

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Stanovení Beta-hydroxymáseelné kyseliny v biologickém materiálu technikou LC/MS

Diplomová práce

Autor: Barbora Hoňková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Studijní program N 1407 analytická chemie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Hoňková
Název práce	Stanovení beta-hydroxymáselné kyseliny v biologickém materiálu technikou LC/MS
Typ práce	Diplomová
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D
Katedra	Katedra analytické chemie
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Beta-hydroxymáselná kyselina je ketolátka, která se vyskytuje v lidském organismu u lidí trpící cukrovkou, alkoholismem, či jsou vystaveni dlouhodobému hladovění. Tato diplomová práce se zabývá stanovením β -hydroxymáselné kyseliny pomocí metody LC/MS. Pro stanovení této sloučeniny byl použit postup pomocí derivatizace. β -hydroxymáselná kyselina byla stanovena ve standardech a modelových vzorcích (krev a moč).
Klíčová slova	beta-hydroxymáselná kyselina, ketoacidóza, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometr, derivatizace
Počet stran	49
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Barbora Hoňková
Title:	Determination of beta-hydroxybutyric acid in biological samples using LC/MS
Type of thesis:	Diploma thesis
Thesis Supervisor:	doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D
Department	Department of Analytical Chemistry
Year of presentation:	2023
Abstract:	Beta-hydroxybutyric acid is a keto substance that occurs in the human body in people suffering from diabetes, alcoholism, or who are exposed to prolonged starvation. This thesis deals with the determination of β -hydroxybutyric acid using the LC/MS method. A derivatization procedure was used to determine this compound. β -Hydroxybutyric acid was determined in standards and model samples (blood and urine).
Key words	beta-hydroxybutyric acid, ketoacidosis, liquid chromatography, mass spectrometry, derivatization
Pages:	49
Language:	Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Petra Fryčáka, Ph.D. Veškeré použité zdroje jsou řádně citovány v seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....
Barbora Hoňková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Petru Fryčákovi, Ph.D. a Mgr. Oleksandru Prystopiukovi za odborné vedení mé diplomové práce, cenné připomínky, rady ale také za čas, který mi věnovali při vypracování této diplomové práce. Velké poděkování také patří interní grantové agentuře za poskytnutí finančních prostředků v rámci projektů IGA_PrF_2022_023 a IGA_PrF_2023_027. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a kamarádům za podporu při studiu.

Obsah

1	Úvod	1
2	β -hydroxymáselná kyselina	2
2.1	Metabolismus ketolátek	3
2.2	Analýza a stanovení β -hydroxymáselné kyseliny	5
3	Ketoacidóza	7
3.1	Diabetická ketoacidóza	7
3.2	Alkoholová ketoacidóza	8
3.3	Další typy ketoacidózy	9
4	Forenzní chemie	11
4.1	Biologické vzorky v oblasti forenzní chemii	12
4.2	Stanovení β -hydroxymáselné kyseliny pro forenzní účely	12
5	Instrumentace	14
5.1	Kapalinová chromatografie	14
5.1.1	Instrumentace v kapalinové chromatografii	15
5.1.2	HPLC	16
5.2	Hmotnostní spektrometrie	18
5.2.1	Iontové zdroje	19
5.2.2	Hmotnostní analyzátory	20
5.2.3	Detektory	22
5.3	Spojení LC/MS	23
5.3.1	Spojení LC – MS/MS	24
6	Validace	25
6.1	Mez detekce a mez stanovitelnosti	25
6.2	Linearita	26
6.3	Opakovatelnost	26
7	Cíle diplomové práce	27
8	Experimentální část	28
8.1	Použité chemikálie	28
8.2	Biologické vzorky	28
8.3	Použité přístroje	29
8.4	Postup pro přípravu kalibračních roztoků a modelových vzorků	30
8.4.1	Příprava kalibračních vzorků	30
8.4.2	Příprava derivatizační směsi	30
8.4.3	Derivatizace analyzovaného vzorku	31
8.5	Stanovení β -hydroxymáselné kyseliny pomocí metody LC/MS	32

8.5.1	Složení mobilní fáze.....	32
8.6	Parametry nastavení hmotnostní analyzátoru	34
9	Výsledky a Diskuse	35
9.1	Fragmentační spektrum standardu.....	35
9.2	Kalibrace.....	35
9.3	Validace metody.....	38
9.4	Stanovení analytu modelových vzorcích.....	39
9.4.1	Vyhodnocení přesnosti měření modelových vzorků.....	42
10	Závěr.....	43
11	Seznam obrázků	44
12	Seznam tabulek a grafů.....	45
13	Seznam použité literatury.....	46

1 Úvod

β -hydroxymáselná kyselina je ketolátka, kterou organismus produkuje při nedostatečném příjmu potravy spolu s dalšími ketolátkami. BHB je nezbytným zdrojem energie pro fungování organismu. Jestliže tělo dlouhodobě hladoví, mozek a svaly nemají dostatečnou energii pro svou funkci, tak může dojít ke kolapsu organismu. Tomuto ději však brání již zmíněná β -hydroxymáselná kyselina.

Vlastnosti β – hydroxymáselné kyseliny jsou však mnohem zajímavější než jen zásobování organismu energií v případě nouze. Díky svým neuroprotektivním účinkům může být tato sloučenina využívána při léčbě nemocí jako je Alzheimerova choroba nebo Parkinsonova choroba, ale také cukrovka typu II.[1], [2]

β – hydroxymáselná kyselina se stanovuje zejména v biologických materiálech odebraných post-mortem. Důvodem je zjištění příčiny smrti jedince. Zvýšené koncentrace této kyseliny jsou důkazem ketoacidózy, což je biochemický stav v těle jedince trpícího alkoholismem, cukrovkou typu I či dlouhodobým hladověním nebo vystavením těla nízkým teplotám.

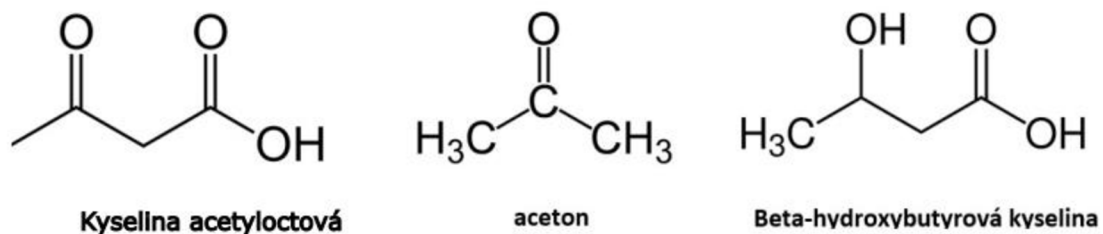
Cílem mé diplomové práce bylo vyvinout vhodný postup přípravy β -hydroxymáselné kyseliny pro její následné stanovení pomocí kapalinového chromatografu s detekcí hmotnostního spektrometru. Pro přípravu daného vzorku byla použita metoda derivatizace, pro lepší vyhodnocení analytu kyseliny β -hydroxymáselné.

2 β -hydroxymáselná kyselina

β -hydroxymáselná kyselina, taktéž známa pod názvy BHB a 3-hydroxybutyrová kyselina, je sloučenina řadící se mezi ketolátky, kam patří také kyselina acetyloctová a aceton viz Obr. 1. Dle chemické struktury můžeme řadit BHB do skupiny karboxylových kyselin. Ketolátky vznikají v játrech a vyskytují se převážně v krvi.[3]

Kyselina β -hydroxymáselná je bezbarvá látka, která je dobře rozpustná ve vodě. Dle její struktury se jedná o slabou kyselinu s hodnotou pKa 4,67. BHB stejně jako ostatní ketolátky jsou pro tělo důležitým zdrojem energie, zejména v období, kdy tělo má nízký příjem zdroje energie. Tělo během hladovění získává energii z odbourávání tuků, a tím vzniká BHB a další ketolátky. Přírodními zdroji BHB jsou látky s vysokým obsahem tuku, jako jsou například oříšky nebo avokádo.[4]

BHB je pro své neuroprotektivní účinky zkoumána v medicíně pro lékařské použití. Studie ukázaly, že BHB může mít zásadní vliv na onemocnění Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby díky svým neuroprotektivním schopnostem a mohla by sloužit k léčbě těchto onemocnění. V dalších studiích bylo prokázáno, že kyselina β -hydroxymáselná má potenciál při léčbě diabetes medius II. stupně. I přes tyto pozitivní účinky, mohou mít doplňky BHB negativní vliv na některé jedince. Mezi negativní účinky se zejména řadí zácpa, nevolnost, pokles hladiny pH krve, což vede k biochemické poruše v těle, k tzv. ketoacidóze. Proto je důležité před použitím doplňku stravy BHB navštívit lékaře a konzultovat jeho použití. BHB jako doplněk stravy se nedoporučuje těhotným nebo kojícím ženám.[1], [2]



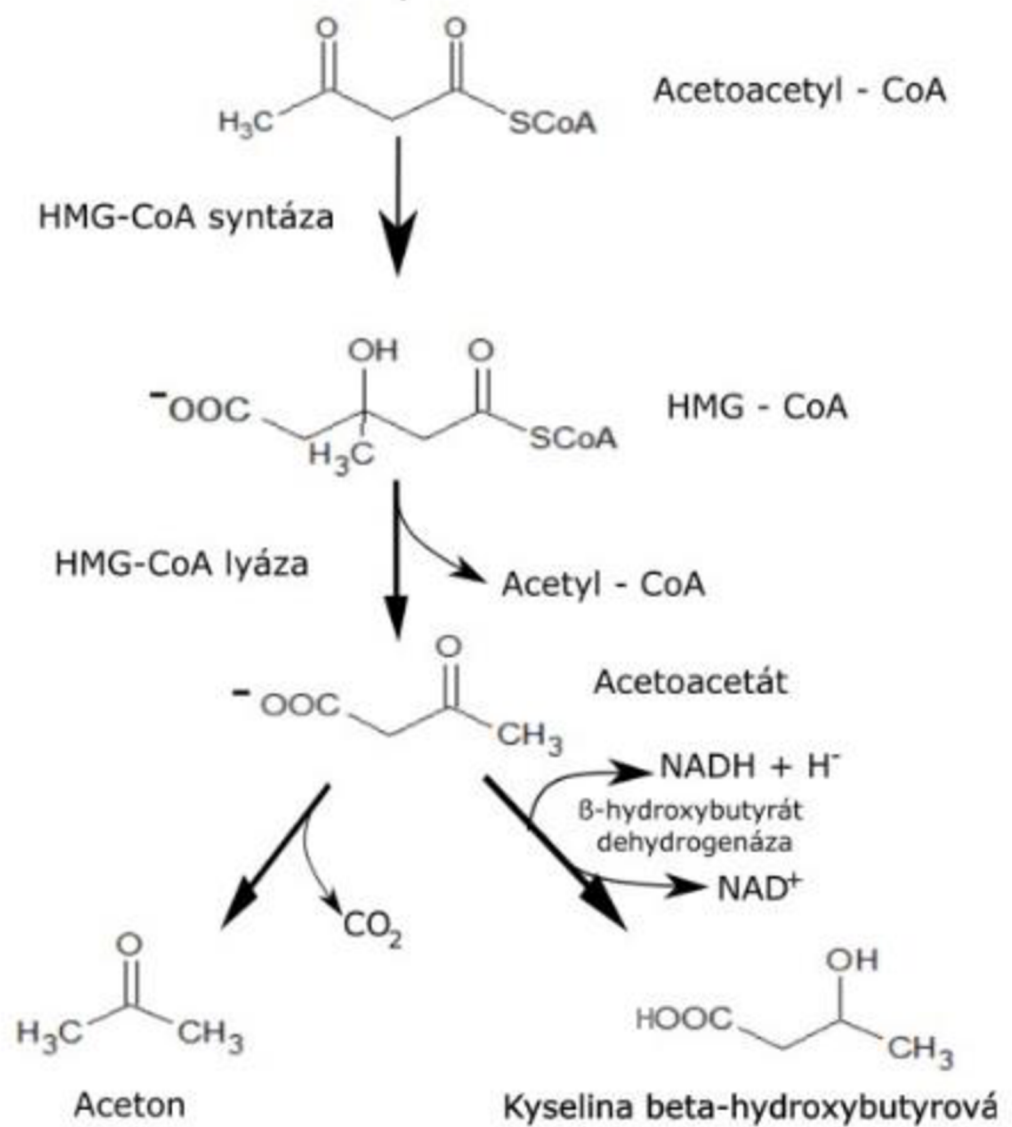
Obr. 1 Porovnání struktur kyseliny acetyloctové, acetonu a β -hydroxymáselné kyseliny

2.1 Metabolismus ketolátek

Ketolátky vznikají v mitochondrii hepatocytů procesem tzv. ketogeneze (viz Obr. 2). Tento metabolismus produkuje ketolátky při jaterní beta oxidaci mastných kyselin. Vzniklé ketolátky se používají jako náhradní zdroj energie pro organismus. Tento proces vzniká snížením, či úplným nedostatkem glukózy v těle, což může nastat například při hladovění nebo dietě.[5]

Ketolátky jsou produkovány v játrech, kde dochází ke štěpení acetylu – CoA, který nevstupuje do Krebsova cyklu. Na Obr 2 je znázorněn proces vzniku ketolátek. Vzniklé ketolátky jsou pomocí krve transportovány do míst, kde je potřeba energie, například mozek nebo svaly. Jestliže člověk trpí onemocněním způsobující ketoacidózu, tak dochází k nadměrné produkci ketolátek. Vysoké hladiny ketolátek mohou mít negativní vliv na zdravotní stav jedince.[5]

Opačný proces ketogeneze se nazývá ketolýza, kdy dochází k odbourávání ketolátek v těle. Na rozdíl od ketogeneze, ketolátky jsou přeměněny v extrahepatálních tkáních. Nejčastěji je odbouráván β -hydroxybutyrát, z něhož vznikají dva meziprodukty, konkrétně acetoacetát a acetoacetyl – CoA. Konečnou odbouranou sloučeninou je acetyl – CoA. Tento proces především slouží jako alternativní zdroj energie pro metabolismus, ale také k syntéze mastných kyselin či glukózy. [5]



