

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**OPTIMALIZACE TEPLOTNĚ PROGRAMOVATELNÉHO
NÁSTŘIKU VELKÉHO OBJEMU VZORKU V PLYNOVÉ
CHROMATOGRFII METODOU PLÁNOVANÉHO
EXPERIMENTU**

Diplomová práce

Autor: Bc. Petr Wojtowicz

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.

Studijní obor: Analytická chemie (prezenční)

Olomouc 2009

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

podpis

Děkuji svému vedoucímu práce doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za odborné vedení při celém procesu zpracování, Ing. Vojtěchu Bekárkovi, za pomoc při práci s GC/MS a Mgr. Lence Žídkové za přípravu buněčného materiálu. Dále také děkuji všem pracovníkům a studentům Laboratoře dědičných metabolických poruch Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Olomouci za jejich obětavost a trpělivost.

ABSTRAKT

Techniky nástřiku velkého objemu vzorku (LVI) patří pro metodu plynové chromatografie k často používaným pro snížení detekčního limitu nejrůznějších analytů. K tomuto účelu lze využít mnoha metod s často velmi obtížným postupem optimalizace. Tato práce se zabývá postupem optimalizace pracovních podmínek programovatelného split-splitless injektoru (PTV) metodou plánovaného experimentu (Box, Hunter & Hunter design of experiments) následovaného centrálním kompozitním designem. Jako modelový vzorek byla vybrána směs n-alkanů. Proces optimalizace je dále použit pro metabolomické studie ke stanovení metabolitů intracelulárního obsahu lidských fibroblastů plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS).

Klíčová slova: metabolomika, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, nástřik velkého objemu vzorku, PTV injektor, design of experiments

ABSTRACT

Techniques of large volume injection (LVI) belong to frequently used ones for decreasing a limit of detection of all sorts of analytes in gas chromatography. It is possible to use many methods of LVI, often with a highly troublesome optimizing procedure, for this purpose. This work deals with an optimizing procedure of conditions of a thermally programmable vaporizing split-splitless injector (PTV) used Box, Hunter & Hunter design of experiments followed by central composite design. A mixture of n-alkanes was chosen as a model sample. The optimizing process is further used for metabolomic studies to quantification of intracellular metabolites from human fibroblasts by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Keywords: metabolomics, gas chromatography, mass spectrometry, large volume injection, PTV injector, design of experiments

OBSAH

ÚVOD	7
I. TEORETICKÁ ČÁST	9
1. METABOLOMIKA	9
1.1 METABOLISMUS	9
1.2 METABOLOM.....	11
1.3 METODY STUDIA METABOLOMU.....	13
1.4 METODY ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	15
1.5 PRAKTICKÉ MOŽNOSTI VYUŽITÍ METABOLOMIKY	16
2. ZÁKLADY POUŽITÉ INSTRUMENTACE	18
2.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	18
2.1.1 Teoretické základy metody a instrumentace	18
2.1.2 Derivatizace.....	20
2.1.3 Dávkování vzorků	21
2.1.4 Nástřík velkého objemu vzorku	23
2.1.5 PTV injektor.....	25
2.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	28
2.2.1 Iontový zdroj	28
2.2.2 Analyzátoři iontů.....	29
2.2.3 Vakuový systém	31
2.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE – HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (GC/MS).....	32
2.3.1 Spojení obou metod.....	32
2.3.2 Hodnocení výsledků analýzy	33
3. DESIGN OF EXPERIMENT (DOE)	36
3.1 PLÁNOVÁNÍ EXPERIMENTU	36
3.2 POSTUP DOE.....	37
3.3 VÝBĚR EXPERIMENTÁLNÍHO PLÁNU	38
3.4 POUŽITÍ METODY PRO OPTIMALIZACI PODMÍNEK PTV INJEKTORU	40
II. PRAKTICKÁ ČÁST	41
4. PRACOVNÍ POSTUP A INSTRUMENTACE	41
4.1 CHEMIKÁLIE A MATERIÁL	41
4.2 INSTRUMENTACE.....	41
4.3 POSTUP PRÁCE.....	43
4.3.1 Příprava buněčného extraktu.....	43
4.3.2 Derivatizační procedura	43
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	44
5.1 ANALÝZA SMĚSI ALKANŮ	44
5.1.1 Návrh experimentu.....	44
5.1.2 Analýza experimentu	45
5.1.3 Centrální kompozitní design	47
5.1.4 Konečné podmínky PTV injektoru	49
5.2 ANALÝZA SMĚSI ORGANICKÝCH KYSELIN A AMINOKYSELIN	51
5.2.1 Vlastnosti vzorku derivátů organických kyselin a aminokyselin.....	51
5.2.2 Volba objemu nástříku	52

5.2.3	DOE analýza pro směs organických kyselin a aminokyselin	52
5.2.4	Centrální kompozitní design vybraných faktorů	54
5.2.5	Konečné podmínky analýzy	55
5.3	ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ FIBROBLASTŮ	57
5.3.1	Volba metody analýzy extraktu fibroblastů	57
5.3.2	Analýza buněk sklízených quenchingem	58
5.3.3	Analýza buněk sklízených trypsinizací	62
5.3.4	Porovnání metod sklízení buněk	64
ZÁVĚR		66
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		67

ÚVOD

Metabolomika je vědní disciplína zkoumající celkový souhrn všech látek, které jsou za daných podmínek produkovány a přeměňovány v živých organismech. Studovány jsou prakticky všechny organismy – jednobuněčné (bakterie, sinice, kvasinky, prvoci), houby, rostliny i živočichové. V živých buňkách probíhá v jednom okamžiku velké množství nejrůznějších chemických pochodů, jež jsou se sebou vzájemně provázány. Dalším důležitým znakem je regulace těchto procesů (zaručení dynamické rovnováhy), jejich buněčná lokace a skutečnost, že probíhají po celý čas existence buňky [1].

Prakticky se výsledky metabolomických studií uplatňují v mnoha oborech: od studia přeměny látek mikroorganismy, přes systémovou biologii, po diagnostiku a kontrolu léčby chorob. Rostoucí význam metabolomiky v systému přírodních věd dokazuje mimo jiné i vydání prvního čísla odborného časopisu *Metabolomics* (Springer Science+Business Media, Inc.) v lednu roku 2005 [2].

Trendem v současné analytické chemii je analýza stále menších množství vzorků po izolaci ze složitých matic, zjednodušení jejich přípravy a v neposlední řadě pokles limitu jejich detekce, přičemž je žádaná automatizace celého procesu. Pro metabolomiku toto platí, díky komplexnosti analýzy a díky velké kvalitativní i kvantitativní rozmanitosti studovaných látek, s o to větším důrazem.

Jedním z důležitých kroků analytického chemika při analýze bývá, zvláště při velmi nízkých koncentracích látek, volba metody izolace a prekoncentrace zkoumaného analytu ze vzorku. I po těchto krocích (velmi často to bývají extrakce, poté vymrazování, odpařování či odfoukání) zpravidla dostáváme stále směs mnoha podobných látek. Je tedy nutno provést jejich separaci. Mocným nástrojem analytické chemie pro dělení látek jsou mnohé chromatografické a elektroforetické metody, jejichž nespornou výhodou je přímé spojení s detektory, které jsou schopny separované chemické individuální, mimo jeho kvantifikace, přímo identifikovat (hmotnostní spektrometr, NMR-spektrometr, infračervený spektrometr, fluorescenční spektrometr, série coulometrických detekčních cel apod.).

Pro plynovou chromatografii je klasické spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem s vysokou citlivostí a nízkým limitem detekce, který, jak již bylo řečeno, je porovnáním s databází spekter schopen určit s vysokou spolehlivostí strukturu neznámé látky (v případě plynové chromatografie jsou to též termostabilní málo polární látky

nebo jejich vhodné deriváty: organické kyseliny, jednoduché hormony, alkaloidy apod.). Mnoho látek, které mají velký potenciál stát se užitečnými biomarkery (například časných stádií závažných onemocnění), jsou však buňkami produkovány jen ve velmi nízkých množstvích. Je proto žádoucí snižovat limity detekce těchto látek. Jedním z možných řešení je předložení většího množství vzorku – large volume injection (LVI). Mezi vyvinutými LVI metodami se díky svým výhodným vlastnostem často uplatňuje injektor, jehož teplotu je možno programovat – programmable temperature vaporiser (PTV). Užitím tohoto injektoru je možno zakoncentrovat studované analyty – vhodným nastavením pracovních podmínek je eliminováno přebytečné množství rozpouštědla ještě před započítáním separace.

Podmínek, které je nutno pro efektivní práci vhodně nastavit, je však celá řada. Je nutno zvolit vhodné rozpouštědlo, teplotu a čas jeho eliminace, průtok nosného plynu v jednotlivých fázích činnosti a další. Optimalizace PTV injektoru tedy bývá obvykle nesnadná a časově náročná. Jedním z řešení nabízejících zefektivnění tohoto procesu je metoda plánovaného experimentu (design of experiments, DOE). Jedná se o matematickou statistickou metodu, pomocí níž se provedením malého počtu pokusů (za předem definovaných podmínek) vyberou ty podmínky, které jsou pro zkoumaný proces významné, ostatní jsou pak zanedbány. Vybrané se po další sérii experimentů podrobí statistické analýze, a tak jsou získány nejvhodnější parametry. Metoda byla původně navržena pro optimalizaci na poli technickém a konstrukčním, stále častěji však nachází uplatnění i v dalších oborech, chemii nevyjímaje. Metoda je v dnešní době součástí mnoha sofistikovaných statistických aplikací.

Cílem předkládané diplomové práce je optimalizace podmínek PTV injektoru při LVI nástřiku metodou plánovaného experimentu. Jako testovací směs pro plynově chromatografickou analýzu s hmotnostní detekcí je použita řada n-alkanů. Získané zkušenosti s obsluhou PTV a s užíváním statistického softwaru pak byla použita v aplikaci v oblasti metabolomiky – stanovení látek extrahovaných z kultivovaných lidských fibroblastů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. METABOLOMIKA

1.1 Metabolismus

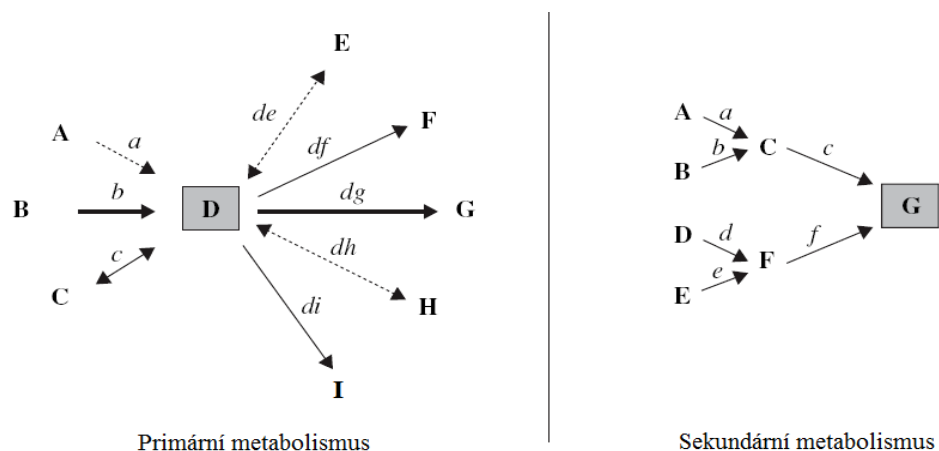
Jako *metabolismus* označujeme soubor procesů, jimiž živé soustavy získávají a využívají volnou energii, pro udržování svých rozličných funkcí a stavební prvky potřebné pro růst a udržování své aktivity. Tohoto dosahují přeměnou souboru malých chemických sloučenin na jiný soubor chemických sloučenin s nižším obsahem volné energie, což zahrnuje velký počet chemických reakcí s mnoha chemickými meziproducty. Získávání této energie je závislé také na druhu živého organismu: *fototrofy* (rostliny, některé bakterie) ji získávají fotosyntézou za účasti slunečního záření, *chemotrofy* (živočichové, většina mikroorganismů) pak oxidací chemických sloučenin, především sacharidů a lipidů. K přenosu a ukládání energie buňka využívá vysokoenergetických fosfátových vazeb tzv. *makroergních* sloučenin (adenosintrifosfát – ATP, ...), do nichž se zapisuje procesem *fosforylace*.

Společnou vlastností všech organismů je, že jednotlivé reakce metabolismu neprobíhají izolovaně, ale prostřednictvím meziproductů jsou spojeny do řetězců nebo cyklů, které se vzájemně protínají a tvoří tzv. *metabolické dráhy*.

Metabolické reakce rozdělujeme na dvě skupiny (anabolismus a katabolismus), které se však vzájemně doplňují. Mají společný přenašeč energie (ATP), používají stejné chemické prostředky (redoxní děje, NAD^+ a NADH) a probíhají mezi stejnými výchozími a konečnými látkami, jen v opačných směrech a odděleně. *Anabolismus* tvoří biosyntetické (asimilační) děje, které vyžadují energii ve formě ATP. Jedná se převážně o redukční děje (vyžadují tedy i vysokoenergetická redukční činidla – nikotinamidadeninukleotid, NADH, nebo fosfátovanou formu nikotinamidadeninukleotidfosfát, NADPH). Jako výchozí látky (prekurzory) využívá pouze několik málo látek (pyruvát, acetylkoenzym A, některé meziproducty citrátového cyklu), z nichž je syntetizováno množství rozličných produktů. Oproti tomu *katabolismus* tvoří děje biodegradační (disimilační), které energii a uvedená redukční činidla produkují, zde se jedná o převážně oxidační stupňovitě probíhající reakce. Výchozími látkami jsou (pro chemotrofy) nejrozmanitější látky (sacharidy, lipidy, proteiny, ...) přijímané v potravě, které jsou přeměněny na společné meziproducty (převážně acetylkoenzym A, dále ketokyseliny, glycerol, NH_4^+ , ...), jež jsou

pak dále přeměněny na konečné produkty (H_2O , CO_2 , NH_3 , eventuálně močovina nebo kyselina močová). Za zvláštní případ lze považovat *amfibolické dráhy*, které plní obě základní funkce metabolismu (citrátový cyklus) [1, 3, 4].

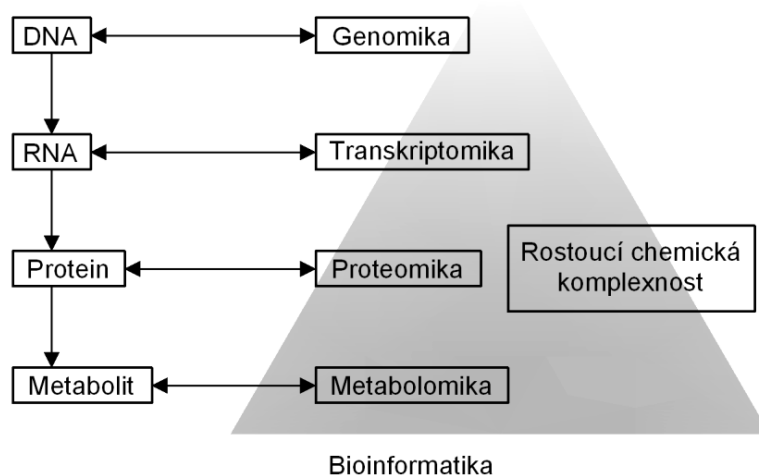
Z jiné stránky lze metabolismus (potažmo i metabolity) rozdělit na primární a sekundární. *Primární metabolismus* zahrnuje procesy nezbytné pro zabezpečení energie a stavebního materiálu pro syntézu základních stavebních složek organismu. Ve všech organismech probíhá shodně a i jeho produkty (*primární metabolity*) jsou v podstatě stejné (glykolýza, respirační řetězec, fotosyntéza). Primární metabolity se účastní velkého množství reakcí, jsou tedy citlivé na okolní podněty, a proto jsou často v popředí metabolomických studií. *Sekundární metabolismus* navazuje na primární, ale jeho konečné produkty (*sekundární metabolity*) se nepodílejí na růstu a vývoji organismu (jsou neesenciální pro život, ačkoliv pro organismus důležité). Často mají neznámou funkci, ale mohou působit například jako signální sloučeniny pro obranu nebo zdokonalovat některé z funkcí organismu. Pro různé organismy se tyto látky liší, ačkoli se syntetizují pouze z malého množství primárních metabolitů, což je podkladem pro jejich obecnou klasifikaci – terpenoidy, alkaloidy, fenolické sloučeniny apod. [5]



Obr. 1. Ilustrace rozdílů primárního a sekundárního metabolismu, převzato z [5]: primární metabolit *D* lze vytvořit z prekurzoru *A*, *B* nebo *C* (*B* je hlavním zdrojem) může být také zpětně konvertován na *C* a zároveň je prekurzorem dalších metabolitů (*E*, *F*, *G*, *H* a *I*); v sekundárním metabolismu jsou metabolity *A* a *B* převedeny na *C* a metabolity *D*, *E* na *F*. Sekundární metabolit *G* může být tvořen z prekurzoru *C* a *F*, není ale meziproduktem další reakce, proto se uvnitř buňky kumuluje nebo je vyloučen

1.2 Metabolom

Metabolomika je poměrně nová vědní disciplína, která se zabývá komplexním studiem látek, které za daných podmínek vznikají v živých organismech – metabolitů. Živá buňka, ať je samostatným organismem či součástí vyššího celku, vnímá podněty ze svého okolí a podle jejich druhu a intenzity na ně určitým způsobem reaguje. Formálně vychází metabolomika ze studia DNA. Genetický materiál buňky (*genomika* = stanovení a interpretace kompletní sekvence DNA) je přepisován (*transkriptomika* = kompletní set mRNA, aktivace genomu) do podoby proteinů (*proteomika* = kompletní set proteinů, jejich funkce, spolupráce), které se dále účastní metabolických reakcí (obr. 2).



Obr. 2. Návaznost „omických“ disciplín, převzato z [5]

Metabolomem je nazýván soubor všech metabolitů přítomných v daném okamžiku v buňce, účastnících se hlavních metabolických reakcí, a které jsou nezbytné pro udržování aktivity, růst a normální fungování buňky [6]. *Metabolity* jsou nízkomolekulární látky, které se od sebe mohou velmi lišit jak chemickými, tak fyzikálními vlastnostmi a dynamikou konverze, to vše v silné závislosti na momentálním stavu prostředí. Metabolit je syntetizován buňkou za účelem vykonávání užitečné, ne-li nezbytné funkce v udržování aktivity a přežití buňky, například přispíváním na infrastrukturu nebo energetické požadavky buňky. Pokud nevykonává přímo biologickou funkci, bude po strukturální modifikaci sloužit jako prekurzor pro další přeměnu na biologicky aktivní sloučeninu. Významnou charakteristikou metabolitu je omezený poločas života, což znamená, že jsou buňkou nepřetržitě přijímány, produkovány, degradovány nebo vylučovány. Metabolom se tudíž skládá z velmi rozdílných chemických sloučenin od *anorganických iontů* (K^+ , PO_4^{3-}) po *hydrofilní sacharidy* (glukosa), *těkavé alkoholy* (glycerol) a *aldehydy* (acetaldehyd),

aminokyseliny (glutamát) a další organické kyseliny (pyruvát), hydrofobní lipidy (estery glycerolu) a komplexní přírodní produkty (nukleotidy, vitaminy, hormony apod.).

Metabolom lze rozdělit na dvě složky: *endometabolom*, tj. kompletní soubor metabolitů přítomných uvnitř buňky, a *exometabolom*, tj. metabolity, které buňka vylučuje do extracelulární tekutiny, eventuálně do růstového média. Z důvodu rozdílné fyziologické role těchto součástí je nutno dbát na jejich rozlišování.

Velikost metabolomu se velice mění v závislosti na studovaném organismu; odhaduje se, že celá rostlinná říše může být schopná produkovat mezi 200 000 a 400 000 primárních a sekundárních metabolitů, podobný počet je i v říši hub. Předpokládá se, že lidský metabolom je ještě větší. Počet metabolitů v buňce je řádově menší než počet genů nebo proteinů (bakterie *Escherichia coli* K12 obsahuje 4 392 genů, 4 464 proteinů a produkuje pouze 796 metabolických sloučenin) [5].

1.3 Metody studia metabolomu

V metabolomice existuje v zásadě několik možných přístupů pro analýzu. Vlastní *metabolomika* zahrnuje analýzu kompletního metabolomu, což je z důvodů velké rozmanitosti struktur a koncentrací časově i přístrojově náročné, proto se častěji provádějí *cílené analýzy* (target analysis). V tomto případě se zaměřujeme pouze na kvalitativní a kvantitativní analýzu několika málo látek souvisejících přímo s jedinou specifickou metabolickou reakcí. Jako *metabolomické profilování* (metabolic profiling) pak označujeme kvantifikaci předem definovaných látek. *Metabolic fingerprinting* je nespécifická analýza celého endometabolomu bez předřazené separace nejčastěji pomocí hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetické rezonance, ale také infračervenou nebo Ramanovou spektrometrií (tvorba tzv. otisku prstu). Neposkytuje tedy informace o jednotlivých metabolitech, ale může sloužit například k porovnání a klasifikaci vzorků. *Metabolic footprinting* studuje extracelulární metabolity a *metabonomika* stanovuje láky metabolické přeměny v rámci jediného organismu studiem jeho tkání nebo biologických tekutin [7]. Jelikož se však jedná o nové stále se rychle rozvíjející vědní disciplíny, není terminologie v této oblasti ustálená a dochází stále ještě k posunům ve významech jednotlivých pojmů.

Pro přesné, správné a reprodukovatelné výsledky při studiu metabolitů buněk různého původu je nutno kvůli komplexnosti analýzy a rozmanitosti analytů dodržet přesný postup. Prvním krokem bývá ukončení buněčného metabolismu – zastavení všech biochemických pochodů (*zhášení, quenching*). Pro různé typy vzorků byly vyvinuty různé metody zhášení. V principu je provedeno vystavení rychlé změně (sekundy) okolního prostředí. Nutnost rychlosti vyplývá ze samotné rychlosti metabolických reakcí. Je nežádoucí, aby buňka na podnět vedoucí k zastavení metabolismu zareagovala změnou koncentrace metabolitů. Změna prostředí bývá nejčastěji teplotní (studené nebo horké zhášení) nebo acidobazická (kyselé nebo alkalické zhášení) [6, 8].

Na proceduru zhášení navazuje *extrakce* metabolitů z biologického materiálu. Výběr extrakčního činidla je závislý na chemické povaze metabolitů. Vyextrahovat vše v jednom extrakčním kroku je, z důvodu již zmiňované rozmanitosti, nemožné. Pro analýzu intracelulárního obsahu je nutno nejprve narušit buněčné stěny, čehož lze dosáhnout enzymaticky, chemicky, fyzikálně nebo mechanicky. Vlastní extrakce je prováděna organickými rozpouštědly a jejich směsmi (methanol, chloroform, ...), vždy podle povahy látek, jež máme v úmyslu stanovovat. Pro zakoncentrování lze použít například zachycení

na koloně s pevnou fází (*solid phase extraction, SPE, solid phase microextraction, SPME*) nebo jednoduše *lyofilizaci* (po přidavku deionizované vody) či *odfoukání dusíkem* s následným selektivním rozpuštěním žádaných sloučenin ve vhodném rozpouštědle, *akceleroanou extrakci* (accelerated solvent extraction, ASE), *mikrovlnnou extrakci* (microwave assisted extraction, MAE) nebo *superkritickou fluidní extrakci* (supercritical fluid extraction, SFE). Vysoce těkavé látky lze pak analyzovat přímo plynovou chromatografií (*head-space techniky*) [5, 6, 8, 9].

