakce byla získána stejným způsobem jako první frakce, přičemž obě frakce byly jímány zvlášť.

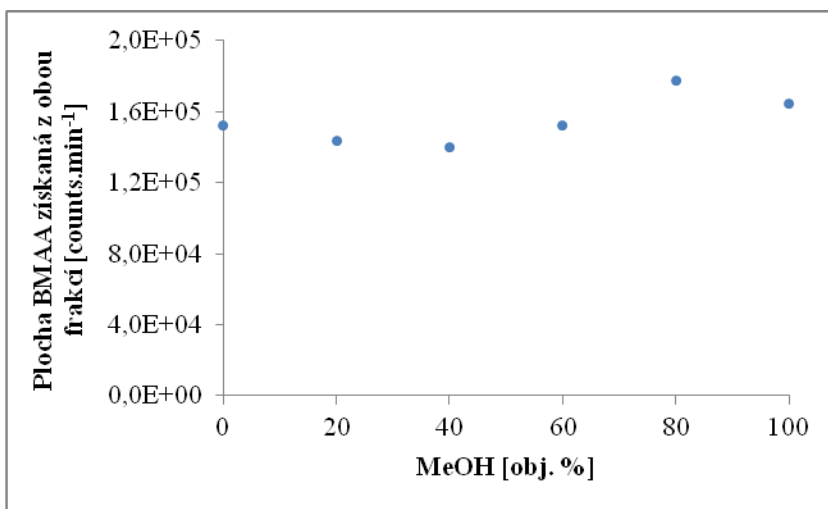
Výsledky 2. fáze optimalizace složení elučního činidla jsou uvedeny na Obr. 23 a 24 a v Tab. 36. Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce jsou uvedena v Příloze 8.5.

Tab. 36: Výtěžnost BMAA a d₄-DAB v jednotlivých frakcích – 2. fáze.

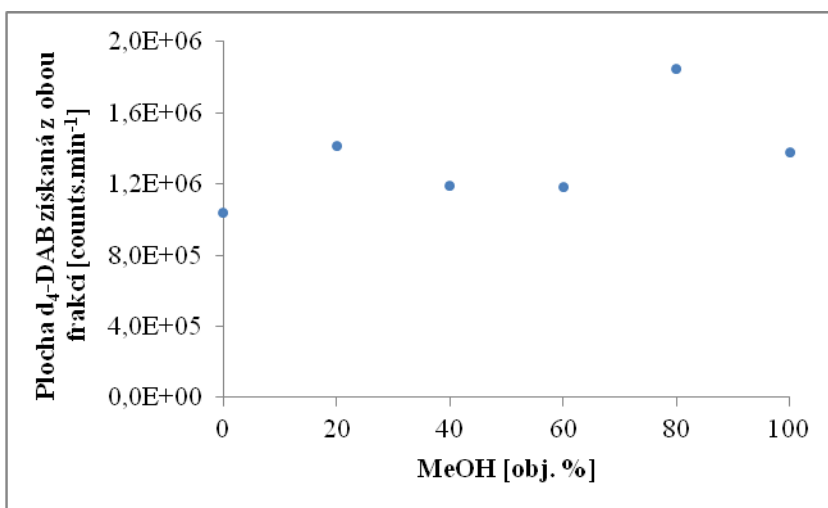
MeOH/H ₂ O [obj. % / obj. %]	Výtěžnost extrakce [%]					
	BMAA			d ₄ -DAB		
	1. frakce	2. frakce	Celkem	1. frakce	2. frakce	Celkem
0 / 100	61,7	5,9	67,6	38,2	2,0	40,2
20 / 80	59,6	4,1	63,7	52,5	2,4	54,9
40 / 60	61,1	1,0	62,2	45,7	0,4	46,2
60 / 40	64,7	2,8	67,5	44,7	1,2	45,9
80 / 20	77,8	0,8	78,6	71,1	0,5	71,6
100 / 0	71,6	1,2	72,8	52,8	0,7	53,5

Na Obr. 23 a Obr. 24 je znázorněn vliv obsahu MeOH/H₂O na plochu píku BMAA a d₄-DAB získanou součtem plochy píku z obou frakcí. Z obrázků je zřejmé, že nejvyšší plochy píku BMAA i d₄-DAB bylo shodně dosaženo při použití elučního činidla s obsahem 80/20 obj. % MeOH/H₂O. Na základě výsledků uvedených v Tab. 36 bylo dále zjištěno, že při tomto složení elučního činidla bylo též dosaženo nejvyšší hodnoty výtěžnosti, a to 78,6 % (BMAA) a 71,6 % (d₄-DAB). Rovněž bylo prokázáno, že při všech testovaných hodnotách, byla většina množství eluovaných sloučenin přítomna již v první frakci.

Vzhledem ke skutečnosti, že u BMAA i d₄-DAB bylo dosaženo nejvyšší hodnoty výtěžnosti extrakce v případě, kdy bylo extrakcí také dosaženo maxima plochy píku příslušné sloučeniny, nebylo další složení elučního činidla v oblasti 60 – 100 obj. % MeOH zkoumáno.



Obr. 23: Vliv obsahu směsi MeOH/H₂O na plochu píku BMAA získanou z obou frakcí.



Obr. 24: Vliv obsahu směsi MeOH/H₂O na plochu píku d₄-DAB získanou z obou frakcí.

Na základě výsledků dvoufázové optimalizace složení elučního činidla, které jsou uvedeny jednak v Tab. 35 a Tab. 36 a jednak na Obr. 21 až Obr. 24, a také s ohledem na výše vyvozené závěry, bylo pro další účely optimalizace zvoleno složení elučního činidla 5 obj. % NH₄OH ve směsi 80/20 obj. % MeOH/H₂O.

Eluce sloučenin byla dále prováděna pouze 3 x 600 µl elučního činidla, neboť v rámci optimalizace bylo prokázáno, že většina množství eluovaných sloučenin je přítomna v první frakci.

4.4.4 Optimalizace objemu vzorku

Posledním optimalizovaným parametrem byl objem vzorku vhodný k SPE extrakci. Cílem optimalizace bylo dosáhnout co nejvyšších hodnot výtěžnosti extrakce při co nejvyšším objemu vzorku určeného k extrakci, aby bylo dosaženo co nejvyššího zakoncentrování BMAA. Účelem optimalizace bylo také zjistit, zda nedochází k překročení sorpční kapacity sorbentu (viz Příloha 8.1) v SPE kolonce v důsledku nežádoucí sorpce jiných látek přítomných v obohaceném vzorku vody, což by mohlo vést ke snížení výtěžnosti extrakce BMAA i d₄-DAB.

Příprava obohaceného vzorku vody pro účely optimalizace je uvedena v Kap. 3.3.9. Jako matrice byla použita voda odebraná z třeboňského rybníka Svět, která nebyla filtrována z důvodu možné sorpce sloučenin na nerozpuštěné pevné částice přítomné ve vzorku vody.

Optimalizace objemu vzorku vhodného k extrakci byla provedena v rozmezí 1 – 50 ml, přičemž do každého testovaného objemu vzorku bylo vždy přidáno 100 µl roztoku VS-B. Pro každý testovaný objem vzorku (viz Tab. 37) byla provedena z ekonomických důvodů pouze 1 SPE extrakce, a to dle postupu uvedeného v Kap. 3.1.1 s menšími úpravami zavedenými na základě předchozí optimalizace pH vzorku a složení elučního činidla. Extrakce vzorků byla provedena za využití SPE aparatury připojené na vodní vývěvu.

Průtok obohaceného vzorku rybníční vody SPE kolonkou odpovídal jedné kapce za sekundu, a to za účelem zajištění dostatečné dlouhé doby kontaktu obohaceného vzorku rybníční vody se sorbentem, neboť při vyšších průtocích by nemusela tato situace nastat a mohlo by tak dojít k významnému negativnímu ovlivnění výtěžnosti extrakce.

Výsledky optimalizace objemu vzorku jsou uvedeny na Obr. 25 a Obr. 26 a také v Tab. 37. Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce jsou uvedena v Příloze 8.5.

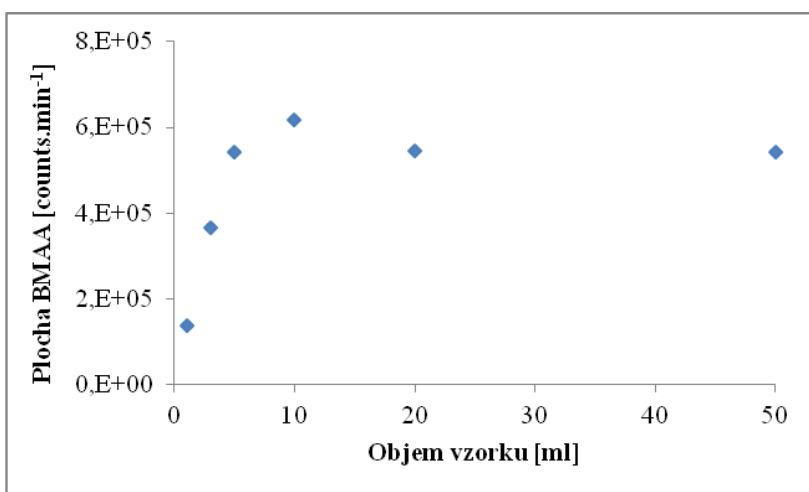
Tab. 37: Vliv objemu vzorku na výtěžnost extrakce.

Slouč.	Výtěžnost extrakce [%]					
	1 ml	3 ml	5 ml	10 ml	20 ml	50 ml
BMAA	76,4	68,0	60,3	34,4	15,2	6,0
d₄-DAB	57,6	53,7	23,6	13,9	3,9	1,5

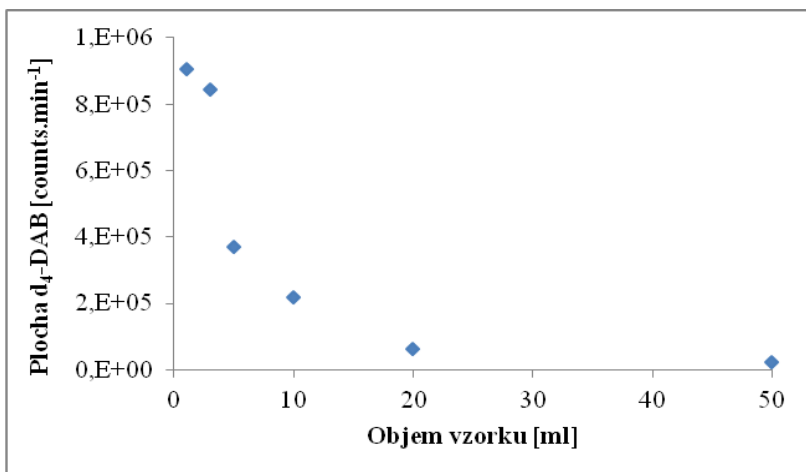
V rámci optimalizace objemu vzorku bylo zjištěno, že při malých objemech dochází k eluci relativně velkého podílu sorbovaného BMAA, což je indikováno nárůstem plochy píku (viz Obr. 25) a relativně vysokou hodnotou výtěžnosti extrakce (viz Tab. 37). V případě objemu 10 ml dochází k eluci maximálního množství BMAA, avšak s výrazným poklesem výtěžnosti extrakce, který je pravděpodobně způsoben konkurenční sorpcí nežádoucích látek

přítomných v matrici vzorku. Při vyšších objemech vzorku již zjevně dochází k překročení sorpční kapacity sorbentu, a to pravděpodobně v důsledku sorpce vysokého množství nežádoucích látek přítomných v matrici vzorku, které se za daných extrakčních podmínek také sorbují na sorbent a zároveň nejsou odstraněny ani v jednom promývacím kroku. Tato situace je indikována mírným poklesem plochy píku BMAA oproti objemu vzorku 10 ml a dále se nezvyšující plochou píku BMAA při vyšších objemech. Dále bylo zjištěno, že s rostoucím objemem vzorku dochází k eluci čím dál menšího podílu d_4 -DAB, což je indikováno postupným poklesem plochy píku (viz Obr. 26) a zároveň výrazným poklesem výtěžnosti extrakce (viz Tab. 37).

Na základě výše uvedených výsledků bylo prokázáno, že nejlepšími hodnotami výtěžnosti extrakce, bylo dosaženo při objemu vzorku 1 ml. Za současných optimálních extrakčních podmínek sice není možné provést zakoncentrování BMAA, ale je možné provést přečištění vzorku, za účelem minimalizace nežádoucích matricových efektů.



Obr. 25: Vliv objemu vzorku na plochu píku BMAA – sorpční kapacita.



Obr. 26: vliv objemu vzorku na plochu píku d_4 -DAB – sorpční kapacita.