Obr. 2 Ketogeneze β -hydroxymáselné kyseliny

2.2 Analýza a stanovení β -hydroxymáselné kyseliny

Pro stanovení koncentrace β -hydroxymáselné kyseliny bylo vyvinuto mnoho metod v závislosti na typu vzorku. Mezi nejčastější stanovované vzorky pro analýzu BHB patří krev, moč, sérum a sklivec. Méně častým určením koncentrace je stanovení BHB z dechu. Toto stanovení je založeno na analýze acetonu, který se zároveň uvolňuje s BHB při dýchání. Avšak tyto testy jsou považovány za méně přesné a nespolehlivé, na rozdíl od krevních testů.[6]

Nejčastější používanou metodou pro stanovení BHB je kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (LC-MS), případně se užívá plynová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (GC-MS). Existuje však řada dalších metod pro stanovení BHB, jednou z metod je fluorometrické stanovení. Toto stanovení je založeno na enzymatické přípravě BHB. Jednotlivé způsoby stanovení β -hydroxymáselné kyseliny jsou vyobrazeny v tabulce I.[7], [8]

Vědci Özkan E, Nemutlu E et al stanovili BHB pomocí plynová chromatografie s detekcí hmotnostního spektrometru. Pro stanovení BHB ve vzorcích plazmy použili metodu derivatizace. Derivatizační činidlo bylo použito MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) + 1% TMCS (trimethylchlorosilan).[9]

Taktéž vědci Elliott S, Smith C, Cassidy D (2010) použili pro stanovení BHB, ve vzorcích krve a moči, metodu GC – MS. Jako kapilární kolona byla použita Phenomenex (Macclesfield, UK) Zebron ZB-5MS capillary column, 30 m s tloušťkou filmu 0,25 mm. Postup přípravy vzorku použili derivatizace pomocí činidel TMCS a BSTFA. [10]

BHB stanovili vědci pomocí UV-VIS stanovení. Pro detekci analytu pomocí spektrofotometrického stanovení byla použita enzymatická metoda. Měření bylo založeno na barvivu WST-1 formazan. [11]

Tab. I: Přehled používaných metody pro stanovení β – hydroxymásečné kyseliny

Článek	Vzorek	Stanovení vzorku
Sørensen L, Rittig N, Holmquist E et al (2013) [7]	Krev	LC-MS/MS
Larsen T, Nielsen N (2005)[8]	Krev, mléko	Fluorometrické stanovení
Devamoglu U, Duman I et all (2021)[11]	Moč, krev	UV-VIS
Özkan E, Nemitlu E (2020)	Plazma	GC-MS
Elliott S, Smith C, Cassidy D (2010) [10]	Krev, moč	GC-MS
Yamane N, Tsuda T, Nose K et al (2006) [6]	Dech	GC

3 Ketoacidóza

Ketoacidóza je nekontrolovatelná forma ketózy, kdy dochází k nahromadění ketolátek v krvi. Jedná se o biochemický stav, který se odehrává v těle. Ke zvýšení koncentrací dochází při cvičení, dlouhodobém půstu nebo dodržování diety založené na vysokém obsahu tuku. Dalším důvodem zvýšení koncentrace ketolátek jsou patologické procesy jako je diabetes mellitus, deficit kortizolu, deficit růstového hormonu, požití vysokých dávek ethanolu nebo salicylátů, případně vzácné poruchy metabolismu. Mezi nejčastější ketoacidózy patří diabetická ketoacidóza a alkoholová ketoacidóza, která je spojena s abstinencí po dlouhodobém požívání alkoholu.[12]

Tento stav může mít vážné dopady na lidský organismus. Jedním z dopadů je poškození jater či ledvin. Mezi příznaky ketoacidózy patří nevolnost, zvracení, únava, malátnost a dehydratace. Pokud není včas vyhledána zdravotní péče a diagnostikována ketoacidóza, může to vést k selhání organismu, až ke smrti jedince.[11]

3.1 Diabetická ketoacidóza

Diabetická ketoacidóza se řadí mezi typické akutní stavy u diabetes mellitus I. typu. Tento stav způsobuje nízká hladina inzulínu v organismu a zvýšené hladiny stresových hormonů jako je kortizol, glukagon, epinefrin a růstový hormon. Následně dochází ke zvýšení koncentrace ketolátek v krvi a v moči (koncentrace ketolátek je vyšší než 5 mmol/l). Další možností vzniku diabetické ketoacidózy je onemocnění chřipkou. Tělo během nemoci spotřebovává větší množství inzulínu, než je potřeba u člověka bez onemocnění. Dle naměřených hodnot glykemie a ketolátek se uzpůsobuje potřebná dávka inzulínu. Pokud tato opatření nejsou dostatečná, je nutná hospitalizace.[13][14]

Mezi časté projevy diabetické ketoacidózy se řadí dehydratace, malátnost, poruchy zraku, acetonový zápach z úst, zvracení, bolest v oblasti břicha, poruchy vědomí až koma. Tyto projevy se mohou u pacientů objevit během několika hodin až dní. Jednotlivé příznaky závisí na závažnosti metabolické poruchy.[15]

K vyhodnocení biochemické poruchy, diabetické ketoacidózy, je třeba určit hodnoty glukózy, pH krve, obsah ketolátek v moči případně v krvi a hodnoty sérových bikarbonátů. Tyto hodnoty se stanovují pomocí laboratorních metod. Zda se jedná o diabetickou ketoacidózu, musí být splněny následující hodnoty viz tabulka II.[16]

Tab. II Minimální hodnoty pro stanovení diabetické ketoacidózy

Stanovené parametry	Minimální hodnoty
pH	7,30 a více
Sérové bikarbonáty	15 mmol/l a více
BHB	258 mg/l a více
glukóza	15 mmol/l a více

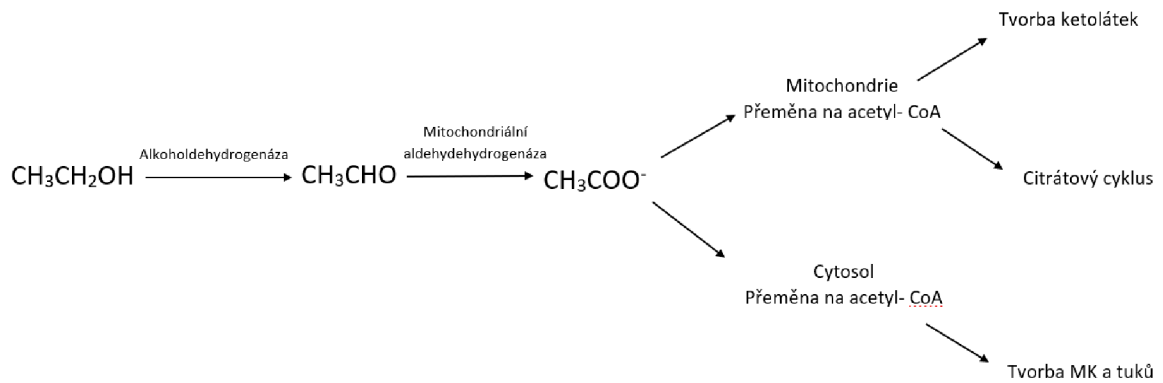
3.2 Alkoholová ketoacidóza

Druhým nejčastějším typem ketoacidózy je tzv. alkoholová ketoacidóza. Tento stav nastává u pacientů, trpící alkoholismem, kteří náhle omezili alkohol na minimální množství. Mezi příznaky této poruchy řadíme gastritidu případně hepatitidu, zvracení či dehydrataci. Po velmi náhlém omezení alkoholu mohou nastat abstinenční příznaky jako jsou pocity úzkosti, třes a slabost.[7], [17]

Rozklad ethanolu začíná přeměnou na acetaldehyd, z kterého následně je katalyticky vytvořen acetát. Tyto dva kroky ovlivňují tvorbu mitochondriální a cytosolové NADH, což je důležitým faktorem pro ketoacidózy. Vzniklý acetát může dále pokračovat v mitochondriích nebo v cytosolu za vzniku acetylu-CoA, což je znázorněno na Obr. 3. V cytosolu dochází k syntéze mastných kyselin a tuků za pomoci acetylu-CoA. V mitochondriích acetyl – CoA pomáhá ke tvorbě ketolátek.[17]

Tvorba ketolátek je podpořena vysokým poměrem NADH/NAD⁺, který vzniká při přeměně ethanolu na acetaldehyd. Zvýšený poměr NADH/NAD⁺ a snížená aktivita enzymu malátdehydrogenázy vede ke zpomalení vstupu acetylu – CoA do citrátového cyklu a k podpoře vstupu acetylu – CoA ke tvorbě ketolátek – acetoacetátu a β-hydroxybutyrátu.

Zvýšená tvorba kyseliny β -hydroxymáselné a kyseliny acetoctové vede k vzniku alkoholické ketoacidózy.[17]



Obr. 3 Vznik ketoacidózy

Stanovení alkoholové ketoacidózy se provádí nejčastěji z krve, moči nebo sklivce, případně z dalších tělních tekutin. Vyhodnocuje se zejména hladina koncentrace β -hydroxymáselné kyseliny. Dalším typem stanovením jsou jaterní testy, hlavně u pacientů s dlouhodobým příjmem alkoholu. Tito pacienti často mívají poruchy jater, kdy dochází ke zvýšení koncentrace laktátu v séru. Dalším indikátorem pro alkoholovou ketoacidózu může být ukazatel zvýšené koncentrace mastných kyselin, případně hormonů.[17]

3.3 Další typy ketoacidózy

Mezi další formy ketoacidózy řadíme ketoacidózy z podchlazení či hladovění. Ketoacidóza způsobena hladověním ve většině případů neohrožuje lidský život. Během hladovění případně při ketogenní dietě vzniká deficit glykogenu. Tento deficit následně způsobuje uvolnění volných mastných kyselin k získání energie pro naše tělo.[18]

Druhým případem ketoacidózy je vystavení těla příliš nízké teplotě kdy tělesná teplota organismu klesne pod 35°C. Vysoké riziko úmrtí na podchlazení mají starší lidi a děti, dále lidé bez domova případně lidé závislí na drogách a alkoholu.[19]

Pro určení úmrtí z podchlazení je důležité provést laboratorní testy na markery, kam patří zvýšená koncentrace β -hydroxybutyrátu, alkoholu, acetonu a další. I přes určení těchto hodnot, je velmi náročné určit příčinu smrti podchlazením, jelikož většina nálezů je nestálých, případně nejsou dostatečně specifické.[19]

4 Forenzní chemie

Forenzní chemie neboli také soudní či detektivní chemie, se řadí mezi tzv. kriminalistickou chemii, kam navíc patří forenzní chemie životního prostředí, toxikologie a kriminalistická průmyslová chemie. Tato věda zkoumá fyzikální a chemické vlastnosti pro řešení kriminalistických důkazů. Vyhotovené analýzy jsou používány při získávání důkazů pro trestnou činnost a jako prostředky pro obhajobu při soudním řízením.[20]

Forenzní chemie provádí několik typů analýz:[20]

- Určení složení neznámé látky (například léčiva, drogy)
- Určení přítomnosti škodlivých látek ohrožující zdraví
- Odhalení padělků listin, peněz, dokumentů atd
- Odhalení znehodnocujících látek pro potraviny, zemědělské produkty atd
- Identifikace inkoustu, barviv, výbušnin

Průběh forenzních analýz probíhá v několika fázích. Nejprve je třeba provést orientační testy. Díky těmto testům získáme přehled o výskytu případně absenci látek ve vzorku. Tyto analýzy zjednoduší další pokračování analýzy. Následně jsou provedeny tzv. screeningové testy, identifikace dané látky a v poslední řadě kvantitativní analýza. Kompletní analýza je zdokumentována posudkem, který je napsán nestranným forenzním znalcem. [19]

Metoda pro zpracování vzorků se vybírá podle dané látky, kterou stanovujeme, dále podle množství poskytnutého vzorku. Velmi často výběr metody záleží i na časových možnostech, vybavení laboratoře a důležitou roli hrají i finanční prostředky. Mezi instrumentální techniky se řadí kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie, infračervená spektrometrie nebo UV-VIS spektrometrie.[21]

4.1 Biologické vzorky v oblasti forenzní chemii

Ve forenzní chemii je velmi podstatný správný odběr vzorku pro analytické účely a jeho uchovávání. Samotný proces odběru vzorku probíhá v rukavicích a speciálních oděvech, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorku a jeho následnému znehodnocení.[22]

Mezi nejčastější vzorky pro forenzní analýzu patří krev (krevní sérum, plazma, plná krev), moč, sliny, sklivec nebo také chlupy, vlasy či sperma. Tato práce se zabývá analýzou vzorků krve a moči. Moč, jako typ biologického vzorku k analýze BHB, se používá především pro zvýšené hodnoty koncentrace analyzované látky BHB. [22]

Další typ biologického vzorku používaného v této práci je krev. Krev patří mezi základní tělní tekutinu v těle. Krev obsahuje červené krvinky, bílé krvinky, krevní destičky a plazmu (voda, plazmatické proteiny a anorganické soli). Krev má za úkol transport látek jako jsou nezbytné živiny pro náš organismus, kyslík, metabolity atd. Pokud vstoupí do organismu látka přes trávicí systém, skrz plíce či sliznici, po daném procesu vstupuje do krve, kde tuto látku můžeme detekovat. Analyzovaná látka může být obsažena v krvi jako daný analyt případně jako metabolit.[23]