Konečným krokem je vlastní analytická koncovka. Objasnění genomu, transkriptomu a proteomu je založeno na chemické analýze biopolymerů složených z nukleotidů nebo aminokyselin, tedy sloučenin chemicky velmi si podobných, což užívané analytické přístupy často usnadňuje. Avšak u metabolomu pozorujeme významné rozdíly v chemických strukturách a vlastnostech, což prakticky vylučuje jeho současné kompletní určení, proto je používána celá řada separačních a detekčních technik [5].

Jako separačních technik je používáno *plynové chromatografie* (gas chromatography, GC, pro nízkomolekulární málo polární látky, těkavé a termicky stabilní – po případné derivatizaci jsou to organické kyseliny, alkaloidy, hormony, ...), *kapalinové chromatografie* (high performance liquid chromatography, HPLC, pro širokou škálu vysokomolekulárních a termolabilních látek – sacharidy, lipidy, enzymy, ...) a *kapilární elektroforezy* (capillary electrophoresis, CE, pro nejrůznější elektricky nabitě látky – ionty, nukleotidy, koenzymy, ...). Velkou výhodou těchto technik je možnost jejich přímého spojení s *hmotnostní spektrometrickou detekcí* jako rychlou, selektivní, kvalitativní i kvantitativní metodou s nízkým limitem detekce a s možností identifikace jednotlivých metabolitů. Jinou používanou metodou je *nukleární magnetická rezonance* (nuclear magnetic resonance, NMR). Vzhledem k obtížnému online spojení této metody se separačními technikami a k nižší mezi detekce je používána spíše pro strukturní analýzu již separovaných metabolitů nebo pro metabolic fingerprinting. Naopak její nespornou výhodou je možnost měření *in vivo*. Obě zmíněné metody jsou schopny pracovat i s radioaktivními izotopy. Toho se využívá například pro studium metabolických drah, kdy je vybraná látka před vstupem do buňky či organismu označena (*isotope labelling*) vhodným izotopem (^2H , ^{13}C , ^{15}N) a tak lze sledovat metabolické cesty jednotlivých molekul. Je-li izotop použitý ke značení radioaktivní, lze k jeho určení navíc použít emitované záření [8, 10].

1.4 Metody zpracování výsledků

Množství výsledků, které produkují metabolomické studie, je nutno efektivně zpracovat, interpretovat, prezentovat a archivovat. K tomuto účelu nám slouží *bioinformatika*. K řešení problémů využívá množství statistických metod, vizualizačních softwarových programů, internetových databází apod.

Data získaná metabolomickými studiemi mívají obvykle tvar spekter (hmotnostních, NMR) seřazených v časových bodech (dle separační metody – GC, HPLC, CE), to vše je násobeno počtem analýz a počtem analyzovaných vzorků – řečí matematiky *multidimensionální vektory*. Tato data jsou značně heterogenní, rozprostřená a často obsahují redundantní a znečištěné části. Nutností je proto data *extrahovat*, v praxi to znamená vytvoření chromatogramů (elektroforeogramů), identifikaci a popis píků (retence, plocha, charakteristiky účinnosti separace, ...), jejich přiřazení k jednotlivým metabolitům apod. Jako pomocný nástroj zde slouží software, jež bývá dodáván jako součást k ovládání moderních instrumentálních přístrojů nebo jako zvláštní aplikace – MatLab (The MathWorks, Natick, MA), XCMS Analyte Profiler (Siuzdak, Scripps Research Institute, San Diego, CA) či MZmine (<http://mzmine.sourceforge.net>).

Takto upravená data jsou připravena pro statistickou analýzu, jejíž úkolem je pak z těchto dat získat co možná nejvíce relevantních informací – jejich porovnávání, hodnocení důležitosti, hledání významných logických vztahů a závislostí apod. K tomuto účelu jsou určeny metody vícerozměrné statistické analýzy – *analýza hlavních komponent* (principal component analysis, PCA), *faktorová analýza* (factor analysis, FA), *shluková analýza* (cluster analysis, CA), *diskriminační analýza* (discriminating analysis, DA) a mnohé jiné [8].

Mezi vědecké časopisy zabývající se touto problematikou patří např. Applied Bioinformatics, Bioinformatics, BMC Bioinformatics, Briefings in Bioinformatics, In Silico Biology, Journal of Bioinformatics nebo Biology and Computational Biology.

1.5 Praktické možnosti využití metabolomiky

Metabolomika jako věda původně vznikla jako komplementární k transkriptomice a proteomice (postgenomická éra), avšak oproti předešlým poskytuje mnohé výhody:

- řádově menší počet metabolitů oproti počtu genů nebo proteinů
- měnící se koncentrace metabolitů během života buňky (reakce na podněty)
- metabolom je „konečný produkt“ genové exprese, lépe proto odráží funkční úroveň buňky (změny v metabolomu jsou vzhledem k proteomice a transkriptomice zesíleny)
- metabolické toky nejsou regulovány pouze genovou expresí, ale také environmentálními stresy
- odhaduje se, že metabolomické experimenty stojí dvakrát až třikrát méně než transkriptomické a proteomické [5, 6]

V současnosti se metabolomikou zabývá široké spektrum vědců. Prvořadým cílem bylo *celkové zmapování metabolických drah*, nejprve nejjednodušších organismů (bakterie [11], kvasinky [12]), poté rostlinného materiálu (sojové boby [13], *Arabidopsis* [14], brambory [15]) a nakonec i složitých živočišných organismů, člověka nevyjímaje.

Následuje množství aplikací v *systémové biologii* (spojení mezi genotypem a fenotypem, porozumění signálů v buněčném metabolismu, vlastní mechanismus metabolické organizace) [2, 16]. Za další aplikace lze považovat metabolomické *simulace a modelování* [17].

Nemalá část metabolomiky se zabývá výzkumem v oblasti lidského zdraví. Základem je detailní znalost všech normálních metabolických drah a pochopení jejich provázanosti [18]. V první řadě se velmi rozvíjejí aplikace zaměřené na včasnější a přesnější *diagnostiku nejrůznějších chorob*. Výzkum je nyní zaměřen především na hledání konkrétního jednotlivého nebo malého souboru metabolitů (*tzv. markerů*), které by mohly poukazovat na *konkrétní onemocnění* (autismus, Huntingtonova či Alzheimerova choroba). Objevují se i první diagnostické testy založené na metabolitech (např. firma Metabolon z Research Triangle Park v Severní Karolíně vyvíjí diagnostiku amyotrofické laterální sklerózy (ALS), zvané též Lou-Gehrigův syndrom, pro který zatím neexistují průkazné krevní testy, bylo nalezeno 13 látek, které se u pacientů s ALS pravidelně vyskytovaly ve vysokých koncentracích) [19].

Další již vyvinuté metody metabolického profilování se týkají například identifikace biomarkerů *akutní myokardiální ischemie* HPLC/MS analýzou aminokyselin a sacharidů v krevní plazmě [20], včasná identifikace *akutního koronárního syndromu* analýzou několika vysoce specifických srdečních enzymů [21], ale i studia *rakoviny* – od komplexní diagnostiky [22], přes sledování progresu a kontroly léčby [23], po klasifikaci jednotlivých druhů nádorů [24]. Pomocí GC/MS byla studována korelace přítomnosti některých esterů mastných kyselin s jaterní dysfunkcí [25]. Rutinní je rovněž mapování změn v lidském metabolomu při vystavení infekčnímu onemocnění, například dynamika cytomegaloviru. Metodou HPLC/MS/MS jsou zaznamenávány změny v glykolýze, citrátovém cyklu a biosyntéze pyrimidinů [26].

Metabolomické přístupy jsou používány již delší dobu například pro odhalování *dědičných metabolických poruch*. Jedná se o deficit enzymu, jeho aktivátoru, transportního proteinu, ale základní příčina může být i na úrovni DNA. Důsledkem pak může být hromadění substrátu a (nebo) nedostatek produktů v metabolických drahách, což následně vyúsťuje ke tkáňovým nebo systémovým projevům. Konkrétně se jedná například o *fenylketonurii*, *tyrosinemii*, *porfyrii* apod. Stanovovanými látkami jsou například *aminokyseliny*, *disulfidy*, *glykogen*, *kyselina močová* či *sfingolipidy* a to v *krvi*, *moči*, *likvoru*, ale i v *plodové vodě*, *erythrocytech* nebo *tkáních* [27–29].

Po včasné diagnostice přecházíme k léčbě onemocnění, přičemž velmi důležité jsou v tomto případě informace o *vstřebávání*, *rozdělení v organismu*, *mechanismu účinku*, *biodegradaci* a *vylučování* použitých medikamentů. Velmi podobná situace je i při zjišťování účinku xenobiotik a při intoxikacích [30–32].

Jinou oblastí je studium *výživy (nutriomika)*. Pozorován je komplexní vliv mnoha faktorů (nejen příjem potravy, ale i vliv chování, životního prostředí, medicíny, genetické výbavy, věku a tělesných proporcí, ...) na tzv. *nutriční fenotyp* (celková suma možných endogenních i exogenních vlivů) [33–35].

Metabolomika jistě nabídne výzkumným pracovníkům do budoucna ještě komplexnější pohled na složité změny probíhající ve stovkách molekul při nástupu a průběhu chorob, což rozhodně dále rozšíří naše znalosti v oblasti medicíny. Vznikají *databáze metabolitů*, které jsou neustále aktualizovány, např. *HMDM* (Human Metabolome DataBase, přístupná z <http://www.hmdb.ca>) [36]. Ucelený přehled současných internetových odkazů souvisejících s metabolomikou založenou na hmotnostní spektrometrii lze nalézt v článku [37].

2. ZÁKLADY POUŽITÉ INSTRUMENTACE

2.1 Plynová chromatografie

2.1.1 Teoretické základy metody a instrumentace

Plynová chromatografie (gas chromatography, GC) je metoda instrumentální chemické analýzy pro separaci a stanovení především plyných a těkavých kapalných látek. Své označení nese podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Princip metody jako takové spočívá v rovnovážném rozdělení analytu mezi *mobilní* a *stacionární* fázi na základě *adsorpce a rozpouštění*. Látky se dělí dle *rozdílů v těkavosti a ve struktuře*. Jako mobilní fáze se užívají permanentní plyny, například vodík, helium, dusík nebo argon. Zdrojem jejího pohybu je tlakový spád. Stacionární fáze má rozhodující vliv na selektivitu separace. V principu existují dvě možná uspořádání kolon, podle převládající významnosti mechanismu retence. Jako sorbenty se používají například různé formy grafitizovaného uhlíku, uhlíková i zeolitová molekulová síta, různé polymery či látky na bázi silikagelu nebo oxidu hlinitého. Pro rozpouštěcí mechanismus retence jsou to alifatické uhlovodíky a polymery na bázi dimethylsiloxanu (nepolární stacionární fáze) nebo ethylenglykolu (polární stacionární fáze). Další možností jsou směsné fáze, které však slouží spíše pro speciální účely [10].

Popsaný děj je sledován na konci kolony měřícím zařízením, jehož signál je úměrný množství analytu a citlivosti (ideálním výstupem by byla křivka – pík – odpovídající normálnímu Gaussovu rozdělení). Jako detektory lze použít například tepelně vodivostní, plamenově ionizační, detektor elektronového záchytu, ale také hmotnostní či infračervený spektrometr [10, 38].

Separaci je možno charakterizovat několika veličinami. *Retenční čas* (t_R) je doba, za kterou látka od nástřiku doputuje kolonou k detektoru. *Mrtvý čas* (t_M) je doba, za kterou doputuje k detektoru látka, která se na koloně vůbec nezadržuje. *Redukovaný retenční čas* (t'_R) je pak doba, kterou látka stráví během putování kolonou ve stacionární fázi (lze ji vyjádřit rozdílem předchozích). K popsaným časům jsou dále definovány příslušné objemy (odpovídají objemům kolonou za daný čas proteklé mobilní fáze).

Důležitým měřítkem pro porovnání retence jednotlivých látek je *kapacitní faktor* (k), jenž je dán poměrem t'_R/t_M . Čím je jeho hodnota vyšší, tím je látka stacionární fází silněji zachycována. Jinou charakteristikou systému je *selektivita* (α) – schopnost separace

dvou látek, závisí na specifických interakcích analyt-stacionární fáze určených jejich funkčními skupinami. Je dána poměrem kapacitních faktorů (retenčních časů), neinformuje však o kvalitě rozdělení. Ta je dána *rozlišením* (R), zahrnujícím mimo retenční čas i šířku píků (w_h – šířka píku v polovině jeho výšky, w_b – šířka píku na základní linii) – rovnice 1. Za dostatečně rozdělené považujeme analyty, jejichž rozlišení je větší nebo rovno 1,5.

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (1)$$

Účinnost chromatografické separace klesá s rostoucí rychlostí rozmývání zón separovaných analytů. Kinetiku procesu rozmývání zón popisuje například teorie chromatografického patra (Martin a Synge, 1941), vycházející z diskontinuální podobnosti s roztřepáváním, nebo van Deemterova dynamická teorie (van Deemter, 1956), vycházející z matematického zpracování předešlé teorie, binomické rozdělení je po aproximaci na nekonečný počet kroků při roztřepávání nahrazeno normálním Gaussovým.

Účinnost v GC definujeme pomocí *počtu teoretických pater* (n , část kolony, kde dochází k ustálení rovnováhy – rovnice 2). Při posuzování této veličiny (je shodná pro obě výše uvedené teorie) je však nutno mít na paměti, že popisuje chování celého chromatografického systému (injekce, teplota průtoky, ...) a je ovlivněna retencí píku použitého k výpočtu. Při porovnávání je proto nutno brát v potaz všechny podmínky jako celek.

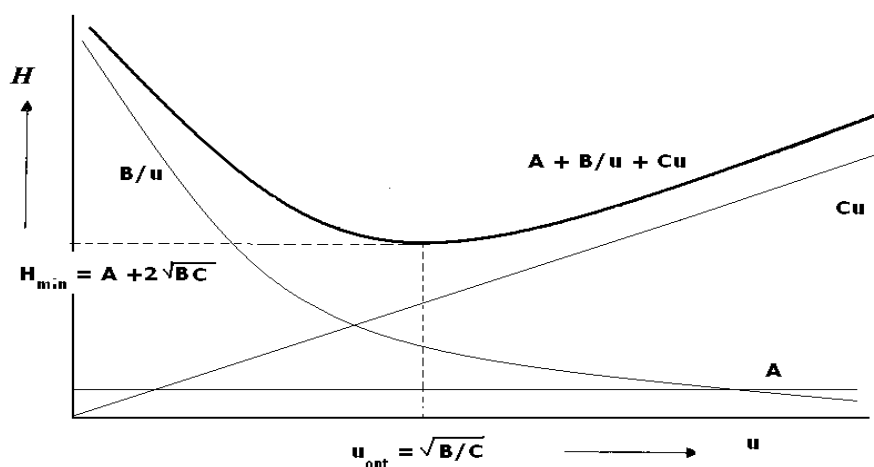
$$n = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (2)$$

Kinetické aspekty analýzy vyjadřuje tzv. *van Deemterova rovnice* (3), kde H je *výškový ekvivalent teoretického patra* (délka kolony/počet teoretických pater), \bar{u} lineární rychlost mobilní fáze, A koeficient odpovídající *vířivé difuzi* v mobilní fázi, B koeficient odpovídající *molekulární difuzi* v mobilní fázi a C koeficient příspěvku *proti přenosu hmoty* v mobilní i stacionární fázi.

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (3)$$

Vířivá difuze souvisí především s nehomogenitami ve stacionární fázi, v případě dnes převážně používaných kapilárních kolon ji lze zanedbat. Molekulární difuzi lze charakterizovat pomocí Fickových zákonů a má souvislost s koncentračními gradienty v koloně. Odpor proti přenosu hmoty je určován difuzí analytu přes fázové rozhraní

a závisí pro kapilární kolony na tloušťce stacionární fáze a kapacitním faktoru. Význam jednotlivých veličin je zřejmý z obr. 3, z praktického hlediska se však často volí průtoky o málo vyšší, než je optimální hodnota [10, 39–42].



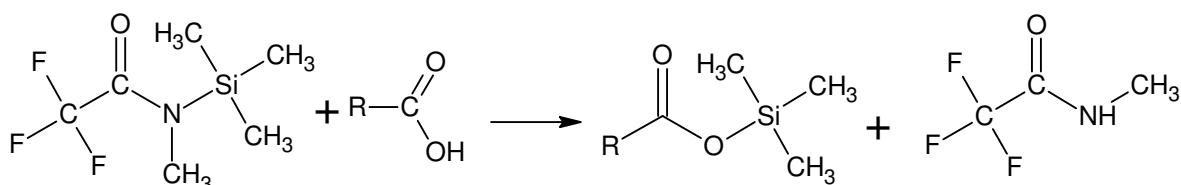
Obr. 3. Závislost výšky teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti (\bar{u}), převzato z [41]

2.1.2 Derivatizace

Derivatizace je postup měnící fyzikální a chemické vlastnosti analytů umožňující stanovit, například pomocí plynové chromatografie, i látky klasickými postupy obtížně stanovitelné, v tomto případě termolabilní nebo málo těkavé.

Derivatizací se v GC rozumí nahrazení reaktivních atomů vodíku ve funkčních skupinách organických látek (jako jsou například alkoholy, fenoly, glykoly, karboxylové kyseliny, hydroxykyseliny, aminokyseliny, aminy, amidy nebo thioly) jinou skupinou podle typu vybrané derivatizační techniky. S ohledem na vlastnosti analytů a zvolenou techniku detekce se používají např. silylace, acylace, esterifikace, alkylace, cyklizace, zavedení halogenu (např. pro detektor elektronového záchytu) nebo kombinace některých z těchto metod. Reakce by měla být rychlá, s kvantitativním průběhem a minimem vedlejších produktů. Vzniklé deriváty mají mít v porovnání s původními sloučeninami nižší polaritu (v GC se nejčastěji používá nepolární stacionární fáze), vyšší těkavost a termickou stabilitu. Tímto dochází k omezení nespecifických interakcí v koloně a ke snížení detekčního limitu, také lze takto chránit nestabilní sloučeniny. Hlavní nevýhodou je však zavedení operace navíc, což se projeví nejen na délce prováděné analýzy, ale také na její ceně. Zvyšuje se i pravděpodobnost, že se dopustíme nějaké chyby.

V současné době je často používanou derivatizační metodou silylace, použitelná pro řadu sloučenin obsahujících ve své funkční skupině proton. Výtěžnost silylace klesá v pořadí: alkoholy > fenoly > karboxylové kyseliny > aminy > amidy. Dále je také ovlivněna polohou funkčních skupin – např. u alkoholů (stejně také u aminů) klesá reaktivita od primárních k terciárním. Jako silylační činidla se používají například trimethylsiloxan, trimethylsilyldiethylamin, N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid, N-trimethylsilylimidazol, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (obr. 4) a jiné [43]. Konkrétní postupy se pro jednotlivé látky, matrice a především pro účel analýz liší, zejména v množství a koncentraci derivatizačního činidla (či činidel) a v délce jejich působení, proto je i zde důležitou součástí nalezení optimálních podmínek [9, 44].



Obr. 4. Derivatizace reakcí s N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamidem (MSTFA)

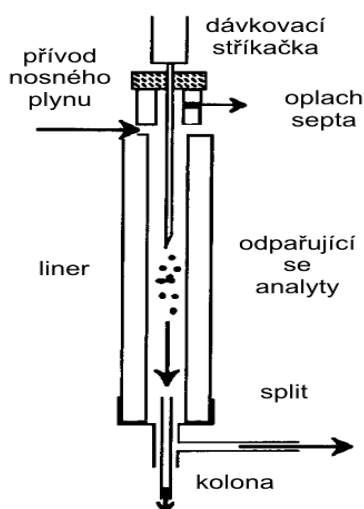
2.1.3 Dávkování vzorků

Velká pozornost je při plynově chromatografické analýze věnována rovněž procesu vstupu analyzovaného vzorku na kolonu. Nutno brát v úvahu skupenství vzorku, jeho množství a koncentraci i povahu analytů, zejména pak bod varu. V této fázi dochází k největším chybám, ať už z důvodu netěsností nebo špatného nastavení podmínek. Opakovatelnost a reprodukovatelnost dávkování lze výrazně zvýšit za použití automatických dávkovačů, které minimalizují nejrůznější odchylky například v rychlosti dávkování a přesnosti dávkovaných objemů.

Nejjednodušší situace nastává při analýzách na náplňových kolonách. Dávkovaný roztok je možno *nastříknout přímo* do vyhřívané kolony, kde je už dále unášen mobilní fází. Plyné vzorky je možno s výhodou dávkovat také pomocí *dávkovací smyčky*. Ta se naplní vzorkem plynu, který je z ní posléze vyfouknut nosným plynem na kolonu.

Složitější situace nastává při dávkování vzorků na kapilární kolonu, dávkovat nelze zpravidla přímo (kapilární kolony mají malé průřezy), používají se *injektory*. Klasický způsob využívá tzv. *split/splitless injektoru* (obr. 5). Konstrukčně se jedná o vyhřívaný kovový blok (udržení konstantní teploty) do něhož se pomocí speciální injekční stříkačky nadávkuje požadované množství kapaliny nebo plynu. Kapalný vzorek je okamžitě

zplyněn a proudem nosného plynu transportován na kolonu. Jak napovídá samotný název, tento injektor může pracovat ve dvou modech. *Split injekce* používá dělič toku. Po odpaření se dostává dle tzv. split poměru na kolonu pouze část vzorku, zbytek je odfouknut děličem do odpadu. Tento způsob vykazuje nízkou opakovatelnost a zkreslení původního složení z důvodů nestejně těkavosti všech složek původní směsi a nedokonalého smísení složek s nosným plynem. Zlepšení vlastností lze dosáhnout použitím vhodného *lineru* (výplň injektoru různých tvarů a objemů, nejčastěji ze skelné vaty) a správným způsobem dávkování (rychlost a objem nástřiku, horká jehla, přítomnost vzduchu v jehle, ...). Z těchto důvodů se používá zejména pro kvalitativní určení směsi vyšších koncentrací, která může být i znečištěná.



Obr. 5. Schéma split/splitless injektoru, upraveno podle [39]

Při *splitless injekci* se naopak na kolonu dostane téměř celé nadávkované množství. Vypařený vzorek rozpuštěný ve velmi těkavém rozpouštědle (hexan, methanol, ...) je pomalu transportován na chladný začátek kolony, kde se fokusuje. Po době dané vlastnostmi rozpouštědla a analytů, objemem nástřikového prostoru, nastřikovanému objemu, nástřikové rychlosti a průtokem nosného plynu (teoreticky 1,5–2násobek času potřebného k protečení nosného plynu nástřikovým prostorem [45]) je otevřen split a vyfouknuty zbytkové páry, zároveň je spuštěn teplotní program kolony, začíná vlastní separace. Oproti výše uvedenému způsobu pozorujeme pokles limitu detekce jednotlivých látek i vzrůst opakovatelnosti analýz; používá se tedy pro kvantitativní analýzu zředěných relativně čistých roztoků.