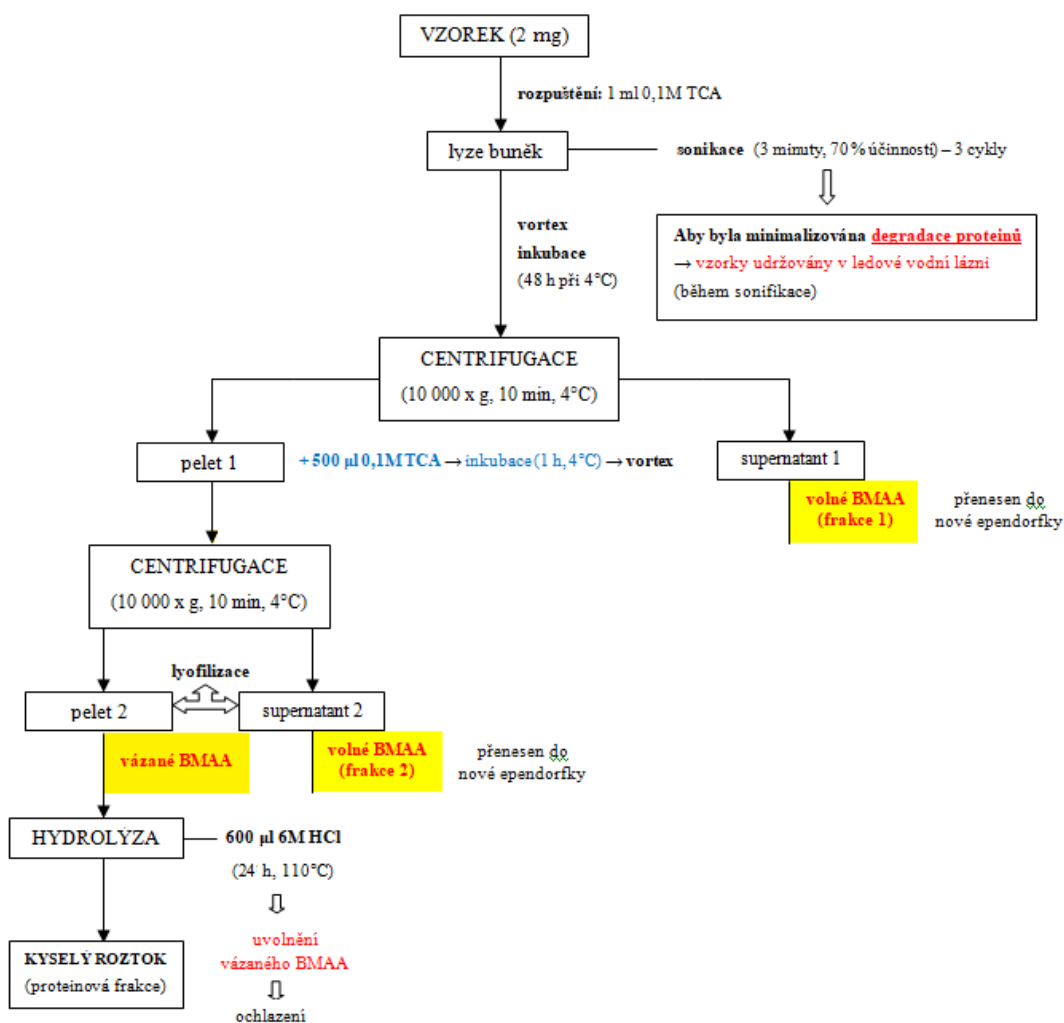
4.5 Optimalizace extrakce kyselinou trichloroctovou s kyselou hydrolyzou

S ohledem na skutečnost, že analýza vázané frakce BMAA je časově náročnější než analýza volné frakce BMAA, a vzhledem k tomu, že asociace BMAA s proteiny v přírodních vzorcích dosud nebyla zcela objasněna, byla analyzována pouze frakce volného BMAA a celkový obsah BMAA ve vzorku. Extrakce BMAA ze vzorků sinic za využití kyseliny trichloroctové a kyselá hydrolyza prováděná v rámci této práce vycházela z extrakčního postupu převzatého z publikace [3]. Schéma zvoleného extrakčního postupu je uvedeno na Obr. 27 a detailněji popsáno níže.

Extrakce volné frakce BMAA byla provedena následovně. Do ependorfky (1,5 ml) byly naváženy přesně asi 2 mg vzorku sinice a byl přidán 1 ml kyseliny trichloroctové o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ (resp. 1 ml vzorku obohaceného BMAA a d_4 -DAB o koncentraci TCA $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$). Poté byla za pomoci ultrazvukového sonikátoru provedena lyze buněk. Sonikace byla prováděna po dobu 3 minut při účinnosti 70 %, a to za účelem rozrušení buněčné stěny. Po celou dobu sonikace byl vzorek udržován v ledové lázni, aby bylo zabráněno degradaci vzorku v důsledku zahřívání. Následně byl vzorek homogenizován za použití vortexu a uložen do chladničky při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$, kde byl po dobu 48 hodin ponechán inkubaci. Přítomnost kyseliny trichloroctové v homogenizátu měla za následek precipitaci přítomných proteinů během inkubační doby. Po skončení inkubační doby byl vzorek odstředěn při relativní odstředivé síle (RCF) $10\,000 \times g$, teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a po dobu 10 minut. Supernatant (frakce 1) byl kvantitativně převeden do nové plastové zkumavky ependorf a uchován v chladničce. Ke zbylému peletu bylo dodatečně přidáno 500 μl kyseliny trichloroctové o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a vzorek byl opětovně homogenizován za pomoci vortexu. Takto homogenizovaný vzorek byl ještě po dobu 1 hodiny ponechán inkubaci v chladničce při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$, a to za účelem extrakce zbylého volného BMAA, které se nepodařilo v prvním kroku vyextrahovat. Po dodatečné inkubaci byl vzorek znovu odstředěn za stejných podmínek, jako je uvedeno výše. Supernatant (frakce 2) byl přenesen do nové ependorfky se supernatantem (frakce 1). Supernatant vzniklý spojením frakce 1 a frakce 2 byl následně lyofilizován, lyofilizát byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze ACN/ H_2O v poměru 60/40 obj. % a kvantitativně přenesen do skleněné šroubovací vialky (1,8 ml). Takto připravený vzorek byl připraven pro analýzu na LC-MS.

Celkový obsah BMAA byl stanoven dle následujícího postupu. Do ependorfky (1,5 ml) byly naváženy přesně asi 2 mg vzorku sinice a přidán 1 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol.l^{-1} (resp. 1 ml vzorku obohaceného BMAA a d_4 -DAB o koncentraci HCl 6 mol.l^{-1} , popř. o koncentraci zvolené na základě příslušné optimalizace). Připravený vzorek

byl inkubován ve vyhřívaném bloku po dobu 24 hodin při 110 °C, a to za účelem degradace proteinů a uvolnění vázaného BMAA. Hydrolyzát byl následně lyofilizován a vzniklý lyofilizát byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze ACN/H₂O v poměru 60/40 obj. % a kvantitativně přenesen do skleněné šroubovací vialky (1,8 ml). Takto připravený vzorek byl připraven pro analýzu na LC-MS.



Obr. 27: Schéma extrakce BMAA v sinicích trichloroctovou kyselinou s hydrolyzou [3].

4.5.1 Testování výtěžnosti extrakce – volná frakce BMAA

Testování výtěžnosti extrakce bylo provedeno dle postupu uvedeného v Kap. 4.5 za účelem zjištění, zda je uvedený postup vhodný pro extrakci obou sloučenin z reálné matrice. Výtěžnost extrakce byla testována na 2 vzorcích sinic: *Arthrospira* a *Nostoc commune*. Obohacené vzorky 2 různých druhů sinic byly připraveny ve 3 nezávislých opakováních dle postupu uvedeného v Kap. 3.3.11. Výsledky testování výtěžnosti jsou uvedeny v Tab. 38 a znázorněny na Obr. 28. Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce jsou k nahlédnutí v Příloze 8.6.

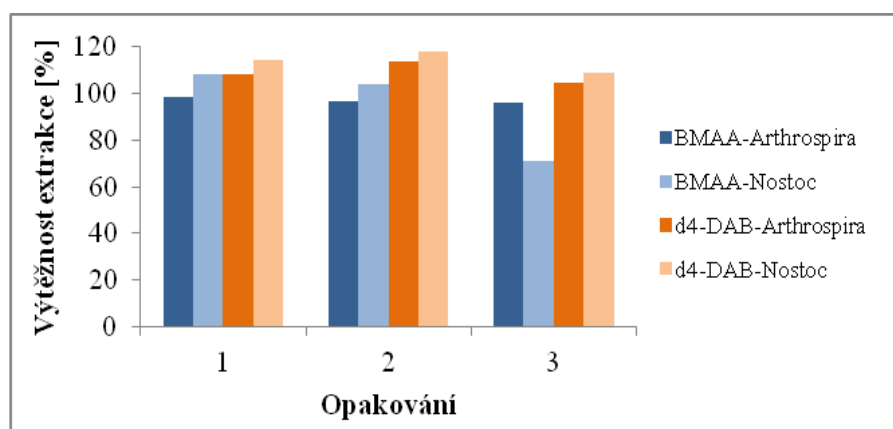
Tab. 38: Výtěžnost extrakce – volná frakce BMAA.

Sloučenina	Výtěžnost extrakce [%]					
	<i>Arthrospira</i>			<i>Nostoc commune</i>		
	Opak. 1	Opak. 2	Opak. 3	Opak. 1	Opak. 2	Opak. 3
BMAA	98,6	96,7	96,1	108,3	103,9	71,0
d₄-DAB	108,1	113,6	104,6	114,5	118,3	109,2

Na základě výsledků výtěžností extrakce uvedených v Tab. 38 bylo zjištěno, že výtěžnost extrakce vyjádřená jako průměrná výtěžnost \pm RSD je:

- $97,2 \pm 1,4$ % (BMAA) a $108,8 \pm 4,2$ % (d₄-DAB) u vzorku *Arthrospira*
- $94,4 \pm 21,6$ % (BMAA) a $114,0 \pm 4,0$ % (d₄-DAB) u vzorku *Nostoc commune*

Z hodnot výtěžností uvedených v Tab. 38 je zřejmé, že pro obě sloučeniny bylo v rámci dvou různých vzorků sinic dosaženo relativně podobných hodnot výtěžností extrakce. Zároveň bylo dosaženo nízkých hodnot relativní směrodatné odchylky (1,4 – 4,2 %), vyjma relativní směrodatné odchylky BMAA (21,6 %) u vzorku *Nostoc commune*. Takto vysoká hodnota je způsobena nízkou výtěžností jednoho opakování BMAA (71,0 %). Nízká výtěžnost BMAA je vzhledem k relativní konzistentnosti ostatních výsledků pravděpodobně způsobena chybou během přípravy vzorku. Pokud by hodnota výtěžnosti 71,0 % nebyla brána v potaz, bylo by dosaženo výtěžnosti $106,1 \pm 2,9$ %. Tato hodnota by již korelovala s ostatními uvedenými hodnotami.



Obr. 28: Porovnání výtěžností BMAA a d₄-DAB v rámci 2 různých vzorků.

Na základě relativní konzistentnosti uvedených výsledků, i s ohledem na zdůvodnění odlehle hodnoty výtěžnosti zjištěné u vzorku 3 (*Nostoc commune*) a celkově vyšší hodnoty výtěžností vnitřního standardu, bylo rozhodnuto, že není nutné provést optimalizaci extrakce volného BMAA, neboť bylo pro oba vzorky dosaženo přijatelných hodnot výtěžností extrakce. Nutné je však provést testování správnosti a přesnosti metody (viz Kap. 4.6.2).

4.5.2 Optimalizace hydrolýzy vzorku – vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové

Dále byla provedena optimalizace koncentrace kyseliny chlorovodíkové (v rámci kyselé hydrolýzy vzorku), které se využívá při analýze celkového obsahu BMAA ve vzorku. Cílem této optimalizace bylo studium vlivu koncentrace kyseliny chlorovodíkové na výtěžnost BMAA a d₄-DAB. V zájmu optimalizace také bylo dosáhnout co nejvyšší výtěžnosti BMAA i d₄-DAB a nízké hodnoty šumu.

Příprava obohacených vzorků sinic určených pro optimalizaci hydrolýzy vzorku je shrnuta v Kap. 3.3.11. Pro každou koncentraci kyseliny chlorovodíkové byla připravena 3 nezávislá opakování, přičemž jako matrice byla použita sinice *Arthrospira*. Obdobným způsobem jako obohacené vzorky sinic byly také připraveny obohacené vzorky bez přítomnosti vzorku sinice, a to pouze v jednom opakování. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v Tab. 39. Primární data pro výpočet výtěžností extrakce jsou uvedena v Příloze 8.6.

Tab. 39: Výtěžnost extrakce – vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové.