4.2 Stanovení β -hydroxymáselné kyseliny pro forenzní účely

Studie zabývající se úmrtím související s chronickým alkoholismem ukazují, že až 15 % nahlášených úmrtí z Evropy a Severní Ameriky je zapříčiněno alkoholem. U mnoha pitev nebyl však prokázán alkohol v krvi (jedná se přibližně o 5–10 %), a tedy nebyla určena jasná příčina úmrtí. Obdobný případem jsou pacienti trpící diabetes typu I. Snížením inzulínu dojde ke zvýšené tvorbě glukózy a ta nadále není schopna transportu přes tkáň. Tento stav spolu s dalšími hormony aktivuje β -oxidaci a tím dojde k zvýšení koncentrace ketolátek v těle, což vyvolává zmíněnou ketoacidózu.[24], [25]

Markerem pro důkaz ketoacidózy je vzniklá β -hydroxymáselná kyselina. Pokud hodnoty koncentrace BHB v krvi dosahují 52 mg/l a méně, jedná se o bezvýznamné hodnoty, na rozdíl od koncentrací nad 258 mg/l, které jsou patologicky významné.[24]

Ve forenzní chemii se nejčastěji z ketolátek stanovuje aceton, který je rutinně sledován v krvi případně v moči. Jeho stanovení je prováděno pomocí plynové chromatografie. Lze očekávat, že přítomnost acetonu v krvi ve vyšších koncentracích bude naznačovat přítomnost β -hydroxymáselné kyseliny. Samotné stanovení β -hydroxymáselné kyseliny

není rutině prováděno. Měření hodnot BHB je prováděno, jestliže se jedná o podezření na ketoacidózu. Stanovení BHB je ve forenzní praxi založeno na metodě plynové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem (GC – MS).[26]

5 Instrumentace

5.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie, z anglického překladu liquid chromatography, se řadí mezi jednu z nejčastěji používaných separačních metod v praxi. Chromatografie byla objevena ruským botanikem Michaiem S. Cvětěm roku 1903. Následně v 40. letech nastává rozvoj kolonové kapalinové chromatografie, za kterou byla udělena Nobelova cena v roce 1952 dvou vědcům Synge a Martin.[27]

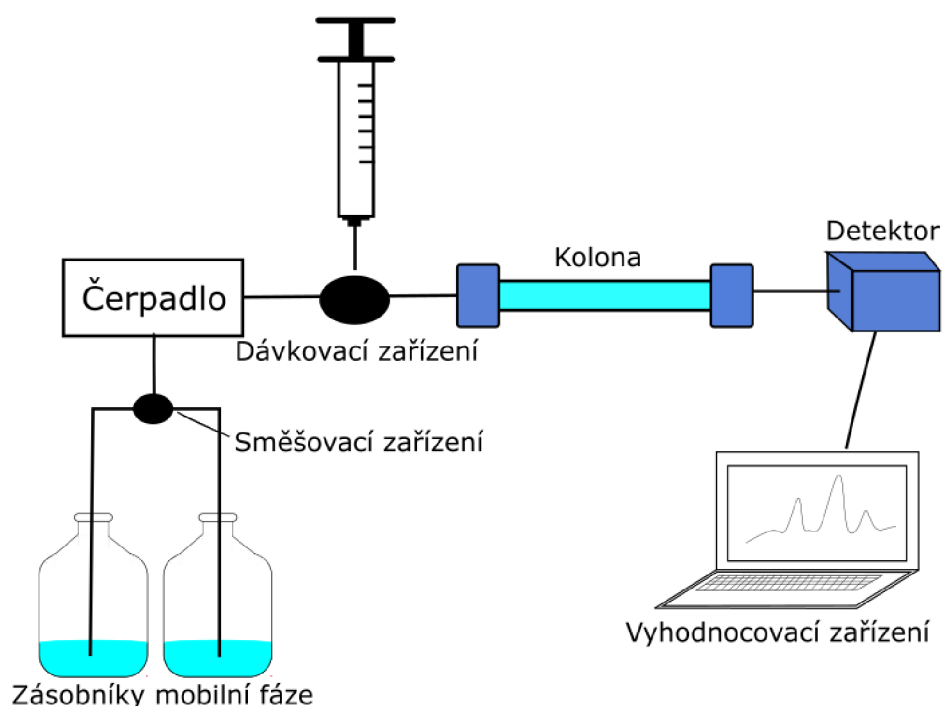
Princip kapalinové chromatografie je založen na rozdělení daného analytu mezi dvě nemísitelné fáze, na mobilní neboli pohyblivou fázi a stacionární (nepohyblivou) fázi. Složky analytu jsou unášeny mobilní fází přes stacionární fázi, kde dochází k interakcím mezi analytem a stacionární fází. Složky daného vzorku, které mají větší afinitu k stacionární fázi, budou déle zadržovány v koloně, a tedy budou mít delší retenční čas. Naopak složky s nízkou afinitou ke stacionární fázi budou vycházet z kolony dříve, tzv. budou mít kratší retenční čas. Na základě vytvořených zón analytu, můžeme rozlišit jednotlivé složky analytu a provést kvalifikaci.[27]

Mobilní fáze je tvořena převážně z kyselin nebo pufrů a organického rozpouštědla. Složení mobilní fáze během analýzy může být stálé, tedy nedochází ke změně složení, nebo se může v průběhu analýzy lišit. Pokud během analýzy nedochází ke změně mobilní fáze, jedná se o tzv. izokratickou eluci. V opačném případě, kdy se mobilní fáze v průběhu analýzy mění, se jedná o gradientovou eluci. [27]

Stacionární fáze můžeme dělit podle polaritý na polární a nepolární. Polární fáze se nejčastěji používají při separaci v systému tzv. normálních fází. Nejčastěji používaná stacionární fáze polárního charakteru je silikagel. Nepolární stacionární fáze se používá při chromatografii na tzv. reverzní fázi. Mezi nejčastější zástupce nepolárního charakteru patří silikagel, na kterém jsou navázané alkylové řetězce (C8 – oktylový řetězec, C18 – oktadecylový řetězec).[27]

5.1.1 Instrumentace v kapalinové chromatografii

Současné chromatografy se skládají z několika částí. Soustava je složena z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, kolony pro kapalinovou chromatografii, detektoru a zařízení pro vyhodnocení dat. Dále obsahuje zařízení pro odstranění plynu (bublinek) tzv. odplyňovač, termostat, zásobní láhve s mobilními fázemi a směšovací zařízení. Mezi součásti kapalinového chromatografu řadíme i ochranné filtry, předkolonky, ventily a další. Tyto součásti nejsou nezbytnou částí chromatografu. Schéma je znázorněno na Obr. 4.[28]



Obr. 4 Schéma kapalinového chromatografu

Čerpadla

Čerpadla jsou nezbytnou částí chromatografického systému. Mezi nejčastěji používaná čerpadla patří tzv. pístová čerpadla. Druhým typem čerpadel jsou pneumatická, kdy se používá jako zdroj hnací síly stlačený plyn. Úkolem čerpadel je kontinuálně přivádět mobilní fázi do chromatografického systému a udržovat bezpulzní chod, čímž dochází k výraznému snížení šumu během analýzy.[28]

Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení má za úkol přesně nadávkovat vzorek pro analýzu. Dávkovací zařízení dělíme na dávkovací zařízení s dávkovacím ventilem, přímým nástřikem injekční stříkačkou a na automatické dávkovače. V dnešní době jsou nejčastěji používány automatické dávkovače, jelikož odeberou přesný objem vzorku a není potřeba obsluhy při analýze několika vzorků jdoucí po sobě.[29]

Kolona

K separačnímu procesu během analýzy dochází v koloně. Kolona je tvořena z inertního materiálu jako je nerez, ocel, polymer případně méně často používaný materiál sklo. Náplň kolony bývá stacionární fáze s částicemi o různých velikostech. Velikost částic bývá 3-10 μm . Nejběžnější velikost kolony je 25 cm s vnitřním průměrem je 2,1mm -5,0 mm. Z kolony je přiváděn eluát přímo na detektor.[30]

Detektor

Předposlední částí systému kapalinové chromatografie je detektor. Na detektor je přiváděn separovaný vzorek z kolony. Velmi častým používaným detektorem v praxi je spektrofotometrický detektor UV – VIS. Tento detektor měří absorpenci separovaného vzorku, který je přiváděn z kolony. Nevýhodou tohoto spektrometru je, že měří pouze při jedné vlnové délce.[31]

V současné době je nejvíce rozšířeno spojení kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru. Tato detekce je výhodná pro kvantitativní i kvalitativní analýzu. O hmotnostním detektoru je následně psáno v kapitole 5.2 Hmotnostní spektrometrie.[31]

5.1.2 HPLC

Nedostatečné rozlišení a celková doba analýzy podpořila vývoj vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Tato metoda vznikla v 70. letech 20. století pod názvem vysokotlaká kapalinová chromatografie. HPLC byla postupně vyvíjena, což bylo následně důvodem k přejmenování na nynější název vysokoúčinná kapalinová chromatografie.[29]

Záměrem pro vývoj této metody bylo získat lepší účinnost, rozlišení ale i citlivost pro jednotlivé analýzy, za co nejkratší čas. Tato zlepšení byla prováděna na základě zmenšování částic sorbentu ve stacionární fázi. Výplň stacionární fáze je složena z tvarově pravidelných částic o velikost 3-15 μm . Tyto částice pak vytváří stejnorodou vrstvu stacionární fáze.

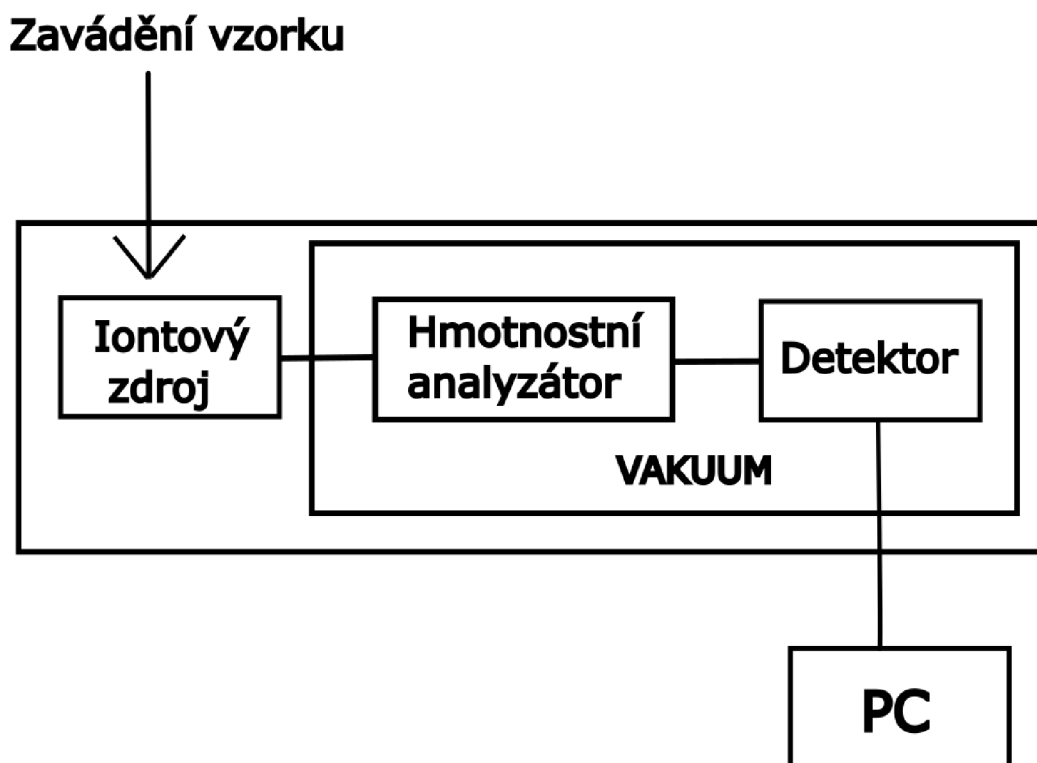
Nevýhodou zmenšování částic je zvýšení tlaku, což značně ovlivňuje použití jednotlivých dílů daného přístroje.[30], [32].