Kromě těchto zřejmě nejpoužívanějších metod existují i další techniky vnesení vzorku na kapilární kolonu. *Přímá injekce* (direct injection) dovoluje vpravení velmi

malého množství vzorku (méně než 1 μ l) do skleněného lineru, odkud jsou vzniklé páry vedeny přímo na kolonu. *On-column injekce* znamená zavedení vzorku přímo na začátek kolony, což vyžaduje velmi tenkou jehlu (nebo jinou kapiláru), jež jsme schopni zavést do analytické kolony, používají se i větší průtoky nosného plynu. Výhodou těchto metod je lepší kvantifikace, malé riziko degradace analytů (užití pro méně stabilní látky) a diskriminace vzorku (užití pro stopovou analýzu). Oproti tomu může dojít ke kontaminaci kolony netěkavými látkami, existuje i riziko paměťových efektů a zpětného úniku analytů, pokud je při rychlém zvýšení teploty překročen tlak nosného plynu. [39, 40, 42, 45].

2.1.4 Nástřik velkého objemu vzorku

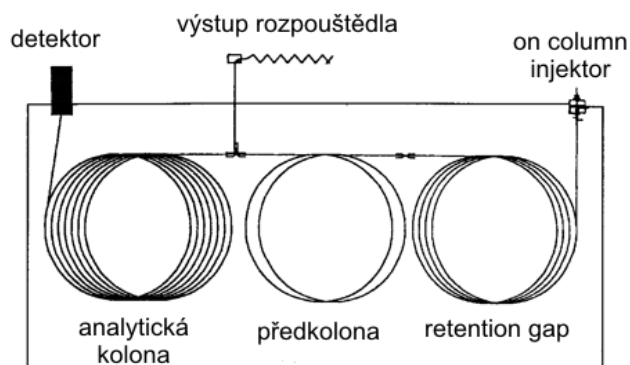
Běžná metoda split a splitless injekce je použitelná s poměrně malými nástřiky, jen 0,1–2 μ l kapaliny a 50–1000 μ l plynu, pro on-column ještě méně. Zavedením většího objemu vzorku (dle použité techniky až několik mililitrů) zvýšíme i absolutní množství zkoumaných analytů, čímž snížíme limit jejich detekce (*large volume injection, LVI*). Další výhodou je možnost vynechání další prekoncentrační procedury, naopak umožňuje online spojení například s extrakcí nebo mikroextrakcí pevnou fází nebo může sloužit jako interface pro multidimensionální chromatografické metody (GC \times GC, HPLC \times GC).

Všeobecným problémem při nástřiku velkého objemu málo koncentrovaných látek je odstranění přebytečného rozpouštědla před analytickou kolonou. Nejjednodušším používaným způsobem je aplikace *tlakového pulsu* (0,5–2 min) spojeného s větším průtokem nosného plynu (8–9 ml/min) během injekce, což umožňuje dávkovat okolo 5–10 μ l kapaliny (*pulsed splitless injection, PSI*). Tento puls umožní rychlejší transfer látek, čímž taktéž zabraňuje jejich teplotní degradaci. Dnes je již standardní součástí přístrojů.

Jiný přístup je založen na zachycení a následném uvolnění analytů (*purge-and-trap metody*) pomocí *kryofokusace* nebo *adsorpce* či jejich kombinací a to buď v dávkovací smyčce, v předkoloně nebo i v koloně samotné.

Jeden z prvních navržených LVI-inletů (Vogt et al., 1979) umožňuje odpaření rozpouštědla v inletu samotném – *programmable temperature vaporizing, PTV* – pomocí kontrolované teploty během nástřiku (viz. kap. 2.1.5). Později (Grob et al., 1985) byla představena metoda *cool on-column* injekce (COC, obr. 6). Po inletu následuje nejprve tzv. *retention gap*, část kolony bez stacionární fáze s délkou dle objemu vzorku. Zde nastříknutý vzorek kondenzuje a vytváří tenký film pseudostacionární fáze, kde se analyty

zakoncentrují. Vypařující se rozpouštědlo je pomocí nosného plynu vedeno do odpadu, vše při teplotě varu užitého solventu korigované na použitý tlak. Po odpaření 90–95 % je výstup uzavřen a začíná teplotní program kolony. Dále bývá někdy zařazena ještě *předkolona* sloužící pro zakoncentrování vysoce těkavých analytů, poté následuje vlastní separační kolona [39, 40, 45–47].

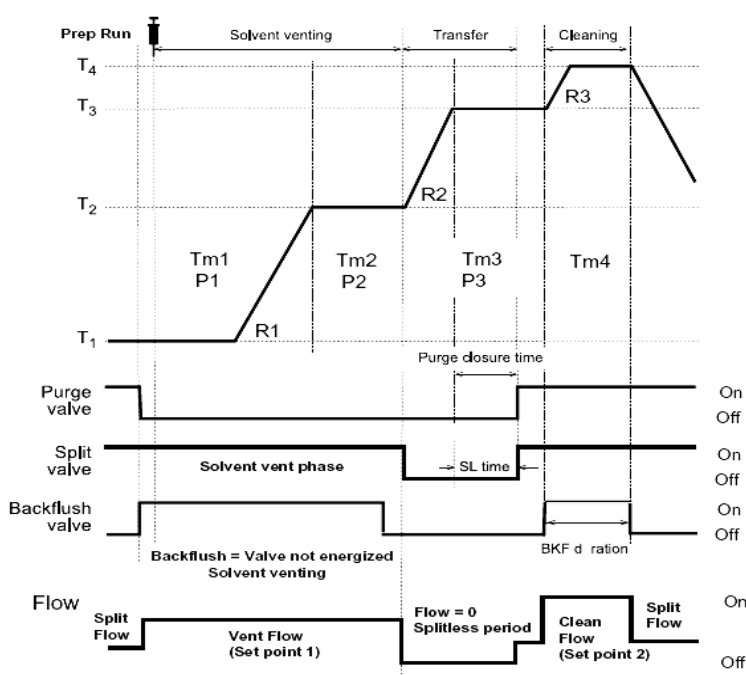


Obr. 6. Schéma plynového chromatografu s on-column injekcí, upraveno podle [40]

Pro nejrůznější aplikace se díky nevýhodám a omezením předešlých metod dále vyvíjejí nové. *Direct sample introduction* (DSI, Amirav et al., 1997) je metoda zavedení kapalného nebo i pevného vzorku ve speciální mikrovialce přímo do inletu konstrukčně podobnému PTV pomocí autosampleru nebo manuálně ovládané sondy. Po zavedení je spuštěn teplotní splitless program a jakmile analýza skončí, je užitá mikrovialka vyjmuta a nahrazena jinou s dalším vzorkem. Výhodou metody je možnost analyzovat i velmi znečištěné vzorky bez rizika kontaminace vložky inletu, nevýhodami pak omezené dávkované množství (jen asi 30 μl dle velikosti mikrovialky), delší doba eliminace rozpouštědla (malý povrch) a nemožnost kryofokusace. Metoda byla použita například pro stanovení reziduí pesticidů a herbicidů v potravinách a farmak ve vodách.

Jiným příkladem může být *at-column* injekce (Kurano et al., 2000). K regulaci vypařování nadbytečného rozpouštědla je v tomto případě používán tlak jeho par. Klíčovým faktorem tohoto způsobu dávkování je pozitivní teplotní gradient injektor/kolona během nástřiku (injektor pod a kolona nad korigovaným bodem varu rozpouštědla). Nastříknutý kapalný vzorek stéká chladným linerem na deaktivovaný začátek kolony (retention gap), kde se začíná odpařovat. Vzniklé páry tlačí nadbytek kapaliny zpět do lineru, kde jsou splitterem odsáty. Jakmile se zde ochladí, tlak par klesne a vzorek může opět klesat; proces se opakuje dokud je přítomno rozpouštědlo, pak dojde k zahřátí inletu a tím k transferu na analytickou kolonu. Metoda byla použita například pro stanovení dioxinů v lidském séru či fenolů ve vodách.

- za otevřeného splitteru dochází při teplotě T_2 (o 5–10 °C nižší než bod varu použitého rozpouštědla) k eliminaci solventu; nevýhodou je současná eliminace vysoce těkavých analytů; čas, po který dochází k eliminaci rozpouštědla, bývá založen na *zkušenostech* nebo je na splitové linii zabudován *solvent-detektor* (nejčastěji teplotně vodivostní)
- zvýšení objemu vzorku je prováděno v zásadě dvěma způsoby: nastříknutím *dalšího podílu* (multiple injection) po odpaření rozpouštědla nebo užitím jediného velkého *nástřiku kontrolovanou rychlostí* (at once speed-controlled injection) přímo při teplotě T_2 (teoretická možnost nástřiku jakéhokoliv množství, jestliže se rychlost vnášení vzorku rovná rychlosti odpařování solventu)
- následuje rychlý ohřev na teplotu T_3 (dle charakteru stanovovaných analytů), při níž dochází k uvolnění vlastních analytů z inletu a k jejich transferu na kolonu, v této chvíli je také spuštěn teplotní program kolony
- poslední fází bývá při ještě vyšší teplotě za velkého průtoku čištění injektoru a poté ochlazení znovu na T_1 pro přípravu na další nástřik



Obr. 8. Fáze programování PTV injektoru, převzato z [48]

Optimalizace podmínek PTV injektoru může být v jistých případech dosti složitá a zdlouhavá, což je dáno zejména velkým množstvím volitelných parametrů. Přesto je se svými výhodami stále často používán pro stopovou analýzu organických látek (*analýza*

životního prostředí [46, 47, 49–52], metabolomika a klinické aplikace [53–55]), ale i vodných vzorků (např. [57]).

Prvním z důležitých optimalizačních kroků je výběr *výplně lineru*, který je závislý zejména na povaze stanovovaných analytů a zvyšuje množství, které lze nastříknout. Avšak může mít i negativní vlivy, existuje možnost degradace analytů, možnost jejich velmi silné vazby na výplň a teplotní omezení desorpce. Užívají se skelná vlákna, organické polymery či uhlíkové anorganické materiály, jen výjimečně je použit prázdný liner.

Na výběr výplně navazuje *volba solventu*, opět dle povahy analytů – uhlovodíky (toluen, hexan, cyklohexan, isooktan), ethery (methyl-terc.butylether) či karboxyderiváty (ethylacetát, acetonitril). Dle použitého rozpouštědla se poté volí další hodnoty: *teplota nástřiku, teplota a čas vypařování solventu, teplota a čas transferu analytů na kolonu, rychlost vzrůstu těchto teplot, tlak a průtok nosného plynu během jednotlivých fází, použití backflushu, ...*

Na všech výše uvedených hodnotách je pak závislé množství vzorku, které lze nastříknout v at once módu. Pro speed-controlled injekci byla vypracována teoretická rovnice (Staniewski et al., 1992) sumarizující nasycení nosného plynu solventem (rovnice 4), která dosahuje dobré shody s naměřenými údaji:

$$V_{\max}^{\text{inj}} = V^{\text{el}} = \frac{M \cdot p_a}{\rho \cdot R \cdot T_o} \cdot \frac{p_o}{p_i} \cdot V_o^t \quad (4)$$

V rovnici (4) představuje V^{inj} rychlost kontrolované injekce, V^{el} rychlost eliminace solventu, M molární hmotnost solventu, p_a parciální tlak solventu, ρ hustotu solventu, R molární plynovou konstantu, T_o a p_o teplotu a tlak na výstupu a V_o celkovou rychlost nosného plynu na výstupu [39, 46, 47].

Jednou z komplexních optimalizačních procedur, jež lze použít pro PTV injektor, je statistická matematická metoda založená na plánované kontrolované změně jednotlivých parametrů – *design of experiment* (DOE), viz kap. 3.2.

2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) je fyzikálně chemická metoda instrumentální analýzy sloužící ke zjišťování struktury látek. Molekuly analyzované látky jsou nejprve ionizovány, čímž dochází k jejich rozpadu na fragmenty, které jsou pak rozděleny podle poměru hmotnost/náboj (m/z) a následně detekovány. Molekuly se stejným sumárním vzorcem lišící se strukturou také jinak fragmentují a mají tedy i rozdílná hmotnostní spektra. Metodou lze zjistit velmi přesně molekulovou hmotnost látky (z tohoto spočítat její elementární složení), dle charakteristických hodnot m/z lze rozpoznat i některé funkční skupiny, výhodou je možnost sledovat poměr izotopů ve vzorku. Kromě strukturní analýzy se této metody využívá i při studiu povrchů, velmi rychle probíhajících dějů (hoření, exploze), či fyzikálně-chemických konstant (ionizační energie, protonová afinita) [10].

2.2.1 Iontový zdroj

Prvním krokem hmotnostní analýzy je ionizace molekul, k čemuž dochází v *iontovém zdroji*. Existuje mnoho různých metod ionizace (dle účelu analýzy, velikosti molekuly, předřazené separační techniky, ...); pro běžnou strukturní analýzu malých organických molekul je zřejmě nejužívanější *ionizace elektronem* (electron ionization, EI). Elektrony emitované žhaveným kovovým vláknem, které proletí dostatečně blízko sledované molekuly jí předají část své energie, což způsobí vznik tzv. molekulárního iontu v podobě kation-radikálu (5). Vzhledem k přebytku předané energie (nejčastěji používaná energie elektronů je 70 eV) se tento molekulární iont ihned rozpadá na fragmenty (energie organických vazeb se pohybuje okolo 10 eV), ty mohou dále fragmentovat. Navíc může docházet k různým přesmykům, či ztrátám neutrálních částic (6, 7). Výhodou je, že pro použité parametry dochází téměř výhradně ke tvorbě jednou nabitých částic, čímž se značně snižuje složitost interpretace spektra.



Vhodným doplňkem pro ionizaci elektronem je *chemická ionizace* (chemical ionization, CI). Ionizaci analytu způsobují molekuly plynu (nejčastěji methan, amoniak, isobutan) ionizované elektronem. V porovnání s předešlou metodou je předaná energie

menší, nedochází proto k tak rozsáhlé fragmentaci a lze ionizovat i látky s větší molekulovou hmotností, oproti tomu však vznikají i adukty s ionizačním plynem znesnadňující interpretaci.

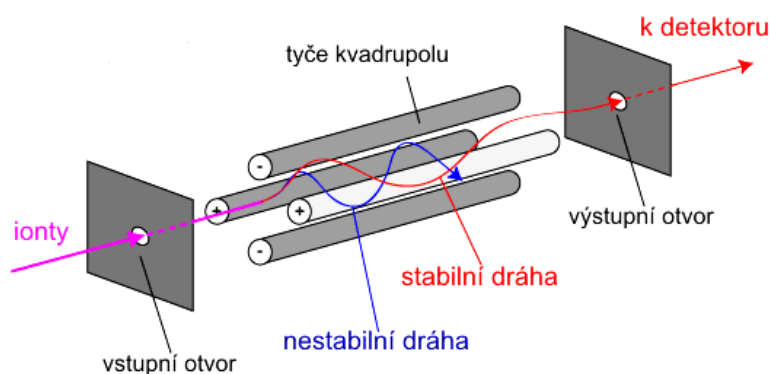
Pro další aplikace byly vyvinuty jiné způsoby ionizace, např. *ionizace polem* (field ionization, FI) nebo *desorpce polem* (field desorption, FD) z kondenzované fáze. Pro velké molekuly (peptidy, proteiny) *ionizace rychlými atomy* (fast atom bombardement, FAB) či *rychlými ionty* (fast ion bombardement, FIB) nebo *desorpce laserem za asistence matrice* (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) a další. Zvláštní postavení zde mají techniky vytvořené pro spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforezou (HPLC/MS, CE/MS) – na rozdíl od předešlých metod pracujících za velmi nízkého tlaku, tyto používají atmosferický tlak – *elektrosprej* (electrospray ionization, ESI) a *chemická ionizace za atmosférického tlaku* (atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Novinkou je metoda přímého vstupu z atmosférického tlaku (*direct analysis at real time, DART*), umožňující vsunout vzorek do prostoru iontového zdroje bez evakuace, což je vhodné zejména pro studium velmi rychle probíhajících dějů [58–60].

2.2.2 Analyzátory iontů

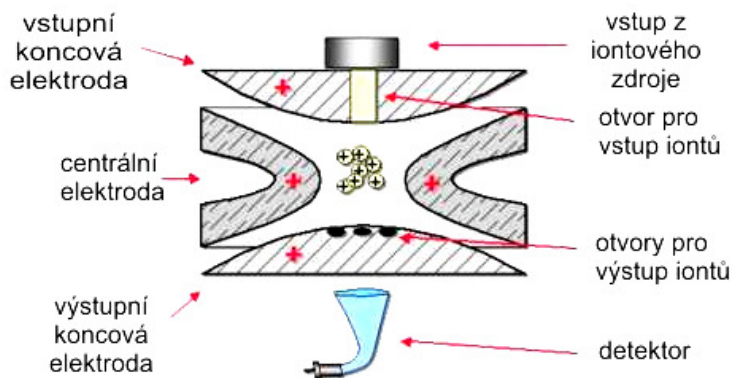
Z prostředí iontového zdroje jsou vzniklé ionty nejčastěji pomocnou elektrodou (repelerem) vypuzeny do *separátoru (analyzátoru) iontů*. Ten má za úkol ionty rozdělit podle poměru m/z . Jestliže použitá technika ionizace rozhoduje o citlivosti analýzy, technika separace pak o její přesnosti. I zde existuje několik různých metod, převážně založených na chování elektricky nabitě částice v elektromagnetickém poli. Nejstarší tzv. *sektorové přístroje* využívaly zakřivení dráhy letící částice ve stacionárním poli. Dnes běžně užívaný separátor *kvadrupól* (quadrupole, Q) využívá rychle se měnícího elektromagnetického pole tvořeného mezi čtyřmi tyčemi. Pole obsahuje střídavou a stálou složku. Při vhodném nastavení procházejí analyzátozem pouze ionty o přesné hodnotě m/z , dráhy ostatních jsou nestabilní a jsou pohlceny na tyčích kvadrupólu (tj. chová se jako filtr). Pro záznam spektra tedy probíhá sken, kdy kvadrupólový filtr postupně propouští ionty o definované hodnotě m/z (viz obr. 9). Může také pracovat v tzv. *RF módu*. V tomto případě projdou všechny ionty – použití jako *kolizní cela* nebo *iontový vodič*. Kvadrupól má sice nižší rozlišení (rozlišení – FWHM – full width at half maximum – se vypočte jako poměr m/z maxima píku ku šířce píku ve výšce poloviny maxima $\Delta_{1/2}m/z$), které je ale pro

rutinní spojení se separačními technikami postačující, navíc patří mezi levnější. Jako modifikace pak byly navrženy analogicky pracující hexapól či oktapól.

Mezi další používané analyzátoři patří *iontová past*. Konstrukčně se skládá ze dvou koncových (vstupní a výstupní) a jedné středové prstencové elektrody (viz obr. 10). Ionty jsou zde pomocí elektromagnetického pole zachyceny uvnitř pasti a poté s měnícím se polem postupně podle své hodnoty m/z vypuzeny k detektoru. Oproti kvadrupólu má o málo větší rozlišení i skenovací rychlost a může analyzovat větší rozsah hodnot m/z , avšak je dražší, proto se pro spojení se separačními technikami používá méně často. Výhodou je možnost záznamu MS/MS spekter.



Obr. 9. Schéma kvadrupólového analyzátoru, upraveno podle [61]



Obr. 10. Schéma řezu iontovou pastí, upraveno podle [62]

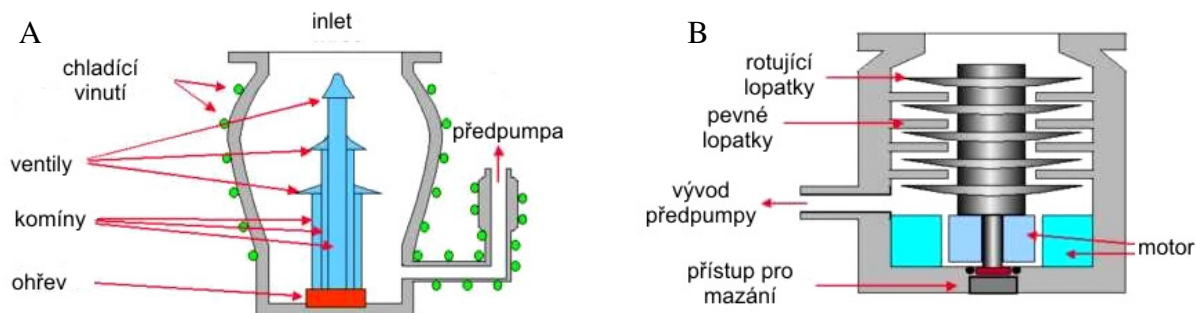
Jiný analyzátor, který je využíván ve spojení se separačními technikami nejméně často, nevyužívá elektromagnetického pole. V tzv. *průletovém analyzátoru* (time of flight, TOF) dochází k rozdělení iontů podle m/z na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje k detektoru. Těžší ionty se po dodání ekvivalentního množství energie pohybují pomaleji než ionty lehčí, proto dorazí do detektoru později. Rozlišení analyzátoru je oproti iontové pasti několikanásobně vyšší, v principu závisí na délce dráhy, kterou ionty v analyzátoru urazí, skenovací rychlost i rozsah m/z jsou, stejně jako cena, také vyšší.

Pro speciální účely byly vyvinuty i jiné iontové zdroje, například *iontová cyklotronová resonance* (ion cyclotron resonance, ICR) nebo *orbitální past* (orbitrap). Pro cyklotronovou resonanci jsou ionty zachyceny v silném magnetickém poli, kde konají složitý kruhový pohyb s frekvencí závislou na m/z . Ionty jsou excitovány a detekován je proud, který při svém pohybu vytvářejí, ten je pak pomocí Fourierovy transformace převeden na hodnotu m/z . Na podobném principu pracuje i orbitální past, s tím rozdílem, že ionty jsou zde zachyceny v nikoli magnetickém, ale statickém elektrickém poli. Rozlišení těchto analyzátorů se může pohybovat až v řádu milionů, jsou tedy schopny rozdělit a zaznamenat hmoty lišící se i jen o jeden elektron (m/z elektronu je 0,000 55).

Poslední součástí hmotnostního spektrometru je detektor pro záznam iontového proudu. K tomu slouží elektronový násobič s diskrétními nebo kontinuální dynodou, eventuálně scintilační fotonásobič. Pro sektorové přístroje je možno použít i detektoru diodového pole [58–60].

2.2.3 Vakuový systém

Aby nedocházelo v prostorách iontového zdroje a analyzátoru k nežádoucím srážkám iontů, je nutno tyto prostory dokonale evakuovat. Z tohoto hlediska se jako nejnáročnější jeví sektorové přístroje, průletový analyzátor a orbitální past. Nejčastěji používané jsou *olejová difusní pumpa* a *turbomolekulární pumpa*. V difusní pumpě (obr. 11A) zahříváný olej stoupá komínou a ventily je rozstříkovan. Strhává s sebou molekuly plynu, které jsou odsáty předpumpou. Je bezúdržbová a tichá, dosažení pracovního tlaku však trvá několik hodin existuje také možnost vniknutí oleje do přístroje. Turbomolekulární pumpa (obr. 11B) je tvořena sérií vhodně tvarovaných pevných a otočných lopatek. Rychlost až 90 000 ot/min odvádí molekuly plynu až k předpumpě. Její výhodou je rychlejší dosažení ještě nižšího pracovního tlaku (až 10^{-6} Pa), avšak má vyšší pořizovací náklady, kratší životnost a hlučnější provoz [10].