Typ vzorku	CHCl [mol.l ⁻¹]	Výtěžnost extrakce [%]			
		BMAA	Průměr	d ₄ -DAB	Průměr
Obohacený vzorek s matricí	0,1	13	11	26	47
		11		60	
		8		56	
Obohacený vzorek bez matrice		20	-----	36	-----
Obohacený vzorek s matricí	0,3	11	8	0	0
		6		0	
		6		0	
Obohacený vzorek bez matrice		28	-----	80	-----
Obohacený vzorek s matricí	05	15	11	0	0
		9		0	
		8		0	
Obohacený vzorek bez matrice		45	-----	99	-----
Obohacený vzorek s matricí	1	5	7	0	0
		8		0	
		7		0	
Obohacený vzorek bez matrice		44	-----	85	-----
Obohacený vzorek s matricí	3	20	19	20	38
		19		45	
		19		50	
Obohacený vzorek bez matrice		64	-----	113	-----
Obohacený vzorek s matricí	6	31	32	17	39
		33		48	
		33		52	
Obohacený vzorek bez matrice		75	-----	115	-----

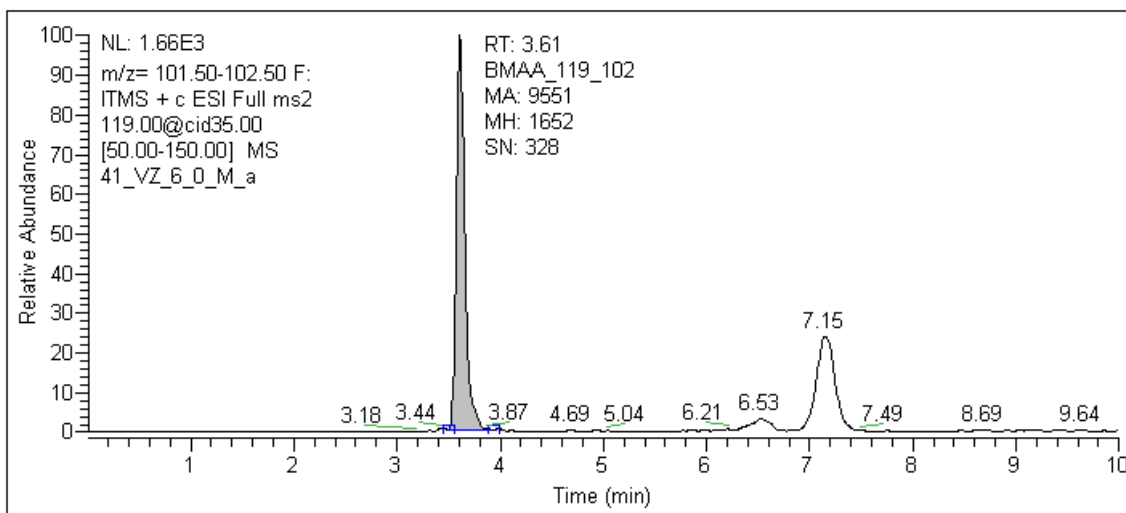
Na základě výsledků výtěžností extrakce uvedených v Tab. 39 bylo zjištěno, že ve všech testovaných koncentracích kyseliny chlorovodíkové bylo pro obě sloučeniny dosaženo převážně velmi nízkých hodnot výtěžností, a to i v poměrně širokém rozmezí (0 – 60 %). Hodnoty výtěžností byly mimo jiné charakterizovány i širokým rozmezím relativní směrodatné odchylky (3 – 49 %). V rozmezí koncentrací kyseliny chlorovodíkové 0,3 – 1,0 mol.l⁻¹ navíc nebyl pozorován pík d₄-DAB. Dále bylo zjištěno, že v případě obohacených vzorků bez přítomnosti matrice docházelo s rostoucí koncentrací kyseliny chlorovodíkové převážně k nárůstu výtěžnosti obou sloučenin. V případě BMAA došlo k nárůstu výtěžnosti extrakce z 20 % na 75 % a v případě d₄-DAB došlo k nárůstu výtěžnosti extrakce z 36 % na 115 %. Tyto výsledky poukazují na skutečnost, že vyšší výtěžnosti obou sloučenin je dosaženo v případě hydrolýzy vzorku v koncentrovanější kyselině chlorovodíkové, nicméně v porovnání s obohacenými vzorky s přítomností matrice nelze tuto teorii potvrdit, a to z důvodu nespolehlivých výsledků.

Vzhledem k tomu, že předpokládaná časová náročnost hledání příčin těchto nespolehlivých výsledků již převyšovala zbývající časové možnosti pro realizaci této práci, nemohly být tyto příčiny dále zkoumány. Z výsledků navíc ani není na první pohled zřejmé, ve které části extrakčního postupu by mohlo k této příčině docházet. V souvislosti s tímto zjištěním nemohly být uskutečněny další plánované kroky optimalizace, a to optimalizace teploty a doby hydrolýzy.

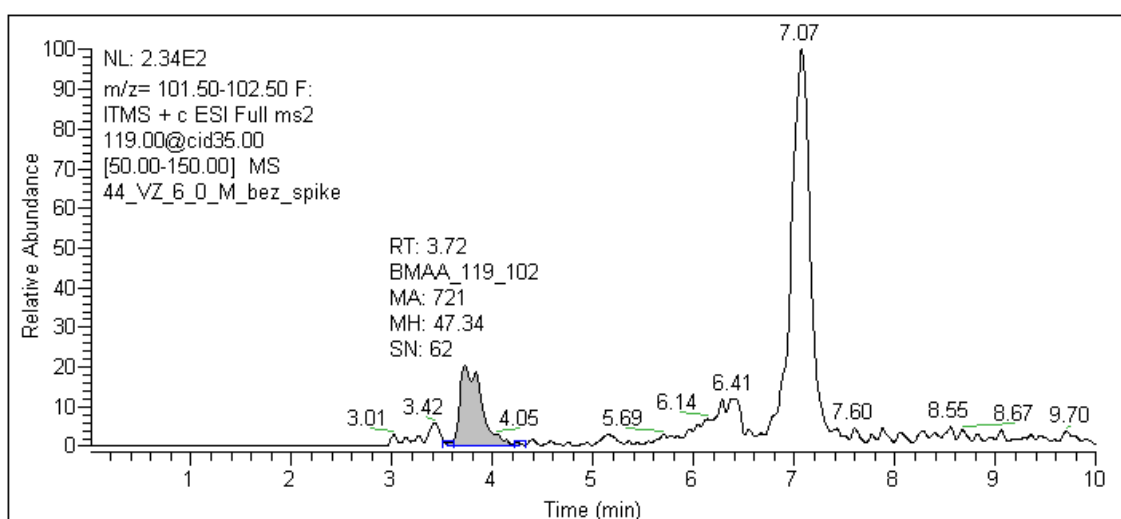
Mezi možné příčiny nízké výtěžnosti BMAA a d₄-DAB mohou být potenciálně zařazeny například nespecifická sorpce těchto sloučenin na stěny nádob či na mechanické částice matrice, různé fyzikálně-chemické vlivy vedoucí k jejich degradaci anebo k tvorbě nových produktů. Jedním z možných řešení by tedy mohlo být provedení testování stability BMAA a d₄-DAB v různě koncentrovaných roztocích kyseliny chlorovodíkové za různých teplot. Dalším řešením by pak mohlo být hodnocení výtěžnosti BMAA a d₄-DAB v různých maticích a při různých koncentracích kyseliny chlorovodíkové s následným vyhodnocením maticových vlivů.

S ohledem na skutečnost, že nebylo předem známo, zda vzorky sinic obsahují detekovatelné množství BMAA, byly také připraveny neobohacené vzorky sinic, kde byla místo pracovního roztoku ST-B a VS-B pipetována deionizovaná voda. Na Obr. 29 a Obr. 30 jsou uvedeny chromatogramy obohaceného a neobohaceného vzorku *Arthrospira*, které byly podrobeny hydrolýze kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 6 mol.l⁻¹. Při vzájemném porovnání Obr. 29 a Obr. 30 je patrný výrazný nárůst signálu píku v retenčním čase 3.61 (v případě obohaceného vzorku). Toto zvýšení signálu odpovídá množství přidaného

BMAA. Zároveň bylo tímto prokázáno, že vzorek *Arthrospira* obsahuje malé množství detekovatelného BMAA, které bylo zřejmě uvolněno v důsledku kyselé hydrolyzy, což je indikováno píkem v retenčním čase 3.72 na Obr. 30. Množství BMAA však nemohlo být kvantifikováno z důvodu nespolehlivých výsledků získaných v rámci této optimalizace.



Obr. 29: Chromatogram obohaceného vzorku sinice – HCl o koncentraci 6 mol.l⁻¹.



Obr. 30: Chromatogram nebohaceného vzorku sinice – HCl o koncentraci 6 mol.l⁻¹.

4.6 Testování metody na reálných vzorcích

Vzhledem k zamýšlenému použití metody pro kvantitativní stanovení neurotoxinu BMAA v reálných vzorcích bylo nezbytné provést i hodnocení správnosti (vyjádřené jako výtěžnost), přesnosti (vyjádřené jako opakovatelnost), meze detekce metody a meze stanovitelnosti metody, které zahrnují vliv matrice vzorku a postup přípravy vzorku k analýze.

4.6.1 Analýza obohacených vzorků rybníční vody

Vzhledem ke skutečnosti, že nebylo možné provést zakoncentrování BMAA, byl obohacený vzorek rybníční vody připraven pouze na koncentrační úrovni $5,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ (viz Kap. 3.3.9), a to ve 3 nezávislých opakováních. Z připraveného obohaceného vzorku byly pro SPE extrakci odebrány 3 alikvotní podíly ($3 \times 1 \text{ ml}$ vzorku), každý s přidavkem $100 \mu\text{l}$ pracovního roztoku $\text{d}_4\text{-DAB}$ (VS-B). Takto připravený obohacený vzorek vody byl podroben SPE extrakci dle optimalizovaných podmínek. Eluáty získané extrakcí byly analyzovány dle optimalizované a validované metody. Pro kontrolu čistoty přípravy vzorků a přístroje byla také provedena analýza slepého vzorku. Výsledky správnosti (výtěžnosti) a přesnosti (opakovatelnosti) metody jsou uvedeny v Tab. 40.

Tab. 40: Správnost (výtěžnost) a přesnost (opakovatelnost) – obohacené vzorky vody.

Koncentrační úroveň [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Kritérium přijatelnosti		Nalezená koncentrace [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Experimentálně zjištěné hodnoty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]		Správnost [%]	Přesnost [%]
5,0	60 – 115	≤ 21	6,50	129	9,3
			7,06		
			5,85		

Na základě výsledků hodnocení správnosti a přesnosti obohacených vzorků uvedených v Tab. 40 bylo zjištěno, že správnost metody je 129 % a přesnost metody je 9,3 %. Výše uvedeného hodnoty správnosti a přesnosti jsou vyšší, než hodnoty zjištěné analýzou kalibračních roztoků, kde byla správnost metody 100 % a přesnost metody 1,4 %.

Změna hodnot těchto parametrů byla do jisté míry očekávána, neboť matrice vzorku obsahuje ve většině případů interferující látky, jež mohou výrazně ovlivnit účinnost ionizace. Konkrétně se může jednat o netěkavé nebo málo těkavé látky, jež mohou pozměnit vlastnosti kapky vznikající při ionizaci, což může ovlivnit účinnost jejího vytváření či odpařování. Dalším negativním důsledkem jsou možné konkurenční vlivy při tvorbě molekulárních iontů.

V rámci analýzy obohacených vzorků vody nebylo splněno uvedené kritérium přijatelnosti pro správnost, převzaté z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F [41]. Přesnost metody byla v rámci analýzy obohacených vzorků vod přijatelná. Pravděpodobným důvodem vysokého hodnoty správnosti je fakt, že v rámci optimalizace objemu vzorku bylo dosaženo oproti ostatním optimalizovaným parametrům SPE extrakce nižší hodnoty výtěžnosti d₄-DAB, což se zřejmě projevilo i u analýzy obohacených vzorků vody.

Nižší hodnota výtěžnosti d₄-DAB měla pravděpodobně za následek zvýšení poměru ploch ST/VS, což vedlo k výpočtu vyšších hodnot koncentrací, a tudíž i vyšších hodnot správnosti, než by odpovídalo při hodnotách výtěžnosti d₄-DAB dosažených v rámci optimalizace pH vzorku a složení elučního činidla, kde není zahrnut vliv matrice vzorku.

4.6.2 Analýza obohacených vzorků sinic

Obohacené vzorky sinic (*Arthrospira* a *Nostoc commune*) byly připraveny pouze na koncentrační úrovni 5,0 µg.l⁻¹ (viz Kap. 3.3.11), a to ve 3 nezávislých opakováních. Připravené obohacené vzorky byly extrahovány kyselinou trichloroctovou o koncentraci 0,1 mol.l⁻¹ dle postupu uvedeného v Kap 4.5, a to za účelem analýzy volné frakce BMAA. Obohacené vzorky určené pro analýzu celkového obsahu BMAA nebyly připraveny z důvodu popsaných v Kap. 4.5.2. Pro kontrolu čistoty přípravy vzorků, čistoty chemikálií a přístroje byla také provedena analýza slepého vzorku.

Výsledky správnosti (výtěžnosti) a přesnosti (opakovatelnosti) metody jsou uvedeny v Tab. 41 (obohacené vzorky *Arthrospira*) a v Tab. 42 (obohacené vzorky *Nostoc commune*).

Tab. 41: Správnost (výtěžnost) a přesnost (opakovatelnost) – vzorky *Arthrospira*.

Koncentrační úroveň [µg.l ⁻¹]	Kritérium přijatelnosti		Nalezená koncentrace [µg.l ⁻¹]	Experimentálně zjištěné hodnoty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]		Správnost [%]	Přesnost [%]
5,0	60 – 115	≤ 21	4,43	88	5,4
			4,15		
			4,62		

Tab. 42: Správnost (výtěžnost) a přesnost (opakovatelnost) – vzorky *Nostoc commune*.

Koncentrační úroveň [µg.l ⁻¹]	Kritérium přijatelnosti		Nalezená koncentrace [µg.l ⁻¹]	Experimentálně zjištěné hodnoty	
	Správnost [%]	Přesnost [%]		Správnost [%]	Přesnost [%]
5,0	60 – 115	≤ 21	4,59	82	14,8
			4,27		
			3,42		

Na základě výsledků hodnocení správnosti a přesnosti obohacených vzorků sinic uvedených v Tab. 41 (*Arthrospira*) a Tab. 42 (*Nostoc commune*), bylo zjištěno, že v závislosti na matici vzorku se správnost metody pohybuje v rozmezí 82 – 88 % a přesnost metody v rozmezí 5,4 – 14,8 %. Hodnoty správnosti a přesnosti byly opět vyšší, než hodnoty zjištěné analýzou kalibračních roztoků, kde byla správnost metody 100 % a přesnost metody 1,4 %.

Změna hodnot těchto validačních parametrů byla pravděpodobně opět způsobena maticí vzorku obsahující četné množství interferujících látek ovlivňující účinnost ionizace, a tím i výtěžnost BMAA i d₄-DAB. Nižší hodnoty správnosti metody jsou zřejmě způsobeny vyšší hodnotou výtěžnosti vnitřního standardu zjištěnou v rámci testování výtěžnosti extrakce. V důsledku toho došlo ke snížení hodnoty poměru ploch ST/VS, a tedy i ke snížení vypočtené hodnoty koncentrace BMAA.

V rámci analýzy obohacených vzorků sinic (analýza volné frakce BMAA) byla splněna uvedená kritéria přijatelnosti převzatá z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F [41], čímž bylo zároveň prokázáno, že vyvinutá analytická metoda určená pro stanovení volného BMAA poskytuje výsledky s dostatečnou správností a přesností.