V dnešní době existuje i tzv. UHPLC neboli ultra vysokotlaká kapalinová chromatografie. Částice pro výplň stacionární fáze jsou ve velikosti menší než 2 μm . Dalšími parametry jsou vyšší pracovní tlaky než u HPLC, dávkování velmi malých objemů a s těmito parametry souvisí zlepšení selektivity metody, vyšší rozlišovací schopnost, nižší rozmývání píků, lepší citlivost metody.[30]

5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS – mass spectrometry) je destruktivní metoda založena na identifikaci atomů, molekul a jejich fragmentů v iontové podobě na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Využití MS je velice rozšířeno, ať už v oblasti rozboru potravin, půdy a hornin nebo pro forenzní účely. Toto využití je dáno především vysokou citlivostí a rychlostí dané analýzy, kdy zjistíme kvantitativní i kvalitativní soubor dat o stanovovaném analytu. [33]

Princip hmotnostní spektrometrie je založen na třech krocích: na tvorbě iontů, separaci a následném zaznamenání iontů. Ionty jsou tvořeny v iontovém zdroji, kde dochází k ionizaci. Následně jsou ionty rozděleny v hmotnostním analyzátoru podle hodnot m/z . Takto rozdělené ionty putují do detektoru, kde jsou snímány. Výsledkem celého procesu je hmotnostní spektrum. Schéma hmotnostního spektrometru je zobrazeno na Obr. 5. [34]



Obr. 5 Schéma hmotnostního spektrometru

5.2.1 Iontové zdroje

V iontovém zdroji dochází k nezbytnému kroku pro hmotnostní spektrometrii k tzv. ionizaci. Během ionizace dochází ke tvorbě iontů v plynném stavu. Ionty, které vznikají, mohou být kladně či záporně nabitě (M^+ , M^- , případně $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ atd.). Tyto ionty jsou dále separovány a detekovány. Iontové zdroje můžeme dělit na dvě skupiny podle energie, kterou přidána analytu. První skupinou jsou „tvrdé“ iontové zdroje, kde energie je natolik vysoká, aby způsobila odštěpení fragmentu z iontu. Druhou skupinu tvoří „měkké“ ionizační zdroje. Použitá energie při ionizaci není příliš vysoká, a tedy pravděpodobnost vzniků fragmentů je také menší. Volba vhodného iontového zdroje závisí na molární hmotnosti a polaritě stanovovaného analytu. Tyto dva parametry ovlivňují výběr vhodné ionizační techniky viz Obr. 6.[35]

Tvrde ionizační zdroje:

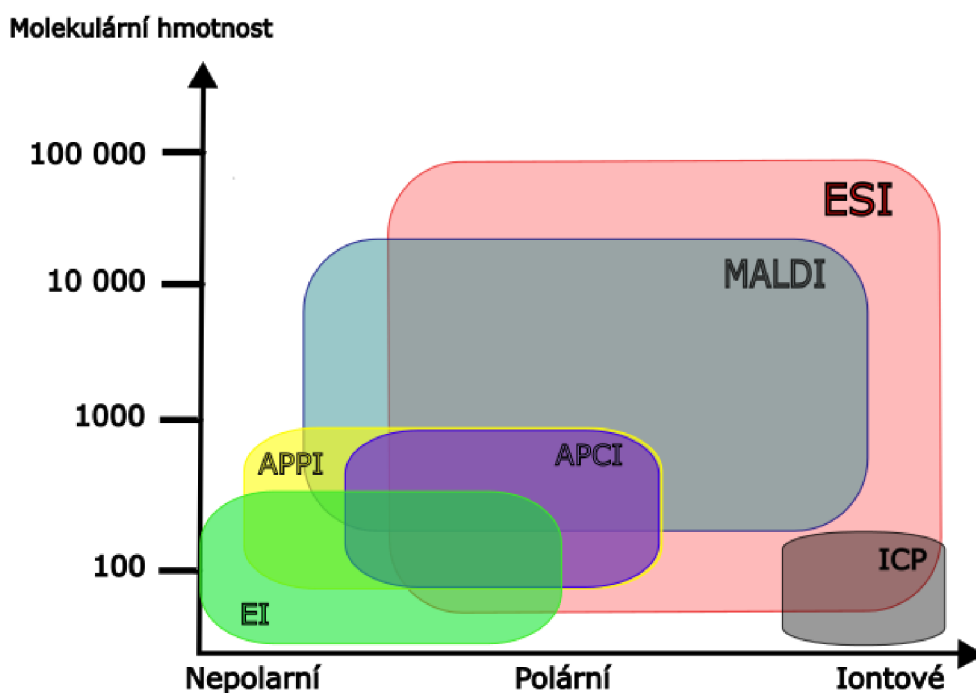
- Ionizaci elektronem (EI)
- Ionizace s indukčně vázaným plazmatem (ICP)

Měkké ionizační zdroje:

- Chemická ionizace (CI)
- Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)
- Fast atom bombardment (FAB)
- Desorpce polem (FD)

Tyto měkké ionizační zdroje pracují za vakua, avšak existují i další typy zdrojů, které nemusí být umístěny ve vakuu, ale pracují za atmosférického tlaku. Mezi tyto ionizační zdroje řadíme

- Ionizace elektrosprejem (ESI)
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)[33]



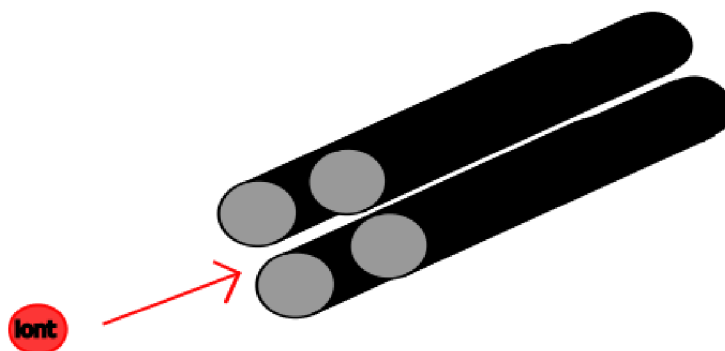
Obr. 6 Porovnání iontových zdrojů v závislosti na molekulární hmotnosti a polaritě

5.2.2 Hmotnostní analyzátoři

Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou fokusovány a vedeny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich separaci na základě odlišné hodnotě m/z . Tato separace je ovlivněna pomocí magnetického a elektrického pole tak, aby byly detekovány jen ionty o určité hodnotě m/z . Mezi hmotnostní analyzátoři řadíme kvadrupólový analyzátor, iontovou past, analyzátor doby letu, orbitální past neboli tzv. orbitrap.[36]

Kvadrupólový analyzátor

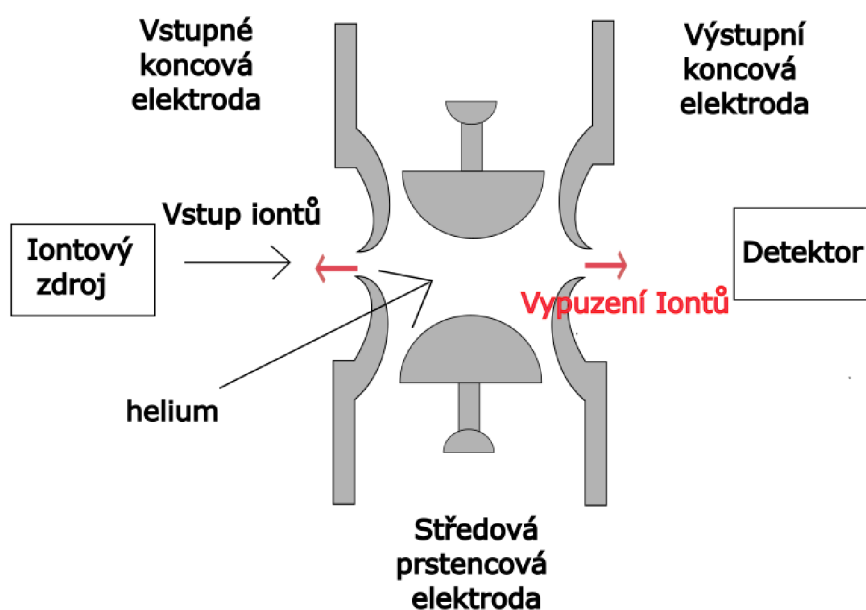
Kvadrupólový analyzátor je tvořen ze čtyř tyčových elektrod, které jsou k sobě rovnoběžné. Na elektrody je vkládáno stejnosměrné a střídavé napětí. Ionty jsou vedeny mezi elektrody. Na ionty začne působit střídavé pole, což má vliv na pohyb iontů. Průchod iontů o určité hmotnosti m/z k detektoru je pak určen pomocí zvoleného poměru mezi stejnosměrným a střídavým napětím. Postupnou změnou daného poměru projdou veškeré ionty separovány na základě poměru hmotnosti a náboje. Schéma kvadrupólového analyzátoru je znázorněno na Obr. 7.[37]



Obr. 7 Schéma kvadrupólového analyzátoru

Iontová past

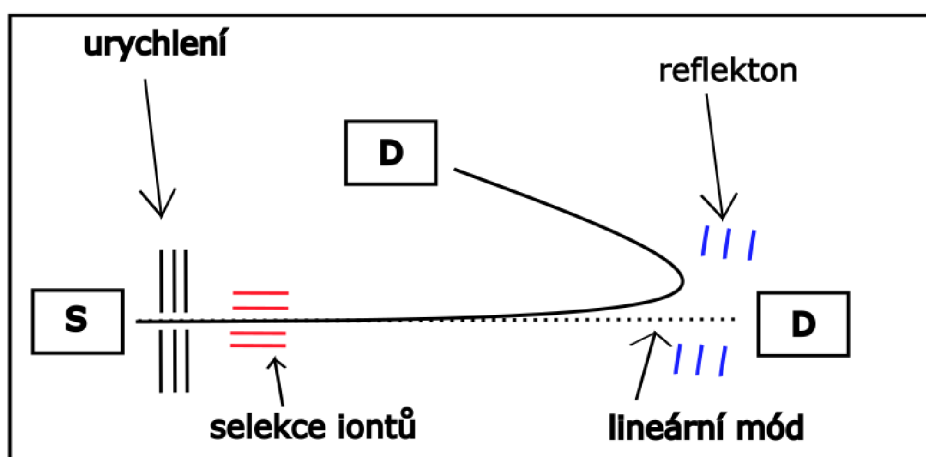
Iontová past je analyzátor, který se skládá ze tří elektrod, z prstencové středové elektrody, vstupní elektrody a výstupní elektrody viz Obr. 8. V prostoru mezi elektrodami dochází k fokusaci iontů, které se pohybují po stálé trajektorii. Pokud dojde ke změně amplitudy vysokofrekvenčního napětí, dojde ke změně pohybu iontů a ty jsou následně fokusovány do detektoru. Díky tomuto principu může být prováděno fragmentován látky, a to několikrát po sobě.[38]



Obr. 8 Schéma iontové pasti

Analyzátor doby letu

Princip analyzátoru doby letu je založen na měření času iontů a dané hodnotě m/z pro zdolání dané dráhy o určité délce. Ionty, které vstoupí do analyzátoru, jsou urychleny pomocí napěťového laseru a postupují do letové trubice (oblast bez pole). Ionty o různé hodnotě m/z mají i různou rychlost. Podle určité rychlosti (závisí na poměru m/z) jsou pak detekovány v různém čase. Čím menší bude hodnota m/z , tím rychleji se bude iont pohybovat. Schéma analyzátoru doby letu je vyobrazeno na Obr. 9[34]



Obr. 9 Schéma analyzátoru doby letu

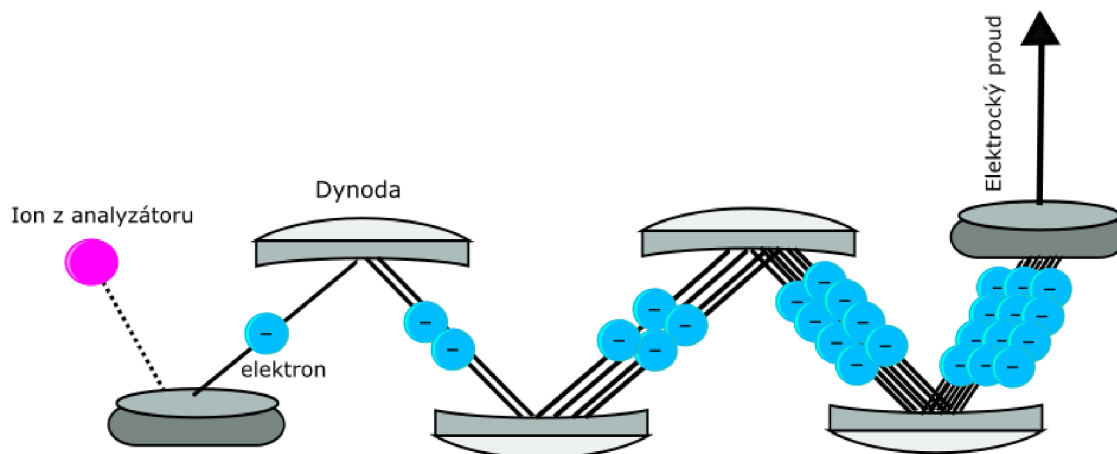
Existuje velká řada analyzátorů pro hmotnostní spektrometrii. Mezi ně patří magnetický sektorový analyzátor. Principem separace je působení magnetického pole na pohyb iontů po kruhové dráze o daném poloměru. [39]

5.2.3 Detektory

Poslední částí hmotnostního spektrometru jsou detektory. Ionty separované v analyzátoru jsou následně fokusovány do detektoru, kde dochází k jejich snímání a vyhodnocování. Dalším krokem je zpracování signálu a konečným výstupem je hmotnostní spektrum.

Mezi nejstarší detektory je řazena tzv. fotografická deska. Princip tohoto detektoru spočívá ve ztmavení místa, kam dopadl iont z analyzátoru. Tato metoda je již však zastaralá a v dnešní době se nepoužívá. Obdobou tohoto detektoru je Faradayův pohár. Faradayův pohár je složen z elektrody, na kterou dopadají ionty. Při dopadu iontů dojde k uvolnění elektronů, které následně putují k anodě. Při tomto procesu vzniká elektrický proud, který je následně snímán a vyhodnocován. [27]

Nejčastěji používané detektory jsou založeny na principu elektronových násobičů. Jejich konstrukce je tvořena několika dynodami. Tyto dynody způsobují zvýšení signálu až 10^8 krát. Ionty dopadají z analyzátoru na dynodu, kde dochází k vyražení elektronů. Vyražené elektrony dopadají na další dynody, kde dojde k opětovnému vyražení dalších elektronů. Takto vzniklé elektrony postupují až k anodě. Vzniklý signál je následně vyhodnocován. Princip elektronového násobiče je znázorněn na Obr. 10. [27]



Obr. 10 Princip elektronového násobiče

5.3 Spojení LC/MS

Spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií se řadí mezi velmi spolehlivou metodu pro identifikaci analyzovaných látek. Díky tomuto spojení lze analyzovat látky, které jsou tepelně stabilní a vysoce polární. Takové látky je velmi obtížné stanovit jinými technikami jako je plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.[40]

Zapojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je v dnešní době jedním z nejpoužívanějších spojení dvou metod i přesto, že zpočátku toto spojení se zdálo být velmi nevhodné. Důvodem bylo, že pro analýzu v hmotnostní spektrometrii je potřeba vzorek v plynné fázi, narozdíl od kapalinové chromatografie, kde se používají sloučeniny, které jsou tepelně stabilní (netěkavé). Dalším problémem pro zapojení LC-MS byly rozdílné průtoky. Tento problém byl vyřešen pomocí děliče toku.[40]

