

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Analýza biologicky aktivních látek pomocí CE-MS**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:

Lucie Surá

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

2022 Olomouc

## Bibliografická identifikace

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Lucie Surá  |
| Název práce:             | Analýza biologicky aktivních látek pomocí CE-MS   |
| Typ práce:               | Bakalářská práce  |
| Pracoviště:              | Katedra analytické chemie   |
| Vedoucí práce:           | doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.  |
| Rok odevzdání práce:     | 2022  |
| Anotace:                 | Bakalářská práce je zaměřena na vývoj metody ke stanovení L-karnosinu a $\beta$ -alaninu v biologických vzorcích pomocí CE-ESI-MS. Zároveň se zabývá použitelností komerčního derivatizačního činidla k derivatizaci vzorku pro analýzu. Funkčnost metody byla prokázána pro standardy a jako reálný vzorek byl zvolen vzorek moči. |
| Klíčová slova:           | AccQ Tag Ultra Derivatization Kit, $\beta$ -alanin, kapilární elektroforéza, CE-ESI-MS, derivatizace, L-karnosin, hmotnostní spektrometrie  |
| Počet stran:             | 41  |
| Počet příloh:            | 0   |
| Jazyk:                   | Český   |

## Bibliographical identification

Author's first name and surname: Lucie Surá

Title: Analysis of biologically active compounds by CE-MS

Type of thesis: Bachelor's thesis

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

The year of submission: 2022

Annotation: The Bachelor's thesis is focused on the development of method for a determination of L-carnosine and  $\beta$ -alanine in biological samples by CE-ES-MS. There's also discussed the applicability of commercial derivatization reagent to derivatize the sample for analysis. The method has been validated for analysis of the standards and the urine sample was chosen as the real sample.

Keywords: AccQ Tag Ultra Derivatization Kit,  $\beta$ -alanine, capillary electrophoresis, CE-ESI-MS, L-carnosine, mass spectrometry

Number of pages: 41

Number of appendices: 0

Language: Czech

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a uvedla jsem veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 1. 7. 2022

.....

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, vynaložený čas a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat rodině, kamarádům a příteli za jejich podporu a pomoc během studia.

Mé poděkování také patří Katedře analytické chemie a Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí přístrojového vybavení a chemikálií k vypracování této bakalářské práce.

# OBSAH

|       |                                     |    |
|-------|-------------------------------------|----|
| 1     | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....      | 8  |
| 2     | SEZNAM OBRÁZKŮ .....                | 10 |
| 3     | ÚVOD .....                          | 12 |
| 4     | TEORETICKÁ ČÁST.....                | 13 |
| 4.1   | Kapilární elektroforéza .....       | 13 |
| 4.1.1 | Druhy kapilární elektroforézy ..... | 13 |
| 4.1.2 | Konstrukce CE .....                 | 15 |
| 4.2   | Hmotnostní spektrometrie.....       | 16 |
| 4.2.1 | Ionizace .....                      | 17 |
| 4.2.2 | Hmotnostní analyzátory .....        | 18 |
| 4.3   | CE-ESI-MS .....                     | 20 |
| 4.4   | $\beta$ -alanin.....                | 21 |
| 4.5   | L-Karnosin .....                    | 21 |
| 4.6   | Kreatinin.....                      | 22 |
| 5     | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....            | 24 |
| 5.1   | Chemikálie a přístroje .....        | 24 |
| 5.1.1 | Chemikálie .....                    | 24 |
| 5.1.2 | Přístroje .....                     | 24 |
| 5.2   | Příprava vzorků .....               | 25 |
| 5.2.1 | Příprava základního pufru .....     | 25 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.2.2 | Derivatizace vzorků.....                                     | 25 |
| 5.2.3 | Derivatizační činidlo .....                                  | 27 |
| 5.2.4 | Derivatizace standardů .....                                 | 28 |
| 5.2.5 | Příprava kalibrační řady $\beta$ -alaninu a L-karnosinu..... | 28 |
| 5.2.6 | Derivatizace vzorků moči.....                                | 29 |
| 6     | VÝSLEDKY A DISKUZE.....                                      | 30 |
| 6.1   | Ověření derivatizace .....                                   | 30 |
| 6.2   | Kalibrační řada .....  | 32 |
| 6.3   | Reálné vzorky .....  | 37 |
| 7     | ZÁVĚR.....   | 38 |
| 8     | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....                              | 39 |

# 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE – kapilární elektroforéza

IEF – izoelektrická fokusace

ITP – izotachoforéza

CZE – kapilární zónová elektroforéza

CIEF – kapilární izoelektrická fokusace

LE – vedoucí elektrolyt

TE – koncový elektrolyt

EOF – elektroosmotický tok

MS – hmotnostní spektrometrie

m/z – poměr hmotnosti a náboje

ESI – elektrosprejová ionizace

NSI – nanosprejová ionizace

MALDI – laserová desorpce/ionizace za pomoci matrice

SELDI – laserová desorpce/ionizace povrchu

MALDI-AP – laserová desorpce/ionizace za pomoci matrice při atmosférickém tlaku

UV – ultrafialové záření

QMS – kvadrupólový hmotnostní spektrometr

ITMS – hmotnostní spektrometr s iontovou pastí

TOF – analyzátor doby letu

TOFMS – hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu

FT-ICR MS – hmotnostní spektrometrie s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací

QQQ – trojitý kvadrupólový analyzátor

NMR – nukleární magnetická rezonance



CE-ESI-MS – kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií přes elektrosprejovou ionizaci

CE-MS – kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií

CE-ESI – kapilární elektroforéza spojená s elektrosprejovým ionizátorem

ESI-MS – hmotnostní spektrometr s elektrosprejovou ionizací

IUPAC – Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii

ATP – adenosintrifosfát

LC-MS – kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

HPLC-MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

AQC – 6-aminochinolylsukcinimid karbamát

AMC – 6-aminochinolin

NHS – N-hydroxysukcinimid

AccQ BB – AccQ Tag Ultra Borate Buffer

MRM – multiple reaction monitoring (sledování více reakcí)

TIC – total ion current (celkový iontový průchod)