4.6.3 Mez detekce (MDL) a mez stanovitelnosti (MQL) metody

MDL a MQL obohacených vzorků rybníční vody v rámci SPE extrakce byly vypočítány na základě poměru signálu ku šumu (S/N), a to postupným ředěním obohacených vzorků rybníční vody, které byly extrahovány dle optimalizovaných podmínek SPE extrakce. Zjištěné hodnoty S/N pro BMAA jsou uvedeny v Tab. 43.

Tab. 43: Zjištěné hodnoty poměru S/N.

Parametr	Opak.	Koncentrace [ng.l ⁻¹]						
		50	100	200	400	600	800	1000
S/N [1]	1	6	11	19	31	35	49	54
	2	5	13	16	25	48	57	55
	3	5	12	16	22	45	43	65

V rámci SPE extrakce vzorků rybníční vody obohacených nízkými koncentracemi BMAA bylo dosaženo hodnot MDL 50 ng.l⁻¹ a MQL 100 ng.l⁻¹. Tyto hodnoty jsou v porovnání s DL 10 ng.l⁻¹ a QL 40 ng.l⁻¹ maximálně jen o půl řádu vyšší, což bylo očekávatelné s ohledem na dosaženou výtěžnost extrakce a přítomnost koextraktů z matrice.

V porovnání s pracemi [24] a [25] uvedenými v Kap. 2.4.1, v nichž bylo využito stejné analytické techniky jako v rámci této práce, bylo v této práci dosaženo více než 10x nižší MDL, a to i přes nemožnost zakoncentrování vzorku, neprovedení derivatizace analytu a za současného využití stejné extrakční metody, avšak s nižším množstvím sorbentu v SPE kolonce. V porovnání s prací [26], jež využila stejné analytické a extrakční techniky jako v této práci (jediným rozdílem je použití trojitého kvadrupólu jako hmotnostního detektoru), bylo dosaženo 20x nižší MQL. Avšak při porovnání s prací [9] bylo dosaženo přibližně 6x vyšší hodnoty MDL a 5x vyšší hodnoty MQL. Tato metoda byla ovšem prováděna za zcela odlišných analytických, extrakčních i derivatizačních podmínek.

V rámci této práce by mohlo být dosaženo výrazně nižších hodnot MDL a MQL za předpokladu vyřešení problému se zakoncentrováním analytu. Návrhy na řešení tohoto problému jsou uvedeny dále v Kap. 4.6.4.

4.6.4 Analýza reálných vzorků rybníční vody

Výsledky dosažené v rámci optimalizace SPE extrakce poukazují, že za těchto podmínek nebylo možné provést zakoncentrování reálného vzorku rybníční vody s ohledem na nízké hodnoty výtěžnosti BMAA i d₄-DAB, a to již při relativně nízkých objemech. Analýzou obohacených vzorků rybníční vody bylo také prokázáno, že správnost metody nesplňuje dané kritérium přijatelnosti uvedené v publikaci Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F [41]. Pravděpodobným důvodem je nižší výtěžnost d₄-DAB zjištěná v rámci optimalizace objemu vzorku v porovnání s výtěžností d₄-DAB zjištěnou v předchozích optimalizačních krocích. Nízká výtěžnost d₄-DAB je zřejmě zapříčiněna matricovými vlivy. Z tohoto důvodu tudíž nebyla provedena analýza reálných vzorků povrchových vod.

Výše uvedené problémy by mohly být vyřešeny na základě hodnocení vlivů matricových efektů na výtěžnost extrakce BMAA i d₄-DAB. Vzhledem ke zřejmé výrazné sorpci nežádoucích látek z matrice vzorku by bylo také vhodné vyzkoušet SPE kolonky s větší sorpční kapacitou. Dále by mohlo být provedeno porovnání výtěžnosti extrakce pro filtrovaný a nefiltrovaný vzorek vody za účelem zjištění, zda nerozpuštěné pevné částice přítomné v matrici vzorku také neovlivňují výtěžnost extrakce BMAA i d₄-DAB. V neposlední řadě by mohla být upravena složení promývacích roztoků za účelem odstranění většího množství nežádoucích látek, za daných extrakčních podmínek taktéž sorbovaných, které by mohly ovlivňovat účinnost procesu ionizace.

V předchozím odstavci navržené postupy, které by mohly alespoň z části vyřešit dané problémy, však už nemohly být z časových důvodů v rámci této práce testovány.

4.6.5 Analýza reálných vzorků sinic

V rámci analýzy obohacených vzorků sinic *Arthrospira* a *Nostoc commune* (Kap. 4.6.2) byla také provedena analýza neobohacených vzorků sinic, a to za účelem zjištění, zda výše jmenované sinice obsahují volné BMAA. Příprava těchto vzorků je shrnuta v Kap. 3.3.12. Analýza každého vzorku sinice byla provedena dle postupu uvedeného v Kap. 4.5, a to ve třech nezávislých opakováních. Pro kontrolu čistoty přípravy vzorků, čistoty chemikálií a přístroje byla rovněž provedena analýza slepého vzorku. Výsledky analýzy reálných vzorků sinic jsou uvedeny v Tab. 44.

Tab. 44: Výsledky analýz reálných vzorků sinic – *Arthrospira* a *Nostoc commune*.

Vzorek	<i>Arthrospira</i>			<i>Nostoc commune</i>		
	Opak. 1	Opak. 2	Opak. 3	Opak. 1	Opak. 2	Opak. 3
Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL	< MDL

Analýzou reálných vzorků sinic bylo zjištěno, že se množství volného BMAA ve vzorcích *Arthrospira* a *Nostoc commune* pohybuje ve všech případech pod mezí detekce metody. Celkový obsah BMAA nebyl stanoven z důvodů již uvedených v Kap. 4.5.2.

5 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly shrnuty základní informace o fyzikálně-chemických vlastnostech, výskytu a toxicitě potenciálního neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu (BMAA). Dále byly popsány extrakční techniky používané pro izolaci a přečištění BMAA z přírodních vzorků, a to extrakce na tuhou fázi a extrakce trichloroctovou kyselinou s kyselou hydrolyzou vzorku. V závěru této části byly porovnány analytické metody zabývající se stanovením neurotoxinu BMAA v rybníční vodě a sinicích.

V rámci praktické části bylo nejprve provedeno ověření vybraných podmínek hmotnostní detekce s ohledem na bakalářskou práci autora. Vzhledem ke komplexnosti matic vzorků bylo na základě hmotnostních spekter standardů provedeno rozšíření MRM přechodů, a to za účelem minimalizace falešně pozitivních výsledků. MRM přechody byly rozšířeny o přechody $119 \rightarrow 76$ a $119 \rightarrow 73$ m/z. Následně bylo provedeno hodnocení elektrického napětí aplikovaného na F-čočkách a S-čočkách a normalizované kolizní energie. Nejlepších podmínek bylo dosaženo při elektrickém napětí na F-čočkách -9,0 V, elektrickém napětí na S-čočkách 65 V a normalizované kolizní energie 22 %. Hodnota normalizované kolizní energie byla později zvýšena z důvodu pozorovaného snížení účinnosti fragmentace na hodnotu 35 %.

Následně bylo provedeno testování vhodnosti systému, v rámci něhož byly hodnoceny následující parametry: rozlišení, kapacitní faktor, separační faktor, účinnost kolony, faktor symetrie, opakovatelnost nástřiku a retenčního času. V případě všech hodnocených parametrů bylo dosaženo přijatelných hodnot splňující kritéria přijatelnosti, čímž byla prokázána způsobilost přístroje k provádění zamýšlených analýz.

Poté byla provedena validace metody, v rámci níž byly hodnoceny následující validační parametry: linearita, přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost i jako mezilehlá přesnost), správnost (vyjádřená jako výtěžnost), rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Bylo zjištěno, že analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou přesností a správností v rozsahu koncentrací $0,1 - 5 \mu\text{g.l}^{-1}$. Mez detekce, resp. mez stanovitelnosti vyjádřená na základě poměru signálu BMAA ku šumu základní linie byla 10 ng.l^{-1} , resp. 40 ng.l^{-1} .

V dalším kroku byla provedena optimalizace SPE extrakce. Optimalizovány byly tyto parametry: pH vzorku, složení elučního činidla a objem vzorku k extrakci. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití vzorku o pH 1, elučního činidla sestávajícího z 5 obj. % NH_4OH ve směsi 80/20 obj. % $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ a při objemu vzorku 1 ml.

Dále bylo provedeno testování a optimalizace extrakce BMAA ze sinic trichloroctovou kyselinou s kyselou hydrolyzou celkového vzorku. V rámci testování výtěžnosti extrakce volného BMAA bylo dosaženo přijatelných hodnoty výtěžností, a to

97,2 ± 1,4 % (pro BMAA) a 108,8 ± 4,2 % (pro d₄-DAB) v případě sinice *Arthrospira* a 94,4 ± 21,6 % (resp. 106,1 ± 2,9 %, v případě nezahrnutí odlehlého výsledku) pro BMAA a 114,0 ± 4,0 % pro d₄-DAB v případě sinice *Nostoc commune*. V rámci analýzy celkového obsahu BMAA byla optimalizována pouze koncentrace hydrolyzačního činidla kyseliny chlorovodíkové v rozmezí koncentrací 0,1 až 6 mol.l⁻¹. Další parametry nebyly optimalizovány, neboť bylo dosaženo nízkých výtěžností obou sloučenin. Mimo jiné bylo také dosaženo velmi nespolehlivých výsledků, což je indikováno, jak velkým rozptylem získaných výtěžností (0 – 60 %), tak širokým rozmezím relativní směrodatné odchylky (3,1 – 49 %). Z časových důvodů nebyla příčina nespolehlivých výsledků zkoumána. Byla však navržena možná řešení problému.

Na závěr byla metoda testována na reálných vzorcích, které byly obohaceny přídatkem BMAA na koncentrační úrovni 5,0 µg.l⁻¹. Výsledky správnosti vyjádřené jako výtěžnost se pohybovaly v rozmezí 82 – 88 % pro sinice. V případě vod bylo dosaženo hodnoty správnosti 129 %. Výsledky přesnosti vyjádřené jako opakovatelnost poskytovaly hodnoty v rozmezí 5,4 – 14,8 % pro sinice, zároveň pro rybniční vodu bylo dosaženo hodnoty 9,3 %. Mez detekce metody, resp. mez stanovitelnosti metody byla 50 ng.l⁻¹, resp. 100 ng.l⁻¹. V porovnání s diskutovanými pracemi bylo v této práci dosaženo srovnatelných či dokonce nižších detekčních limitů, a to i vzhledem k uvedeným problémům a nemožnosti zakoncentrování vzorků rybničních vod.

Vzhledem ke skutečnosti, že v rámci analýzy rybničních vod nebylo dosaženo přijatelné hodnoty správnosti, nebylo možné využít metodu pro zamýšlené použití. V případě analýzy volného BMAA bylo dosaženo přijatelných hodnot správnosti a přesnosti, tudíž byla provedena analýza dvou reálných vzorků sinic (*Arthrospira* a *Nostoc commune*). Analýzou reálných vzorků sinic bylo zjištěno, že hodnoty koncentrací se pohybovaly pod mezí detekce metody. Celkový obsah BMAA nebylo možné stanovit, a to vzhledem k problémům, které nastaly během optimalizace extrakčního procesu. Nicméně v rámci optimalizace bylo zaznamenáno malé množství detekovatelného BMAA, které nemohlo být kvantifikováno z důvodu nespolehlivých výsledků. Ačkoli problémy, které se v průběhu zpracování této práce vyskytly, nebyly z časových důvodů vyřešeny, byla alespoň navržena možná řešení těchto problémů.

Další práce by mohla být tedy zaměřena na řešení výše uvedených problémů, a to zejména na hledání příčiny nízké výtěžnosti extrakce BMAA i d₄-DAB při analýze povrchových vod, včetně hodnocení matricových vlivů. Dále by mohly být studovány příčiny nízkých výtěžností extrakce BMAA i d₄-DAB při hydrolýze vzorku kyselinou chlorovodíkovou, aby bylo možné provést optimalizaci dalších kroků tohoto extrakčního postupu.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **Nordic Council of Ministers.** Analysis, occurrence, and toxicity of B-methylamino-L-alanine (BMAA): A risk for the consumer? [online]. Copenhagen : Nordic Council of Ministers, 2007. ISBN 978-92-893-1541-8. [Citace: 9.11.2017], 128 stránek. Dostupné z: <http://norden.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A701964&dsid=5389>.
- [2] **Jiang, L.** Mass spectrometry of non-protein amino acids: BMAA and neurodegenerative diseases [disertační práce online]. Stockholm: Stockholm University, Department of Environmental Science and Analytical Chemistry, 2015. [Citace: 15.9. 2017]. 43 stránek. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Mass-Spectrometry-of-Non-protein-Amino-Acids%3A-BMAA-Jiang/5dbb4a9379d966396ae9d8b8e2bd4a8e42ed5532>.
- [3] **Lage, S., a další.** BMAA extraction of cyanobacteria samples: which method to choose? *Environmental Science and Pollution Research International*. Leden 2016, Sv. 23, 1, stránky 338-350. doi: 10.1007/s11356-015-5266-0.
- [4] **Beach, Daniel G., Kerrin, Elliott S. a Quilliam, Michael A.** Selective quantitation of the neurotoxin BMAA by use of hydrophilic-interaction liquid chromatography-differential mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (HILIC-DMS-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Listopad 2015, Sv. 407, 28, stránky 8397-8409. doi: 10.1007/s00216-015-9012-8.
- [5] **Jiang, L., a další.** Quantification of neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. *Scientific Reports*. Listopad 2014, Sv. 4, 6931, stránky 1-7. doi: 10.1038/srep06931.
- [6] **Main, Brendan J., Dunlop, Rachael A. a Rodgers, Kenneth J.** The use of L-serine to prevent β -methylamino-L-alanine (BMAA)-induced proteotoxic stress in vitro. *Toxicon*. Leden 2016, Sv. 109, stránky 7-12. doi:10.1016/j.toxicon.2015.11.003.
- [7] **Esterhuizen-Londt, M.** β -N-methylamino-L-alanine in south african fresh water cyanobacteria: Incidence, prevalence, ecotoxicological considerations and human exposure risk [disertace na internetu]. Port Elizabeth: Nelson Mandela Metropolitan University, Faculty of Science, 2010. [Citace: 2.1.2018]. 201 stránek. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/274716867/>.
- [8] **Karlsson, O., a další.** Environmental neurotoxin interaction with proteins: Dose-dependent increase of free and protein-associated BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in neonatal rat brain. *Scientific Reports*. Říjen 2015, Sv. 26, 15570, stránky 1-9. doi: 10.1038/srep15570.