5.3.1 Spojení LC – MS/MS

Spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií nám umožňuje fragmentaci stanovené látky a její strukturní identifikaci, čímž se stává výsledek přesnější. Měření pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie je založeno na třech částech. První částí je samotná izolace iontového prekurzoru. Druhým krokem je vznik fragmentů a posledním krokem je samotná analýza vzniklých fragmentů.[40]

Vznik fragmentů je uskutečněn pomocí reakce iontu s nabitými částicemi, případně srážkou s neutrálním plynem. Jiný způsob pro fragmentaci je ozáření iontu elektromagnetickým zářením, kdy je důležité správně nastavit vlnovou délku daného záření.[40]

V praxi se nejčastěji využívá tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS také značeno jako MS². Lze provádět i několik hmotnostních analýz. Značení pro tři a více stupňů fragmentací je pak následně značeno jako MSⁿ, kdy *n* znamená, kolik bylo použito na danou analýzu tandemových stupňů. [41]

6 Validace

Validace je založena na několika komponentech, podle kterých lze posoudit, zda daná metoda je vhodná k používání v praxi či nikoliv. Validace je realizována pro zavedení nové metody při stanovení analytu v praxi, při použití metody převzaté z jiné laboratoře nebo je provedena na základě validačního plánu. Jedná se o nezbytný krok pro splnění správné výrobní praxe (SVP) nebo laboratorních předpisů jako je ISO 17025 a ISO 15189. Kontrola pro správné provedení z praxe je složena z údajů naměřených v laboratoři a z údajů poskytnuty výrobcem. [42]

Důvodem pro validaci je zajištění dostatečné kvality, což je povinností analytického chemika. Dalším důvodem je, aby změřená hodnota vypovídala reálné hodnotě. Na základě špatných hodnot může analytik špatně vyhodnotit daný problém a tím například ovlivnit zdraví pacienta nebo špatně určit příčinu smrti, což by mělo velmi negativní vliv v praxi.[42]

Validace se skládá z validačních parametrů. Mezi tyto parametry řadíme pravdivost (dříve správnost), přesnost, citlivost nebo nejistotu měření a další. Všechny tyto parametry nám dále vypovídají informace, zda daná metoda umožňuje dodržet stanovené požadavky.[43]

6.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je parametr validace, který udává nejnížší možnou hodnotu pro daný analyt, kterou lze detekovat. V praxi se za hodnotu LOD považuje signál, který lze jednoznačně odlišit od šumu. Na rozdíl od LOD mez stanovitelnosti (LOQ) udává nejnížší možnou koncentraci analytu, kterou lze kvantifikovat. Obě hodnoty, jak LOD, tak i LOQ, lze vypočítat z následujících rovnic (1) a (2)[44]

$$LOD = \frac{3 * s}{k} \quad (1)$$

$$LOD = \frac{10 * s}{k} \quad (2)$$

Značení písmenem „s“ v rovnici znamená směrodatnou odchylku, která je získána z opakovaného měření slepých pokusů. Značení „k“ v rovnici znamená směrnici kalibrační přímky.

6.2 Linearita

Linearita je parametr validace, který udává lineární závislost mezi dvěma a více naměřenými hodnotami. Naměřené hodnoty jsou měřeny z blanku a kalibračních roztoků o dané koncentraci. Změřené hodnoty se následně vyjadřují v závislosti na koncentraci daných roztoků. Rozsah odezvy, přímo úměrné určité hodnotě koncentrace, je označen jako lineární interval. Linearita je charakterizována korelační koeficientem R^2 , který charakterizuje těsnost závislosti mezi dvěma náhodnými proměnnými. Lineární závislost je vyobrazena pomocí grafu lineární závislosti a matematického vztahu, který je vyjádřen jako $y = a + bx$. Kde „a“ znázorňuje posunutí a „b“ udává směrnici kalibrační přímky.[45]

6.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost je parametr validace, který je definován jako těsnost shody mezi nezávislými výsledky získané během měření. Hodnoty pro stanovení opakovatelnosti jsou získány měřeními v průběhu jednoho dne. Během měření nesmí dojít ke změně nastavení metody, měřicího systému nebo personálu.[44]

7 Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- vyvinout metodu pro derivatizaci BHB, její chromatografickou separaci a hmotnostně spektrometrickou detekci
- aplikovat vyvinutou metodu na modelové vzorky biologického materiálu (krev, moč) a ověřit její použitelnost pro analýzu reálných vzorků ve forenzní praxi

8 Experimentální část

8.1 Použité chemikálie

- Pyridin: $\geq 99,9$ % (w/w), SIGMA – ALDRICH
- 3-hydroxybutyrová kyselina: 95 % (w/w), SIGMA-ALDRICH
- Anhydrid kyseliny 2-methyl-6-nitrobenzoové: $>98,08$ % (w/w), SIGMA – ALDRICH
- 2 – pyridinmethanol: 98 % (w/w), SIGMA – ALDRICH
- 4 – (Dimethylamino)pyridin: ≥ 98 % (w/w), SIGMA – ALDRICH
- Deionizovaná voda (Water HPLC, LAB – SCAN, Batch No: 2012-2256)
- Acetonitril: % (w/w), VWR chemicals
- Kyselina mravenčí: 89 % (w/w), Penta s.r.o.
- Značený standard 3-hydroxybutyrové kyseliny – d4

8.2 Biologické vzorky

Pro stanovení BHB byly použity biologické vzorky krve a moči. Tyto vzorky byly odebrány z vlastní krve v odběrovém centru a následně použity pro analýzu.

8.3 Použité přístroje

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000, Thermo Scientific
- Hmotnostní spektrometr LTQ XL, Thermo Scientific
- Mini třepačka TTS 2 Basic, Yellow Line
- Centrifuga Mikro 120, Hettich Zentrifugen
- Digitální suchý ohřivač
- Čistička Ultrazvuková Elmasonic-S, MERCI s.r.o.
- Digitální váha Sartorius
- Kolona F5 (pentafluorofenyl) 100 x 2,1mm, velikost částic 1,7 μm , Phenomenex

8.4 Postup pro přípravu kalibračních roztoků a modelových vzorků

Příprava kalibračních vzorků a reálných vzorků byla převzata a upravena podle článku Miyazaki T et al (2015)[46]. Dle článku byl použitý postup pomocí derivatizace pro stanovení β -hydroxymáselné kyseliny. Tento postup byl následně pro potřeby této analýzy patřičně upraven.

8.4.1 Příprava kalibračních vzorků

Ze standardního roztoku BHB bylo odebráno patřičné množství vzorku pro přípravu kalibračních roztoků o koncentraci 3,6 $\mu\text{g/ml}$, 11,2 $\mu\text{g/ml}$; 36,6 $\mu\text{g/ml}$; 112,0 $\mu\text{g/ml}$; 336,0 $\mu\text{g/ml}$ a 1120,0 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace kalibračních vzorků byly vybrány na základě rozmezí analyzovaných modelových vzorků. Tyto koncentrace byly naředěny pomocí roztoku acetonitrilu s vodou v poměru 1:1.

K 50 μl vzorku (přípraveného standardu o dané koncentraci) bylo přidáno 20 μl značeného standardu d_4 -BHB o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a 80 μl vody. Takto připravená směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu. Následně bylo ze vzorku odebráno 100 μl . Ke 100 μl vzorku byl přidán acetonitril o objemu 200 μl . Vzorek byl následně promíchán pomocí vortexu po dobu 1 minuty.

Po důkladném promíchání bylo odebráno 50 μl vzorku, který se následně odpařil do sucha pomocí proudu dusíku. K odparku bylo přidáno 45 μl čerstvě připravené derivatizační směsi. Takto připravený vzorek se nechal reagovat 10 minut při laboratorní teplotě. Po 10 minutách bylo k vzorku přidáno 50 μl 2-pyridinmethanolu. Vzorek obsahující derivatizační směs a 2-pyridinmethanol byl nechán 30 minut reagovat při laboratorní teplotě. Po uplynutí 30 minut byl vzorek 20x zředěn (v poměru 1:19; vzorek: ředící roztok) na celkový objem 200 μl . Jako ředící směs byl použitý acetonitril a voda v poměru 1:9.

8.4.2 Příprava derivatizační směsi

Do plastové zkumavky (ependrofy) o objemu 1,5 ml bylo naváženo 67 mg anhydridu kyseliny 2-methyl-6-nitrobenzoové, 20 mg 4 – (dimethylamino)pyridinu a 900 μl pyridinu. Takto připravená směs byla důkladně protřepána. Derivatizační směs bylo potřeba připravit vždy v den, kdy byly připravovány vzorky a následně proběhla analýza vzorků.

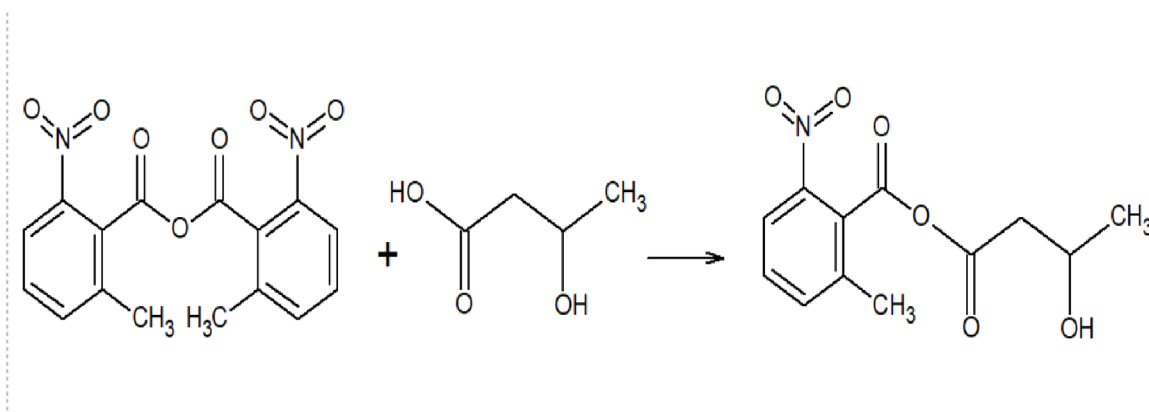
8.4.3 Derivatizace analyzovaného vzorku

Celkem bylo analyzováno 5 modelových vzorků, čtyři vzorky krve a jeden vzorek moči. Vzorek číslo 5 byla vlastní krev odebrána v odběrovém centru, vzorky číslo 1-4 byly naspikovány analytem BHB pro potřeby stanovení.

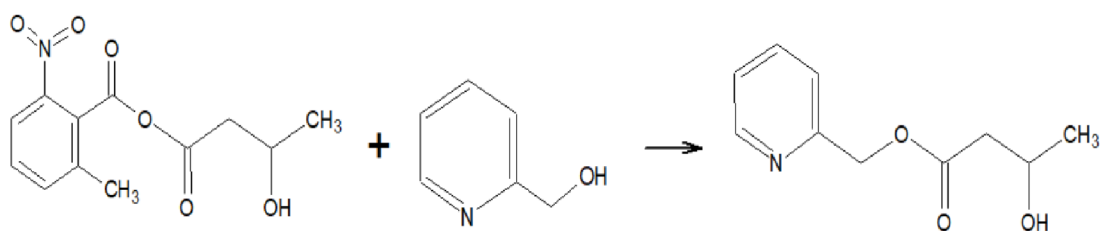
K 50 μl vzorku (připraveného standardu o dané koncentraci) bylo přidáno 20 μl značeného standardu $\text{d}_4\text{-BHB}$ o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a 80 μl vody. Takto připravena směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu. Následně bylo ze vzorku odebráno 100 μl . Ke 100 μl vzorku byl přidán acetonitril o objemu 200 μl . Vzorek byl následně promíchán pomocí vortexu po dobu 1 minuty.

Následně bylo ze vzorku odebráno 100 μl . Ke 100 μl vzorku byl přidán acetonitril o objemu 200 μl . Vzorek byl následně promíchán pomocí vortexu po dobu 1 minuty a poté vložen do centrifugy po dobu 3 minut při otáčkách 140xg. Po 3 minutách byla ke vzorku přidána derivatizační směs (složení derivatizační směsi viz. příprava derivatizační směsi) a postupovalo se jako v přípravě kalibračních vzorků (viz příprava kalibračních vzorků).

Stanovení analytu BHB v reálných vzorcích bylo provedeno pomocí derivatizační metody, dle postupu v kapitole 6.4. Tato metoda se skládala ze dvou fází. V první fázi docházelo k reakci β -hydroxymásečné kyseliny s anhydridem kyseliny 2-methyl-6-nitrobenzoové viz Obr 11. V druhé fázi docházelo k reakci sloučeniny vzniklé v prvním kroku s 2-pyridinmethanolem viz Obr.12.



Obr. 11 Reakce kyseliny β -hydroxymásečné s anhydridem kyseliny 2-methyl-6-nitrobenzoové



Obr. 12 Vznik analyzované látky po derivatizaci

8.5 Stanovení β -hydroxymásečné kyseliny pomocí metody LC/MS

Pro stanovení analytu BHB byl použit kapalinový chromatograf s detekcí pomocí hmotnostního analyzátoru. Pro tohle stanovení BHB byl použit kapalinový chromatograf Thermo Scientific Ultimate 300. Hmotnostní detektor byl použitý Thermo Scientific LTQ XL. Veškeré výsledky byly analyzovány pomocí programu Xcalibur a excelu.