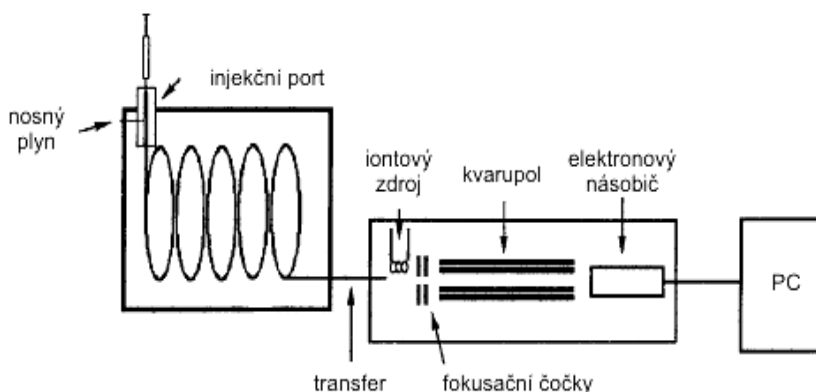


Obr. 11. Schéma olejové difusní pumpy (A) a turbomolekulární pumpy (B), upraveno podle [62]

2.3 Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

2.3.1 Spojení obou metod

Spojení plynové chromatografie jako separační techniky s hmotnostní spektrometrií jako detektorem (obr. 12) je dnes rutinně používáno pro kvalitativní identifikaci i kvantitativní stanovení neznámých sloučenin ve vzorcích z nejrůznějších odvětví od klinických aplikací po analýzu životního prostředí (omezení plynové chromatografie na těkavé, málo polární a teplotně stabilní látky lze kompenzovat vhodnou derivatizací).

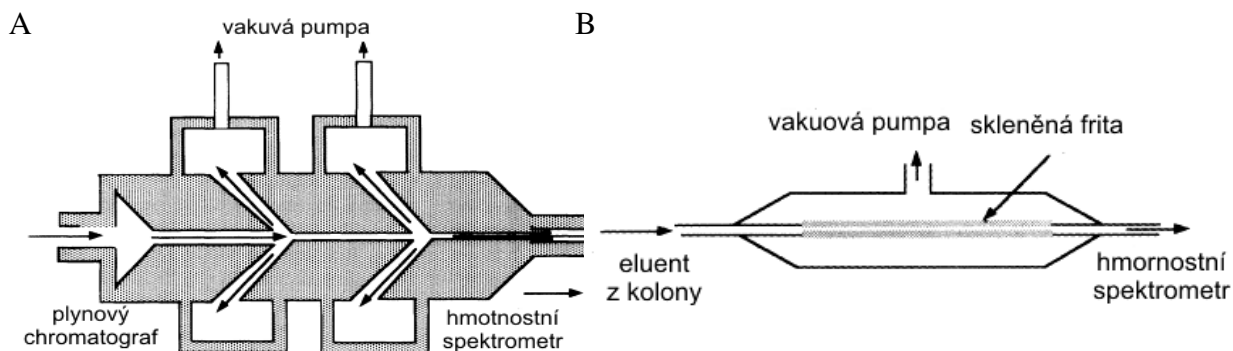


Obr. 12. Schéma GC/MS, upraveno podle [40]

Úskalí metody spočívá ve vlastním propojení obou přístrojů: problém je v rozdílu tlaků a velkém přebytku nosného plynu, který je nutno před zavedením do hmotnostního spektrometru odstranit. Jako řešení byla navržena množství rozhraní tzv. koncentrátorů, například *Ryhageův* (proudový koncentrátor, jet, obr. 13A), pracující na principu odsátí helia jako lehkého nosného plynu přímo za použití postupně se zužujících otvorů, zatímco se předpokládá, že těžší analyty pokračují dále do hmotnostního spektrometru. Tento koncentrátor je spolehlivý, ale vykazuje nízké výtěžky (okolo 25 %), přesto je stále používán ve spojení s náplňovými kolonami, kde jsou vyžadovány vyšší průtoky. Jiný koncentrátor (*Biemanův*, obr. 13B) pracuje na podobném principu. I současné využití je obdobné: nosný plyn je odčerpáván přes skleněnou fritu nebo polytetrafluorethylenovou folii. Toto řešení je schopno pracovat s většími výtěžky, protože zde nedochází k tak velké ztrátě analytů, pracuje však s o něco menšími průtoky nosných plynů.

Většina přístrojů v dnešní době však používá již kapilární kolony (běžné pro GC/MS jsou nepolární o průměru 0,25 mm a délce 30 m) s nižšími průtoky (okolo 1 ml/min). V tomto případě za použití výkonného vakuového systému není nutné zařazovat žádný koncentrátor, kapilární kolona ústí přímo do iontového zdroje. Pro přechod je ale

nutno vyhřívát, aby v jeho prostoru nedocházelo ke kondenzaci analytů a je také nutno zajistit jeho teplotní stabilitu [60, 63].



Obr. 13. Konstrukční řešení Ryhageova (A) a Biemanova (B) koncentrátoru, upraveno podle [63]

2.3.2 Hodnocení výsledků analýzy

Pro kvalitativní určení látky pomocí plynové chromatografie lze použít několik postupů. V principu jsou to metody založené na retenci a metody využívající vlastností samotných analytů. Pro *retenci* (zadržení) jsou to nejčastěji *retenční čas* (t_R , doba, po níž se po injekci analyt eluuje), *korigovaný retenční čas* (t'_R , retenční čas zkrácený o dobu eluce látky, jež se při daných podmínkách na analytické koloně nezadržuje), či nejlépe *retenční indexy*. Retenční index (RI, Kovats, 1958) je charakteristika dané látky (retenční čas normalizovaný dle vztahu (8), kde n značí počet uhlíkových atomů příslušného n -alkanu), která celkově zhodnocuje procesy probíhající při separaci, je proto reprodukovatelnější a je za daných podmínek pro danou látku konstantou. Jako standard pro určování retenčních indexů se nejčastěji používají po sobě jdoucí homology n -alkanů.

$$RI = 100 \cdot \frac{\log t'_{R_x} - \log t'_{R_n}}{\log t'_{R_{n+1}} - \log t'_{R_n}} + 100 \cdot n \quad (8)$$

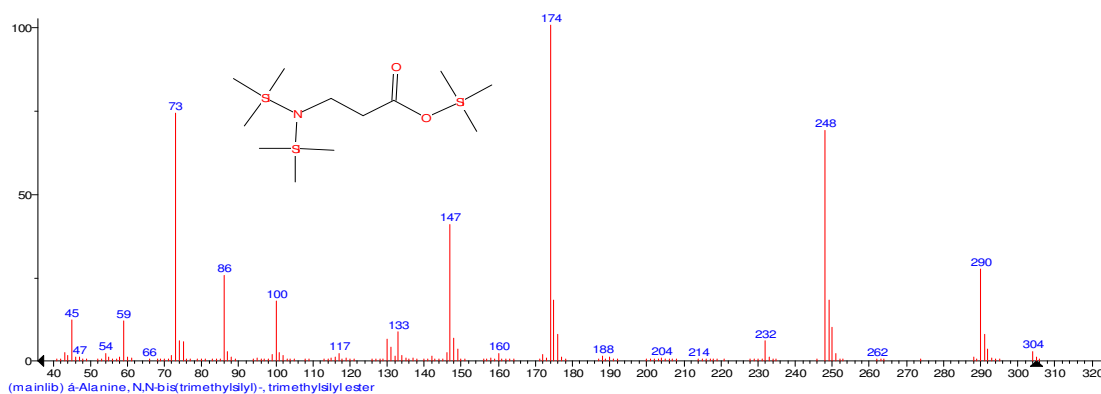
Detektory, které pracují se specifickými vlastnostmi konkrétních analytů, jsou žádané, neboť nám přidávají množství informací získaných z analýzy. Jsou to například detektory se zvýšenou citlivostí pro konkrétní atom (plamenoionizační s alkalickým kovem, detektor elektronového záchytu), fluorescenční, infračervený nebo hmotnostní spektrometr. Vždy však bývá vhodné porovnání s nástřikem standardů jednotlivých analytů, jsou-li ovšem k dispozici [39, 42].

Hmotnostní spektrometr je detektor mající pro analýzu vhodné vlastnosti. Je velmi citlivý, má široký lineární dynamický rozsah, navíc poskytuje odezvu pro všechny látky (s ohledem na ionizační techniku a měřený rozsah m/z). Pro identifikaci se v tomto případě

používá tzv. *full scan mód*, kdy jsou zaznamenávány všechny ionty ve vybraném rozsahu m/z . Ze záznamu hmotnostního spektra (obr. 14) lze srovnáním s knihovnou spekter přímo určit, o jaký analyt se jedná. Tyto aplikace bývají součástí ovládacího softwaru. Pokud se však daná látka v naší databázi nenachází (procentuální shoda je jen velmi nízká a diference mezi hodnotami m/z nezanedbatelné), musíme přistoupit k interpretaci spektra.

Při interpretaci spektra věnujeme pozornost píku s *nejvyšší hodnotou m/z* a jeho intenzitě, *oměru výšek nejintenzivnějších píků* ve spektru, přítomnosti *charakteristických sérií* či *neobvyklých hodnot m/z* . Důležitá je také analýza rozdílu hodnot sousedních m/z , zjišťujeme tak, které malé neutrální molekuly či dceřiné ionty mohly být odštěpeny. Navíc, už dle samotné hodnoty m/z lze (s přihlédnutím k rozlišení) zjistit pravděpodobný molekulový vzorec látky (organická sloučenina velmi často obsahuje jen málo prvků, proto existuje jen omezené množství vhodných kombinací).

V rutinních analýzách v laboratořích, které analyzují vzorky stejných typů látek a zejména pak pro kvantifikaci, lze s výhodou použít tzv. *SIM mód* (selected ion monitoring), kdy nesnímáme celé spektrum, ale jen vybrané hodnoty m/z charakteristické pro analyzované látky, čímž lze dosáhnout poklesu limitu detekce a také zvýšení selektivity analýzy pro velmi složité směsi [58 - 60].



Obr. 14. Hmotnostní spektrum tris-trimethylsilylderivátu β -alaninu, exportováno – program Xcalibur 1.4 (NIST MS Library)

Kvantitativní posouzení analytu také spočívá v několika možných přístupech. Pro přesnou kvantifikaci je však nutno zajistit stálost podmínek, především *dokonalou separaci analytů* (koeluci je možno řešit například dekonvolucí – tj. matematickým rozkladem na jednotlivé složky, nebo užitím hmotnostního spektrometru v SIM módu) a *konstantní odezvu* (během analýzy nedochází ke změnám pro různé analyty). Dále je

nutno vybrat vlastnost píků, kterou budeme vyhodnocovat. Lze použít výšku (h_i), častěji však plochu (a_i), někdy je možno použít i poměrnou hodnotu *signál/šum* (S/N).

Pro určení obsahu složky se používají čtyři základní metody. Metoda *vnitřního (interního) standardu* je založena na přidavku známého množství standardní látky – m_s (nesmí se nacházet v analyzovaném vzorku, nesmí reagovat s jeho složkami a musí se eluovat ve vhodném čase) přímo do analyzovaného vzorku. Pro stanovení látky stačí jeden nástřík a není nutno znát přesný injektovaný objem, obsah přepočteme poměrem. Nevýhodou je nutná znalost odezvových faktorů – α_i (stejně koncentrace různých látek neposkytují shodnou plochu píků – (9) – za předpokladu linearit odezvového faktoru, při nelinearitě dochází k zavádění dalších korekčních faktorů).

$$\frac{m_i}{m_s} = \alpha_i \cdot \frac{a_i}{a_s} \quad (9)$$

Metoda *vnějšího standardu (absolutní kalibrace, kalibrační křivky)* se porovnávají hodnoty opakovaných analýz provedených za totožných podmínek. Nastříkují se stejná množství roztoků obsahujících různá množství standardu. Z výsledků je sestrojena kalibrační závislost, obsah analytu je pak odečten přímo z této závislosti (zde šetří práci řada statistických automaticky vyhodnocujících softwarů). Výhodou je nepotřeba znalosti odezvových faktorů, pokud jako standard použijeme stanovovanou látku. Zdrojem chyb jsou nejčastěji nepřesně dávkované objemy nebo nevhodně zvolený kalibrační model.

Metodou *standardního přidavku* se často řeší problém stanovení malého počtu látek ve složitých maticích (eliminace nežádoucích matrix efektů). K analyzovanému vzorku (a_i, V_i) se přidá známý objem standardu analytu (V_s, m_s). Výpočet je založen na nárůstu odezvy odpovídajícímu přidavku (a_s). Často se používá více než jeden standardní přídavek. Vyhodnocení je možné početně (10) a graficky.

$$m_i = m_s \cdot \left(\frac{V_s \cdot a_i}{(V_i + V_s) \cdot a_s - V_i \cdot a_i} \right) \quad (10)$$

Poslední užívanou metodou je *vnitřní normalizace*. Tato méně používaná metoda určuje relativní zastoupení jednotlivých látek ve směsi. Nutná je znalost odezvových faktorů a všechny součásti směsi musí být eluovány, musí poskytovat odezvu a musí být identifikovány [33, 60, 65].

3. DESIGN OF EXPERIMENT (DOE)

3.1 Plánování experimentu

Termín *experiment* používáme pro označení soustavy měření (pozorování, pokusů) jak ve vědecké, tak v technické i humanitní praxi. Cílem experimentu je získat objektivní relevantní informace o zkoumaném jevu, doplnit stávající nebo ověřit předešlé. Častým úkolem je nalezení vazeb a vztahů mezi popisnými veličinami daného procesu, zejména jde-li o vztahy velmi komplikované, ne zcela dobře popsatelné vhodným modelem. Čím více proměnných je nutno vzít v úvahu, tím se popis situace stává méně efektivním. Nejen z tohoto důvodu se v této oblasti uplatňují metody matematické statistiky.

Jedním z odvětví aplikované statistiky jsou i metody plánovaných (řízených) experimentů, častěji v literatuře označovaných jako *design of experiment (DOE)*. Metoda byla původně navržena pro zpracování velkého objemu dat z biologické a klinické oblasti (R. Fisher, R. Yates), později našla uplatnění v technické praxi (G. Taguchi) a dnes se rozšiřuje do mnoha dalších odvětví, chemii nevyjímaje, např. [66–73]. Technika umožňuje studovat vliv mnoha *nezávislých proměnných* (i jejich interakcí) na *závislou proměnnou*. Užití je široké: návrh a vývoj procesů a produktů, zlepšování jejich vlastností, určení klíčových parametrů ovlivňujících procesy, analytické simulace, testování a validace, řešení problémů s jakostí apod. Nespornými výhodami jsou zlepšování jakosti, snížení počtu nekvalitních a neshodných výrobků, snížení počtu vlastních experimentů (úspora času i nákladů na jejich realizaci), tím i větší spokojenost zákazníka a tržní konkurenceschopnost [74–77].

Pro DOE existují speciální softwary (Qualitek – Qualitek International Inc., USA; Design Expert – Statuse, USA; MODDE – Umetrics, Švédsko), ale metoda je komplementována i do celé řady běžných statistických balíčků: Statistica – StatSoft, USA; Minilab – State College, Pennsylvania, USA; NCSS, – Kaysville, USA; Statgraphic – Statistical Graphic USA; JMP – SAS Institute Inc., USA a pod. Po celém světě bývají také pořádána mnohá školení zabývající se touto technikou, proto většímu rozšíření brání snad jen nedůvěra a skepse.

Plánování experimentu znamená vytvoření takových podmínek, abychom při nejmenším možném rozsahu experimentu získali co největší objem informací v co největší kvalitě. „Žádnou analýzou experimentálních dat nelze obejít špatně či nedostatečně připravený experiment [77].“

3.2 Postup DOE

Prvním krokem při plánování je ustavení týmu pracovníků. Měl by zahrnovat *všechny sféry* procesu, všechny osoby, které se na finálním stavu podílejí (inženýr, technolog, operatér, manager, obchodník, ...). Tito lidé by pak měli společně *určit cíle* experimentu. Pro správné provedení je nutné uvážit všechny myšlenky o daném problému, což nebývá vždy jednoduché.

Následuje stanovení *sledované proměnné* (odezvy, response) – plocha píku, index lomu látky, hlučnost motoru, ... Sledovaná proměnná by měla být lehce měřitelná a poskytovat užitečnou relevantní informaci, přičemž je veliký důraz kladen na přesnost jejího měření. Parametrů může být samozřejmě i více. V principu lze rozlišit tři druhy proměnných: odezva má být *co největší* (plocha píku), je požadována *konkrétní hodnota* (index lomu) nebo má být odezva *co nejnižší* (hlučnost motoru).

Následuje výběr *variabilních charakteristik (faktorů)* a *rozsahu jejich variability (úrovní)* – tedy reálné rozmezí, mezi nimiž se nastavení jednotlivých parametrů může měnit (teplota roztoku: 25–75 °C, čas míchání: 0–10 min, měřicí přístroj nebo obsluhující osoba: A–C, složení chladicí lázně: látky v poměru 1/10–5/1 apod.). Faktory rozlišujeme *regulovatelné* (navrhované ovlivnitelné proměnné) a *šumové* (neovlivnitelné) s negativním dopadem na odezvu.

Vypracování *experimentálního plánu* – typ, počet opakovaných měření, pořadí a doba provedení apod. (viz kap. 3.3). Následuje vlastní *provedení* experimentu. V této části je nutno dát pozor především na přesné dodržení vypracovaného plánu.

Statistické zpracování dat se skládá především v nalezení takové kombinace hodnot jednotlivých faktorů, aby byla odezva optimální. Určují se *základní faktory*, tedy ty, které mají pro daný cíl největší význam a je vypočtena jejich optimální hodnota. Toto zpracování je z větší části založeno na *regresní analýze* a na *analýze rozptylu (analysis of variance, ANOVA)*, což vyžaduje velmi rozsáhlé výpočty. Řešení je užití vhodného statistického software se srozumitelnými a přehlednými výstupy (tabulky, grafy). Závěrem je formulace *praktických doporučení* a návrhy pro *přesnější optimalizaci signifikantních faktorů*.

Samozřejmostí je ověření optimalizovaných hodnot faktorů nezávislým experimentem a porovnání naměřené a vypočtené odezvy [70, 76, 77].

3.3 Výběr experimentálního plánu

Důležitou součástí metody DOE je sestavení plánu. Dle účelu, pro nějž experiment plánujeme, je také nutné zvolit správný plán. Plán je zapisován do tzv. *plánovací matice*. Řádky zde obvykle tvoří jednotlivá měření, ve sloupcích jsou řazeny faktory; nastavení je označeno jako „–“ a „+“ (eventuelně jako 1 a 2) pro nižší a vyšší nastavenou hodnotu (či systém vypnuto/zapnuto apod.), eventuálně písmeny, je-li možných nastavení více. Vzájemné interakce se značí „x“ a poslední sloupce bývají vyhrazeny pro naměřené response (obr. 15A). Existují dva rozdílné přístupy v plánování experimentů – *klasický a moderní*.

Klasické plánování zkoušek také dále zahrnuje větší množství metod, kterými lze procesy systematicky vyšetřovat. *Faktorové plány* (víceparametrické zkoušky) provádí optimalizaci procesu za současného respektování několika proměnných. Pro minimalizaci nákladů se používají pouze dvě nastavení pro jednotlivé faktory, v tomto případě je však nutno předpokládat *lineární chování* těchto parametrů mezi zvolenými mezemi. Mezi tyto plány řadíme např. *plně faktorový design*: u každé zkoušky je změněn právě jeden parametr – výhodou je jednoduchost, nevýhodou nemožnost sledovat vzájemné interakce. Opakem je *plně faktorový design*: zde se postupně obmění všechny faktory, navíc se uvažuje o jednotlivých interakcích. Tento plán má vysokou vypovídací hodnotu, avšak počet experimentů a tím i náklady na ně s počtem vyšetřovaných faktorů až neúměrně rostou. Jakýmsi kompromisem je *částečně faktorový plán*: zde se sloupce v plánovací matici jinak obsazené interakcemi nahrazují dalšími faktory (lze jen tehdy, je-li jisté, že jsou vzájemné interakce jen nepatrné nebo vůbec žádné).

Dalšími metodami jsou například *kvadratické plány* (Latin Square, Graeco Latin Square, Lattice Square, Randomized Blocks, ...). Jejich výhodou je možnost užití více než dvou různých nastavení faktorů (pokud je chování odezvy nelineární), ale současně maximálně pro čtyři ovlivňující faktory. Jinou rodinou jsou *plány deterministické* (Gauss-Seidlův, gradientní, simplexní apod.). Jejich předností je rychlé nalezení optima, avšak je zatížen chybou při výskytu lokálních optim a nelinearity a je použitelný jen pro dva až tři faktory.

Jiné jsou ortogonální návrhy dle *Placketta-Burmana* (obr. 15B). Předpokládá se, že vzájemná působení jsou zde rovnoměrně rozložena (nemají v plánovací matici vlastní sloupce), jejich odhalení je pak matematicko-statistickou záležitostí. Má-li proces dvouúrovňové faktory užívají se soustavy L4 (pro 2–3 f.), L8 (4–7 f.), L12 (8–11 f.), L16

(8–15 f.) nebo L32 (16–31 f.), větší soustavy mají užití zpravidla pouze pro simulační studie. Pro tříúrovňové faktory se nejčastěji používají soustavy L9 (3–4 f.), L18 (až 7 f.) a L27 (až 13 f.), vyšší mají opět pouze teoretický význam.

A	A	B	C	A×B	A×C	B×C	A×B×C	R	B	1	2	3	4	5	6	7
1	-	-	-	+	+	+	-		1	1	1	1	1	1	1	1
2	-	-	+	+	-	-	+		2	1	1	1	2	2	2	2
3	-	+	-	-	-	-	+		3	1	2	2	1	1	2	2
4	-	+	+	-	+	+	-		4	1	2	2	2	2	1	1
5	+	-	-	-	+	+	+		5	2	1	2	1	2	1	2
6	+	-	+	-	-	-	-		6	2	1	2	2	1	2	1
7	+	+	-	+	-	-	-		7	2	2	1	1	2	2	1
8	+	+	+	+	+	+	+		8	2	2	1	2	1	1	2

Obr. 15. A: Plně faktorový návrh pro tři faktory se vzájemnými interakcemi; B – Plackett-Burmanův plán L8 pro maximálně 7 faktorů

Užití klasických metod však stále má svá omezení a klade důraz nejen na čas věnovaný zpracování, ale hlavně interpretaci získaných dat, což často zahrnuje těžkopádnou matematiku. Moderní metody se zdají být řešením, i když stále používají některé osvědčené postupy. Jejich navržení má dospět k optimu rychleji, než je možno v klasických metodách, navíc je možno do optimalizace zařadit o mnoho více proměnných.