- [9] **Roy-Lachapelle, A., Sollic, M. a Sauv , S.** Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry. [editor] Springer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.  ervenec 2015, Sv. 407, 18, str anky 5487-5501. doi: 10.1007/s00216-015-8722-2.
- [10] **Esterhuizen-Londt, M., Wiegand, C. a Downing, Tim G.** β -N-methylamino-l-alanine (BMAA) uptake by the animal model, *Daphnia magna* and subsequent oxidative stress. *Toxicol.*  erven 2015, Sv. 100, str anky 20-26. doi: 10.1016/j.toxicol.2015.03.021.
- [11] **Faassen, Elisabeth J.** The neurotoxin BMAA in aquatic systems. Analysis, occurrence and effects [disertace na internetu]. Wageningen: Wageningen University, Department of Environmental Sciences, 2016. 196 str anek. [Citace: 20.10.2017]. Dostupn  z: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/505930>.
- [12] **Berntzon, L., a dal i.** Detection of BMAA in the human central nervous system. *Neuroscience*. Duben 2015, Sv. 292, str anky 137-147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.032.
- [13] **R evillon, D., a dal i.** Systematic detection of BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in shellfish production areas along the French coasts. *Toxicol.*  nor 2016, Sv. 110, str anky 35-46. doi:10.1016/j.toxicol.2015.11.011.
- [14] **Andr s, R., a dal i.** Improved detection of β -N-methylamino-l-alanine using N-hydroxysuccinimide ester of N-butylnicotinic acid for the localization of BMAA in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Březen 2015, Sv. 407, 13, str anky 3743-3750. doi: 10.1007/s00216-015-8597-2.
- [15] **Ros n, J., a dal i.** BMAA detected as neither free nor protein bound amino acid in blue mussels. *Toxicol.* Leden 2016, Sv. 109, str anky 45-50. doi:10.1016/j.toxicol.2015.11.008.
- [16] **Sp cil, Z., a dal i.** Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst*. Leden 2010, Sv. 135, 1, str anky 127-132. doi: 10.1039/b921048b.
- [17] **Chiu, Alexander S., a dal i.** Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Z r  2011, Sv. 8, 9, str anky 3728-3746. doi: 10.3390/ijerph8093728.

- [18] **Simpson, Nigel J.K.** Solid-phase extraction: Principles, techniques, and applications [online]. New York: Marcel Dekker, 2000. 1 Introduction to solid-phase extraction. [Citace: 28.1.2018], 17 stránek. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/94e7/f88acb553b5eb559dd6b896659f66201dd9b.pdf>.
- [19] **Riddelová, K.** *Izolační a separační metody: Extrakce tuhou fází* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická; 2012. [Citace: 10.11.2017] 33 stránek. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-6%20LSC_SPE_2012.pdf.
- [20] **Sigma-Aldrich.** Guideline to solid phase extraction [online]. [s.l.] : Sigma-Aldrich, Supelco , 1998. [Citace: 8.10.2017]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
- [21] **Waters.** Sample preparation [online]. Milford : Waters, 2017. [Citace: 25.11.2017]. Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/lcSP.pdf>.
- [22] **Waters.** Oasis MCX product and generic method information [online]. Milford : Waters, rok neuveden. [Citace: 26.11.2017]. Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/oasis12.pdf>.
- [23] **Waters.** Oasis cartridges and 96-well plates: Care and use manual [online]. Milford : Waters, 2017. [Citace: 30.11.2017]. Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/716001391en.pdf>.
- [24] **Al-Sammak, Maitham A., a další.** Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples. *Toxicon*. Prosinec 2013, Sv. 76, stránky 316-325. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.10.015.
- [25] **Al-Sammak, Maitham A., a další.** Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins*. Leden 2014, Sv. 6, 2, stránky 488-508. doi: 10.3390/toxins6020488.
- [26] **Combes, A., a další.** Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in complex environmental samples. *Analytica Chimica Acta*. Duben 2013, Sv. 771, stránky 42-49. doi: 10.1016/j.aca.2013.02.016.
- [27] **Esterhuizen-Londt, M. a Downing, T. G.** Solid phase extraction of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from South African water supplies. *Water SA*. Říjen 2011, Sv. 37, 4, stránky 523-528. doi: org/10.4314/wsa.v37i4.10.
- [28] **Jiang, L., a další.** Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Červen 2012, Sv. 403, 6, stránky 1719-1730. doi: 10.1007/s00216-012-5966-y.

- [29] **Jiang, L., a další.** Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Únor 2013, Sv. 405, 4, stránky 1283-1292. doi: 10.1007/s00216-012-6550-1.
- [30] **Rosén, J. a Hellenäs, Karl-Erik.** Determination of the neurotoxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst*. Prosinec 2008, Sv. 133, 12, stránky 1785-1789. doi: 10.1039/b809231a.
- [31] **Meriluoto, J., Spooft, L. a Codd, Geoffrey A.** Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis [online]. New Jersey: Wiley, Leden 2017 [Citace: 12.12.2017]. 576 stránek. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=uq6GDQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs>
- [32] **Hořejší, K.** Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení neurotoxinu β -N-methylamino-L-alaninu ve vodě pomocí LC-MS [bakalářská práce online]. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta; 2016 [Citace: 25.11.2017] 80 stránek. Dostupné z: <https://wstag.jcu.cz/portal/studium/prohlizeni.html>
- [33] **Bose, A.** HPLC calibration process parameters in terms of system suitability test. *Austin Chromatography*. Říjen 2014, Sv. 1, 2, stránky 1-4. ISSN 2379-7975.
- [34] **Center for Drug Evaluation and Research.** Reviewer guidance: Validation of chromatographic methods [online]. Silver Spring : Food and Drug Administration, Listopad 1994. [Citace: 28.12.2017], 30 stránek. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>.
- [35] **The US Pharmacopeia 40 and National Formulary 35.** <621> Chromatography - First supplement [online]. [Citace: 24.11.2017]. Dostupné z: https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c621_1SUSP40.pdf.
- [36] **Dong, Michael W.** Modern HPLC for practicing scientists [online]. New Jersey : Wiley, 2006. ISBN 9780471973102. 304 stránek. [Citace: 15.12.2017]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=RYOHFneTy-UC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>.
- [37] **Huber, L.** Validation of analytical methods [online]. Německo : Agilent Technologies, 2010. [Citace: 28.10.2017]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>.
- [38] **Food and Drug Administration.** Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics: Guidance for industry [online]. Silver Spring : Food and Drug Administration, Červenec 2015. 18 stránek. [Citace: 5.12.2017]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>.

- [39] **International Conference on Harmonisation.** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). [online] 1996. [Citace: 15. 10 2017]. Dostupné z: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- [40] **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.
- [41] **Association of Official Analytical Chemists.** Guidelines for Standard Method Performance Requirements - Appendix F [online]. [s.l.] : Association of Official Analytical Chemists, 2012. 17 stránek. [Citace: 19.10.2017]. Dostupné z: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.
- [42] **Wells, G, Prest, H. a Russ IV., Charles W.** Signal, noise, and detection limits in mass spectrometry [online]. USA : Agilent Technologies, 2011. [Citace: 10.10.2017]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-7651EN.pdf>.
- [43] **Shabir, Ghulam A.** Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry. *Journal of Validation Technology*. Leden 2005, Sv. 10, stránky 210-218.
- [44] **Krause, Stephan O.** Good Analytical Method Validation Practice: Deriving Acceptance Criteria for the AMV Protocol - Part II. *Journal of Validation Technology*. Únor 2003, Sv. 14, stránky 162-178.
- [45] **Waters.** Taking the complexity out of SPE method development [online]. Milford : Waters, 2017. [Citace: 3.12.2017]. Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005685en.pdf>.
- [46] **Waters.** Empower system suitability: Quick reference guide [online]. Milford : Waters, 2002. 14 stránek. [Citace: 9.12.2017]. Dostupné z: http://www.instrumentalia.si/iawww/images/manuals/Empower_SST_Quick_Reference_Guide_71500031605r.pdf.
- [47] **Agilent Technologies.** The LC handbook: Guide to LC columns and method development [online]. USA : Agilent Technologies, 2015. [Citace: 12.12.2017]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>.
- [48] **Dolan, John. W.** LC troubleshooting: Why do peaks tail? *LC-GC North America*. Červen 2003, Sv. 21, 7, stránky 612-616.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	faktor symetrie
ACN	acetonitril
AD	Alzheimerova nemoc
ALS	amyotrofická laterální skleróza
AMPA	receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolpropionová kyselina
AP	automatická pipeta
AQC	6-aminochinolyln-N-hydroxysukcinimidyl karbamát
BMAA	β -N-methylamino-L-alanin
BP	bakalářská práce autora
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
cc	kubický centimetr
CDER	Centrum pro hodnocení a výzkum léčiv
c _{ST/VS}	koncentrace standardu/vnitřního standardu
DNS	derivatizační činidlo dansyl chlorid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC	plynová chromatografie
HCl	kyselina chlorovodíková
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HLB	hydrofilne-lipofilní sorbent
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišení
IDL	instrumentální mez detekce
IQL	instrumentální mez stanovitelnosti
IT	iontová past
K	kapacitní faktor
K _D	rozdělovací koeficient
LC	kapalinová chromatografie
LC-FLD	kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
LLE	extrakce typu kapalina-kapalina
m	hmotnost
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MCX	silný kationtový iontoměnič pracující ve smíšeném módu (tzv. mixed-mode)

MDL	mez detekce metody
MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
mGluR5	metabotropní glutamátový receptor
MP	magisterská práce autora
MQL	mez stanovitelnosti metody
M_r	relativní molekulová hmotnost
MRM	typ skenu hmotnostního detektoru (multi reaction monitoring)
MS^2	tandemová hmotnostní spektrometrie
N	účinnost kolony
NCE	normalizovaná kolizní energie (tj. kolizní energie vztažená ke standardu)
NMDA	receptor N-methyl-D-aspartát
NS	hodnota neuvedena
PD	Parkinsonova nemoc
PEEK	polyetherether keton
pK	disociační konstanta
QC	koeficient kvality
R	rozlišení
RCF	relativní odstředivá síla
ROS	reaktivní formy kyslíku
RSD	relativní směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu ku šumu
SCX	silný kationtový iontoměnič
SPE	extrakce na tuhou fázi
SQ	jednoduchý kvadrupól
SST	testování vhodnosti systému
ST	standard β -N-methylamino-L-alanin (analyt)
TCA	kyselina trichloroctová
TIC	celkový iontový proud
TQ	trojitý kvadrupól
UPR	mechanismy odstraňující špatně složené proteiny
USP	lékopis Spojených států amerických
V	objem
VS	vnitřní standard d_4 -diaminomáslenná kyselina
$V_{ST/VS/MF}$	objem standardu/vnitřního standardu/mobilní fáze
α	separační faktor

8 PŘÍLOHY

8.1 Příloha A

Tab. 45: Podrobnější popis jednotlivých kroků SPE extrakce bazických analytů [22].

Fáze	Roztok	Účel
Kondicionace	1 ml metanolu	Příprava kolonky k použití
Ekvilibrace	1 ml deionizované vody	
Nanesení vzorku (load)	1 ml obohaceného vzorku (v 0,1M HCl)	Sorpce analytu na sorbent
Promytí 1 (wash 1)	1 ml 0,1M HCl	Odstranění proteinů a uzamčení bazického analytu na sorbentu
Promytí 2 (wash 2)	1 ml metanolu	Odstranění internujících látek zadržovaných hydrofobními interakcemi
Eluce (elute)	1 ml 5% NH ₄ OH v metanolu	Deprotonizace funkčních skupin analytu

Tab. 46: Doporučené objemy pro jednotlivé kroky SPE extrakce - dle udání výrobcem [23].

Velikost SPE kolonky	1 cc	3 cc	6 cc	12 cc	20 cc	35 cc
Kondicionace	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml	10 ml	50 ml
Ekvilibrace	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml	10 ml	50 ml
Vzorek*	1 ml	2 ml	5 ml	15 ml	30 ml	100 ml
Vzorek**	50 ml	200 ml	500 ml	1000 ml	2000 ml	5000 ml
Promývání	1 ml	2 ml	4 ml	5 ml	10 ml	40 ml
Eluce	1 ml	2 ml	4 ml	5 ml	10 ml	60 ml

* Doporučený objem pro analýzu koncentrovaného vzorku za předpokladu ředění 1:1.