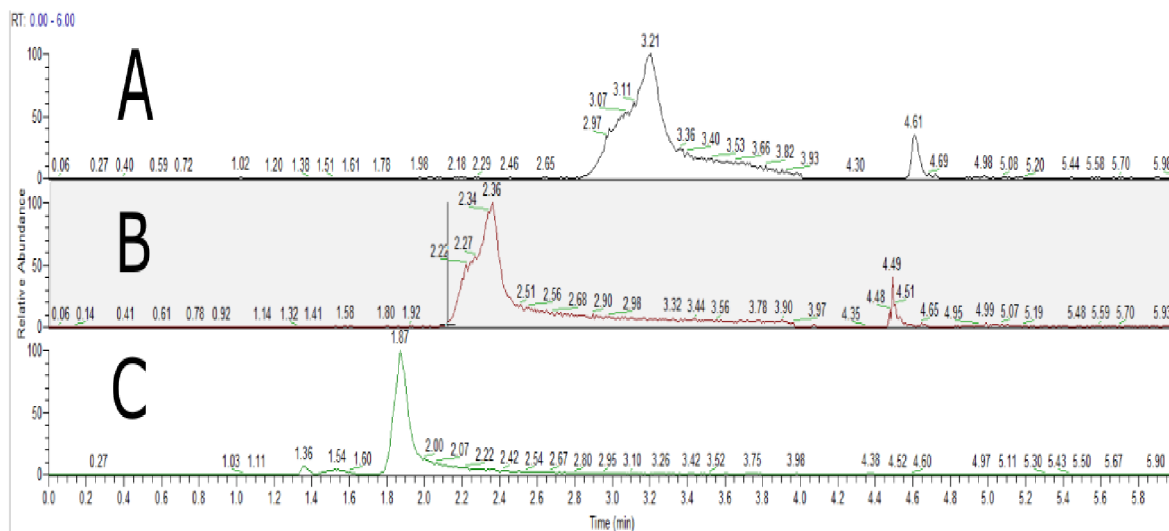
Pro stanovení BHB byla použita kolona Kinetex® F5 o rozměrech 100 x 2,1 mm, velikost částic byl 1,7 μ m. Kolona byla po celou dobu analýzy vyhřívána na 40°C. Objem nástřiku na kolonu byl nastaven na 5 μ l.

8.5.1 Složení mobilní fáze

Složení mobilní fáze bylo vybráno na základě několika měření stejného vzorku s různou mobilní fází A. Byly porovnány jednotlivé složení mobilní fáze a na základě analýz stejného vzorku s odlišným složením mobilní fáze A byla vybrána: 2% acetonitril, 1% kyselina mravenčí a voda. Složení mobilní fáze B bylo tvořeno acetonitrem a 0,1% kyselinou mravenčí. Při složení této mobilní fáze došlo ke zlepšení tvaru píku a zvýšení intenzity. Složení mobilní fáze lze vidět v tabulce III a na Obr.13.

Tab. III Optimalizace složení mobilní fáze

	Složení mobilní fáze A	Složení mobilní fáze B
A	2% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí a voda	acetonitrilem a 0,1% kyselinou mravenčí
B	2% acetonitril, 0,5% kyselina mravenčí a voda	acetonitrilem a 0,1% kyselinou mravenčí
C	2% acetonitril, 1% kyselina mravenčí a voda	acetonitrilem a 0,1% kyselinou mravenčí



Obr. 13 Optimalizace složení mobilní fáze

Pro lepší separaci analytu byla použita během analýzy gradientová eluce, její složení a průběh můžete vidět v tabulce IV. Po celou dobu analýzy byl nastaven průtok mobilní fáze na 0,4 ml/min. Celkový čas analýza činil celkem 6 minut.

Tab. IV Složení mobilní fázi během analýzy

Minuty	Složení A [%]	Složení B [%]
0	100	0
1,5	100	0
4	0	100
5	100	0
6	100	0

8.6 Parametry nastavení hmotnostní analyzátoru

β -hydroxymáselná kyselina byla analyzována pomocí zvolených parametrů pro nastavení hmotnostního spektrometru viz tabulka V. Veškeré nastavené parametry byly po celou dobu analýzy neměnné.

Tab. V Parametry nastavení hmotnostního spektrometru

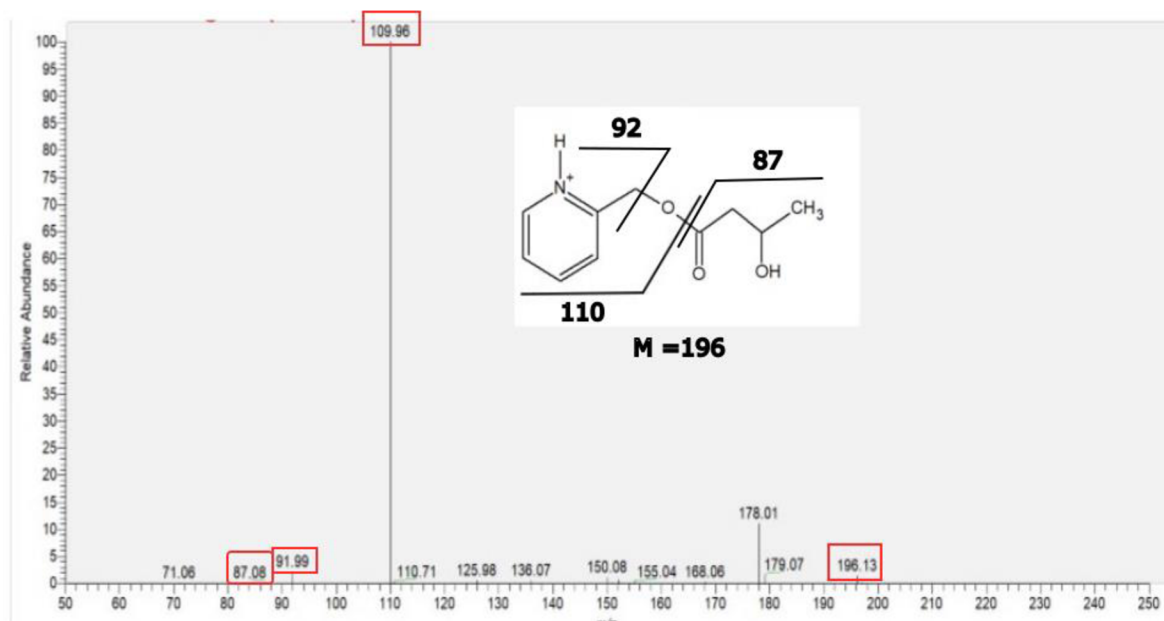
Průtok zamlžujícího plynu	60 arb
Průtok pomocného plynu	5 arb
Průtok sweep plynu	0 arb
Spray Voltage	5 kV
Teplota kapiláry	250 °C
Napětí v kapiláře	10 V
Tube lens	120 V
Ionizační mód	pozitivní

9 Výsledky a Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout vhodný postup přípravy vzorků a optimální nastavení metody pro analýzu biologických vzorků pro stanovení BHB pomocí metody LC/MS.

9.1 Fragmentační spektrum standardu

Ve spektru lze sledovat kladně nabitou molekulu standardu BHB, jejíž hodnota m/z je 196 Da. Tato molekula byla následně fragmentována, a tedy lze ve spektru vidět převážně její fragment m/z 110 Da. Tento fragment měl dostatečnou intenzitu pro následné použití při vyhodnocování koncentrace BHB v reálných vzorcích. Další možné vzniklé fragmenty mohou být m/z 92 Da a m/z 87 Da. Fragmenty iontu m/z 196 Da jsou zobrazeny na Obr. 14.



Obr. 14: Fragmentační spektrum MS/MS pro kladně nabitý iont 196

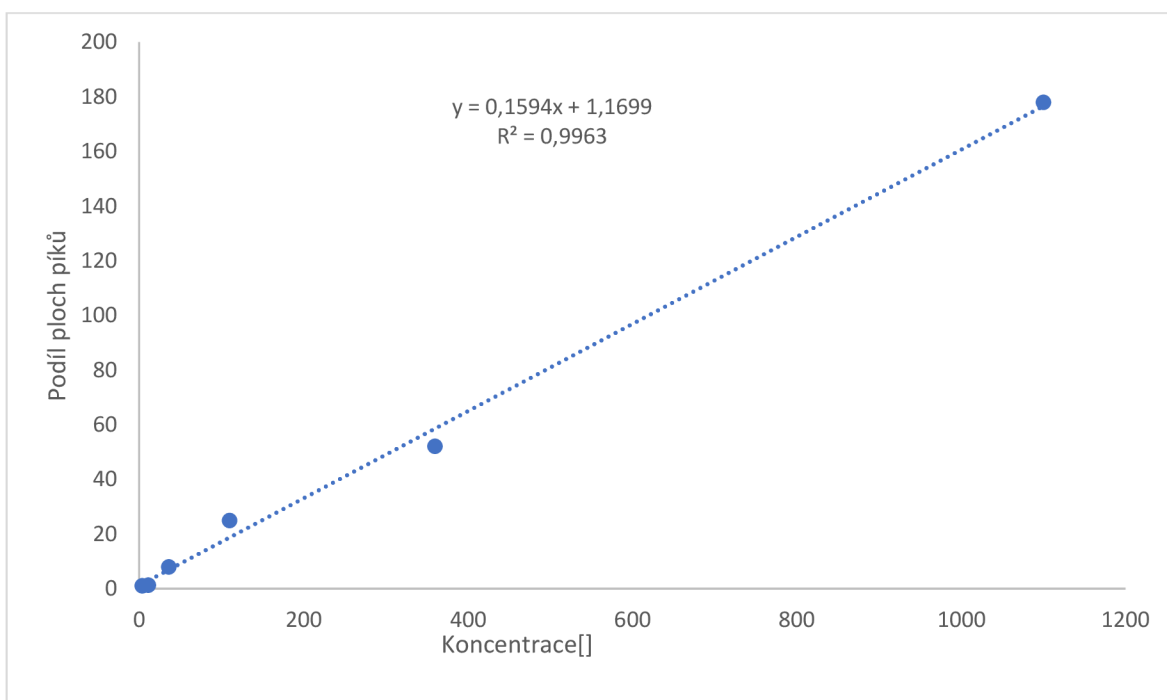
9.2 Kalibrace

Pro stanovení kalibrační závislosti bylo proměřeno šest vzorků neznačeného standardu BHB o koncentraci 3,6 $\mu\text{g/ml}$, 11,0 $\mu\text{g/ml}$; 36,0 $\mu\text{g/ml}$; 110,0 $\mu\text{g/ml}$; 360,0 $\mu\text{g/ml}$ a 1100,0 $\mu\text{g/ml}$. Ke každému vzorku byl přidán izotopicky značený standard d_4 -BHB. Z naměřených poměrů ploch pík produkovaných iontů m/z 110 Da byla vytvořena kalibrační závislost, plochy pík jsou vyjádřeny v Tab. VI. V grafu 1 je zobrazena kalibrační závislost podílu ploch pík

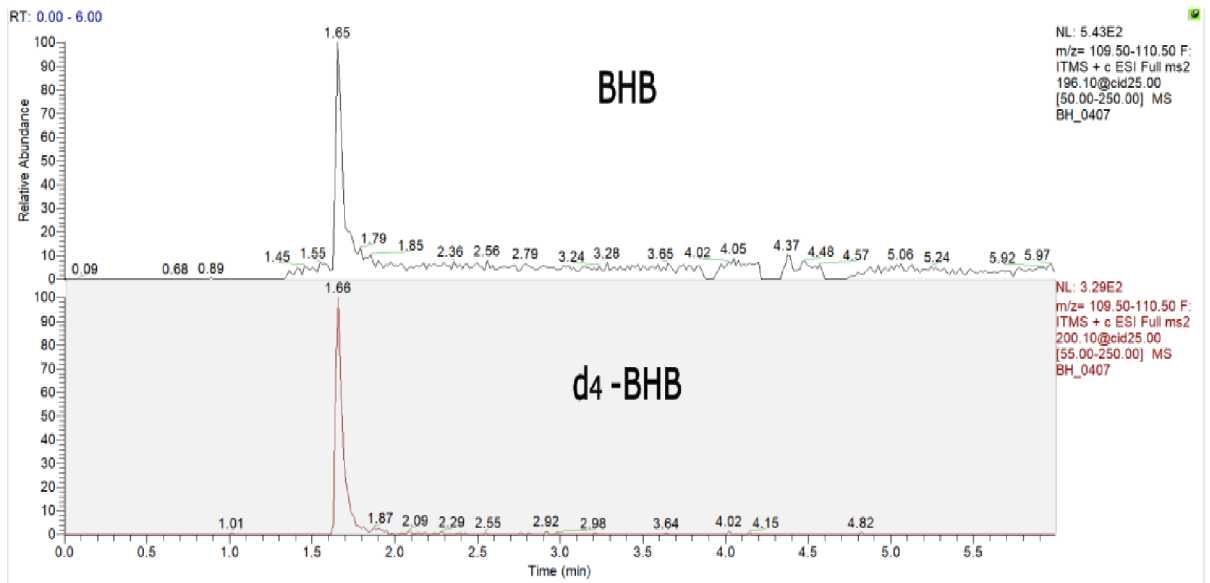
neznačeného standardu vs značeného standardu. Na Obr 15 a 16 jsou vyobrazeny chromatogramy kalibračních roztoků o koncentraci 11,0 µg/ml a 1100,0 µg/ml. Ve vrchní části obrázku je chromatografický záznam iontu m/z 110 Da získaný pomocí MS/MS prekurzorového iontu m/z 196 Da. Ve spodní části Obr 15 a 16 je chromatografický záznam iontu m/z 110 Da získaný pomocí MS/MS prekurzorového iontu m/z 200 Da.