EIC – extracted ion chromatogram (extrahovaný iontový chromatogram)

SRM – selected reaction monitoring (monitorování vybrané reakce)

## 2 SEZNAM OBRÁZKŮ

|   |    |
|---|----|
| Obr. 1: Vznik elektrické dvojvrstvy a výsledný elektroosmotický tok (podle zdroje [2]) ..             | 15 |
| Obr. 2: Schéma kapilární elektroforézy (podle zdroje [2]).....  | 15 |
| Obr. 3: (1) EOF v kapiláře, (2) tok vyvolaný tlakem (podle zdroje [2]) .....                          | 16 |
| Obr. 4: Schéma MS s trojitým kvadrupólovým analyzátozem [14] - upraveno .....                         | 19 |
| Obr. 5: Schéma ESI s pomocnou kapalinou [15] - upraveno .....   | 20 |
| Obr. 6: $\beta$ -Alanin.....  | 21 |
| Obr. 7: Syntéza L-karnosinu v těle [20] - upraveno .....  | 22 |
| Obr. 8: Mezomerní struktury kreatininu .....  | 23 |
| Obr. 9: Vznik kreatininu dehydratací kreatinu .....   | 23 |
| Obr. 10: Názorné schéma derivatizace aminokyselin pomocí činidla AQC .....                            | 26 |
| Obr. 11: Derivatizovaný $\beta$ -alanin .....   | 26 |
| Obr. 12: Derivatizovaný L-karnosin.....   | 26 |
| Obr. 13: Reakce činidla AQC se směsí v roztoku [27] – upraveno.....                                   | 27 |
| Obr. 14: Hmotnostní spektrum derivatizovaného standardu $\beta$ -alaninu .....                        | 30 |
| Obr. 15: Hmotnostní spektrum derivatizovaného standardu L-karnosinu.....                              | 31 |
| Obr. 16: Hmotnostní spektrum s fragmentací iontu o m/z 395 .....                                      | 31 |
| Obr. 17: TIC sken vzorku a EIC chromatogramy pro L-karnosin (červeně) a $\beta$ -alanin (zeleně)..... | 32 |
| Obr. 18: Hmotnostní spektrum v čase 10,978 minut pro EIC pík L-karnosinu.....                         | 33 |
| Obr. 19: Hmotnostní spektrum v čase 11,573 minut pro EIC pík $\beta$ -alaninu .....                   | 34 |
| Obr. 20: Hmotnostní spektrum pro nejvyšší pík TIC skenu v čase 4,626 minut.....                       | 34 |
| Obr. 21: Hmotnostní spektrum v čase 8,484 minut pro druhý vyšší pík v TIC skenu .....                 | 35 |
| Obr. 22: Hmotnostní spektrum v čase 20,161 minut pro třetí vysoký pík v TIC skenu.....                | 35 |
| Obr. 23: Graf kalibrační závislosti $\beta$ -alaninu.....   | 36 |

|   |    |
|---|----|
| Obr. 24: Graf kalibrační závislosti L-karnosinu .....     | 36 |
| Obr. 25: Výsledný SRM záznam pro reálný vzorek moči ..... | 37 |

### 3 ÚVOD

Suplementace L-karnosinem je často používána ke zlepšování sportovních výsledků. V poslední době se však používá také v medicínských terapiích zejména k podpoře funkce svaloviny. Přestože  $\beta$ -alanin je prekurzorem určujícím rychlost tvorby L-karnosinu, suplementace přímo  $\beta$ -alaninem není tak účinná pro zvýšení jeho koncentrace ve svalstvu jako suplementace samotným L-karnosinem. Jen určité procento přijatého  $\beta$ -alaninu je převáděno na L-karnosin a ze zbylého množství přijaté látky je syntetizován koenzym A. Funkce L-karnosinu v lidském těle doposud nebyly přesně specifikovány, a ačkoliv bylo navrženo více jeho funkcí, jsou potvrzeny pouze jeho pufrční účely při vysoké svalové zátěži.

Dnes se L-karnosin podává pacientům s onkologickými onemocněními prostaty po jejím chirurgickém odstranění pro normalizaci funkce močových cest, přičemž jeho vliv na svaly v močových cestách nebyl přímo prokázán. Největším rozdílem mezi syntetickým a biologickým L-karnosinem je jeho nižší hydrolizovatelnost L-karnosinázou ve střevní sliznici, čímž je umožněn jeho terapeutický potenciál.

Cílem této práce je vývoj metody použitelné pro analýzu  $\beta$ -alaninu a L-karnosinu v biologických vzorcích. Důležitou součástí je také potvrzení použitelnosti zvoleného způsobu derivatizace analytů a optimalizace metody CE-ESI-MS pro kvalitativní a kvantitativní stanovení obsahu L-karnosinu v moči pacientů, kteří podstupují podpůrnou léčbu jeho suplementací.

## 4 TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 Kapilární elektroforéza

Elektroforéza je separační elektromigrační metoda založená na separaci nabitých částic. Využívá pohyb těchto částic v aplikovaném stejnosměrném elektrickém poli, kde se rozdělují na základě rozdílných rychlostí migrace způsobených různou velikostí náboje i molekul. [1, 2]

Kapilární elektroforéza (CE) je jednou ze základních separačních elektroanalytických metod. Využívá rozdělování vlivem odlišného náboje v prostředí elektrolytu, ke kterému dochází v kapiláře po vložení elektrického napětí na její začátek a konec. Nabité částice se pohybují k protielektrodě a jejich rychlost je přímo úměrná jejich mobilitě a intenzitě elektrického pole – výpočet podle rovnice (1). Proto je možné tuto metodu použít pro širokou škálu rozpuštěných látek s vysokou selektivitou a účinností.

$$v = \mu_e \cdot E, \quad (1)$$

Kde  $v$  je rychlost částic,  $\mu_e$  je jejich mobilita a  $E$  je intenzita elektrického pole. Její jednotkou je  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . [2]

#### 4.1.1 Druhy kapilární elektroforézy

CE může probíhat více způsoby, jako je izoelektrická fokusace (IEF), izotachoforéza (ITP) a kapilární zónová elektroforéza (CZE). [2]