** Doporučený objem pro velkoobjemovou analýzu vody.

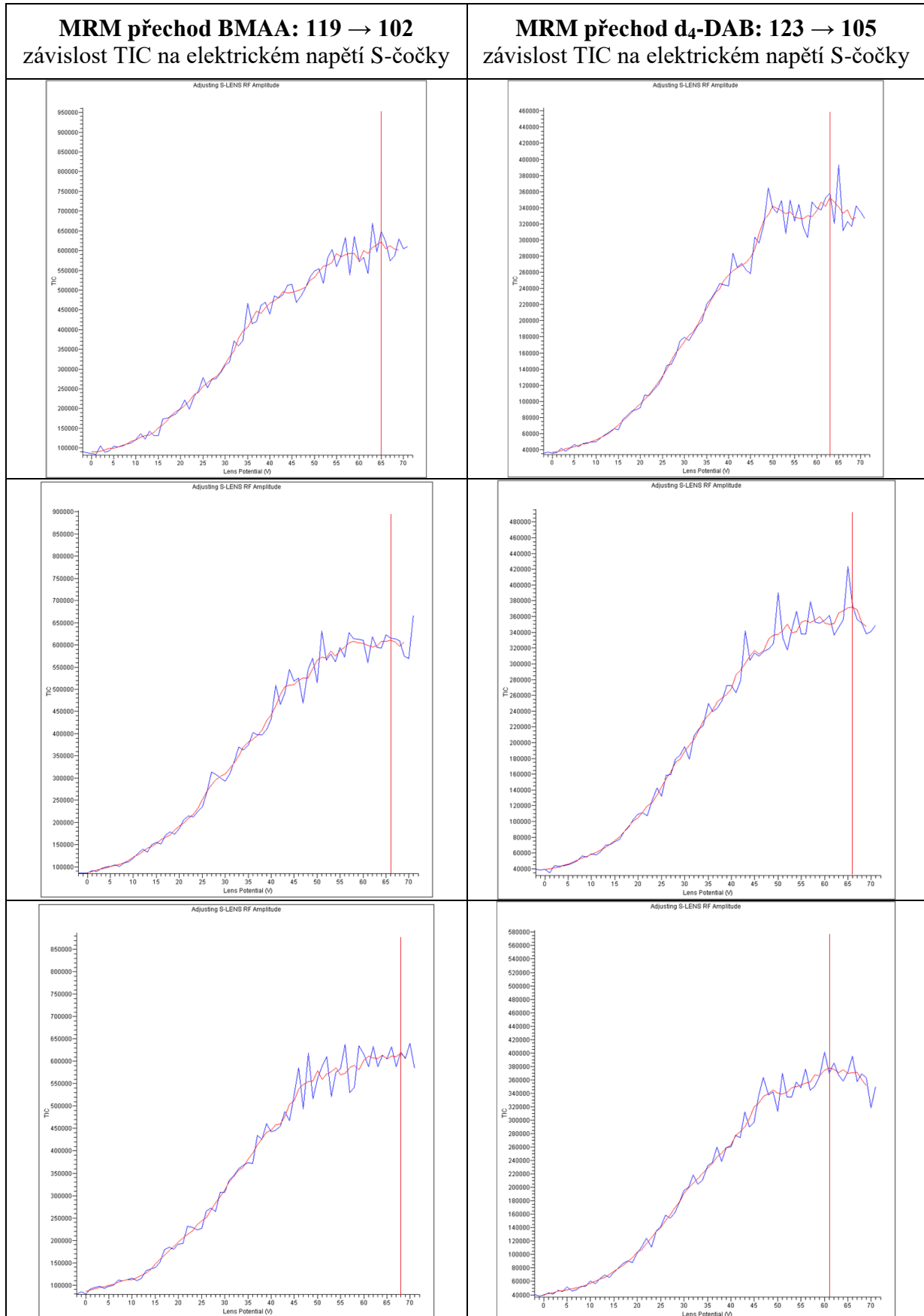
Tab. 47: Maximální kapacita sorbentu a vhodný objem elučního činidla - dle výrobce [21].

	Hmotnost sorbentu				
	2 mg*	5 mg	10 mg	30 mg	60 mg
Maximální kapacita	60 – 400 µg	0,15 – 1 mg	0,35 – 2 mg	1 – 5 mg	2 – 10 mg
Běžný objem vzorku	10 – 375 µl	10 – 100 µl	50 – 200 µl	100 µl – 1 ml	200 µl – 2 ml
Objem elučního činidla	25 µl	≤ 150 µl	≤ 250 µl	≥ 400 µl	≥ 800 µl

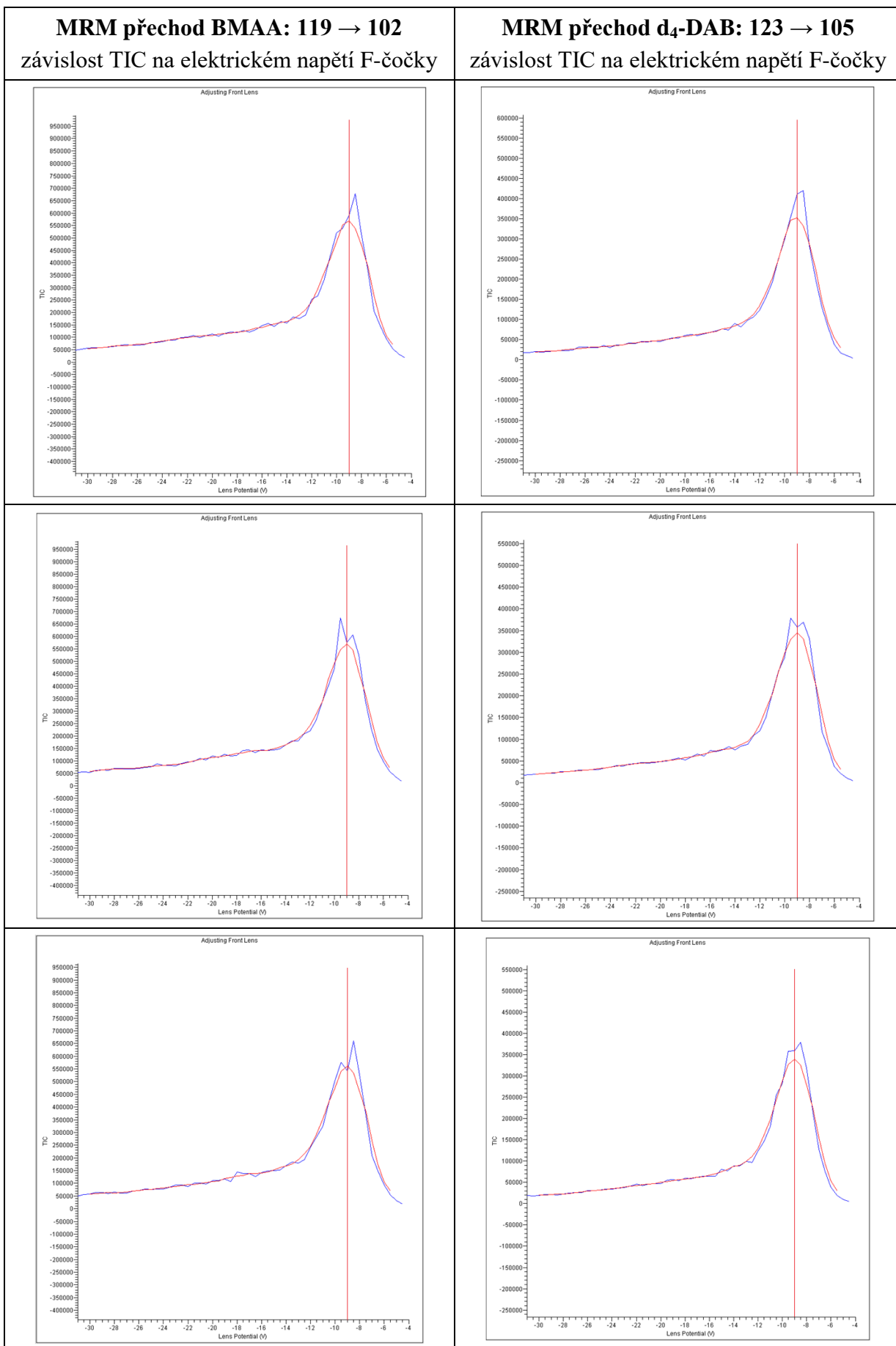
* Dostupné pouze v 96 jamkovém provedení.

8.2 Příloha B

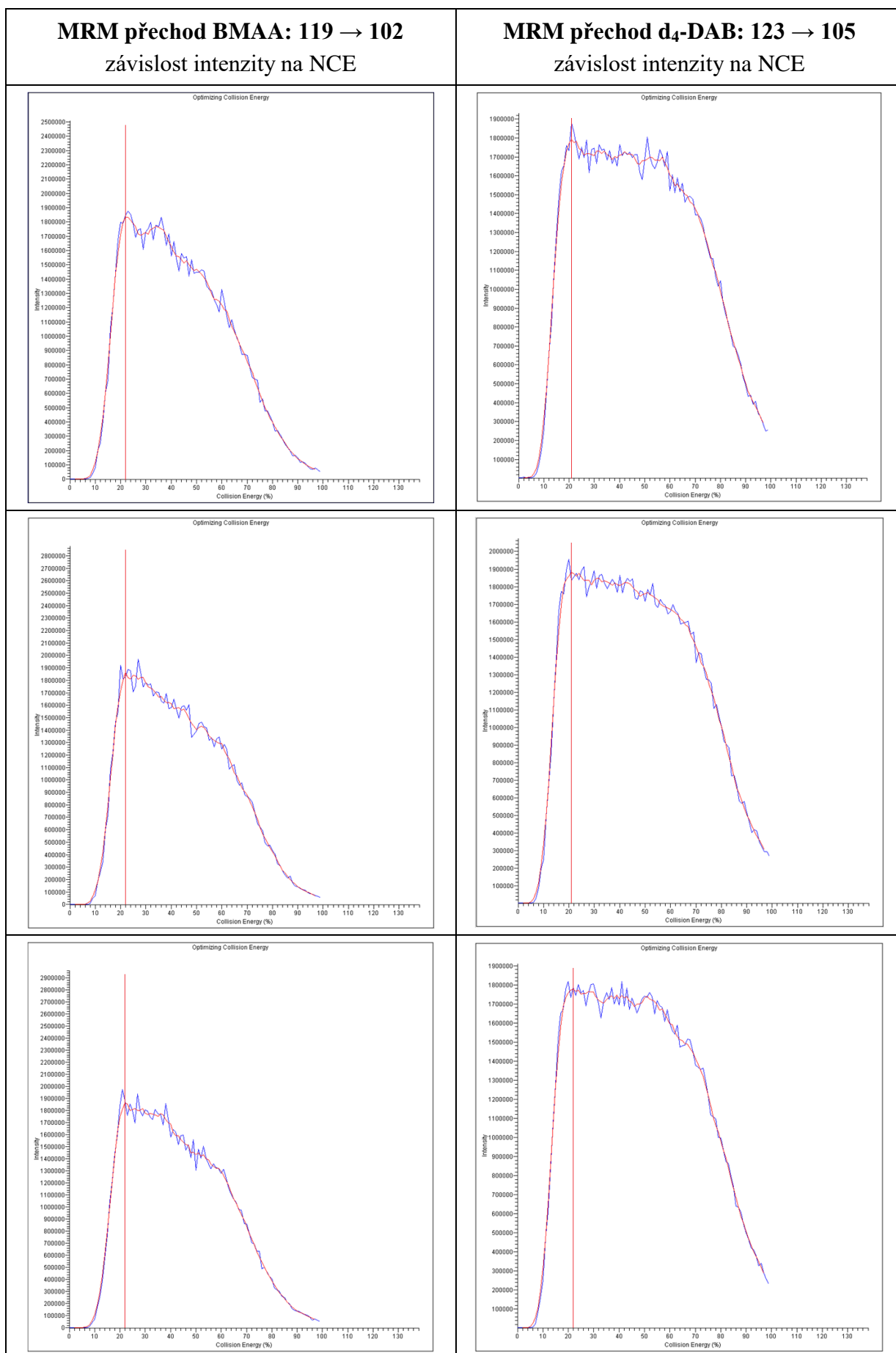
Tab. 48: Optimalizace elektrického napětí S-čoček.



Tab. 49: Optimalizace elektrického napětí F-čoček.



Tab. 50: Optimalizace normalizované kolizní energie.



Tab. 51: Hmotnostní spektra BMAA při NCE 22 % a 35 % - kalibrační křivka.

C _{ST} [µg.l ⁻¹]	NCE 22 %	NCE 35 %
0,10		
0,20		
0,50		
0,75		
1,00		
2,00		
5,00		

8.3 Příloha C

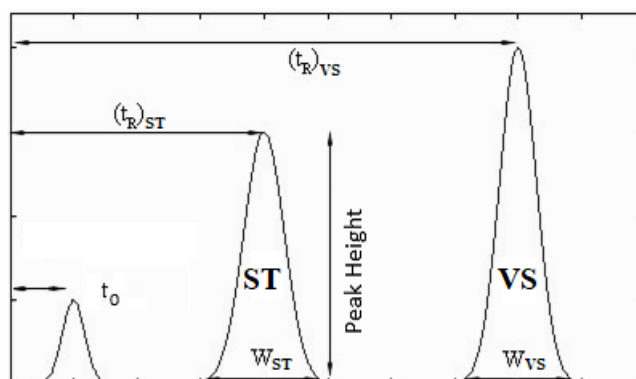
Rozlišení je parametr popisující separační výkon celého chromatografického systému ve vztahu k jednotlivým složkám vzorku. Udává separační schopnost kolony [34,35].

Kapacitní faktor udává poměr mezi redukovaným retenčním časem analytu a mrtvým retenčním časem, jenž odpovídá eluční době látek nezadržených ve stacionární fázi [33,34].