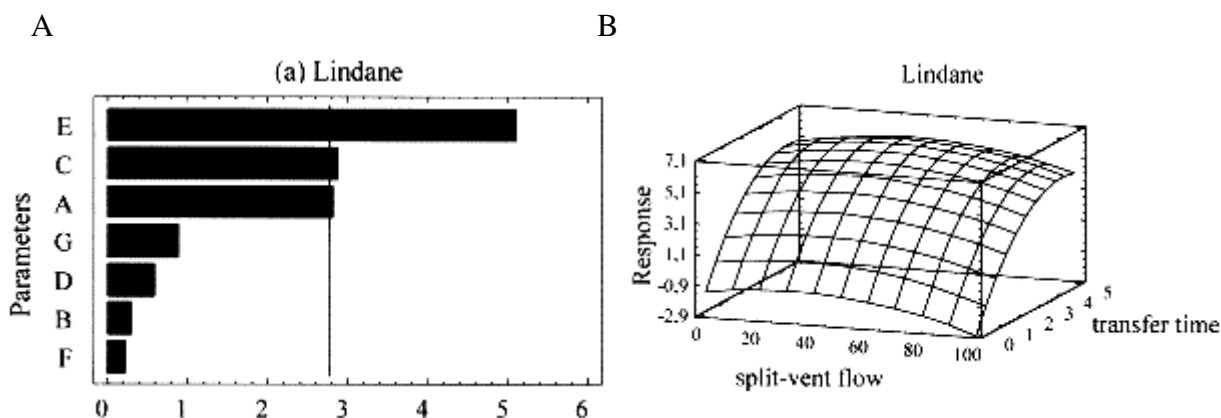
Jedním z moderních postupů je *plánování dle Shainia*. Metoda umožňuje postupným ohraničováním optimalizovat až 1 000 faktorů (díky hospodárnosti se však často omezujeme do 100) a to pomocí předběžných zkoušek: metodou multivariačních karet, srovnávací nebo komponentní metodou se omezíme na 5–10 důležitých faktorů, jež jsou podrobeny plně faktorové zkoušce. Relevantnost získaných údajů je kontrolována pomocí rozptylových diagramů.

Moderní postup dle *Taguchiho* na rozdíl od Shainia redukuje množství původních faktorů, především na základě dosavadní znalosti celého procesu, zkušenostmi spolupracovníků. Vyhodnocení má základ v analýze rozptylu. Pro jednotlivé faktory je definována *střední hodnota a standardní odchylka*, tyto se zapisují do tzv. *tabulky reakcí*, z níž se dá rozpoznat vliv vzájemného působení faktorů. Klíčovou veličinou dle Taguchiho je tzv. *šumový činitel* (neboli poměr signál – vliv jednotlivých významných faktorů – ku šumu – vliv *poruchových*, neovlivnitelných faktorů). Cílem popsaného procesu je maximalizace hodnoty signál/šum [68, 76].

3.4 Použití metody pro optimalizaci podmínek PTV injektoru

Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, metoda DOE je účinným nástrojem pro optimalizaci procesů, které jsou závislé na mnoha faktorech a to i v oblasti chemie. Jedním z případů je bezesporu i optimalizace nástřiku velkého objemu vzorku přes PTV injektor. Pokud bychom postupovali při optimalizaci „klasicky,“ měnili bychom jeden parametr, zatímco ostatní by zůstaly neměnné, a sledovali bychom, co se děje s odezvou. Proces by se opakoval při dalších zvolených parametrech. DOE nám umožní cíleně měnit všechny parametry zároveň a poté zpracováním zjistit optimální nastavení.

Z faktorů ovlivňujících nástřik PTV injektorem (viz kap. 2.1.5) jsou pro experimentální design vybrány ty, jež mohou mít zásadní vliv na analýzu – zejména teplota nástřiku, teplota a doba transferu analytů na kolonu, přítomnost různých typů linerů atd. Po provedení experimentů (vhodné je použití ortogonálního Plackett-Burmanova plánu) je statisticky vyhodnocen vliv jednotlivých faktorů (tzv. *Paretův diagram*, viz obr. 16A) na zkoumanou odezvu – pro jednotlivé látky je to nejčastěji plocha píku (s přihlédnutím na poměr signál/šum), neboť se obvykle snažíme o co nejnižší mez detekce. Nelze opomenout ani vzájemné interakce jednotlivých proměnných. Vybrané faktory jsou následně blíže optimalizovány metodou *centrálního kompozitního designu*, ostatní zůstávají na své dříve vypočtené vhodné hodnotě. V této technice jsou počítačem vytvářeny mocninné závislosti, jež je možno zobrazit pomocí 3D grafu (viz obr. 16B) [73].



Obr. 16. A: *Paretův diagram standardizovaných efektů zkoumaných parametrů (A – plnění inletu, B – rychlost vzestupu teploty, C – split-vent flow, D – doba odpařování solventu, E – transfer time, F – počáteční teplota injektoru, G – chybový faktor); B: prostorový graf responční plochy významných parametrů pro vybraný pesticid – Lindan, převzato z [73]*

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4. PRACOVNÍ POSTUP A INSTRUMENTACE

4.1 Chemikálie a materiál

Standardy použitých n-alkanů (C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{14} , C_{15} , C_{18} , C_{19} , C_{20} a C_{21}) byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich (St. Louis, USA), jako standardy pro plynovou chromatografii (99 %). Zásobní roztok standardů (koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$) byl připraven v n-hexanu (solvent pro plynovou chromatografii, 95 %) a dále ředěn dle potřeby.

Použité standardy organických kyselin (p.a.): laktát, cis-akonitát, kyselina vanilylmandlová (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), kyselina citramalová (Fluka, Buchs, Švýcarsko).

Použité standardy aminokyselin (p.a.): L-leucin, L-methionin, L-prolin, L-fenylalanin (Nutritional Biochemical Co., Cleveland, USA), β -alanin (LobaChemie Pvt. Ltd., Tarapur, Indie).

Směsný zásobní roztok standardů organických kyselin a aminokyselin byl připraven o koncentraci 1 mmol/l (methanol/deionizovaná voda – 18 M Ω /cm, 1:1) a dále ředěn dle potřeby. Do vialky se springem (100 μl , silanizováno, National Scientific, Rockwood, USA) bylo napipetováno 50 μl směsi a odfoukáno dusíkem (Messer, ČR, 99,996 %) dosucha, takto připravené vzorky byly uloženy při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do derivatizace.

Buněčné kultury fibroblastů byly získány od zdravých dobrovolníků z řad personálu laboratoře klinické biochemie.

Činidla použitá pro extrakci a derivatizaci standardů organických kyselin, aminokyselin a buněčného materiálu: methanol (99 %, pro HPLC, Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), pyridin (puriss pro GC, Fluka, Steinheim, Německo), ethoxyaminhydrochlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA, Fluka, Steinheim, Německo).

4.2 Instrumentace

Analýza vzorků byla prováděna na plynovém chromatografu Trace GC Ultra s hmotnostním detektorem DSQ II (Thermo Electron Corporation, USA). Nosným plynem bylo helium (99,999 %, Messer, ČR), konstantní průtok mobilní fáze byl nastaven

na 1 ml/min. Separace byly uskutečněny na kapilární koloně Zebron Guardian ZB-5MS (30 m x ID 0,25 mm, df 0,25 μ m, Phenomenex, USA).

Parametry programovatelného injektoru byly předmětem optimalizace (viz kap. 5.1.4), liner byl použit bez náplně.

Teplotní program kolony pro analýzu n-alkanů byl následující: 45 °C (0,1 min) 35 °C/min 300 °C (1,5 min).

Teplotní program pro analýzu standardů organických kyselin, aminokyselin a buněčných extraktů byl následující: 40 °C (2 min), 8 °C/min 155 °C (0,2 min), 10 °C/min 255 °C (0,2 min), 100 °C/min 300 °C (2 min).

Detektor – hmotnostní spektrometr (EI ionizace, 70 eV) pracoval ve full scan modu (m/z 30–489; 1,04 skenů za sekundu) s teplotou iontového zdroje 200 °C a teplotou transferové linie 250 °C.

Dále byly pro přípravu vzorků použity: centrifuga Mikro 120 (Henttrich, Německo), ultrazvuk Kraintek 12 (Podhájska, Slovensko), vortex (IKA Works, USA), analytické váhy Kern ABT 120 5 DM (Praha, ČR), mikropipety Hamilton (Reno, USA, 10, 100, 300 μ l a 1 ml), přípravná deionizované vody (Werner Reinstwassersystem, Německo).

Ke zpracování výsledků GC/MS byl použit software Xcalibur Data system 1.4 (Thermo Electron Corporation, USA) a program MZmine2 (<http://mzmine.sourceforge.net>). Pro návrh experimentů a statistické zpracování dat byl použit program Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004, <http://www.statsoft.cz>). Eventuální konečná úprava grafů byla provedena pomocí programu CorelDRAW Graphic Suite 12.0 (Corel Corporation, 2004).

4.3 Postup práce

4.3.1 Příprava buněčného extraktu

Linie fibroblastů byly kultivovány v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) standardním postupem v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) doplněném 10% FBS (fetal bovine serum) a antibiotiky – streptomycinem (100 µg/ml) a penicilinem (100 U/ml). Sklizení buněk probíhalo dvěma způsoby – trypsinizací a quenchingem.

Před trypsinizací byly buňky dvakrát promyty 5 ml 0,9% roztoku chloridu sodného, poté byl přidán roztok obsahující trypsin a EDTA (ethylendiamintetraacetát). Po třech minutách byla reakce zastavena přidáním 5 ml kultivačního média. Suspenze byla centrifugována (5 min, 1 200 rpm) a peleta buněk byla extrahována dvakrát 1 ml 80% methanolu. Oba extrakty byly spojeny, lyofilizovány, resuspendovány ve 100 µl deionizované vody a uloženy v mrazícím boxu (-20 °C) do analýzy.

Quenching probíhal pomocí 20 ml plastové stříkačky se zahnutou jehlou přímo v kultivační nádobce. Do nádoby bylo vstříknuto 20 ml quenchovacího roztoku (60% methanol, -50 °C), ten byl následně lyofilizován a uchován pro další analýzu. Quenchované buňky byly poté dvakrát extrahovány 1 ml 80% methanolu. Spojené extrakty byly centrifugovány (5 min, 10 000 rpm), supernatant byl lyofilizován, resuspendován ve 100 µl deionizované vody a uložen v mrazícím boxu (-20 °C) do analýzy.

Buňky v rámci svého postgraduálního studia lékařské genetiky pěstovala a sklízela Mgr. Lenka Žídková [78].

4.3.2 Derivatizační procedura

Před derivatizací bylo k suchým vzorkům (odfoukáno dusíkem) přidáno 50 µl methanolu, dále byly 5 min sonikovány a centrifugovány (1 min, 10 000 rpm). Supernatant byl přenesen do springeru a odfoukán dusíkem dosucha.

Vlastní derivatizace vzorků byla prováděna dle [79]. K odfoukané směsi standardů (vysušenému extraktu buněk) ve springerech bylo přidáno 10 µl ethoxylaminhydrochloridu (roztok v pyridinu, 56 mg/ml) a 40 µl pyridinu. Ethoxymace probíhala při teplotě 40 °C po dobu 90 min, poté byly vzorky odfoukány dusíkem dosucha. Následně bylo přidáno 30 µl silylačního činidla (MSTFA), silylace probíhala taktéž při teplotě 40 °C po dobu 50 min. Derivatizované vzorky je nutno ihned analyzovat (kaskádovitý průběh derivatizace látek obsahujících aminoskupinu [80]).

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Analýza směsi alkanů

5.1.1 Návrh experimentu

Prvním krokem při optimalizaci podmínek PTV injektoru byl výběr parametrů, které budou studovány, a meze, ve kterých budou optimalizovány. Vybrány byly následující faktory (návrh designu je shrnut v tab. 1): teplota vypařování rozpouštědla (evaporation temperature), doba vypařování rozpouštědla (evaporation time), průtok splitterem (split-flow), teplota transferu (transfer temperature), doba transferu na kolonu (transfer time), rychlost teplotního vzrůstu při transferu (transfer heating rate) a možnost backflushu (zaostření analytů na začátku kolony pomocí malého průtoku mobilní fáze opačným směrem).

Tab. 1. Plackett-Burmanův návrh experimentu pro optimalizaci nástřiku směsi alkanů

č.	evaporation temperature [°C]	evaporation time [min]	split-flow [ml/min]	transfer temperature [°C]	transfer time [min]	transfer heating rate [°C/s]	backflush
1	30	0,5	0	240	10,0	14,5	NE
2	70	0,5	0	150	0,5	14,5	ANO
3	30	4,0	0	150	10,0	5,5	ANO
4	70	4,0	0	240	0,5	5,5	NE
5	30	0,5	150	240	0,5	5,5	ANO
6	70	0,5	150	150	10,0	5,5	NE
7	30	4,0	150	150	0,5	14,5	NE
8	70	4,0	150	240	10,0	14,5	ANO

Objem nástřiku směsného roztoku n-alkanů byl zvolen na 8 μ l (koncentrace 100 μ mol/l). Tento objem byl zvolen na základě operačního manuálu k přístroji [48]; pro používaný liner bez náplně je doporučeno dávkovat najednou max. 10 μ l. Charakteristiky n-alkanů shrnuje tabulka 2.

Jako odezva byla zvolena veličina charakterizující celkovou plochu píků a eliminaci nejtěkavější složky směsi (rovnice 11, A_i značí plochy jednotlivých píků, A^{10} plochu píku n-dekanu a κ je koeficient, jež dává případnou váhu eliminaci nejtěkavější složky). Jako kvantifikační ion byl použit $m/z = 57$.

$$R = \frac{\sum A_i^{all}}{\max \sum A_i^{all}} + \kappa \frac{\sum A_i^{10}}{\max \sum A_i^{10}} \quad (11)$$

Při návrhu experimentu bylo použito ortogonálního Plackett-Burmanova návrhu pro sedm faktorů s osmi pokusy. Jednotlivé pokusy byly řazeny dle standardního Box, Hunter & Hunterova pořadí. Nástřiky byly opakovány třikrát. Ve zpracování jsou pro názvy jednotlivých faktorů používány anglické ekvivalenty, především kvůli jejich někdy těžkopádnému překladu.

Tab. 2. Shrnutí vlastností použitých *n*-alkanů

C	6	10	11	12	14	15	18	19	20	21
Mr	86,2	142,3	156,3	170,3	198,4	212,4	254,5	268,5	282,6	296,6
bp	67	174	195	216	252	270	317	329	343	356
RI	600	1 000	1 100	1 200	1 400	1 500	1 800	1 900	2 000	2 100

C – počet uhlíků *n*-alkanu; *Mr* – relativní molekulová hmotnost; *bp* – bod varu; *RI* – retenční index

5.1.2 Analýza experimentu

Výpočet byl proveden ze tří opakování (tab. 3), jednotlivé analýzy byly prováděny v náhodném pořadí.

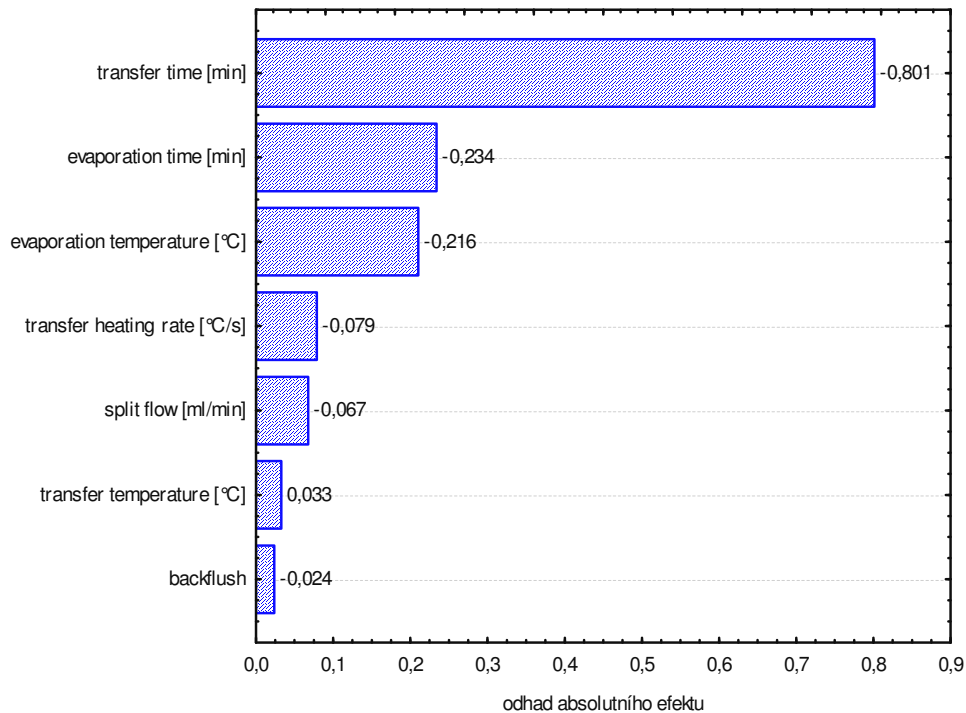
Tab. 3. Hodnoty odezev pro optimalizaci nástřiku směsi *n*-alkanů

číslo exp.	R1	R2	R3	R průměr	sm. odchylka	variační koef.
1	1,00	1,20	1,11	1,10	0,10	9,1 %
2	1,55	1,56	1,49	1,53	0,04	2,5 %
3	0,74	0,85	0,78	0,79	0,06	7,3 %
4	1,49	1,50	1,32	1,44	0,10	6,9 %
5	1,96	1,59	1,82	1,79	0,19	10,3 %
6	0,70	0,83	0,77	0,77	0,06	8,2 %
7	1,43	1,45	1,52	1,47	0,05	3,2 %
8	0,48	0,45	0,46	0,46	0,02	3,7 %

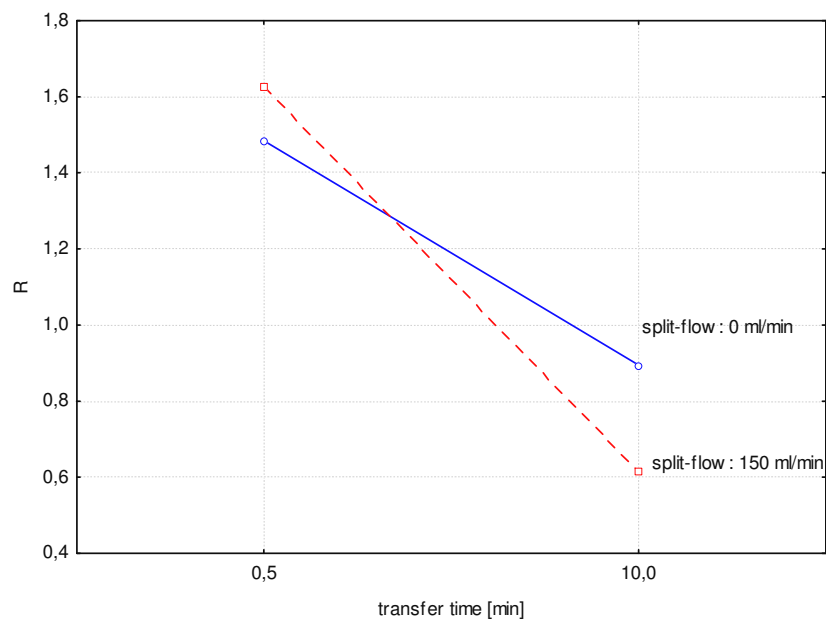
Analýza výsledků spočívá nejprve v prozkoumání grafických výstupů. Prvním je tzv. Paretův diagram efektů (obr. 17). Z něho vyplývá vliv jednotlivých faktorů na vypočtenou odezvu. Kladný efekt značí přímou závislost (čím vyšší nastavení faktoru, tím vyšší odezva), záporný efekt nepřímou závislost (vyšší nastavení značí nižší odezvu). Absolutní hodnota efektu pak značí důležitost jeho vlivu. Pro prováděnou analýzu byl zjištěn jako klíčový faktor s nepřímým vlivem transfer time, dále je vhodné věnovat bližší pozornost parametrům evaporation time a evaporation temperature.

Následuje prozkoumání interakcí efektů – tzv. grafy marginálních hodnot. Jedná se o znázornění krajních hodnot pro vybrané faktory. Posuzována je vzájemná poloha vykreslených úseček. Jestliže jsou rovnoběžné, neinteragují spolu vůbec, vzájemná

interakce je pozorována, pokud se úsečky protínají. Čím větší je úhel, pod kterým se úsečky kříží, tím je interakce mezi faktory větší. Studovány byly v tomto případě pouze dvoufaktorové interakce: jako významné se ukázaly interakce faktorů split-flow/transfer time a split-flow/evaporation temperature.