Tab. VI Hodnoty koncentrace standardu BHB, plochy píku BHB a d₄ – BHB a jejich poměr

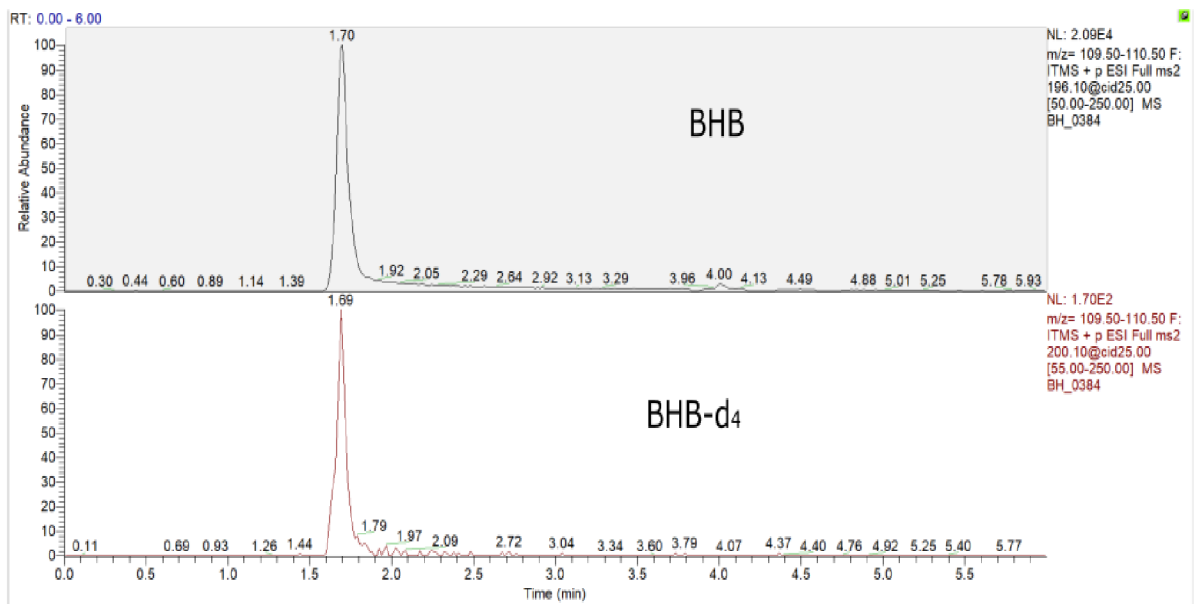
Koncentrace BHB [µg/ml]	Plochá píku BHB	Plocha píku d ₄ – BHB	Poměr ploch píků BHB/ d ₄ – BHB
3,6	372	371	1,00
11,0	1104	857	1,29
36,0	7162	807	7,97
110,0	8168	459	24,98
360,0	42 129	808	52,14
1100,0	114 085	641	177,98



Graf 1 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci



Obr. 15 Chromatografický záznam standardu BHB o koncentraci 11,0 $\mu\text{g/ml}$ a přidáného d_4 -BHB



Obr. 16 Chromatografický záznam BHB o koncentraci 1100,0 $\mu\text{g/ml}$

9.3 Validace metody

Linearita

Validační parametr linearita byla vyhodnocena pomocí kalibračních roztoků obsahující nedeuterované BHB o koncentraci 3-1100 µg/ml. Ke všem vzorkům byl přidán deuterovaný standard d₄-BHB o objemu 20 µl, k němuž následně byly vztaženy jednotlivé plochy píku nedeuterovaného BHB o dané koncentraci. Veškeré kalibrační roztoky byly proměřeny celkem třikrát. Linearita je stanovena v grafu 1. Rovnice závislosti z grafu je: $y = 0,1594x + 1,1699$. Korelační faktor R^2 má hodnotu 0,9963.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Validační parametry LOD a LOQ, byly stanoveny na základě hodnot kalibračních parametrů a vypočteny pomocí rovnice číslo (1) a (2) v kapitole 5.1. Mez detekce (LOD) činí 43,57 µg/ml, mez stanovitelnosti (LOQ) je rovna 145,23 µg/ml. Na základě vizuálního hodnocení, lze chromatografických záznamů, je zřejmé že mez detekce je 11,0 µg/ml, což lze vidět na Obr 15, kde pík iontu m/z 110 Da je trojnásobně vyšší než šum měření.

Opakovatelnost

Validační parametr opakovatelnosti byl měřen pro kalibrační vzorek o koncentraci 36 µg/ml ve čtyřech měření. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce číslo VII. Následně byl vypočten parametr RSD [%], který se rovná 10,10%.

Tab. VII: Naměřené hodnoty ploch píku pro koncentraci 36 µg/ml, použité pro stanovení opakovatelnosti.

Koncentrace [µg/ml]	Plocha píku BHB/plocha píku d ₄ – BHB
36,0	7,97
36,0	8,87
36,0	9,43
36,0	10,15

9.4 Stanovení analytu modelových vzorcích

Vyhodnocení koncentrace BHB v reálných vzorcích byla provedena pomocí kalibrační přímky, závislost plochy píku (plocha píku byla vypočtena jako poměr plochy píku nedeuterovaného BHB a deuterovaného d₄-BHB) na koncentraci BHB. Jednotlivé kalibrační roztoky byly proměřeny a byla vytvořena kalibrační přímka viz graf 1. Stanovení množství BHB v reálných vzorcích bylo uskutečněno pomocí deuterovaného standardu, který byl přidán ke každému vzorku krve a moči. Na základě izotopicky značeného standardu jsme schopni rozlišit signál BHB ve vzorku a signál standardu. Toto rozlišení je zapříčiněno deuteriem, který je obsažen ve značeném standardu celkem čtyřikrát, tím dojde k navýšení m/z o 4 Da. Graf číslo 1 vyobrazuje kalibrační závislost, dále rovnici regrese a korelační koeficient R². Hodnota R² je rovna 0,9963, rovnic regrese pro danou kalibrační závislost je: $y = 0,1594x + 1,1699$

Koncentrace BHB v modelových vzorcích krve a moči byly vypočteny pomocí kalibrační přímky získané z lineární závislosti viz graf 1. Jednotlivé koncentrace jsou shrnuty v Tab. VIII.

Výpočet koncentrace BHB pro vzorek č. 3:

$$y = 0,1594x + 1,1699$$

$$x = \frac{70,67 - 1,1699}{0,1594}$$

$$x = 430 \mu\text{g/ml}$$

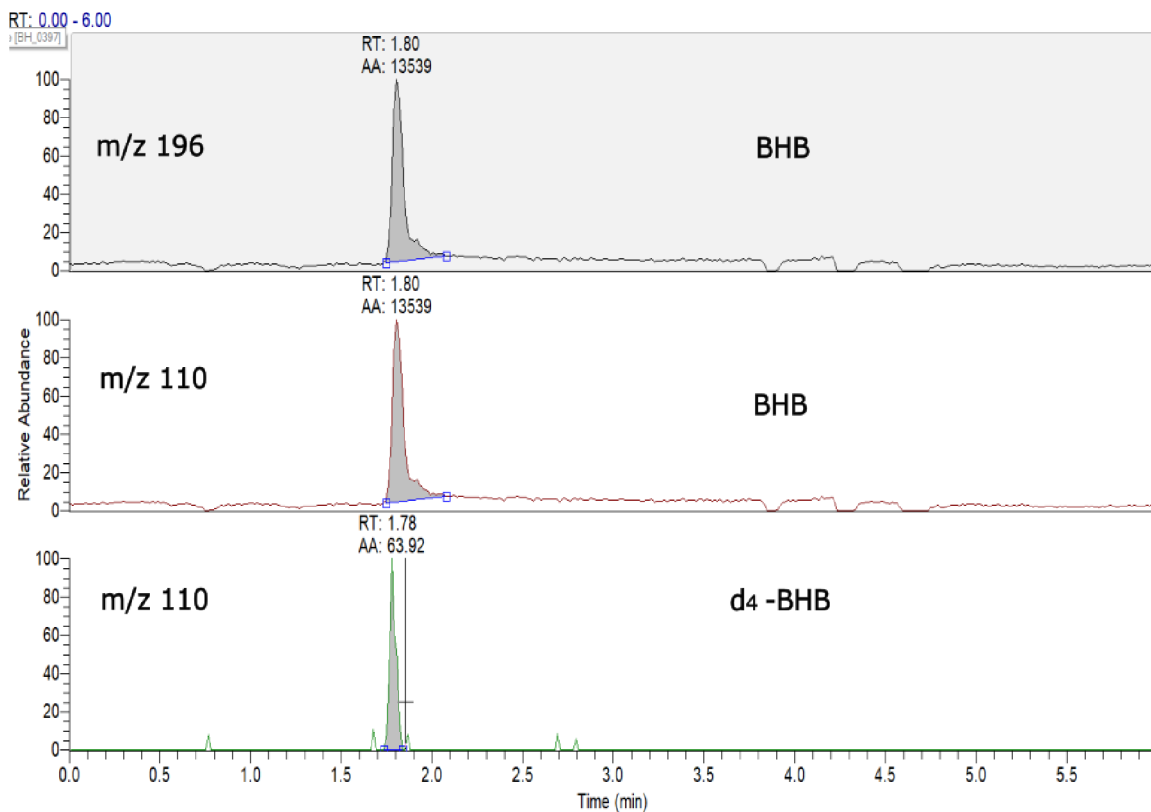
Tab. VIII Parametry pro stanovení koncentrace modelových vzorků a jejich vypočtená koncentrace

Vzorek	Typ vzorku	Plocha píku BHB	Plocha píku dBHB	BHB/dBHB	Koncentrace [µg/ml]
1	Moč	492 779	443	1112,37	6900*
2	Krev	10 435	68,47	152,40	950
3	Krev	13 144	195	67,41	430
4	Krev	18 237	86,22	211,52	1300
5	Krev	347	288	1,20	7**

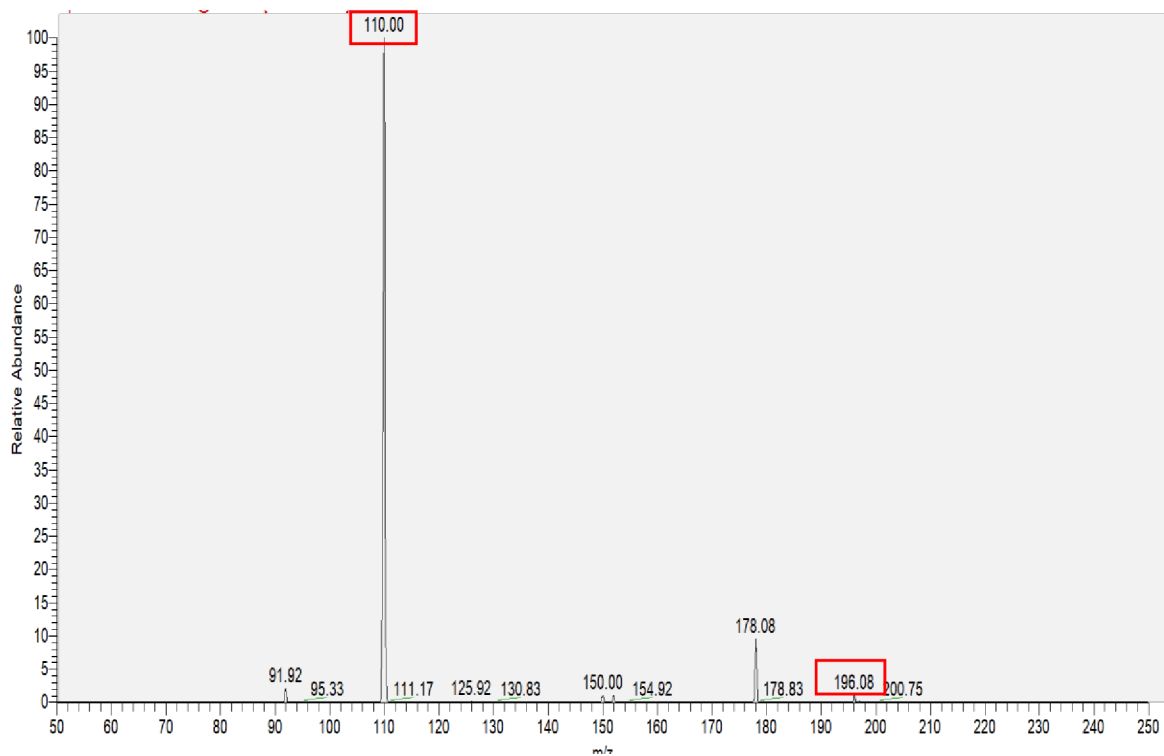
*Koncentrace stanovená ve vzorku moči, je mimo kalibrační závislost a je pouze odhadovaná na základě, dosazení podílu ploch píku do lineární rovnice. Abnormálně vysoká koncentrace je zřejmě způsobena přítomností neidentifikované interferující látky přítomné v moči. Tuto domněnku podporuje i netypický poměr intenzit prekurzorového a produktového iontu analytu v tomto vzorku.

** Stanovení ve vzorku krve číslo 5 (původní nespikovaná krev) poskytlo koncentraci pod mezí detekce, jedná se tedy pouze o odhad. Pro účely přípravy modelových vzorků spikováním byla původní koncentrace v krvi považována za nulovou.

Na Obr.17 můžete vidět záznam z analýzy reálného vzorku číslo 3. Kdy se jedná o plnou krev. Během analýzy jsem sledovala iont m/z 196 Da a jeho fragment m/z 110 Da a značeny standard d₄-BHB. Vrchní část chromatogramu se nachází MS spektrum kladně nabitého iontu 196, v prostřední části se nachází MS/MS spektrum kladně nabitého iontu m/z 110 Da z prekurzorového iontu m/z 196 Da. Ve spodní části spektra je zobrazeno MS/MS spektrum kladně nabitého iontu m/z 110 Da z prekurzorového iontu m/z 200 Da. Na Obr. 18 je zobrazeno hmotnostní spektrum analyzovaného modelového vzorku krve číslo 2, kde opět byly sledovány kladně nabité ionty m/z 196 Da a jeho fragment m/z 110 Da pro BHB.



Obr. 17 Chromatogram modelového vzorku číslo 2



Obr. 18 Hmotnostní spektrum modelového vzorku číslo 2

9.4.1 Vyhodnocení přesnosti měření modelových vzorků

Na základě analyzovaných hodnot modelových vzorků a očekávaných hodnot BHB, bylo provedeno vyhodnocení přesnosti dané metody. Naměřené koncentrace a reálné koncentrace jsou porovnány v tabulce číslo IX.