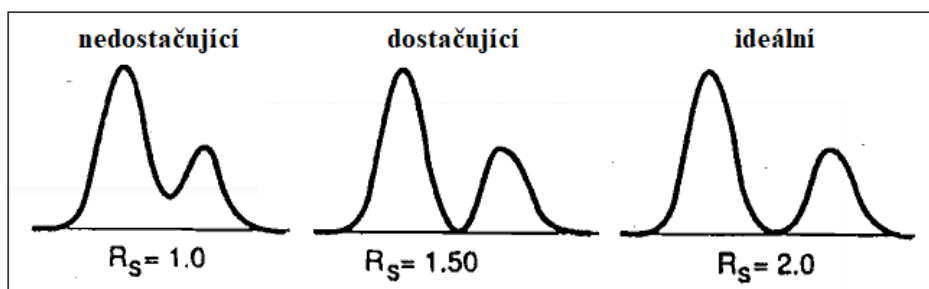
Separací faktor (též selektivita) závisí pouze na charakteru látek, typu a složení mobilní fáze a udává poměr mezi kapacitními faktory píků separovaných látek [33].

Tab. 52: Výpočet parametrů rozlišení, kapacitního faktoru a separačního faktoru.

PARAMETR	VÝPOČET	ZDROJE
ROZLIŠENÍ	$R = 2 \frac{(t_R)_{VS} - (t_R)_{ST}}{W_{ST} + W_{VS}}$	[33,34,46]
KAPACITNÍ FAKTOR	$K = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	[33,34,47]
SEPARAČNÍ FAKTOR	$\alpha = \frac{K_{VS}}{K_{ST}} = \frac{(t_R)_{VS} - t_0}{(t_R)_{ST} - t_0}$	[33,34,47]



Obr. 31: Vyhodnocení rozlišení, kapacitního faktoru a separačního faktoru [33].



Obr. 32: Separace píků podle hodnot rozlišení [34].

Tab. 53: Výpočet účinnosti kolony.

PARAMETR	VÝPOČET	ZDROJE
ÚČINNOST KOLONY	$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$	[46,47]

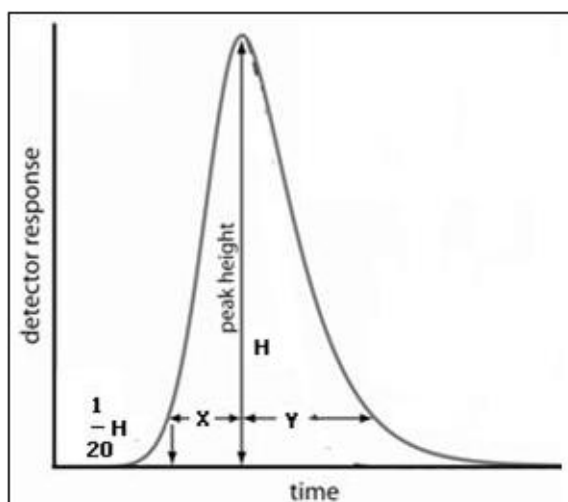
Tab. 54: Výpočet opakovatelnosti nástřiku.

PARAMETR		VÝPOČET	ZDROJE
Průměr	x	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$	[34]
Výběrová směrodatná odchylka	SD	$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	
Relativní směrodatná odchylka	RSD	$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$	

Faktor asymetrie je parametr udávající symetrii píku, kdy se za ideálních okolností předpokládá, že se rozpuštěná látka eluuje jako symetrický gausovský pík [33].

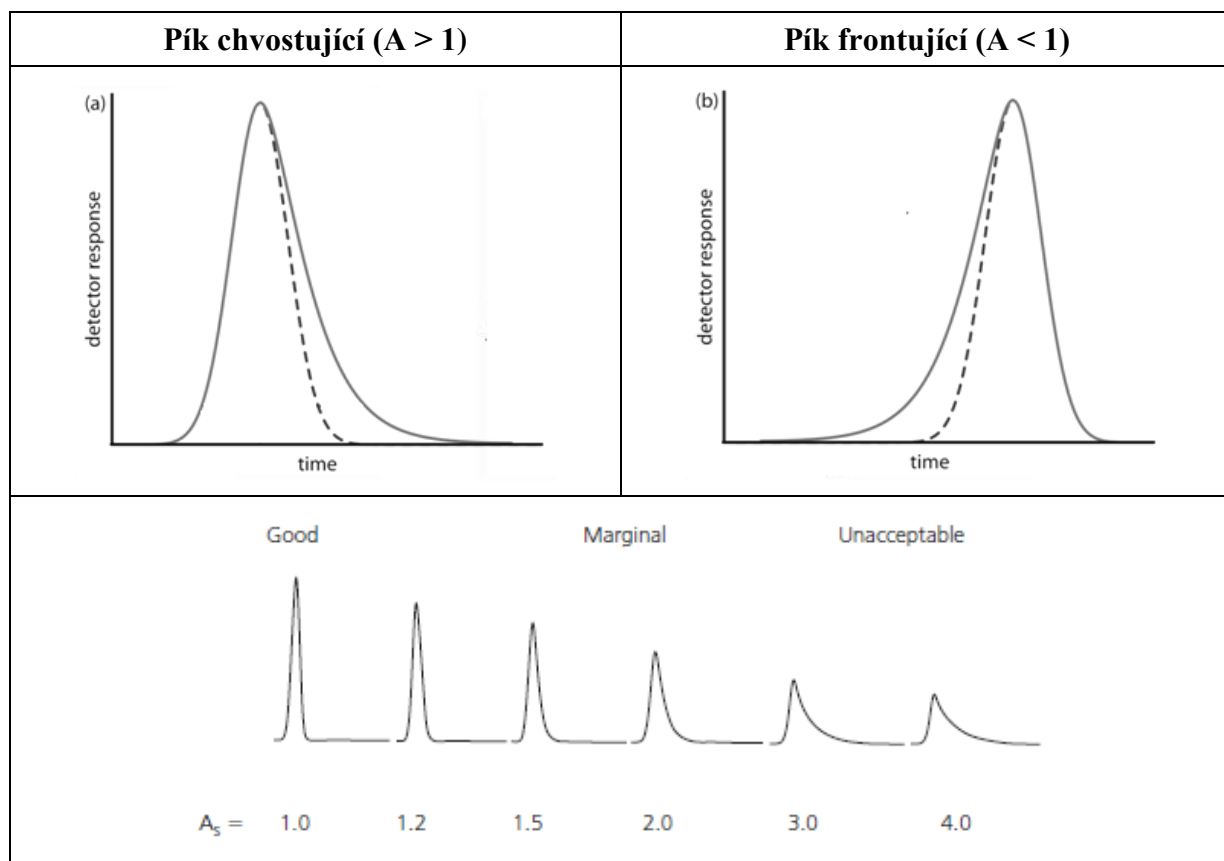
Tab. 55: Výpočet parametru faktoru asymetrie.

PARAMETR	VÝPOČET	ZDROJE
FAKTOR ASYMETRIE	$A = \frac{x+y}{2x}$	[33,34,47]



Obr. 33: Vyhodnocení faktoru asymetrie [33].

Tab. 56: Příklady asymetrických píků [33,48].



Tab. 57: Primární data pro výpočet hodnotících parametrů SST.

Nástřík	(t_R) _{ST} [min]	(t_R) _{VS} [min]	t_0 [min]	W_{ST} [min]	W_{VS} [min]	$W_{ST/2}$ [min]	$W_{VS/2}$ [min]
1	5,50	7,01	1,33	0,58	0,40	0,21	0,23
2	5,49	7,01	1,33	0,44	0,40	0,21	0,23
3	5,49	7,00	1,33	0,38	0,41	0,22	0,22
4	5,50	7,00	1,33	0,38	0,40	0,22	0,22
5	5,50	7,01	1,34	0,40	0,42	0,23	0,22
6	5,49	7,00	1,33	0,38	0,41	0,22	0,23
7	5,53	7,09	1,33	0,40	0,42	0,21	0,24
8	5,57	7,11	1,33	0,42	0,42	0,22	0,23
9	5,57	7,11	1,33	0,40	0,42	0,27	0,23
10	5,57	7,10	1,33	0,36	0,43	0,22	0,23
Průměr (t_R) [min]	5,52	7,04					
SD(t_R) [min]	0,036	0,051					
RSD(t_R) [%]	0,647	0,721					

Legenda:

- (t_R)_{ST} retenční čas BMAA
 (t_R)_{VS} retenční čas d₄-DAB
 t_0 mrtvý retenční čas
 W_{ST} šířka píku BMAA v základně
 W_{VS} šířka píku d₄-DAB v základně
 $W_{ST/2}$ šířka píku BMAA v polovině jeho výšky
 $W_{VS/2}$ šířka píku d₄-DAB v polovině jeho výšky
 SD výběrová směrodatná odchylka
 RSD relativní směrodatná odchylka

Tab. 58: Primární data pro výpočet opakovatelnosti nástřiku (v rámci SST).

Nástřik	$c = 0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$		$c = 1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$	
	P_{ST} [counts.min ⁻¹]	P_{VS} [counts.min ⁻¹]	P_{ST} [counts.min ⁻¹]	P_{VS} [counts.min ⁻¹]
1	1938	454784	19764	433935
2	1959	455929	19805	431861
3	1953	445062	19338	429712
4	1971	448544	19838	433737
5	1963	450395	19519	433337
6	1977	449210	19798	435769
7	1941	444641	19825	434638
8	1972	450624	19441	442616

Legenda:

P_{ST} plocha píku BMAA

P_{VS} plocha píku d₄-DAB

Tab. 59: Primární data pro výpočet faktoru symetrie (v rámci SST).

Nástřik	x_{ST} [min]	y_{ST} [min]	x_{VS} [min]	y_{VS} [min]	A_{ST} [1]	A_{VS} [1]
1	0,21	0,36	0,23	0,41	1,36	1,39
2	0,21	0,40	0,23	0,41	1,45	1,39
3	0,21	0,41	0,22	0,41	1,48	1,43
4	0,21	0,41	0,22	0,41	1,48	1,43
5	0,21	0,39	0,23	0,41	1,43	1,39
6	0,22	0,43	0,22	0,41	1,48	1,43
7	0,22	0,41	0,25	0,41	1,43	1,32
8	0,20	0,40	0,22	0,41	1,50	1,43
9	0,23	0,45	0,22	0,42	1,48	1,45
10	0,23	0,43	0,22	0,42	1,43	1,45

Legenda:

x_{ST} šířka přední části píku BMAA v 5 % jeho výšky

y_{ST} šířka zadní části píku BMAA v 5 % jeho výšky

x_{VS} šířka zadní části píku d₄-DAB v 5 % jeho výšky

y_{VS} šířka zadní části píku d₄-DAB v 5 % jeho výšky

A_{ST} faktor symetrie pro BMAA

A_{VS} faktor symetrie pro d₄-DAB

8.4 Příloha D

Tab. 60: Primární data pro výpočet správnosti a přesnosti (intra-day).

Koncentrační úroveň	Označení roztoku	Koncentrace (ref.)	Koncentrace (exp.)	Plocha BMAA	Plocha d ₄ -DAB	Poměr ploch BMAA/d ₄ -DAB	Průměrná koncentrace	SD	SPRÁVNOST	PŘESNOST
		[µg.l ⁻¹]	[µg.l ⁻¹]	[counts.min ⁻¹]	[counts.min ⁻¹]	[1]	[µg.l ⁻¹]	[1]	[%]	[%]
1	K1 - a	0,10	0,115	1438	2243995	0,000641	0,118	0,0032	118,49	2,7
	K1 - b		0,122	1561	2239776	0,000697				
	K1 - c		0,119	1513	2259917	0,000669				
2	K2 - a	0,20	0,220	3518	2255750	0,001560	0,197	0,0205	98,47	10,4
	K2 - b		0,188	2858	2246128	0,001272				
	K2 - c		0,183	2838	2306426	0,001231				
3	K3 - a	0,50	0,430	7679	2265384	0,003390	0,473	0,0400	94,65	8,5
	K3 - b		0,481	8775	2288721	0,003834				
	K3 - c		0,509	9324	2285535	0,004079				
4	K4 - a	0,75	0,723	13824	2323116	0,005950	0,736	0,0287	98,11	3,9
	K4 - b		0,769	14543	2291105	0,006348				
	K4 - c		0,716	13666	2322279	0,005885				
5	K5 - a	1,0	0,993	19199	2310078	0,008311	1,044	0,0549	104,35	5,3
	K5 - b		1,035	20091	2316303	0,008674				
	K5 - c		1,102	21147	2283602	0,009261				
6	K6 - a	2,0	1,891	38111	2359637	0,016151	1,977	0,0743	98,84	3,8
	K6 - b		2,024	40808	2356983	0,017314				
	K6 - c		2,015	40012	2321755	0,017233				
7	K7 - a	5,0	5,174	104342	2327920	0,044822	5,005	0,1884	100,10	3,8
	K7 - b		5,040	101084	2315758	0,043651				
	K7 - c		4,802	96779	2327944	0,041573				

Tab. 61: Primární data pro výpočet správnosti a přesnosti (inter-day).