Obr. 17. Pareťův diagram absolutních efektů faktorů



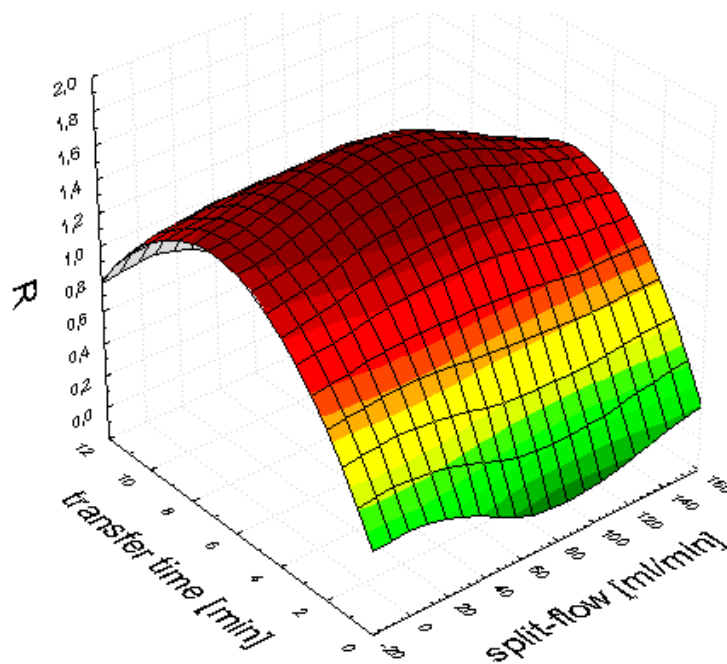
Obr. 18. Graf marginálních hodnot – interagující efekty split-flow a transfer time, R – odezva definovaná v rovnici 11 ($\kappa = 2$)

5.1.3 Centrální kompozitní design

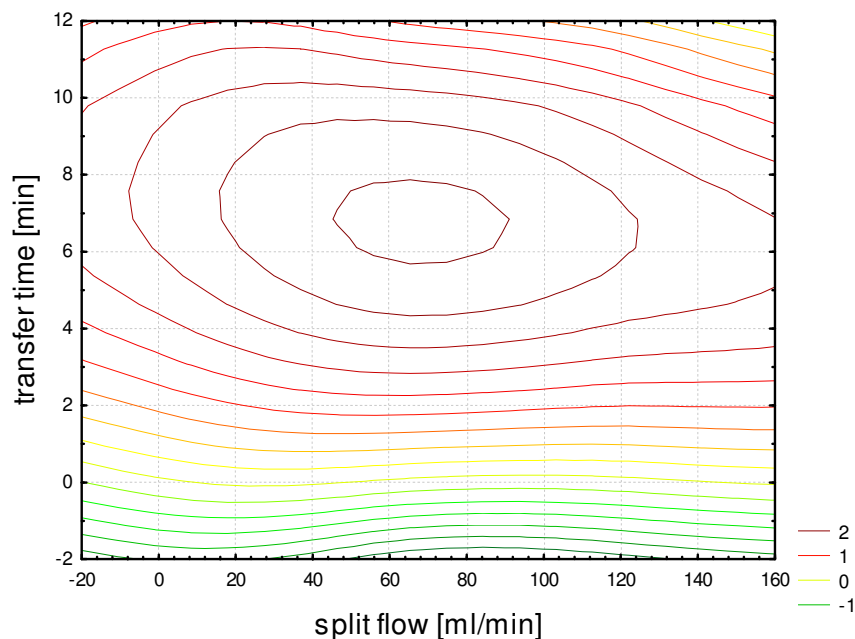
Pro centrální kompozitní design byly vybrány tyto faktory: transfer time z důvodu dominantního vlivu na sledovanou odezvu a split-flow z důvodu odhalených interakcí. Design byl uskutečněn jako plně faktorový plán pro následující úrovně: transfer time – 0,5, 1,0; 1,5; 2,5; 5,0; 7,5 a 10 min; split-flow – 0, 30, 60, 90, 120 a 150 ml/min. Pro vyhodnocení byla použita odezva definovaná v kap. 5.5.1 (rovnice 11, $\kappa = 2$), regresní model byl kvadratický s interakcí lineárních členů (rovnice 12), pro vykreslení byl využit kvadratický spline. Statistická analýza byla provedena ze tří nástřiků, s variačním koeficientem v rozmezí 4,2–15,5 %.

$$R = \alpha F_1^2 + \beta F_2^2 + \gamma F_1 F_2 + \delta F_1 + \varepsilon F_2 + \varphi \quad (12)$$

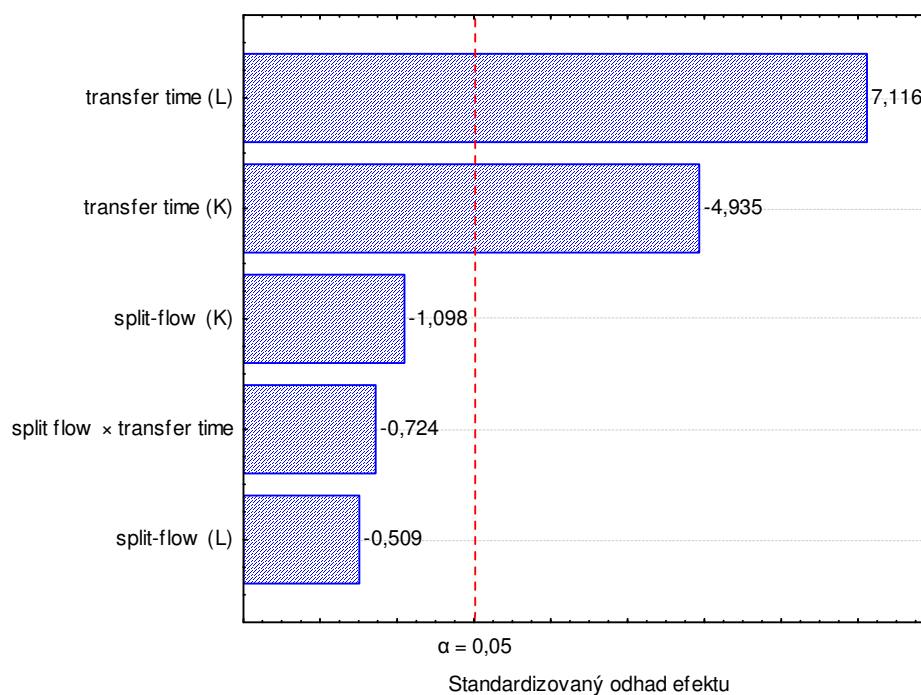
Na obr. 19 lze vidět 3D graf znázorňující odezvou plochu, obr. 20 ukazuje vrstevnicový graf (promítnutí téže závislosti na plochu). Obrázek 21 znázorňuje Paretův diagram standardizovaných efektů responsní analýzy.



Obr. 19. 3D graf kompozitního designu, studované faktory splitless time a split-flow, R – odezva definovaná v rovnici 11 ($\kappa = 2$)



Obr. 20. Vrstevnicový graf, studované faktory splitless time a split-flow



Obr. 21. Paretův diagram standardizovaných efektů responční analýzy

Analýzou responční plochy bylo vypočteno optimální nastavení studovaných parametrů: transfer time 6,9 min a split-flow 55 ml/min. Regresní analýza v tomto případě potvrdila statistickou významnost faktoru transfer time (zde v kvadratické i lineární podobě), dále určila za významný absolutní člen. Faktor split-flow (v obou modelových podobách) a interakce studovaných faktorů byly označeny jako statisticky nevýznamné.

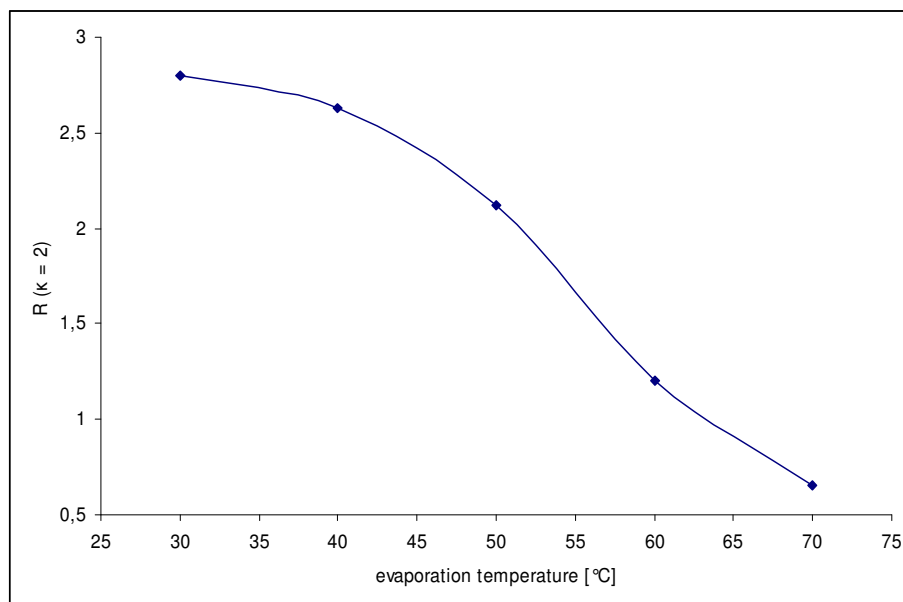
5.1.4 Konečné podmínky PTV injektoru

Optimalizované podmínky PTV injektoru shrnuje tabulka 4. Faktory evaporation time, transfer temperature, transfer heating rate a backflush byly zvoleny na základě analýzy Placket-Burmanova designu. Faktor evaporation temperature je shodný s teplotou nástřiku. Jeho hodnota (40 °C oproti 30 °C v původním designu) byla zvolena z důvodu technických parametrů přístroje (ochlazení na nižší teplotu bylo časově náročné), příliš významná eliminace stanovovaných alkanů přitom nebyla pozorována (obr. 22). Na závěr proběhla optimalizace faktorů transfer time a split-flow metodou responsního povrchu.

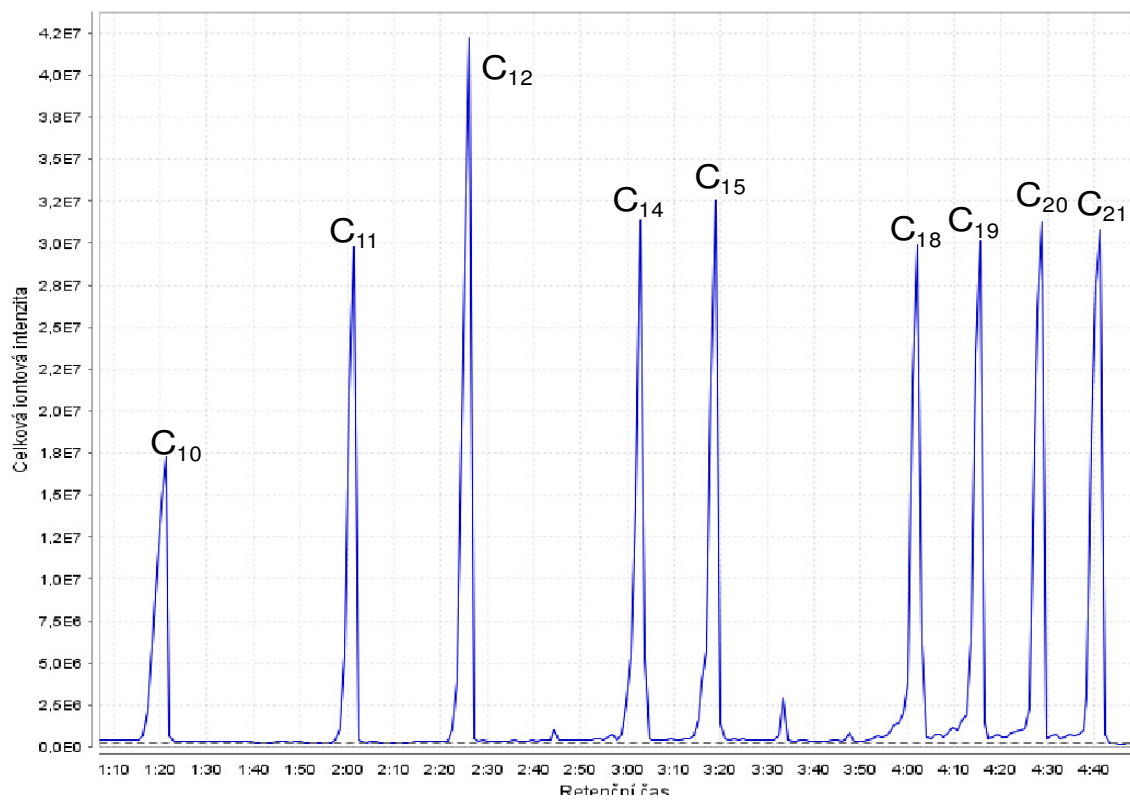
Tab. 4. Optimalizované podmínky PTV injektoru pro analýzu *n*-alkanů

evaporation temperature [°C]	evaporation time [min]	split-flow [ml/min]	transfer temperature [°C]	transfer time [min]	transfer heating rate [°C/s]	backflush
40	0,5	55	240	6,9	5,5	NE

Za těchto podmínek byl proveden kontrolní nástřik, získaný chromatogram ukazuje obrázek 23. Předpokládaná odezva (predikce dle statistického modelu) za optimálních podmínek $R_p = 2,22$. Experimentální hodnota byla $R_e = 2,25$ (relativní chyba 1,4 %). Účinnost separace dosahuje v tomto případě 32 000 teoretických pater (C_{12}).



Obr. 22. Vliv faktoru evaporation temperature na odezvu (dle rovnice 11, $\kappa = 2$)



Obr. 23. Chromatogram analýzy *n*-alkanů získaný za optimalizovaných podmínek

5.2 Analýza směsi organických kyselin a aminokyselin

5.2.1 Vlastnosti vzorku derivátů organických kyselin a aminokyselin

Vzorek n-alkanů pro analýzu PTV injektorem je dle svého složení ideální: solvent (n-hexan) má o více než 100 °C nižší teplotu varu než nejnižše vroucí analyzovaná složka směsi (n-dekan). Z tohoto důvodu je možné přebytečný solvent eliminovat před vlastní analýzou. Vzorek derivátů studovaných standardů organických kyselin a aminokyselin (taktéž jako vzorek derivatizovaných buněčných extraktů) je poněkud odlišný. Derivatizační směs, ve kterém se analyzované sloučeniny nacházejí, se skládá z derivatizačního činidla (MSTFA, teplota varu 132 °C) a artefaktů vzniklých při procesu silylace. Z důvodu vysoké teploty varu derivatizačního činidla/solventu jej není možné předem odpařit. MSTFA samotné i vzniklé artefakty jsou však na rozdíl od silylovaných analytů značně polární sloučeniny, proto vykazují na nepolární koloně jen velmi malou retenci. Přebytek solventu tedy v tomto případě není předem eliminován splitterem, nýbrž přes kolonu. Proto byl v tomto případě zvolen mód PTV-splitless.

Vlastnosti standardů analyzovaných organických kyselin a aminokyselin jsou shrnuty v tabulce 5 (NIST MS Library). Standardy byly zvoleny na základě rozsahu retenčních indexů látek, které se běžně v metabolomu buněk vyskytují a které je možno analyzovat metodou GC/MS.

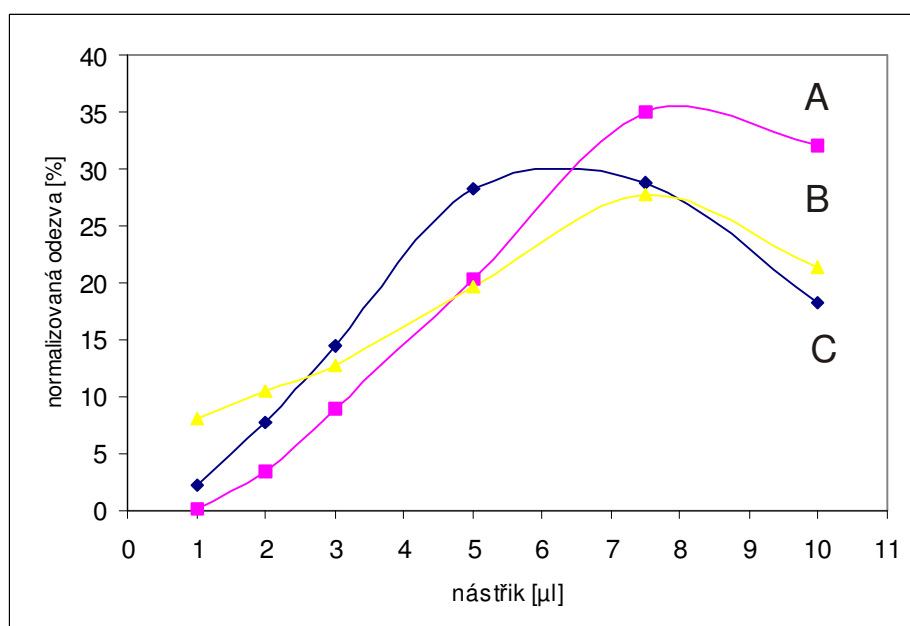
Tab. 5. Vlastnosti derivátů analyzovaných organických kyselin a aminokyselin

látka (τ)	Mr	Mr (τ -TMS)	RI (τ -TMS)	m/z (QI) τ -TMS
laktát (2)	90	234	1 063	219
L-leucin (2)	131	275	1 272	158
L-prolin (2)	115	259	1 302	142
β -alanin (3)	89	305	1 434	174
kys. citramalová (3)	148	364	1 489	247
L-methionin (2)	149	293	1 530	176
L-fenylalanin (2)	165	309	1 649	218
cis-akonitát (3)	174	390	1 756	285
kys. vanilylmandlová (3)	198	414	1 896	297

Mr – relativní molekulová hmotnost; *TMS* – trimethylsilylderivát; τ – nejběžnější stupeň silylace; *RI* – retenční index pro užití podmínky separace (kap. 4.2); *QI* – kvantifikační ion

5.2.2 Volba objemu nástřiku

Nejprve bylo nutno zvolit objem, který bude při analýzách nástřikován. Byl proveden nástřik 1; 2; 3; 5; 7,5 a 10 μl standardní směsi (1 mmol/l) a byla sledována závislost odezev (plocha píků dle QI, 200 °C, splitless time 1 min). Jako nejvhodnější byl zvolen objem 5 μl . Na obrázku 24 jsou uvedeny závislosti pro β -alanin (A), prolin (B) a laktát (C).



Obr. 24. Optimalizace objemu nástřiku; A – β -alanin, B – prolin, C – laktát

5.2.3 DOE analýza pro směs organických kyselin a aminokyselin

Výše byly popsány rozdíly mezi principy eliminace solventu pro případ analýzy alkanů a pro případ derivátů kyselin. Na základě těchto rozdílů byl zvolen i experimentální design. V tomto případě byly optimalizovány (plán dle Placket-Burmana pro až sedm faktorů s osmi analýzami) následující parametry (tab. 6): teplota nástřiku (injection temperature), splitless time a backflush. Dále bylo testováno použití tlakového pulsu – tlak a doba trvání (surge pressure, surge duration). Zbylé dva faktory (empty) jsou náhodné, sloužící pro bližší posouzení variability procesu.

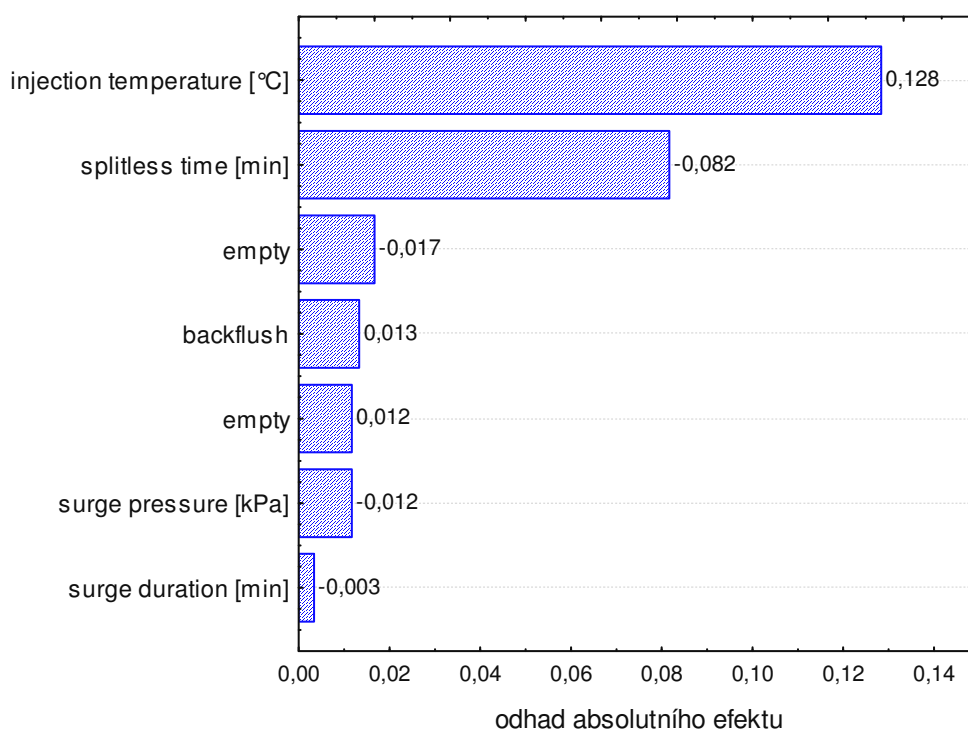
Nástřik byl 5 μl , koncentrace směsného standardu 1 mmol/l. Analýza designu byla zpracována ze tří nástřiků, celkový plán byl prováděn v náhodném pořadí. Jako odezva byla zvolena suma ploch píků analyzovaných látek normalizovaná podle maximální

odezvy (podobně jako rovnice 11 bez členu eliminace volatilních analytů). Tabulka 6 dále ukazuje průměrné hodnoty normalizovaných odezev a příslušné variační koeficienty.

Tab. 6. Placket-Burmanův design pro analýzu organických kyselin a aminokyselin

č.	injection temperature [°C]	splitless time [min]	surge pressure [kPa]	surge duration [min]	backflush	R průměr	variační koeficient
1	200	0,5	210	3,0	ANO	0,85	12,1 %
2	250	0,5	210	0,5	NE	0,99	11,3 %
3	200	3,0	210	0,5	ANO	0,74	14,3 %
4	250	3,0	210	3,0	NE	0,89	13,4 %
5	200	0,5	1 000	3,0	NE	0,82	15,2 %
6	250	0,5	1 000	0,5	ANO	0,95	16,2 %
7	200	3,0	1 000	0,5	NE	0,77	18,3 %
8	250	3,0	1 000	3,0	ANO	0,87	15,2 %

Analýza Placket-Burmanova experimentu odhalila jako významné faktory injection temperature (přímá závislost) a splitless time (nepřímá závislost). Dále lze konstatovat, že použití tlakového pulsu zkoumanou analýzu výrazně neovlivní, proto není do dalších úvah zahrnut. Systém také zásadně neovlivňují náhodné vlivy, neboť oba nekontrolované faktory byly vyhodnoceny jako statisticky nevýznamné. Pro získaný model nebyly odhaleny žádné interakce faktorů.



Obr. 25. Paretův diagram odhadu absolutních efektů

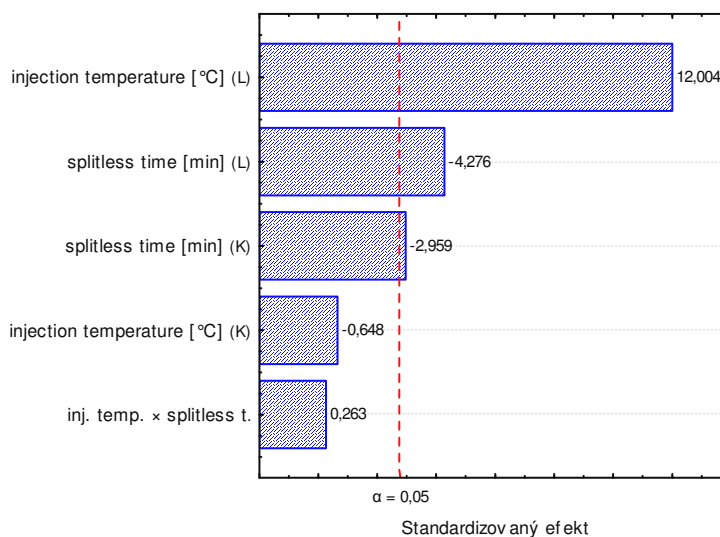
5.2.4 Centrální kompozitní design vybraných faktorů

Plackett-Burmanův design odhalil dva významné faktory (injection temperature, splitless time), jež byly dále podrobeny centrálnímu kompozitnímu designu. Použit byl částečně faktorový plán pro dva faktory se dvěma úrovněmi a deset analýz. Návrh a řešení designu (tři nástřiky, náhodné pořadí) je uveden v tabulce 7.