IEF je elektrokinetická metoda založená na migraci amfoterních sloučenin, dokud nedosáhnou svých izoelektrických bodů. Tehdy se vytvoří dynamická rovnováha a vytváří se ostré zóny s vysokou rozlišovací schopností. Izoelektrický bod amfoterní molekuly je definován jako p*H*, kdy má taková sloučenina čistý neutrální náboj. [3, 4]

IEF lze mimo jiné provádět v gelové elektroforéze. Tato forma IEF využívá nejčastěji akrylamidový gel a separace je poměrně časově náročná. Moderní IEF pro 2D gelovou elektroforézu využívají tenký gel jako molekulové síto. Vzorek je aplikován na IEF gel, který má imobilizovaný p*H* gradient, a separován v elektrickém poli. Amfolyty putují díky elektrickému poli do polohy s p*H*, ve kterém jsou neutrální. Když jsou ionty v izoelektrickém bodě, který je roven bodu gradientu p*H*, jsou v tomto bodě udržovány

a mají v něm vysokou koncentraci. [4, 5]

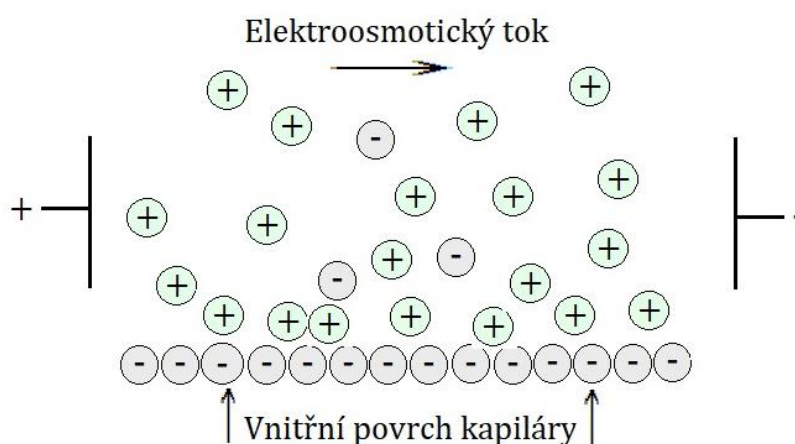
Kapilární IEF (CIEF) je stejně jako gelová IEF založená na rozdílech izoelektrických bodů amfolytů. V CIEF je kombinována vysoká rozlišovací schopnost gelové IEF s výhodami instrumentace CE a není potřeba použití stabilizačního gelu. Další výhodou je použití silnějšího elektrického pole, což umožňuje rychlé zaostřování látek podle jejich izoelektrických bodů, které jsou mobilizované díky EOF a prochází postupně detektorem. Pro tuto metodu je nutné použití kapilár s hydrolyticky stabilním pokrytím, bránícím adsorpci a změnám EOF. [3, 6]

Metoda ITP se používá pro separaci menších nabitých organických a anorganických sloučenin, ale není možná separace kationtů a aniontů současně. ITP je založena na použití nespojitých pufrů, a proto se v kapilárách používají dva různé tlumivé roztoky tzv. vedoucí elektrolyt (LE) a koncový elektrolyt (TE). Tyto pufrы mají rozdílnou elektroforetickou pohyblivost, přičemž LE má vyšší elektroforetickou pohyblivost než nejrychlejší složka vzorku a TE má pomalejší elektroforetickou pohyblivost než nejpomalejší iont v roztoku. První nádoba s počáteční elektrodou je naplněna LE a druhá s koncovou elektrodou obsahuje TE. V aplikovaném elektrickém poli se ve stacionárním stavu ionty pohybují k protielektrodě a vznikají zóny v závislosti na pohyblivosti unášených iontů. Nejprve kapilárou prochází nejrychlejší ion a jako poslední je zóna s nejpomalejším iontem. Detektorem prochází zóny postupně, a proto z něj vychází stupňovitý signál. Koncentrace iontů jsou v zónách konstantní a přímo úměrné délce zóny, což umožňuje kvantitativní stanovení analytů. [7]

CZE je účinná citlivá separační metoda, při které je možné dosáhnout vysokého počtu teoretických pater. Je nejjednodušším a nejuniverzálnějším módem CE, který je použitelný pro separaci velkých nabitých molekul. Nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími analýzu je napětí, délka kapiláry a pufr (pH a složení). Pufr by měl mít nízkou vodivost a neměl by způsobovat interference při detekci analytu. Zásadním rozdílem oproti ITP je, že v CZE zůstává složení pufru stejné v celém prostoru separace i v nádobkách s elektrodami a migrující ionty se dělí do zón, které se mohou překrývat. [2, 8, 9]

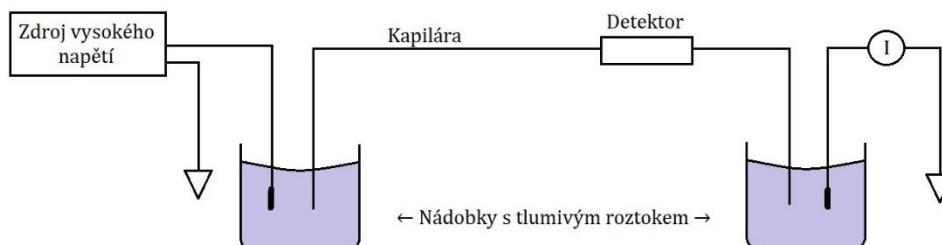
### 4.1.2 Konstrukce CE

V CE se nejčastěji používají křemenné kapiláry se silanolovými skupinami na vnitřní stěně. Tyto kapiláry mají obvykle vnitřní průměr 10-100  $\mu\text{m}$  a délku 30-100 cm. Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikovaný kovalentním navázáním molekul v závislosti na separovaném vzorku. Silanolové skupiny jsou při hodnotách pH vyšších než 4 v disociované formě a přitahují k sobě kladné ionty z roztoku pufru, čímž vzniká elektrická dvojvrstva. Polaritu napětí je možné obrátit v závislosti na náboji separovaného analytu. (Obr. 1) [1, 2]