Tab. IX Hodnoty pro výpočet měření přesnosti a vypočtená chyba přesnosti

Vzorky	Typ vzorku	Naměřená koncentrace [µg/ml]	Skutečná koncentrace [µg/ml]	Chyba [%]
Vzorek 2	krev	950	500	90
Vzorek 3	krev	430	400	7,5
Vzorek 4	krev	1300	900	44,44

10 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá stanovením β -hydroxymáselné kyseliny v biologickém materiálu. Příprava této sloučeniny probíhala pomocí derivatizace, kdy BHB reagovala s anhydridem kyseliny 2-methyl-6-nitrobenzoové a následně 2-pyridinmethanolem za vytvoření stanovovaného analytu.

Stanovení probíhalo pomocí metody LC/MS, kdy nejprve byly optimalizováno složení mobilní fáze, gradientu a následně parametry hmotnostního spektrometru. Stanovovaný analyt β -hydroxymáselné kyseliny byl analyzován v kladném módu. Kdy jsme mohli vidět ve spektru pík s hodnotou m/z 196 Da. Pro ověření identity daného analytu byla provedena fragmentace analytu m/z 196 Da. Ve spektru jsme ve stejném čase viděli fragment s hodnotou m/z 110 Da. Celková analýza trvala 6 minut a stanovovaný analyt BHB byl sledován v 1,66 minutě.

Stanovení reálných vzorků probíhalo z krve a moči. Tyto reálné vzorky byly odebrány z vlastní krve v odběrovém místě, koncentrace jednotlivých vzorků byla od 430 $\mu\text{g/ml}$ do 6900 $\mu\text{g/ml}$.

Jednou z hlavních výhod této metody pro stanovení β – hydroxymáselné kyseliny je její časová nenáročnost, zvláště když v dnešní době je kladen velký důraz na rychlost analýzy a na její přesnost při určování důvodu smrti jedince.

11 Seznam obrázků

Obr. 1 Porovnání struktur kyseliny acetyloctové, acetonu a β -hydroxymáselné kyseliny	2
Obr. 2 Ketogeneze β -hydroxymáselné kyseliny	4
Obr. 3 Vznik ketoacidózy	9
Obr. 4 Schéma kapalinového chromatografu	15
Obr. 5 Schéma hmotnostního spektrometru	18
Obr. 6 Porovnání iontových zdrojů v závislosti na molekulární hmotnosti a polaritě	20
Obr. 7 Schéma kvadrupólového analyzátoru	21
Obr. 8 Schéma iontové pasti	21
Obr. 9 Schéma analyzátoru doby letu	22
Obr. 10 Princip elektronového násobiče	23
Obr. 11 Reakce kyseliny β -hydroxymáselné s anhydridem kyseliny 2-methyl-6-nitrobenzoové	31
Obr. 12 Vznik analyzované látky po derivatizaci	32
Obr. 13 Optimalizace složení mobilní fáze	33
Obr. 14: Fragmentační spektrum MS/MS pro kladně nabitý iont 196	35
Obr. 15 Chromatografický záznam standardu BHB o koncentraci 11,0 $\mu\text{g/ml}$ a přidaného d_4 -BHB	37
Obr. 16 Chromatografický záznam BHB o koncentraci 1100,0 $\mu\text{g/ml}$	37
Obr. 17 Chromatogram modelového vzorku číslo 2	41
Obr. 18 Hmotnostní spektrum modelového vzorku číslo 2	41

12 Seznam tabulek a grafů

Tab. I: Přehled používaných metody pro stanovení β – hydroxybutyrové kyseliny	6
Tab. II Minimální hodnoty pro stanovení diabetické ketoacidózy	8
Tab. III Optimalizace složení mobilní fáze	33
Tab. IV Složení mobilní fázi během analýzy	34
Tab. V Parametry nastavení hmotnostního spektrometru	34
Tab. VI Hodnoty koncentrace standardu BHB, plochy píku BHB a d_4 – BHB a jejich poměr	36
Tab. VII: Naměřené hodnoty ploch píku pro koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$, použité pro stanovení opakovatelnosti.....	38
Tab. VIII Parametry pro stanovení koncentrace reálných vzorků a jejich vypočtena koncentrace .	40
Tab. IX Hodnoty pro výpočet měření přesnosti a vypočtená chyba přesnosti	42
Graf 1 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci	36

13 Seznam použité literatury

- [1] R. Gharib, A. Khatibi, R. Khodarahmi, M. Haidari, and S. Husseinzadeh, "Study of glycation process of human carbonic anhydrase II as well as investigation concerning inhibitory influence of 3-beta-hydroxybutyrate on it," *Int J Biol Macromol*, vol. 149, pp. 443–449, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.01.192.
- [2] K. Imamura, T. Takeshima, Y. Kashiwaya, K. Nakaso, and K. Nakashima, "D- β -hydroxybutyrate protects dopaminergic SH-SY5Y cells in a rotenone model of Parkinson's disease," *J Neurosci Res*, vol. 84, no. 6, pp. 1376–1384, Nov. 2006, doi: 10.1002/JNR.21021.
- [3] J. Fontana, P. Lavříková. "Odbourávání lipidů a metabolismus ketolátek. Funkce buněk a lidského těla" [online]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/11-odbouravani-lipidu-ametabolismus-ketolatek/>
- [4] J. J. Kaneko, J. W. Harvey, and M. L. Bruss, "Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Sixth Edition," *Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Sixth Edition*, pp. 1–916, Jan. 2008, doi: 10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3.
- [5] Kohlmeier, Martin. (2003). Kohlmeier M. Nutrient metabolism. Academic Press, London, 2003, 826 pp. ISBN 0-12-417762-X.
- [6] N. Yamane, T. Tsuda, K. Nose, A. Yamamoto, H. Ishiguro, and T. Kondo, "Relationship between skin acetone and blood β -hydroxybutyrate concentrations in diabetes," *Clinica Chimica Acta*, vol. 365, no. 1–2, pp. 325–329, Mar. 2006, doi: 10.1016/J.CCA.2005.09.016.
- [7] L. K. Sørensen *et al.*, "Simultaneous determination of β -hydroxybutyrate and β -hydroxy- β -methylbutyrate in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry," *Clin Biochem*, vol. 46, no. 18, pp. 1877–1883, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.08.011.
- [8] T. Larsen and N. I. Nielsen, "Fluorometric determination of β -hydroxybutyrate in milk and blood plasma," *J Dairy Sci*, vol. 88, no. 6, pp. 2004–2009, 2005, doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(05)72876-9.
- [9] E. Özkan, E. Nemutlu, M. S. Beksac, and S. Kir, "GC–MS analysis of seven metabolites for the screening of pregnant women with Down Syndrome fetuses," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 188, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.JPBA.2020.113427.
- [10] S. Elliott, C. Smith, and D. Cassidy, "The post-mortem relationship between beta-hydroxybutyrate (BHB), acetone and ethanol in ketoacidosis," *Forensic Sci Int*, vol. 198, no. 1–3, pp. 53–57, May 2010, doi: 10.1016/J.FORSCIINT.2009.10.019.
- [11] U. Devamoglu, I. Duman, E. Saygili, and O. Yesil-Celiktas, "Development of an Integrated Optical Sensor for Determination of β -Hydroxybutyrate Within the Microplatform," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 193, no. 9, pp. 2759–2768, Sep. 2021, doi: 10.1007/s12010-021-03563-3.
- [12] L. Laffel, "Ketone Bodies: a Review of Physiology, Pathophysiology and Application of Monitoring to Diabetes." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 1999, :DOI: 10.1002/(SICI)1520-7560(199911/12)15:6<412.

- [13] L. K. Sørensen *et al.*, "Simultaneous determination of β -hydroxybutyrate and β -hydroxy- β -methylbutyrate in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry," *Clin Biochem*, vol. 46, no. 18, pp. 1877–1883, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.08.011.
- [14] T. Pelikánová, v. Bartoš, "*Praktická diabetologie*", 6. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf, 2018, ISBN 978-80-7345-559-0.
- [15] N. Sadones, W. E. Lambert, and C. P. Stove, "The (non)sense of routinely analysing beta-hydroxybutyric acid in forensic toxicology casework," *Forensic Sci Int*, vol. 274, pp. 38–43, May 2017, doi: 10.1016/j.forsciint.2017.01.002.
- [16] A. Šmahelová, "*Akutní komplikace diabetu*," 1. vydání, Praha: Triton, 2006, ISBN 80-7254-812-3.
- [17] K. D. Wrenn, C. M. Slovis, G. E. Minion, and R. Rutkowski, "The syndrome of alcoholic ketoacidosis," *Am J Med*, vol. 91, no. 2, pp. 119–128, 1991, doi: 10.1016/0002-9343(91)90003-G.
- [18] C. Palmiere *et al.*, "Postmortem biochemistry in suspected starvation-induced ketoacidosis," *J Forensic Leg Med*, vol. 42, pp. 51–55, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jflm.2016.04.013.
- [19] C. Palmiere, G. Teresiński, and P. Hejna, "Postmortem diagnosis of hypothermia", doi: 10.1007/s00414-014-0977-1.
- [20] V. Krajník, V. Porada, J. Straus, "*Kriminalistika*", Bratislava: Aladémiá Policajného zboru SR, 2002, isbn 978-80-8054-929-9.
- [21] Ho Mat H., "*Analytical methods in forensic chemistry*", New York: E.Horwood, 1990, ISBN :978-01-3037-961-0
- [22] M. Balíková, "*Forenzní a klinická toxikologie*", Druhé doplněné vydání, Praha: Galén, 2007, ISBN: 978-80-7492-304-3
- [23] S.Trojan, "*Lékařská fyziologie*", Grada Publishing a.s, 2003, ISBN 978-80-2470-512-5.
- [24] S. Elliott, C. Smith, and D. Cassidy, "The post-mortem relationship between beta-hydroxybutyrate (BHB), acetone and ethanol in ketoacidosis," *Forensic Sci Int*, vol. 198, no. 1–3, pp. 53–57, May 2010, doi: 10.1016/j.forsciint.2009.10.019.
- [25] L. N. Denmark, "The investigation of beta-hydroxybutyrate as a marker for sudden death due to hypoglycemia in alcoholics," *Forensic Sci Int*, 1993. doi: 10.1016/0379-0738(93)90211-r
- [26] N. Sadones, W. E. Lambert, and C. P. Stove, "The (non)sense of routinely analysing beta-hydroxybutyric acid in forensic toxicology casework," *Forensic Sci Int*, vol. 274, pp. 38–43, May 2017, doi: 10.1016/J.FORSCIINT.2017.01.002.
- [27] P. Klouda, "*Moderní analytické metody*", druhé upravené a doplněné vydání, Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2
- [28] Kellner Robert, Otto Matthias, Widmer H. Michael, and Mermet Jean-Michel, *Analytical Chemistry*, 1st ed. Wiley -VCH, 1998.

- [29] J. Churáček, *“Analytická separace látek“*, Praha: Nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8
- [30] L. Nováková, M. Douša, and a kolktiv, *“Moderní HPLC separace v teorii a praxi“*, vol. 1., Hradec Králové; Klatovy: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013.
- [31] V. R. Meyer, , *“Practical High-Performance Liquid Chromatography, “*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. doi: 10.1002/0470032677.fmatter.
- [32] K. Štulík, , *“Analytické separační metody, “*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN, 80-246-0852-9
- [33] D. Friedecký and K. Lemr, *“Úvod do hmotnostní spektrometrie,” Biochem. Metab*, vol. 20, no. 3, pp. 152–157, 2012.
- [34] E. de Hoffmann and V. Stroobant, *“Mass spectrometry: principles and applications.”* Třetí vydání, West Sussex England: J. Wiley; 2007 Chichester
- [35] Ho, Chung & Lam, Ka Chun & Chan, Michael & Cheung, R & Law, Lap & Lit, Lydia & Ng, K.F. & Suen, Margaret & Tai, H.L.. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 24. 3-12.
- [36] E. de Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, and U. A. T. Brinkman, *“Analytical separation and detection methods for flavonoids,” J Chromatogr A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 31–63, Apr. 2006, doi: 10.1016/J.CHROMA.2006.01.019.
- [37] S. E. van Bramer, *“An Introduction to Mass Spectrometry,”* 1998. [Online]. Available: <http://science.widener.edu/~svanbram>
- [38] M. E. Raymond, *“Ion trap mass spectrometry. “ International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes,(1992) 118–119, 71–135. doi: .10.1016/0168-1176(92)85059-9.*
- [39] Nagornov, K. O., Kozhinov, A. N., & Tsybin, Y. O. (2017). Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry at the Cyclotron Frequency. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(4), 768–780. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1598-y>
- [40] M. Sadílek, *“Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie“*, *Chemické listy.*, vol. 114 (2)., 133-144, 2020. Získáno z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3541>
- [41] S. Zhou, Q. Song, Y. Tang, and W. Naidong, *“Critical Review of Development, Validation, and Transfer for High Throughput Bioanalytical LC-MS/MS Methods,” Curr Pharm Anal*, vol. 1, no. 1, pp. 3–14, Mar. 2006, doi: 10.2174/1573412052953346.
- [42] Z. Plzák, J. Kratochvíla, B. Friedecký, and L. Šprongl, *“Doporučení pro validace a verifikace postupů laboratorních vyšetření ve zdravotnických laboratořích,”* 2021.
- [43] Z. Plzák and D. Milde, *“Názvosloví v oblasti metrologie a zabezpečování kvality,” Chemické listy*, 2012.
- [44] V. Bartoš, *Management kvality v klinických laboratořích: studijní opora*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2014. ISBN 978-80-7464-596-9.

- [45] Červený, V., Klokočnicková, E., Kříženecká, S., Milde, D., Nižnanská, A., Plzák, Z., Suchánek, M., Vilímc, J., & chemii, M. (n.d.). KVALIMETRIE Stručný přehled metrologie v chemii.
- [46] T. Miyazaki *et al.*, "Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC–ESI–MS/MS," *Springerplus*, vol. 4, no. 1, Dec. 2015, doi: 10.1186/s40064-015-1304-0.