Tab. 7. Návrh a řešení centrálního kompozitního designu

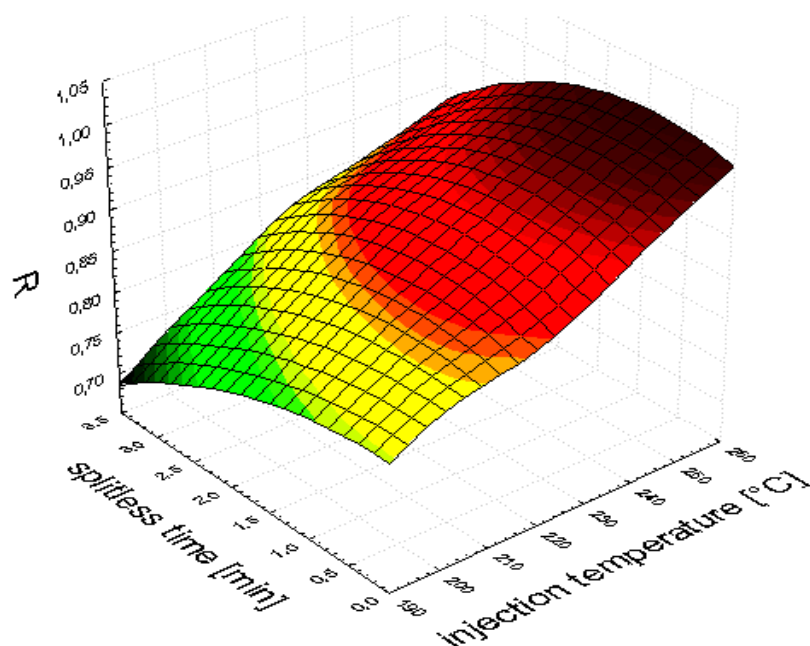
č.	injection temperature [°C]	splitless time [min]	R průměr	variační koeficient
1	200	0,5	0,84	12,5 %
2	200	3,0	0,76	13,1 %
3	250	0,5	0,97	12,9 %
4	250	3,0	0,90	9,3 %
5	198	1,5	0,81	14,0 %
6	251	1,5	0,98	9,6 %
7	225	0,2	0,88	11,6 %
8	225	2,8	0,87	10,4 %
9	225	1,5	0,90	11,2 %
10	225	1,5	0,90	10,9 %

Kompozitní design byl zpracován dle stejných parametrů jako při analýze n-alkanů (kvadratický regresní model s interakcí lineárních členů, kvadratický spline pro vykreslení). Obrázek 26 ukazuje Paretův diagram standardizovaných efektů responšní analýzy. Pro statistický model jsou v tomto případě významné zejména oba lineární členy.



Obr. 26. Paretův diagram standardizovaných efektů responšní analýzy

Na obrázku 27 je ukázán 3D graf odezvové plochy. Jako globální maximum byly vypočteny následující hodnoty: splitless time 1,3 min a injection temperature 373 °C.



Obr. 27. 3D graf odezvové plochy centrálního kompozitního designu, optimalizované faktory splitless time a injection temperature, R – odezva dle rovnice 11 ($\kappa = 0$)

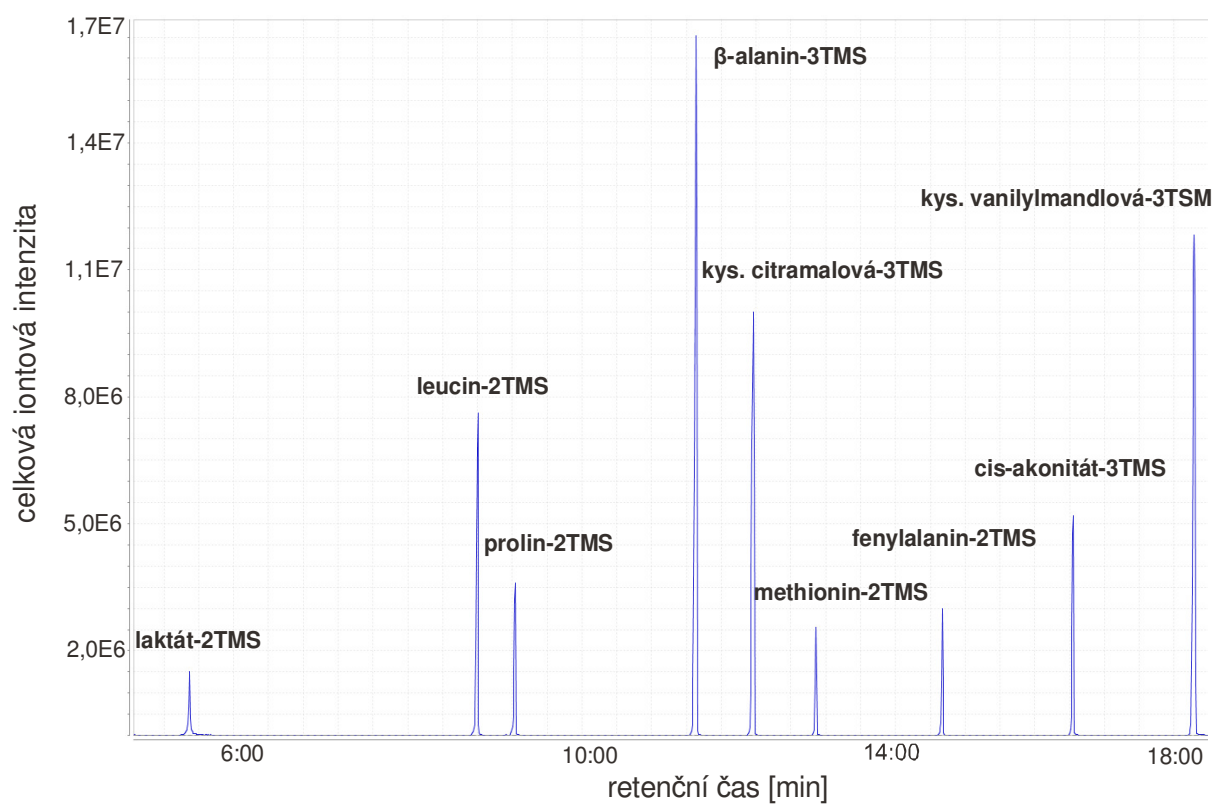
5.2.5 Konečné podmínky analýzy

Konečné parametry PTV analýzy směsi derivatizovaných organických kyselin a aminokyselin v PTV-splitless módu shrnuje tabulka 8. Nejprve byl podle linearity odezvy vybrán objem nástřiku. Analýza experimentálního designu odhalila z optimalizovaných jako významné faktory injection temperature a splitless time, tyto byly dále podrobeny centrálnímu kompozitnímu designu. Analýza responsní plochy odhalila globální maximum v případě faktoru injection temperature mimo reálně nastavitelnou oblast (373 °C), proto byla tato hodnota snížena a druhý faktor byl dopočten z regresní závislosti. Backflush ani tlakový puls nebyly využity.

Tab. 8. Optimalizované podmínky analýzy modelové směsi

dávkovaný objem [μ l]	injection temperature [°C]	splitless time [min]	backflush	tlakový puls
5	250	1,1	NE	NE

Chromatogram získaný za optimalizovaných podmínek ukazuje obrázek 28. Predikce statistického modelu činila $R_p = 0,99$ a experimentální měření ji potvrdilo. Účinnost separace dosahuje v tomto případě 200 000 teoretických pater (methionin).



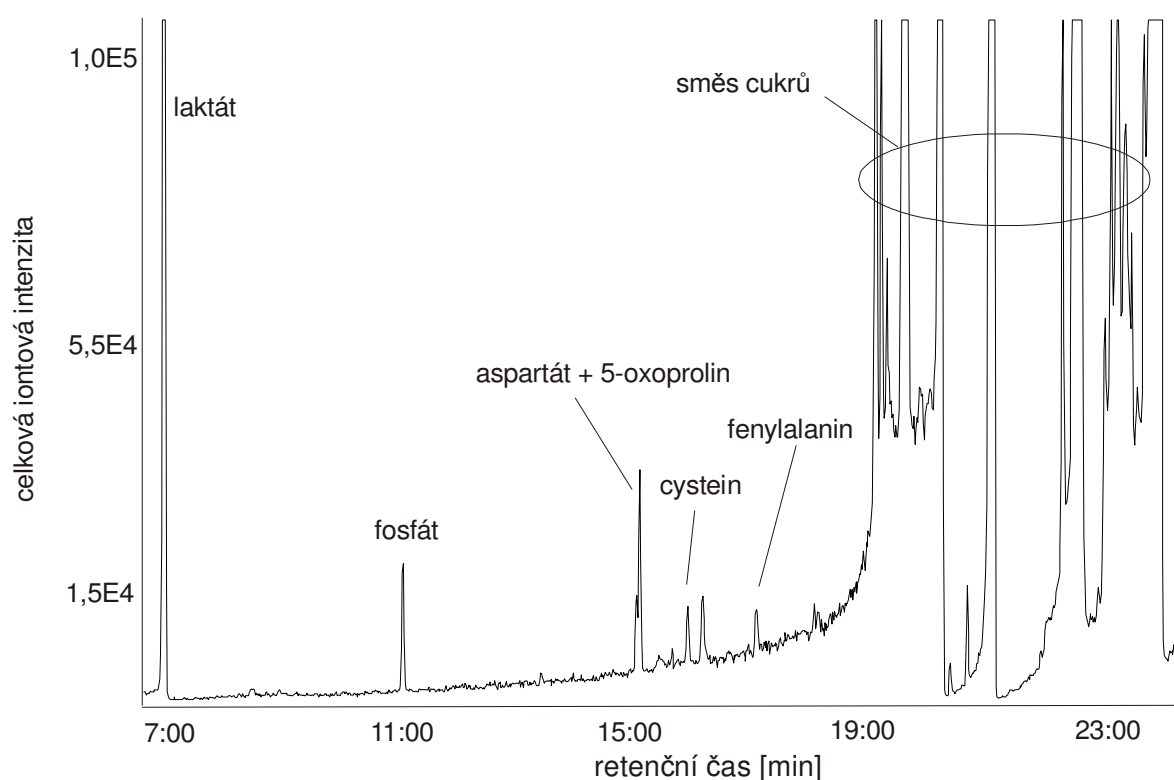
Obr. 28. Chromatogram standardů organických kyselin a aminokyselin získaný za optimalizovaných podmínek

5.3 Analýza reálných vzorků fibroblastů

5.3.1 Volba metody analýzy extraktu fibroblastů

Kultivované lidské buňky jsou pro výzkum a diagnostiku velmi důležité, pěstování je totiž uskutečňováno v přesně definovaném prostředí, kde je minimalizován vliv změny vnějších faktorů. K tomuto účelu je však nutné mít i odpovídající analytické nástroje.

Nástřik se splitem (1 μ l, poměr 1:20, 240 °C) používaný například pro analýzu organických kyselin v moči, je pro analýzu nedostatečný. V takto získaném chromatogramu (obr. 29) je možno nalézt pouze několik málo látek, z tohoto důvodu byl zvolen PTV injektor ve splitless módu (snížení limitu detekce).



Obr. 29. Chromatogram extraktu fibroblastů (trypsinizované), zvětšená základní linie

V předchozí části diplomové práce byl metodou design of experiment optimalizován nástřik plynově chromatografické analýzy modelové směsi organických kyselin a aminokyselin. Výsledné hodnoty jsou nyní použity k analýze látek extrahovatelných z lidských fibroblastů: objem 5 μ l, injection temperature 250 °C, splitless time 1,1 min.

Odebrané fibroblasty byly kultivovány standardním postupem v DMEM médiu. Šest vzorků (10^6 buněk) stejné linie bylo sklizeno metodou trypsinizace (T1–T6), dalších šest vzorků stejné linie metodou quenchingu studeným methanolickým roztokem (Q1–Q6). Intracelulární metabolity sklizených buněk byly extrahovány methanolem, derivatizovány (viz kap. 4.3), analyzovány plynovým chromatografem a detekovány hmotnostním spektrometrem.

Interpretace chromatogramů je v tomto případě založena na porovnání celkového profilu látek, které se nacházejí v intracelulárním obsahu, nikoli na přesném určení jednotlivých množství. To je znesnadňováno především skutečností, že mnohé organické kyseliny (fumarát, sukcinát) tvoří při derivatizaci více než jeden TMS-derivát. Tuto vlastnost mají také aminokyseliny (glycin, lysin), přičemž derivatizace aminoskupiny navíc probíhá kaskádovitě, je tedy nutno standardizovat čas od ukončení derivatizace po vlastní nástřik [80].

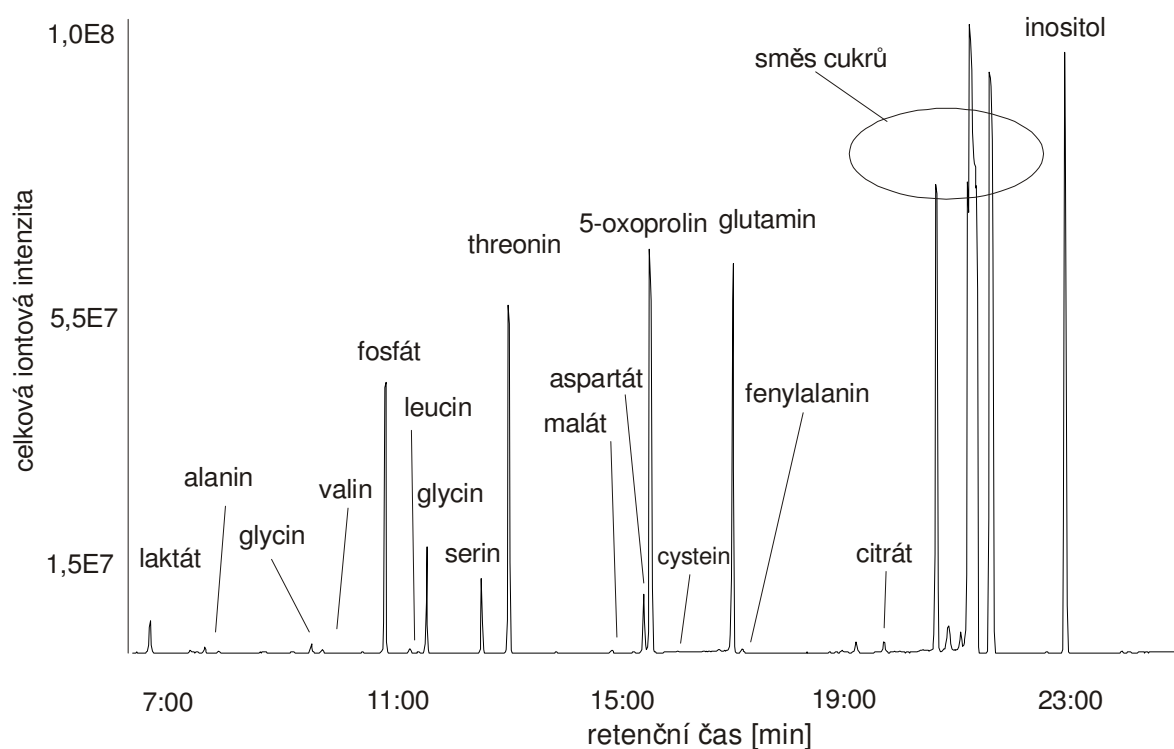
5.3.2 Analýza buněk sklizených quenchingem

V získaných chromatogramech bylo možno identifikovat (shoda s knihovnou spekter 66–98 %, srovnání vypočtených retenčních indexů s retenčními indexy uvedenými v zakoupené knihovně) následující látky: alanin, β -alanin, aspartát, citrát, cystein, glukosa (a další špatně rozlišitelné cukry), glutamin, glycin, cholesterol, inositol, izoleucin, laktát, lysin, malát, fenylalanin, fosfát (difosfát), prolin, 5-oxoprolin, serin, kyselina stearová, threonin, valin. Dále byly v chromatogramu pozorovány píky odpovídající produktům degradace derivatizačního činidla. Některé minoritní píky se nepovedlo identifikovat vůbec. Některé vlastnosti identifikovaných látek (NIST MS Library), spolu s vyhodnocením analýzy buněk sklizených quenchingem (Q1), shrnuje tabulka 9, chromatografický záznam této analýzy ukazuje obrázek 30.

Tab. 6. Analýza intracelulárního obsahu fibroblastů (QI, sklizeno quenchingem)

látka (τ)	Mr	Mr (τ -TMS)	RI (τ -TMS) NIST	RI* (τ -TMS)	m/z (QI) τ -TMS	zastoupení plochy (TIC) [%]	shoda s knihovnou NIST [%]
laktát (2)	90	234	1 063	1 051	219	0,70	91
valin (1)	117	189	1 085	1 082	146	0,08	92
alanin (2)	89	233	1 090	1 090	116	0,04	75
fosfát (3)	98	314	1 273	1 270	299	6,91	95
izoleucin (2)	131	275	1 275	1 272	158	0,12	83
prolin (2)	115	259	1 302	1 302	142	0,03	75
glycin (3)	75	291	1 317	1 310	248	1,78	82
sukcinát (2)	118	262	1 322	1 317	241	0,01	77
serin (3)	105	321	1 360	1 365	204	7,12	66
threonin (3)	119	335	1 387	1 389	291	7,12	98
β -alanin (3)	89	305	1 434	1 434	174	0,02	97
malát (3)	134	350	1 501	1 499	233	0,06	73
aspartát (3)	133	349	1 531	1 536	100	1,04	72
5-oxoprolin (2)	129	273	1 534	1 547	156	11,58	81
cystein (3)	121	337	1 568	1 578	220	0,04	82
glutamin (3)	120	336	1 634	1 642	246	9,13	87
fenylalanin (2)	165	309	1 649	1 649	218	0,12	79
citrát (4)	192	480	1 843	1 840	183	0,27	74
inositol (6)	180	612	2 129	2 129	305	0,04	67
kys. stearová (1)	284	356	2 243	2 245	341	0,02	75

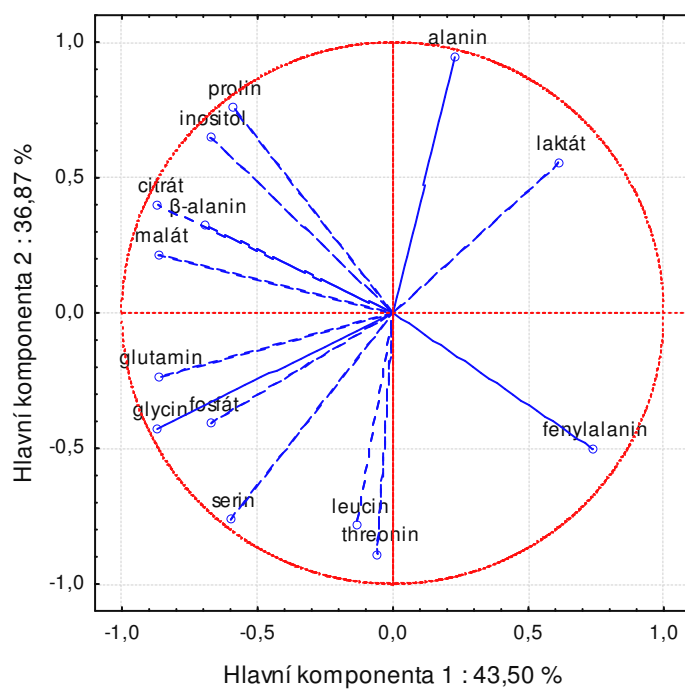
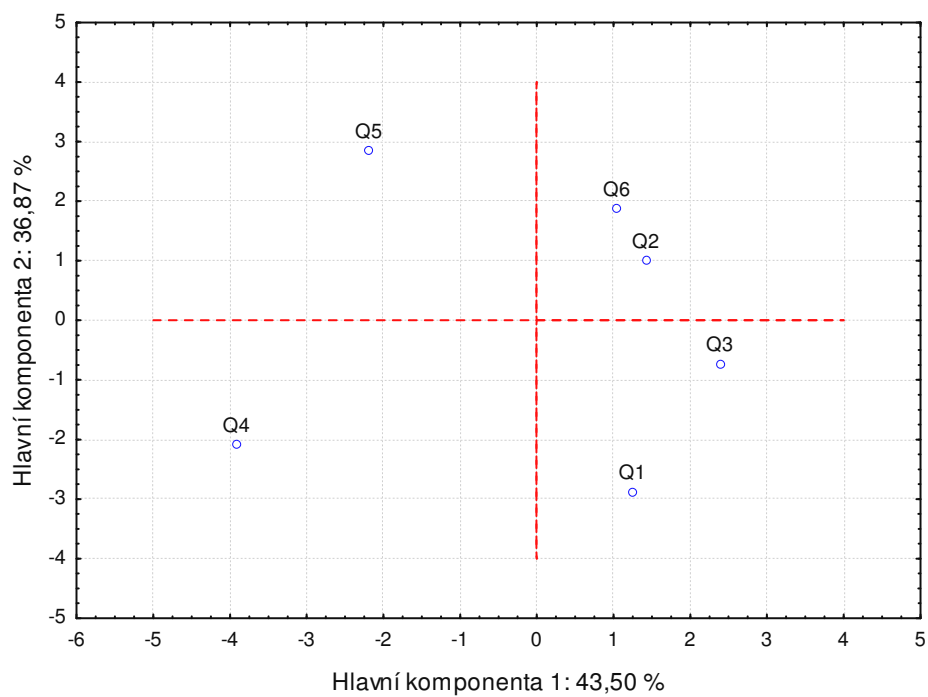
Mr – relativní molekulová hmotnost; TMS – trimethylsilylderivát; τ – stupeň silylace; RI* – retenční indexy vypočtené pro užití podmínky separace (kap. 4.2); QI – kvantifikační ion



Obr. 30. Chromatogram extraktu fibroblastů sklízených quenchingem (Q1)

Pro odhalení hlubších souvislostí v získaných datech byly vzorky (Q1–Q6) následně porovnány analýzou hlavních komponent ($\alpha = 0,05$). Pro analýzu bylo vybráno celkem 14 metabolitů, kvantifikovatelných (dle příslušných iontů, tab. 6) ve všech jednotlivých chromatogramech (alanin, β -alanin, citrát, fenylalanin, fosfát, glutamin, glycin, inositol, laktát, leucin, malát, prolin, serin, threonin). Pro správnost byla data jednotlivých analýz standardizována na celkový iontový proud.