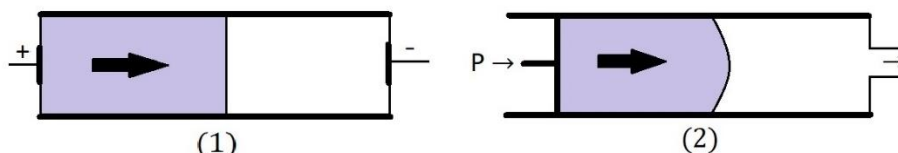
Obrázek 1: Vznik elektrické dvojvrstvy a výsledný elektroosmotický tok (podle zdroje [2])

Kapilára je ponořena do zásobní nádoby s elektrolytem, ve kterém jsou elektrody z inertního materiálu. Vzorek je dávkován do konce kapiláry, kterou je unášen přes detektor až do odpadní nádoby. (Obr. 2) Záznam se nazývá elektroforegram a zobrazuje závislost odezvy detektoru na čase. Poloha píku udává „kvalitativní“ informaci o analytu a výška píku kvantitativní informaci. [1, 10]



Obrázek 2: Schéma kapilární elektroforézy (podle zdroje [2])

Ionty jsou v roztoku unášeny k elektrodě na konci kapiláry na základě jejich opačného náboje. Díky solvataci iontů v roztoku však nejsou k elektrodě na konci kapiláry unášeny pouze ionty opačného náboje, ale celý objem roztoku. Tento jev, na kterém je založena kapilární elektroforéza, je nazýván elektroosmotický tok (EOF). Díky němu není třeba použití pumpy mobilní fáze. (Obr. 3) [2]



Obrázek 3: (1) EOF v kapiláře, (2) tok vyvolaný tlakem (podle zdroje [2])

Mezi konce kapiláry je vloženo vysoké napětí, které způsobuje pohyb iontů k protielektrodě, které jsou ale solvatované, a proto s sebou strhávají celý objem roztoku. Tím je způsobeno, že všechny ionty kladné, záporné i neutrální se pohybují jedním směrem a je možná jejich detekce. Příčinou EOF je elektrická dvojvrstva, která vzniká na rozhraní disociovaných silanolových skupin a roztoku. Na rozdíl od toku vyvolaného tlakem, který má typicky parabolický profil, EOF způsobuje plochý rychlostní profil kapaliny v kapiláře. Plochý profil způsobuje menší příspěvek k rozmytí zón analytu v porovnání s chromatografickými metodami, a tudíž i vyšší účinnost separace. [2, 10, 11]

Výhodou kapilární elektroforézy oproti jiným separačním metodám je možnost separace velmi rozdílných sloučenin. Na jednom přístroji je možná separace jak anorganických iontů, tak velkých biomolekul. Mění se pouze složení pufru použitého k separaci, případně polarita napětí v závislosti na náboji analytu. Další nespornou výhodou této metody oproti jiným je množství vzorku potřebného k separaci, přičemž stačí mikrolitry pufru a nanolitry vzorku. [10]

## 4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je vysoce výkonná detekční analytická metoda, pomocí které je možné zjistit molární hmotnost atomů či molekul v analytu a identifikovat neznámé látky. Touto metodou se zjišťuje prvkové složení ionizovaného vzorku na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), proto je také hojně využívána ve spojení s nejrůznějšími



separačními metodami. Je založena na ionizaci a fragmentaci vzorků v plynné fázi, přičemž analyt je nejprve převeden na ionty dodáním energie. Hmotnostní spektrum vyjadřuje závislost zastoupení obsažených iontů na poměru jejich  $m/z$ . [2]

Vzorky v závislosti na iontovém zdroji mohou být do přístroje dávkovány v plynném, kapalném, ale i pevném stavu. Dávkovací systém dopravuje vzorek do iontového zdroje, kde je ionizován a převeden do plynného skupenství. Ionizace probíhá bombardováním fotony, elektrony, ionty i molekulami a tepelnou nebo elektrickou energií. Při výstupu z ionizátoru je proud iontů urychlen do analyzátoru, který je rozděljuje na základě poměru  $m/z$  a ionty jsou potom převedeny iontovým převodníkem na elektrický signál. Mohou být sledovány na detektoru buď postupně nebo všechny najednou. Jako detektory jsou nejčastěji používány násobiče elektronů, jejichž princip je podobný fotonásobičům, ale obsahují katodu citlivou na dopad nabitých částic. Mezi další detektory se řadí plošné a Faradayovy detektory. Aby nedocházelo ke srážkám a odchýlkám iontů z požadované trajektorie, detektor i hmotnostní analyzátor pracují ve vakuu, proto mezi další součásti hmotnostního spektrometru patří turbomolekulární a olejová pumpa. [2]

#### **4.2.1 Ionizace**

Pro MS se využívají různé ionizační techniky jako je elektrosprejová ionizace (ESI), nanosprejová ionizace (NSI), laserová desorpce/ionizace za pomoci matrice (MALDI), laserová desorpce/ionizace povrchu (SELDI) a MALDI za atmosférického tlaku (MALDI-AP). [12]

ESI je technika probíhající za atmosférického tlaku. Využívá předionizace v roztoku, aby vícenásobně nabitě kationty nebo anionty přecházely do plynné fáze v kapičkách aerosolu přímo ze vzorku. ESI spočívá v pronikání nejlépe alespoň trochu vodného roztoku kapilárou z nerezové oceli. Konec této kapiláry je nazýván elektrosprejová jehla. Ta může být nabitá až na několik kilovoltů požadované polarity podle typu vzorku. Kombinace proudu, náboje a kapaliny vede pomocí jehly ke vzniku aerosolové disperze nabitých kapiček. Kapičky postupně ztrácejí molekuly rozpouštědla, dokud nevstoupí do hmotnostního analyzátoru, který je ve vakuu. Z důvodu přechodu mezi atmosférickým tlakem a vakuem se používají rozhraní tzv. skimmery, které umožňují postupné snižování tlaku směrem k analyzátoru. Teploty ESI se nejčastěji pohybují od pokojové teploty po 350 °C. [12]