Koncentrační úroveň	Označení roztoku	Koncentrace (ref.)	Koncentrace (exp.)	Plocha BMAA	Plocha d ₄ -DAB	Poměr plochy BMAA/d ₄ -DAB	Průměrná koncentrace	SD	SPRÁVNOST	PŘESNOST
		[µg.l ⁻¹]	[µg.l ⁻¹]	[counts.min ⁻¹]	[counts.min ⁻¹]	[1]	[µg.l ⁻¹]	[1]	[%]	[%]
1	K1 – 1. den	0,10	0,084	897	605560	0,00148	0,082	0,002	82,4	2,8
	K1 – 2. den		0,083	1031	548635	0,00188				
	K1 – 14. den		0,080	527	408260	0,00129				
2	K2 – 1. den	0,20	0,176	1723	623891	0,00276	0,196	0,020	97,8	10,3
	K2 – 2. den		0,216	1989	551368	0,00361				
	K2 – 14. den		0,195	1192	438926	0,00272				
3	K3 – 1. den	0,50	0,453	4215	634568	0,00664	0,487	0,089	97,4	18,4
	K3 – 2. den		0,589	4871	576188	0,00845				
	K3 – 14. den		0,420	2720	493984	0,00551				
4	K4 – 1. den	0,75	0,734	6670	630986	0,10507	0,787	0,054	104,9	6,8
	K4 – 2. den		0,841	6521	555537	0,01174				
	K4 – 14. den		0,786	4779	475769	0,01004				
5	K5 – 1. den	1,0	1,054	8793	584017	0,01506	0,967	0,075	96,7	7,8
	K5 – 2. den		0,925	6302	491623	0,01282				
	K5 – 14. den		0,924	5706	485504	0,01175				
6	K6 – 1. den	2,0	2,079	17680	601107	0,02941	2,059	0,184	103,0	8,9
	K6 – 2. den		1,866	13289	530226	0,02506				
	K6 – 14. den		2,232	11410	407758	0,02798				
7	K7 – 1. den	5,0	4,950	41347	594113	0,06959	4,987	0,071	99,7	1,4
	K7 – 2. den		5,069	35302	529272	0,06670				
	K7 – 14. den		4,942	25231	409721	0,06158				

Tab. 62: Očekávaná správnost metody (výtežnost) jako funkce koncentrace analytu.

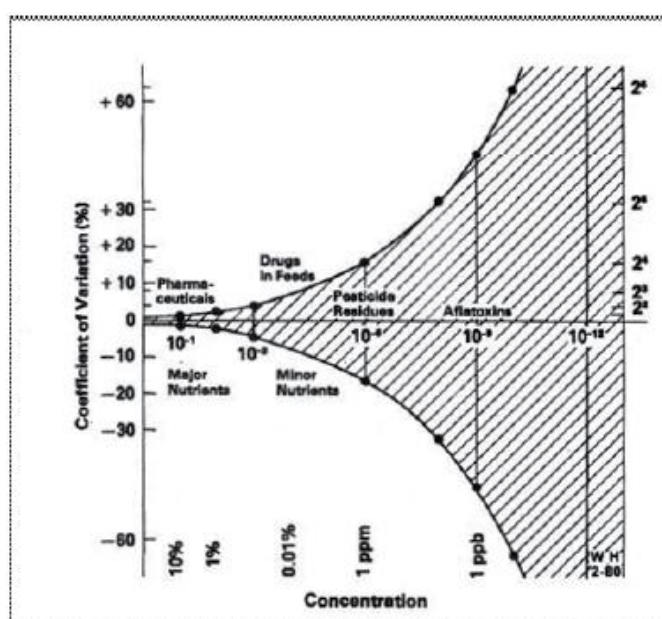
Analyt [%]	Poměr analytu	Jednotky	Správnost [%] (resp. výtežnost)
100	1	100 %	98 – 102
10	10^{-1}	10 %	98 – 102
1	10^{-2}	1 %	97 – 103
0,1	10^{-3}	0,1 %	95 – 105
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10^{-7}	100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	80 – 110
0,000001	10^{-8}	10 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	60 – 115
0,0000001	10^{-9}	1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	40 – 120

Pozn.: Tabulka převzata z publikace [41] a upravena autorem.

Tab. 63: Očekávaná přesnost metody (opakovatelnost) jako funkce koncentrace analytu.

Analyt [%]	Poměr analytu	Jednotky	Přesnost [%] (resp. opakovatelnost, RSD)
100	1	100 %	1,3
10	10^{-1}	10 %	1,9
1	10^{-2}	1 %	2,7
0,1	10^{-3}	0,1 %	3,7
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10^{-7}	100 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15
0,000001	10^{-8}	10 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	21
0,0000001	10^{-9}	1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	30

Pozn.: Tabulka převzata z publikace [41] a upravena autorem.



Obr. 34: Ilustrace exponenciálního nárůstu RSD se snižující se koncentrací analytu [41].

8.5 Příloha E

Tab. 64: Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce dle obecného postupu výroby.

Kolonka	Plocha BMAA	Výtěžnost BMAA	Plocha d ₄ -DAB	Výtěžnost d ₄ -DAB
	[counts.min ⁻¹]	[%]	[counts.min ⁻¹]	[%]
SPE 1	123667	80,4	1243669	73,4
SPE 2	132386	86,1	1231376	72,7
SPE 3	120519	78,4	1100061	65,0
SPE 4	125275	81,4	1150946	68,0
SPE 5	124214	80,8	1215197	71,7
SPE 6	109293	71,1	1081527	63,9
SPE 7	121431	78,9	1139074	67,3
SPE 8	122472	79,6	1094801	64,6

Plocha zjištěná v referenčním vzorku byla:

- 153809 counts.min⁻¹ pro BMAA
- 1693659 counts.min⁻¹ pro d₄-DAB

Tab. 65: Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce v rámci optimalizace pH vzorku.

Obohacený roztok	Plocha píku zjištěná v jednotlivých frakcích [counts.min ⁻¹]					
	BMAA			d ₄ -DAB		
	L	W	E	L	W	E
pH 1	<DL	<DL	174262	<DL	<DL	1667012
pH 2	<DL	18712	143221	<DL	<DL	1233385
pH 3	<DL	<QL	133562	<DL	<DL	923635
pH 4	<DL	<QL	114353	<DL	<DL	726322
pH 5	<DL	<DL	101761	<DL	<DL	658740
pH 6	<DL	<DL	102572	<DL	<DL	295137
pH 7	<DL	<DL	113797	<DL	<DL	797720

Plocha zjištěná v referenčním vzorku byla:

- 215599 counts.min⁻¹ pro BMAA
- 2201078 counts.min⁻¹ pro d₄-DAB

Legenda:

- L ... frakce získaná po nanesení vzorku
- W ... frakce získaná po promytí oběma promývacími roztoky
- E ... frakce získaná po eluci sloučenin
- <DL ... menší než mez detekce
- <QL ... menší než mez stanovitelnosti

Tab. 66: Primární data pro výpočet výtěžnosti BMAA a d₄-DAB ve frakcích.

(1. fáze optimalizace složení elučního činidla)

NH ₄ OH [obj. %]	Plocha píku zjištěná v jednotlivých frakcích [counts.min ⁻¹]							
	BMAA				d ₄ -DAB			
	L	W	E1	E2	L	W	E1	E2
1	<DL	<DL	99793	30137	<QL	3925	19643	94606
3	<DL	<DL	137569	5474	<QL	2242	1057505	86753
5	<DL	<DL	122654	3800	<QL	<QL	1159367	36865
10	<DL	<DL	163451	2895	<QL	<QL	1299170	14584
15	<QL	<QL	148999	3471	<DL	<QL	1113429	9263
20	<QL	<QL	138156	3830	<DL	<QL	548026	8690

Plocha zjištěná v referenčním vzorku byla:

- 207562 counts.min⁻¹ pro BMAA
- 2047293 counts.min⁻¹ pro d₄-DAB

Legenda:

- L ... frakce získaná po nanesení vzorku
- W ... frakce získaná po promytí oběma promývacími roztoky
- E1 ... frakce získaná po první eluci
- E2 ... frakce získaná po druhé eluci
- <DL ... menší než mez detekce
- <QL ... menší než mez stanovitelnosti

Tab. 67: Primární data pro výpočet výtěžnosti BMAA a d₄-DAB ve frakcích.

(2. fáze optimalizace složení elučního činidla)

MeOH/H ₂ O [obj. %]	Plocha píku zjištěná v jednotlivých frakcích [counts.min ⁻¹]							
	BMAA				d ₄ -DAB			
	L	W	E1	E2	L	W	E1	E2
0 / 100	<QL	<DL	139210	13310	14135	<QL	983768	52194
20 / 80	<DL	<DL	134559	9157	17089	4161	1352570	62214
40 / 60	<DL	<DL	137937	2362	22159	<QL	1178216	11194
60 / 40	<DL	<DL	146019	6330	12085	<QL	1151718	31341
80 / 20	<DL	<DL	175490	1737	3483	<QL	1831685	13420
100 / 0	<DL	<DL	161616	2595	3252	<QL	1359538	19261

Plocha zjištěná v referenčním vzorku byla:

- 225585 counts.min⁻¹ pro BMAA
- 2576714 counts.min⁻¹ pro d₄-DAB

Legenda:

- L ... frakce získaná po nanesení vzorku
- W ... frakce získaná po promytí oběma promývacími roztoky
- E1 ... frakce získaná po první eluci
- E2 ... frakce získaná po druhé eluci
- <DL ... menší než mez detekce
- <QL ... menší než mez stanovitelnosti

Tab. 68: Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce v rámci optimalizace objemu vzorku.

Objem vzorku [ml]	Plocha píku zjištěná v jednotlivých frakcích [counts.min ⁻¹]					
	BMAA			d ₄ -DAB		
	W1	W2	E	W1	W2	E
1	<DL	<DL	137099	<QL	<QL	905798
3	<QL	<QL	365826	7149	6289	843409
5	5131	3175	541452	67545	18130	370547
10	22307	7600	617230	54591	6258	218505
20	27029	7117	544572	27121	2566	62067
50	21794	8020	542586	12209	1295	23785

Plocha zjištěná v referenčním vzorku byla:

- 225585 counts.min⁻¹ pro BMAA
- 2576714 counts.min⁻¹ pro d₄-DAB

Legenda:

- W1 ... frakce získaná po promytí prvním promývacím roztokem
- W2 ... frakce získaná po promytí druhým promývacím roztokem
- E ... frakce získaná po první eluci
- <DL ... menší než mez detekce
- <QL ... menší než mez stanovitelnosti

Tab. 69: Přehled postupů SPE extrakce dle různých publikací.

PUBLIKACE	[C1]	[C2]	[C3]	[C4]	[C5]
Kondicionace	5 ml MeOH	5 ml MeOH	2 ml MeOH 1 ml HCOOH (pH = 3)	5 ml MeOH	20 ml MeOH
Ekvilibrace	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O	1 ml 0,1M HCl 2 ml MeOH	5 ml kyselina citrónová (pH = 4)	20 ml 100mM mravenčanového pufru (pH = 4)
Nanesení vzorku	100 ml vzorku	500 ml vzorku	Okyselený vzorek (množství neuvedeno)	100 ml okyseleného vzorku (pH = 4)	1000 ml vzorku
Promytí	-----	-----	-----	5 ml kyselina citrónová (pH = 4) s 15 % MeOH	20 ml 2% HCOOH 20 ml MeOH
Eluce	6 ml 5% NH ₄ OH v MeOH	6 ml 6% NH ₄ OH v MeOH	3 ml 5% NH ₄ OH v MeOH	5 ml 3% NH ₄ OH v MeOH	20 ml 5% NH ₄ OH v MeOH/ACN (1:1)
Další úprava	Odpaření N ₂ (g), 50 °C Derivatizace Rekonstituce	Odpaření N ₂ (g) Derivatizace Rekonstituce	Odpaření N ₂ (g), 40 °C Rekonstituce	Odpaření N ₂ (g), RT Derivatizace Rekonstituce	Odpaření N ₂ (g) Derivatizace, Rekonstituce

Pozn.: RT = teplota místnosti

8.6 Příloha F

Tab. 70: Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce – volná frakce BMAA.

Typ vzorku	Plocha píku [counts.min ⁻¹]					
	BMAA			d ₄ -DAB		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
<i>Arthrospira</i>	355626	348738	346521	1948871	2046672	1885309
<i>Nostoc commune</i>	390378	374658	283071	2063378	2131915	2025362

Plocha v referenčním vzorku:

- 360506 counts.min⁻¹ (BMAA)
- 1802128 counts.min⁻¹ (d₄-DAB)

Tab. 71: Navážky vzorků sinic – volná frakce BMAA

Typ vzorku	Navážka [mg]		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
<i>Arthrospira</i>	2,21	1,97	2,43
<i>Nostoc commune</i>	2,51	2,27	2,23

Tab. 83: Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce BMAA – optimalizace hydrolyzy.

Obohacený vzorek s matricí	Koncentrace kyseliny chlorovodíkové [mol.l ⁻¹]					
	0,1	0,3	0,5	1	3	6
1	3973	3462	4515	1400	6100	9551
2	3330	1905	2753	2375	5705	10007
3	2539	1698	2323	2071	5708	10131
Obohacený vzorek bez matrice	6052	8552	13804	13507	19654	23037
Neobohacený vzorek	688	1247	2142	2255	1134	721

Tab. 84: Primární data pro výpočet výtěžnosti extrakce d₄-DAB – optimalizace hydrolyzy.

Obohacený vzorek s matricí	Koncentrace kyseliny chlorovodíkové [mol.l ⁻¹]					
	0,1	0,3	0,5	1	3	6
1	184103	0	0	0	138643	121059
2	423885	0	0	0	319032	342727
3	400376	0	0	0	354137	368399
Obohacený vzorek bez matrice	252425	567214	701026	601637	800220	815233
Neobohacený vzorek	0	0	0	0	0	0

Plocha v referenčním vzorku: 30651 counts.min⁻¹ (BMAA), 710062 counts.min⁻¹ (d₄-DAB)

Tab. 85: Navážky vzorků sinice (*Arthrospira*) – optimalizace kyselá hydrolyzy.

Obohacený vzorek s matricí	Koncentrace kyseliny chlorovodíkové [mol.l ⁻¹]					
	0,1	0,3	0,5	1	3	6
1	2,57 mg	2,36 mg	2,05 mg	2,25 mg	2,36 mg	2,21 mg
2	2,37 mg	2,23 mg	2,72 mg	1,70 mg	2,14 mg	2,56 mg
3	2,29 mg	2,62 mg	2,17 mg	1,70 mg	2,12 mg	2,05 mg
Obohacený vzorek bez matrice	1,60 mg	2,04 mg	2,08 mg	2,75 mg	2,24 mg	1,67 mg
Neobohacený vzorek	2,15 mg	2,35 mg	1,89 mg	2,24 mg	2,18 mg	1,97 mg