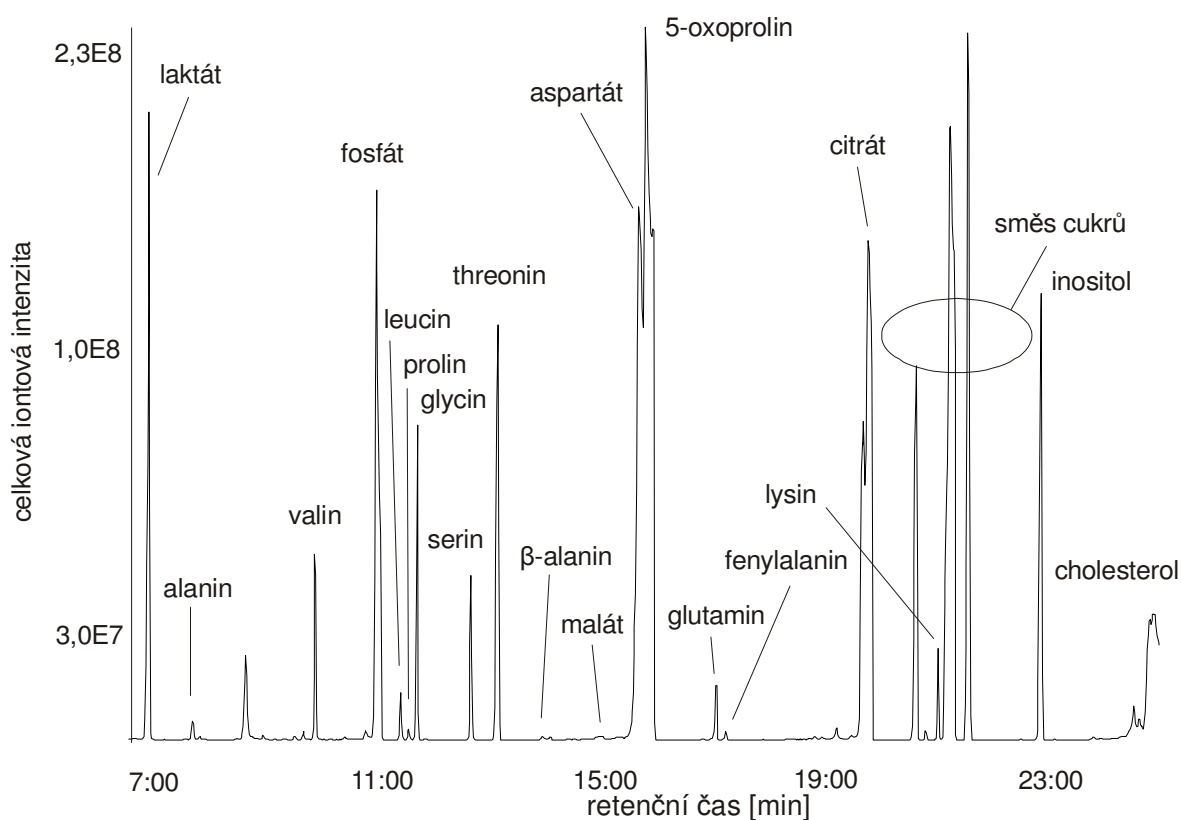
Na obrázku 31 lze vidět projekci objektů (jednotlivých vzorků) a proměnných (zkoumaných látek) do roviny první a druhé hlavní komponenty (vysvětlují variabilitu v datech z 80,37 %). Lze rozpoznat blízkou podobnost mezi vzorky Q2 a Q6, jako nepodobný ostatním se jeví vzorek Q4. Dále lze konstatovat, že variabilita je způsobena převážně množstvím fenylalaninu, dále laktátu a alaninu. Nejvíce spolu korelují hodnoty koncentrací β -alaninu a citrátu, dále leucinu a threoninu a také glycinu a fosfátu.



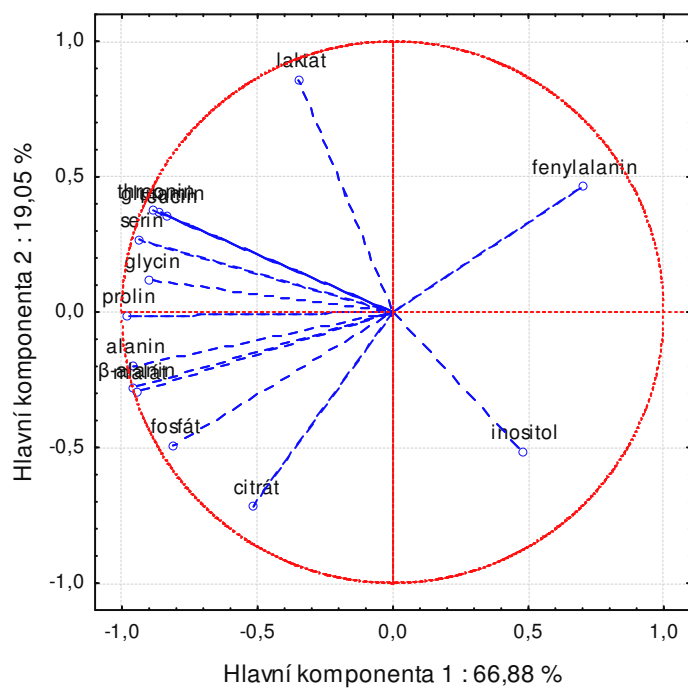
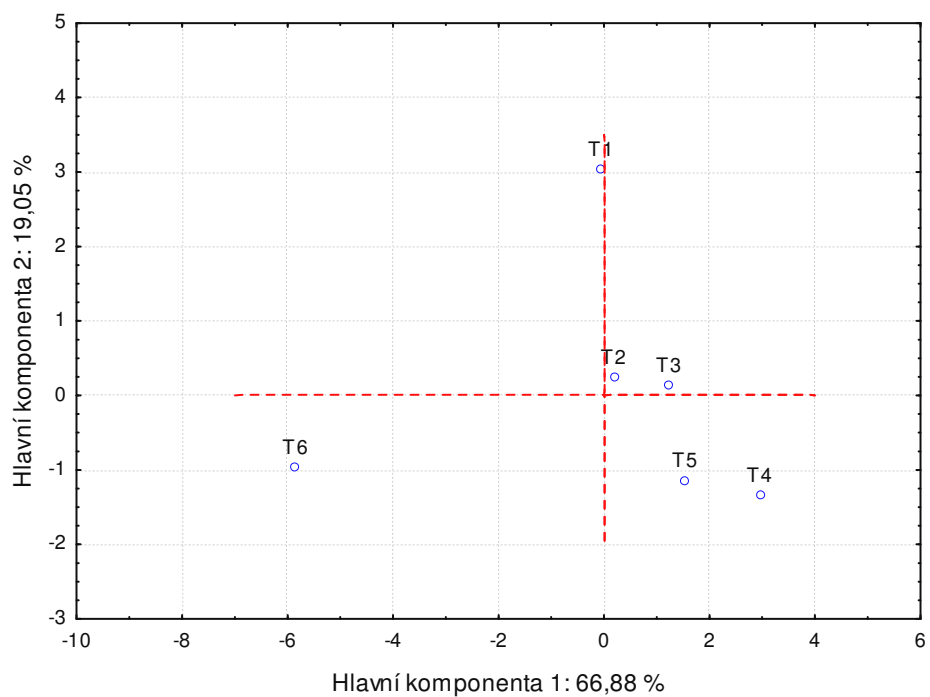
Obr. 31. Projekce případů a proměnných do komponentní roviny, quenčované buňky

5.3.3 Analýza buněk sklizených trypsinizací

V chromatografickém záznamu analýzy extraktu fibroblastů, které byly sklizeny metodou trypsinizace (obr. 32), byly nalezeny totožné metabolity jako v případě sklizení quenchingem. Rovněž byla provedena analýza hlavních komponent (obr. 33), zde první a druhá hlavní komponenta vysvětlují míru variability v datech z 85,93 %. Podobnost lze nalézt u vzorků T2–T5, naopak vzorky T1 a T6 jsou odlišné. I v tomto případě je variabilita způsobena hladinami fenylalaninu a laktátu, ale na rozdíl od quenchovaných fibroblastů i hladinami inositolu. Vysokou míru korelace vykazují threonin s glutaminem a malát s β -alaninem.



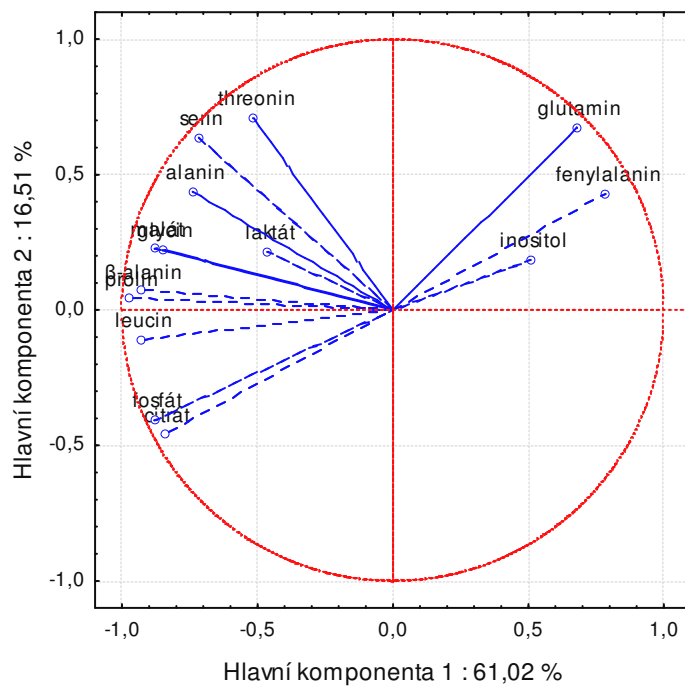
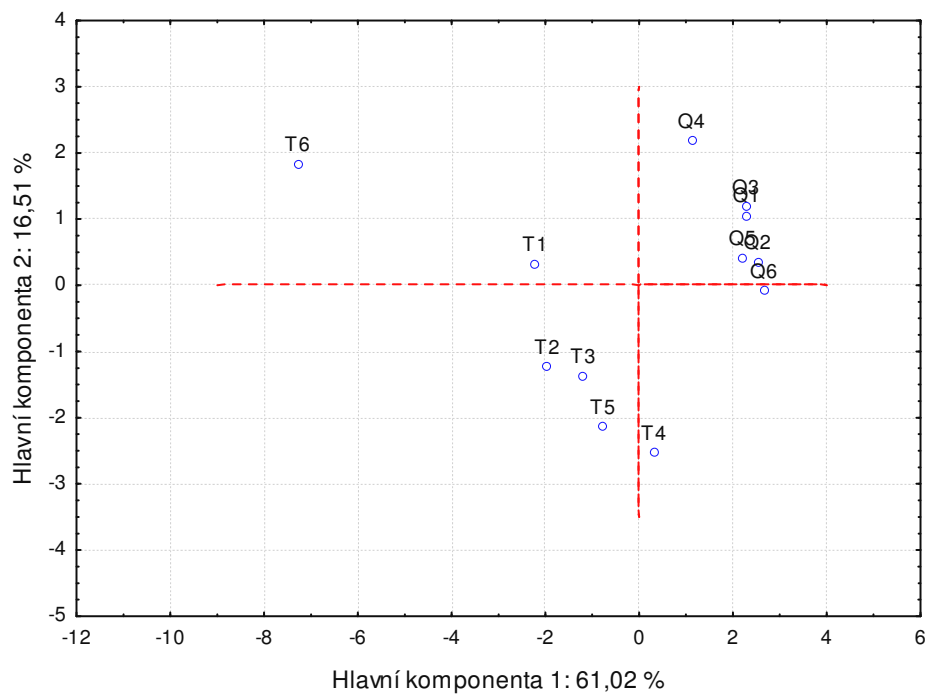
Obr. 32. Chromatogram extraktu fibroblastů sklizených trypsinizací (T3)



Obr. 33. Projekce případů a proměnných do komponentní roviny, trypsinizované buňky

5.3.4 Porovnání metod sklízení buněk

Na obrázku 34 lze vidět projekci případů a proměnných do komponentní roviny 1-2 (celkové procento vysvětlené variability 77,53 %) pro obě metody sklízení fibroblastů současně. Je patrné, že zkoumané metody je možné od sebe odlišit. Navíc lze pozorovat, že rozptyl quenchovaných objektů je mnohem menší, než v případě trypsinizace. Tato skutečnost potvrzuje dřívější publikace (např. [81]), že metoda quenchingu je pro metabolomické studie zásadní, neboť lépe odráží skutečné *in vivo* hladiny metabolitů v buňkách. Rozdíly jsou opět způsobeny hladinami fenylalaninu a nyní i glutaminu, v menší míře pak inositolem. Korelovaná jsou množství glycinu a malátu, prolinu a β -alaninu, rovněž fosfátu a citrátu.



Obr. 34. Projekce případů a proměnných do komponentní roviny, porovnání metod sklizení

ZÁVĚR

Metabolomika je v současné době bouřlivě se rozvíjející vědní disciplína. Spojuje poznatky z mnoha odvětví – biochemie, biologie, genetiky, medicíny, analytická chemie, informatiky aj. Zkoumáním pochodů, které se odehrávají v živých organismech, vědci odhalují stále nová tajemství života. K určení metabolomu (celkového obrazu metabolitů nacházejících se v buňkách či tkáních) metabolomice slouží nejrůznější postupy analytické chemie. Velmi rozšířené jsou účinné separační metody (plynová a kapalinová chromatografie, kapilární elektroforeza) ve spojení s citlivými detektory (hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance).

Cílem předkládané práce byla optimalizace nástřiku velkého objemu vzorku pro plynově chromatografickou analýzu s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Jako inlet pro velkoobjemový nástřik byl zvolen teplotně programovatelný injektor. Optimalizace nástřiku byla prováděna statistickou metodou design of experiment.

Nejprve byly optimalizovány podmínky pro modelovou směs n-alkanů. Tato část práce byla zaměřena na bližší seznámení se s metodikou práce s injektorem a vyhodnocováním a zpracováním dat. Byla také zkoumána relevance použití metody design of experiment.

Dalším krokem byla optimalizace nástřiku směsi derivatizovaných organických kyselin a aminokyselin pomocí v předchozí práci vyzkoušeného postupu. Nalezené optimální podmínky byly následně použity pro analýzu metabolomu kultivovaných lidských fibroblastů. Použití buněk je velmi vhodné pro výzkum a diagnostiku, neboť je možné při jejich pěstování zajistit konstantní podmínky a omezit tak nežádoucí vliv náhodných vnějších faktorů.

Do budoucna by se práce měla zaměřit na přesnou kvantifikaci jednotlivých metabolitů a interpretaci jejich biochemického významu. Také by měly být prozkoumány další metody, které by vedly ke snížení limitu detekce těchto analytů nebo k rozšíření jejich počtu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Voet D., Voetová J. G.: *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha, 1995, překlad z anglického originálu Arnošt Kotyk a kol. ISBN 80-85605-44-9.
- [2] Goodarce R.: *Metabolomics 1* (2005) 1–2.
- [3] Kotlík B., Růžičková K.: *Chemie II. v kostce*. Fragment, Havlíčkův Brod, 1997. ISBN 80-7200-342-9.
- [4] Foltin J., Ransom J., Oransky J. M. (editors): *Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition*. McGraw-Hill Companies, 2003. ISBN 0-07-138901-6.
- [5] Pilátová K.: *Metabolomika*. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 2008.
- [6] Dunn W. B., Ellis D. I.: *Trends in Analytical Chemistry 24* (2005) 285–294.
- [7] Nicholson J. K., et al.: *Nature Reviews 1* (2002) 153–160.
- [8] Dettmer K., Aronov P. A., Hammock B. D.: *Mass Spectrom Rev. 26* (2007) 51–78.
- [9] Moldoveanu S. C, David V.: *Sample preparation in chromatography*. ELSEVIER, Hardbound, 2002. ISBN-13: 978-0-444-50394-7.
- [10] Štulík a kol.: *Analytické separační metody*. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha, 2005. ISBN 80-264-0852-9.
- [11] Vaidyanathan S.: *Metabolomics 1* (2005) 17–28.
- [12] Pope G. A. et al.: *Yeast 24* (2007) 667–679.
- [13] Benkeblia N. et al.: *Metabolomics 3* (2007) 297–305.
- [14] Trethewey R. N.: *Current Opinion in Plant Biology 7* (2004) 196 – 201.
- [15] Farre E. M., Fernie A. R., Willmitzer L.: *Metabolomics 4* (2008) 161–170.
- [16] Kell G. D.: *Current Opinion in Microbiology 7* (2004) 296–307.
- [17] Ishii N., Soga T., Nishioka T., Tomita M.: *Metabolomics 1* (2005) 29–37.
- [18] German J. B., Hammock B. D., Watkins S. M.: *Metabolomics 1* (2005) 3–9.

- [19] Objevy, které změni náš život – Metabolomika. Ekonom.iHNed.cz, převzato z měsíčníku MIT Technology Review.
Dostupné z <http://ekonom.ihned.cz/c1-16254800-objevy-ktere-zmeni-nas-zivot> (2. 6. 2005)
- [20] Sabatine M. S. et al.: *Circulation* 112 (2005) 3868–3875.
- [21] Wu A. H. B.: *Biomarkers Med.* 1 (2007) 45–57.
- [22] Yang Ch., Richardson A. D., Osterman A., Smith J. W.: *Metabolomics* 4 (2008) 13–29.
- [23] Perroud B. et al.: *Molecular Cancer* 5 (2006) 64.
- [24] Aleryani S. L. et al.: *Clinica Chimica Acta* 359 (2005) 141–149.
- [25] Tong W. et al.: *Toxicogenomics* 112 (2004) 1622–1627.
- [26] Munger J. et al. : *PLoS Pathog* 12 (2006) 1165–1175.
- [27] Kuhara T.: *Journal of Chromatography B* 758 (2001) 3–25.
- [28] Šťastná S. (ed.): *Metabolická příručka 2007*. Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha, 2007. Dostupné z <http://www.udmp.cz> (26. 4. 2007)
- [29] Kuhara T.: *Journal of Chromatography B* 855 (2007) 42–50.
- [30] Schnackenberg L. K., Beger R. D.: *Drug Discovery Today: Technologies* 4 (2007) 13–16.
- [31] Keun H. C.: *Pharmacology & Therapeutics* 109 (2006) 92–106.
- [32] Kussman M., Raymond F., Affolter M.: *Journal of Biotechnology* 124 (2006) 758–787.
- [33] Gibney M. J. et al.: *Am. J. Clin. Nutr.* 82 (2005) 497–503.
- [34] Zeisel S. H.: *J. Nutr.* 135 (2007) 1613–1616.
- [35] Walsh M. C. et al.: *Am. J. Clin. Nutr.* 84 (2006) 531–539.
- [36] Wiahart D. S.: *Nucleic Acids Research* 35 (2007) 521–526.
- [37] Tohge T., Fernie A. R.: *Phytochemistry* 70 (2009) 450–456.

- [38] Scott R. P. W.: *Chromatographic Detectors*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996. ISBN 0-8247-9779-5.
- [39] Jennings W., Mittlefehldt E., Stremple P.: *Analytical Gas Chromatography*. Academic Press, San Diego, 1997. ISBN 0-12-384357-X.
- [40] Grob R. L., Barry E. F.: *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2004, ISBN 0-471-22983-0.
- [41] Šíma J.: *Vybrané kapitoly a aplikace plynové chromatografie*. Materiály pro přednášky z Analytické chemie na Biologické fakultě Jihočeské univerzity. Dostupné z http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm (26.11.2007)
- [42] McNair H. M., Miller J. M.: *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998. ISBN 0-471-17261-8.
- [43] Pierce A. E.: *Silylation of organic compound*. Pierce Chemical Company, Rockford, 1968.
- [44] Toyooka T. (editor): *Modern Derivatization Methods for Separation Sciences*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 1999. ISBN 0-471-98364-0.
- [45] Riddelová K.: *Izolační a separační metody – Plynová chromatografie (Nástříky)*, učební texty VŠCHT Praha, 2007. Dostupné z http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_GC_NASTRIKY_1107.pdf (6. 11. 2008)
- [46] Korenková E., Matisová E., Slobodník E.: *Waste Management* 26 (2006) 1005–1016.
- [47] Hoh E., Mastovska K.: *Journal of chromatography A*, 1186 (2008) 2–5.
- [48] *Operating Manual for TRACE GC Ultra*, Thermo Fisher Scientific Inc., January 2007 Edition, Milan, Italy, 2007.
- [49] Villén J., Señoráns F. J., Herraiz M.: *J. Microcolumn Separations* 11(1999) 89–95.
- [50] Quintana J. B. et al.: *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27–39.
- [51] Mol H. G. J. et al.: *J High Resol. Chromatogr.* 19 (1999) 69–79.
- [52] Drechsel D. et al.: *Chromatographia* 54 (2001) 114–154 .
- [53] Hu R., Zhang, L. Yang Z.: *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2007) 349–359.

- [54] Kuhara T.: *Journal of Chromatography B* 758 (2001) 3–25.
- [55] León V. M. et al.: *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91–101.
- [56] Teske J., Efer J., Engewald W.: *Chromatographia* 46 (1997) 580–586.
- [57] Miñones Vázquez M. et al.: *J. Chromatogr. A*, 919 (2001) 363–371.
- [58] Ubik K.: *Fyzikálně-chemické metody (Hmotnostní spektrometrie), cyklus Organická chemie, svazek 24*. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha 1999. ISBN 80-86241-05-X.
- [59] Ekman R. et al. (ed.): *Mass spectrometry : instrumentation, interpretation, and applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2009. ISBN 978-0-471-71395-1.
- [60] Tranter G., Holmes J., Lindon J. (editors): *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Academic Press, Hardbound, 2000. ISBN 0-12-226680-3.
- [61] Douglas F.: *GC/MS Analysis*. Scientific Testimony (online journal) Dostupné z <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html> (6. 11. 2008)
- [62] Hardy J.: HordeNet, stránky katedry chemie University of Akron, Ohio, USA. Dostupné z http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/Mass_Spec/index.html (7. 11. 2008)
- [63] Scott R. P. W.: *Tandem technics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1997. ISBN 0-471-96760 2.
- [64] Kitson G. F., Larsen B. S., McEven C. E.: *Gas chromatography and mass spectrometry*. Academic Press, San Diego, 1996, ISBN 0-12-483385-3.
- [65] Fifield F.W., Kealy D.: *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. Blackwell Science Ltd, Malden, 2000. ISBN 0-632-05384-4.
- [66] Dayal P. et al: *Pharm. Sci. Tech.* 6 (2005) 573–585.
- [67] Sahni N. S., Isaksson T., Næs T.: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 56 (2001) 105–121.
- [68] Guervenou J. et al.: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 63 (2002) 81–89.
- [69] Leesawat P., Laopongpaisan A., Sirithunyalug J.: *CMU. Journal* 3 (2004) 97–112.
- [70] Florián Č.: *CHEMagazín* 12 (2003) 14–16.
- [71] Smagunova A. N. et al.: *Journal of Analytical Chemistry* 59 (2004) 1146–1152.

- [72] Annadurai G. et al: *Bioprocess Engineering* 23 (2000) 715–719.
- [73] Concha-Graña E. et al.: *Journal of Chromatography A* 958 (2002) 17–24.
- [74] Tong L., Chen C., Wang, C.: *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 31 (2007) 1049–1057.
- [75] Lundstedt T.: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42 (1998) 3–40.
- [76] Blecha P., Vavřík I.: *JAKOST II – řízení a zabezpečování jakosti, kap. 6 – DoE*. interní učební texty Ústavu výrobních strojů, systémů a robotiky Fakulty strojního inženýrství VUT v Brně. Dostupné z <http://simulace.fme.vutbr.cz/stranky/studium/opory/jakost/doe.pdf> (17. 3. 2009)
- [77] Morávka J., Maroš B., Michalek K.: *Vliv neortogonality plánu experimentu na statistickou korektnost modelu*. Příspěvek na konferenci Technical Computing Prague 2008. Dostupné z http://dsp.vscht.cz/konference_matlab/MATLAB08/prispevky/073_moravka.pdf (12. 3. 2009)
- [78] Žídková, L., Hron K., Friedecký D., Adam T.: *Quenching and extraction of human skin fibroblasts in adherent culture for metabolomic studies*. Dosud nepublikováno.
- [79] Koek M. M. et al.: *Anal. Chem.* 78 (2006) 1272–1281.
- [80] Kanani H., Chrystanthopoulos, P. K., Klapa, M. I.: *Journal of Chromatography B* 871 (2008) 191–201.
- [81] Sellick C. A. et al.: *Anal. Chem.* 81 (2009) 174–183.