NSI je způsob ionizace vycházející z ESI, která využívá k tvorbě iontů kombinaci kapilárního efektu a vodivosti nabitě jehly. Kapilára potažená kovem je naplněna vzorkem k analýze, který se ke špičce přesouvá kapilárním efektem a přebytkem náboje. Toto je dostačující k jemnému rozstříku bez pomoci rozprašovacího plynu nebo tlaku. [12]

MALDI je technika doplňující vlastnosti ESI a využívá k desorpci látek uložených v matrici pulzní laser o předem určené vlnové délce. Matrice je obvykle vyrobena z organické sloučeniny, která je složena z malých molekul. Tato metoda se většinou používá pro pevné vzorky. K ionizaci a desorpci vzorků je nejčastěji využíván UV dusíkový laser, ale může být použit i infračervený laser (např. CO<sub>2</sub>). [12]

SELDI je metoda odvozená od MALDI, která je založena na analytických vlastnostech povrchů a používá se ke studiu specifických biologických interakcí. Vzorkové terče SELDI jsou potaženy kovalentně navázanými funkčními skupinami, které afinitně připojují zkoumané analyty. Toto umožňuje koncentrování cílových biomolekul na sondě a eliminaci nečistot promýváním terčů před analýzou. [12]

MALDI-AP se na rozdíl od klasické MALDI neprovádí za vysokého vakua a jeho hlavní výhodou je snadnější příprava vzorku. Pro tuto techniku stejně jako pro ESI postačuje atmosférický tlak. [13]

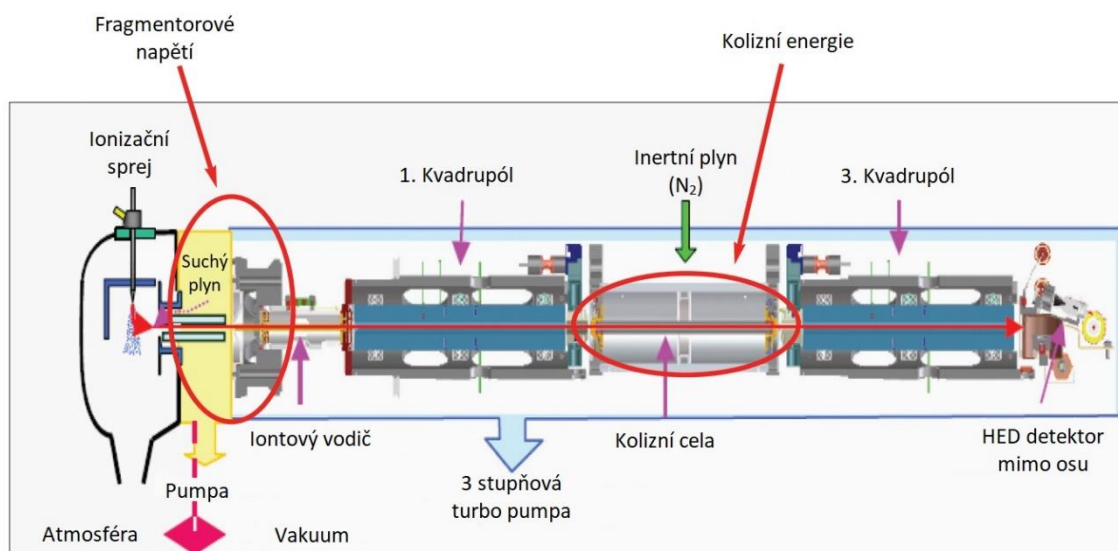
#### **4.2.2 Hmotnostní analyzátoři**

Hmotnostní spektrometry využívají k analýze různé způsoby analyzátořů např.: kvadrupólové analyzátoři (QMS), iontové pasti (ITMS), analyzátoři doby letu (TOF), nebo iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR MS). [12]

QMS jsou buď jednoduché nebo trojitě a jsou nejčastěji používány ve spojení s ESI. QMS fungují jako filtry propouštějící pouze ionty o určitém  $m/z$ . Skládají se ze čtyř tyčí o parabolickém nebo kruhovém průřezu, na které je připojeno stejnosměrné či střídavé napětí. Principem separace je pohyb iontů v elektrickém poli. Napětím je ovlivňována trajektorie iontů a tím i poměry  $m/z$ , které jsou sledovány a ostatní ionty nejsou propuštěny k detektoru. Tyto analyzátoři mají velkou citlivost, ale malé rozlišení. [2, 12]

Trojitě kvadrupólové analyzátoři (QQQ) využívají pozorování charakteristických iontů o konkrétní hodnotě  $m/z$ . Toto sledování umožňuje nastavení prvního kvadrupólu tak, aby propouštěl pouze ionty s danou  $m/z$ . Ve druhém kvadrupólu, který je naplněn

inertním plynem a je někdy nazýván kolizní cela, se tyto ionty sráží a fragmentují. Třetí kvadrupól sbírá fragmenty podle  $m/z$  v režimu skenování. (Obr. 4) Jiné nastavení tohoto spektrometru umožňuje pozorování všech iontů v analytu, což se využívá nejčastěji k analýze neznámých směsí nebo při hledání konkrétní části směsi. [12]



Obrázek 4: Schéma MS s trojitým kvadrupólovým analyzátozem [14] - upraveno

ITMS jsou oblíbeným typem analyzátoru díky možnosti miniaturizace a analýzy in situ. Mají mnoho výhod, mezi které patří vysoká citlivost, přesnost a možnost tandemové MS. Přímočará iontová past je šestielektrodový analyzátor. Kolem střední osy jsou symetricky rozmístěny čtyři rovinné pravoúhlé elektrody a osa je zakončena dvěma plochými elektrodami. Další používané pasti jsou lineární iontové a válcové iontové. [15]

Nejpřímějším způsobem pro analýzu velkých proteinů a biomolekul je lineární MALDI-TOFMS, kdy ionty z MALDI putují do detektoru bez vychýlení. Analyzované ionty zasahují detektor v čase, který odpovídá druhé odmocnině jejich hmotnosti. Měření TOF jsou omezena dobou mezi dvěma laserovými pulzy MALDI a ty mohou být synchronizovány s TOF a její detekcí. Dnešní TOFMS jsou vybaveny funkcí zaostřování s časovou prodlevou, která zamezuje širokému šíření kinetické energie pulzů mezi ionty za pomoci dodatečného zdroje napětí. Toto má za následek zvýšení rozlišení a přesnější měření. [12]

Odrážové TOFMS se skládají ze dvou trubic, které jsou na jednom konci spojené v ostrém úhlu. V místě překřížení se nachází reflexní napěťové zrcadlo zaostřující ionty tím, že zužuje rozptyl jejich kinetické energie. Ionty jsou následně nasměrovány ke

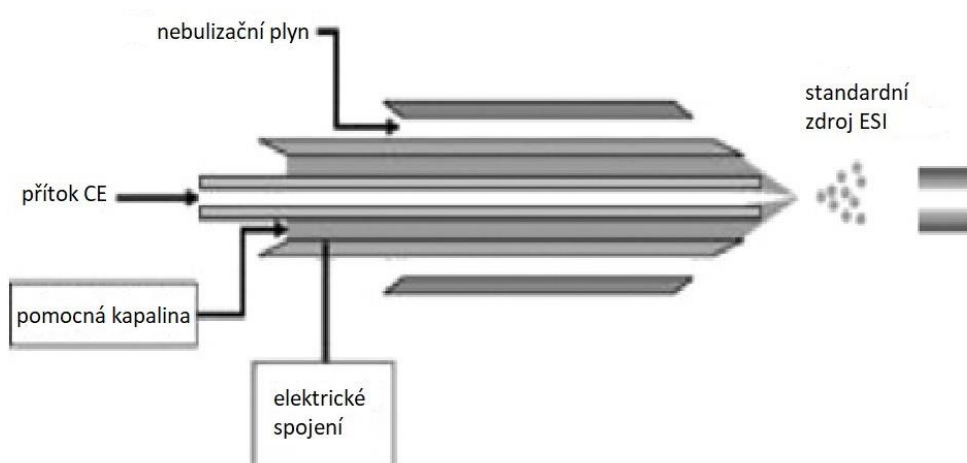
druhému TOF analyzátoru, kde dochází k jejich detekci. Tento systém umožňuje větší přesnost než lineární konstrukce, ale jejich hmotnostní rozsah je omezený. [12]

FT-ICR MS určuje poměr  $m/z$  iontů podle jejich cyklotronové frekvence v konstantním magnetickém poli. Tato metoda má velmi vysoké rozlišení a umožňuje stanovování hmotností s vyšší přesností. Používá silné magnety obdobně jako NMR, a proto je potřebná vysoká úroveň údržby. [12]

### 4.3 CE-ESI-MS

Kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií je velmi efektivní v profilování polárních a ionizovatelných sloučenin. Nicméně spojení CE s MS musí probíhat mimokapilárním způsobem a problémy představují velmi nízké průtoky v CE a nutnost vytvořit uzavřený elektrický obvod. Při tomto spojení je nejčastěji využívanou ionizační technikou ESI. [16]

Hlavním krokem spojení CE-MS je napojení CE na ESI-MS. CE může být spojena s MS přes rozhraní za použití pomocné kapaliny nebo bez ní. Nejobvykleji se však pro CE-ESI-MS používá rozhraní s pomocnou kapalinou, přičemž jeho účelem je zajistit elektrický kontakt mezi CE separací a zdrojem ESI. (Obr. 5) Toto rozhraní lze použít k optimalizaci procesu ESI, a proto jsou složeni a průtok kapaliny jejími kritickými parametry. Pomocná kapalina se často skládá ze směsi vody a organického modifikátoru jako je methanol nebo isopropanol a může obsahovat těkavou kyselinu ke zvýšení iontového charakteru analytu. [17]

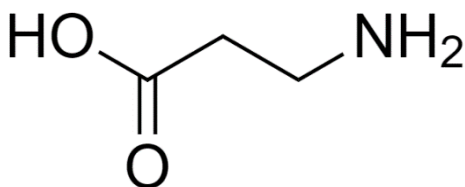


Obrázek 5: Schéma ESI s pomocnou kapalinou [15] - upraveno

Tato kapalina je přiváděna kapilárou do analyzovaného roztoku. ESI zároveň může využívat soustředný tok tzv. nebulizačního plynu, kterým je nejčastěji dusík, a slouží k pomoci zmlžování. Rychlosti průtoku potřebného pro MS jsou alespoň o řád vyšší než vlastní průtoky CE. Problémem tohoto způsobu detekce je ale snížená reprodukovatelnost, což je způsobeno zejména lidským faktorem při vkládání kapiláry do ESI. [17]

#### 4.4 $\beta$ -alanin

$\beta$ -alanin, podle názvosloví IUPAC kyselina 3-aminopropanová, (Obr. 6) je přirozeně se vyskytující neproteinogenní  $\beta$ -aminokyselina v těle. V  $\beta$ -alaninu je aminoskupina v poloze  $\beta$  od karboxylové skupiny a vlivem rozdílné polohy aminoskupiny se liší jeho fyziologické vlastnosti od proteinogenního alaninu. Stejně jako většina aminokyselin tvoří vodíkové vazby.  $\beta$ -aminokyseliny se v přírodě vyskytují velmi vzácně a  $\beta$ -alanin je jediná přirozeně se vyskytující aminokyselina bez chirálního centra. [18]

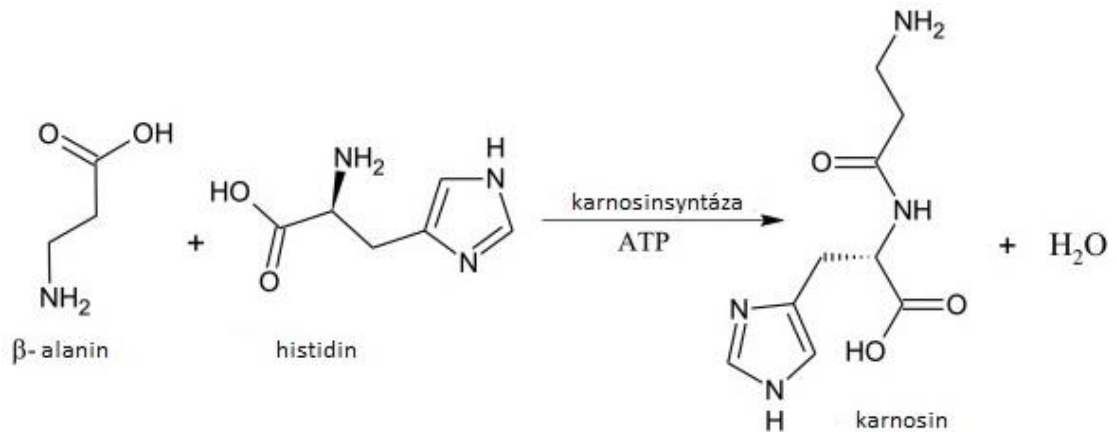


Obrázek 6:  $\beta$ -Alanin

Vzniká degradací L-karnosinu a dihydrouracilu a sám je metabolicky rozkládán na acetát. Získává se z masité stravy a luštěnin ve formě kyseliny pantothenové (vitamin B<sub>5</sub>), která se skládá z kyseliny pantoové a  $\beta$ -alaninu a je prekurzorem pro koenzym A. V nízkých koncentracích se nachází v kosterním svalstvu. Také tvoří základní stavební jednotku L-karnosinu a anserinu, což je N-methylovaný L-karnosin. [19]

#### 4.5 L-Karnosin

L-Karnosin je cytoplazmatický dipeptid tvořený  $\beta$ -alaninem a histidinem. V těle je jeho syntéza katalyzována enzymem karnosinsyntázou (Obr. 7). Opačná reakce je katalyzována L-karnosinázou, která jej hydrolyzuje. Koncentrace histidinu ve svalstvu a plazmě je vysoká, a proto je rychlost tvorby L-karnosinu omežována množstvím  $\beta$ -alaninu v těle. Bylo zjištěno několik jeho analogů jako např. anserin, balenin a homokarnosin. [19]



Obrázek 7: Syntéza L-karnosinu v těle [20] – upraveno

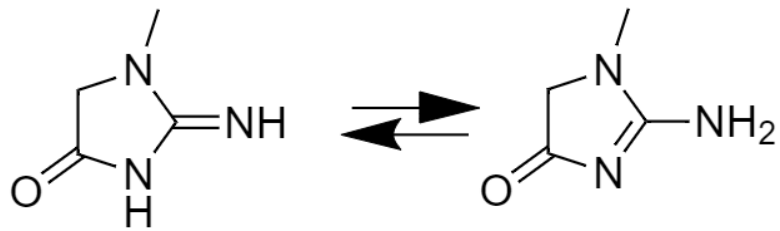
L-Karnosin se nachází v kosterním svalstvu a má schopnost na sebe vázat vodíkové ionty vznikající při anaerobní glykolýze. Jeho koncentrace ve svalech se liší mezi různými typy svalů, ale i mezi různými svalovými vlákny ve stejném svalu. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny u rychle se stahujících vláken, tzv. rychlých svalů. [21]

Patří mezi intracelulární pufrы působící ve svalových buňkách a udržující acidobazickou rovnováhu organismu. Zároveň je znám jako neuropeptid s antioxidačními vlastnostmi. Nejvíce se však L-karnosin i β-alanin využívá ve sportu, kvůli regulaci pH ve svalstvu při sportovních výkonech a snížení svalové únavy. Jsou mu připisovány i jiné funkce, z nichž je prokázána pouze pufrací. [19, 20]

Jeho složka L-histidin je esenciální aromatická aminokyselina, která je přijímána převážně stravou. Obsahuje kladně nabitou imidazolovou skupinu a tvoří vodíkové vazby. Podílí se na udržování pH krve, ale na rozdíl od L-karnosinu je volný histidin relativně slabým pufrém. [22, 23]

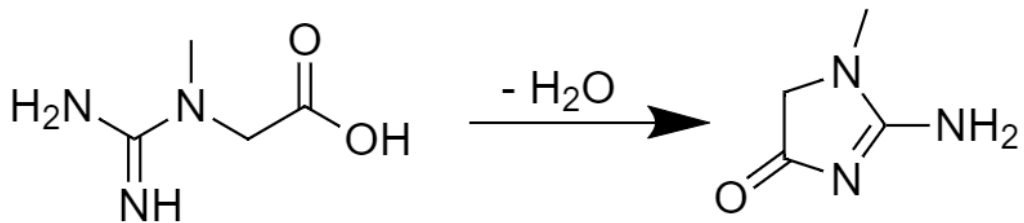
## 4.6 Kreatinin

Kreatinin je organická dusíkatá nebílkovinná látka vyskytující se v krevní plazmě. (Obr. 8) Je koncovým odpadním produktem metabolismu kreatinu. Kreatinin se v lidském těle tvoří ze dvou zdrojů a podle toho se dělí na endogenní, který je generován svalovou tkání, a exogenní, který je produkován při metabolismu masa. [24]



Obrázek 8: Mezoerní struktury kreatininu

Kreatin je syntetizován hlavně v ledvinách, játrech a slinivce. Je zdrojem energie pro biologické procesy např. pro svalovou aktivitu. Kreatinin je metabolitem kreatinu, pokud se do jeho metabolismu zapojuje ATP. (Obr. 9) Za normálních okolností je množství vylučovaného kreatininu relativně konstantní. [25]



Obrázek 9: Vznik kreatininu dehydratací kreatinu

Téměř veškerý kreatinin je transportován krevním řečištěm skrze ledviny a následně vylučován močí. Je důležitým klinickým analytem, jehož hladina v séru je považována za klíčový biomarker pro monitorování onemocnění a funkce ledvin. Při klinickém hodnocení kreatininu se běžně používají metody jako Jaffeova reakce a enzymatické metody. [24]

Jaffeova reakce je rychlá a dostupná metoda, kdy kreatinin reaguje s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Změna barvy je dobře detekovatelná a kvantitativně stanovitelná spektrofotometrem. Tato metoda je ale poměrně citlivá na interferenty jako jsou ketony a glukóza. Z tohoto důvodu se používá enzymatická metoda, která je založena na enzymatických reakcích kreatininu. [24]

# 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 5.1 Chemikálie a přístroje

### 5.1.1 Chemikálie

- Voda stupně čistoty pro LC-MS (výrobce LiChrosolv, Merck, Německo)
- Methanol stupně čistoty pro LC-MS (výrobce LiChrosolv, Merck, Německo)
- L-Karnosin čistota p. a. (výrobce Sigma Aldrich – Merck, Německo)
- $\beta$ -Alanin čistota p. a. (výrobce Sigma Aldrich – Merck, Německo)
- Kyselina octová čistota p. a., koncentrace 100 % (výrobce Sigma Aldrich – Merck, Německo)
- Hydroxid amonný čistota p. a., koncentrace 30 % (výrobce Sigma Aldrich – Merck, Německo)
- Hydroxid sodný standardní roztok, čistota p. a. koncentrace 0,1001 mol/l (výrobce Sigma Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda ze systému Direct-Q 3 UV Water Purification System 18,2 M $\Omega$  Milli-Q (výrobce Merck, Německo)
- AccQ Tag Ultra Derivatization Kit (výrobce Waters, USA) obsahující vialky:
  - Vial 1: AccQ Tag Ultra Borate Buffer (borátový pufr)
  - Vial 2A: AccQ Tag Ultra Reagent Powder (obsahující činidlo AQC – 6-aminochinolyln-hydroxysukcinimidyl karbamát)
  - Vial 2B AccQ Tag Ultra Reagent Diluent (acetonitril)

### 5.1.2. Přístroje

Navážky se připravovaly na analytických vahách Mettler Toledo XSE205 Dual Range (výrobce Mettler Toledo, Ohio, USA). Odměrování objemů bylo prováděno za pomoci automatických pipet Eppendorf Research Plus o objemech 100–1000  $\mu$ l, 20–200  $\mu$ l a 2–20  $\mu$ l (výrobce Eppendorf, Hamburg, Německo). K titraci pufru sloužil pH metr inoLab 7110 s kombinovanou elektrodou a magnetickou míchačkou (výrobce WTW, Německo). Promíchávání roztoků se provádělo orbitální třepačkou (vortexem) MS 3 Basic



(výrobce IKA, Německo). Roztoky byly zahřívány na topném bloku Digital Dry Bath (výrobce Labcim, Olomouc Česká republika). Vzorčky moči se filtrovaly přes stříkačku s mikrofiltrem SimplePure MS PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  (výrobce Membrane Solutions, USA).

K separaci vzorků před analýzou sloužil přístroj CE Agilent 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Samotná analýza pak probíhala na MS s QQQ analyzátozem Agilent 6460 Triple Quad (výrobce Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) a ionizací pomocí ESI. Pomocná sprejovací kapalina byla přiváděna izokratickou LC pumpou Agilent 1260 (výrobce Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Před vstupem do spojení CE-ESI-MS (interface) se kapalina rozdělovala děličem toku v poměru 1:100, přičemž její průtok byl optimalizován. K ovládní přístrojů a sběru signálu se používal software MassHunter verze B.06.00. Měření probíhalo v nepokryté křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a celkovou délkou 90 cm (výrobce Molex, USA). Kapilára byla každý den před měřením kondicionována promytím 0,1M NaOH po dobu 10 minut a po stejně dlouhou dobu deionizovanou vodou. Mezi každým měřením se kapilára promývala 2 minuty deionizovanou vodou a 3 minuty základním elektrolytem.

## **5.2 Příprava vzorků**

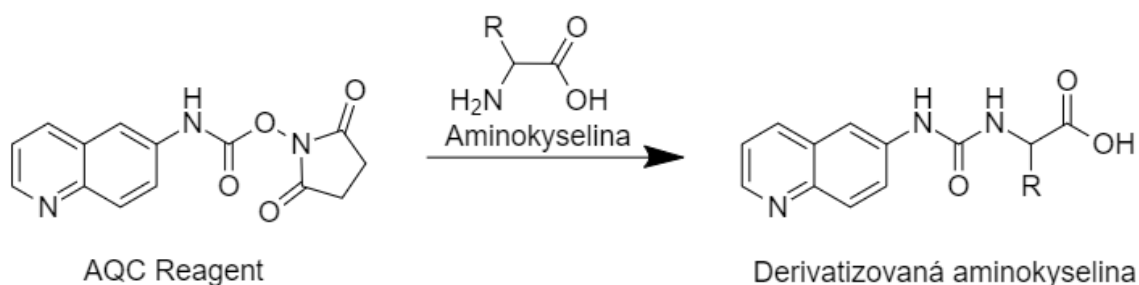
### **5.2.1 Příprava základního pufru**

Pro všechny analýzy byl připraven základní pufr octanu amonného o pH 9,5, který byl používán při separaci na CE. Bylo připraveno 50 ml roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,05 mol/l odebráním 157,5  $\mu\text{l}$  100% kyseliny octové a doplněním vodou po rysku. Takto připravený roztok byl titrován 30% roztokem hydroxidu amonného na pH 9,5, za neustálého míchání magnetickou míchačkou.

### **5.2.2 Derivatizace vzorků**

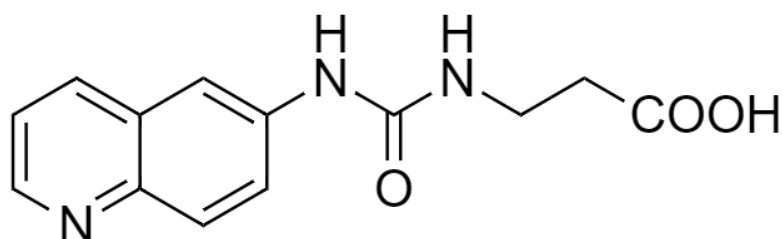
Důvodem derivatizace vzorků byla zejména nízká molekulová hmotnost  $\beta$ -alaninu, která je 89 g/mol. Nízké hmotnosti by mohly způsobovat problémy pro efektivitu analýzy pomocí MS. Derivatizovalo se za použití komerčního činidla AccQ Tag Ultra Derivatization Kit od firmy Waters. Toto činidlo bylo zvoleno kvůli komerční dostupnosti a rychlosti vlastní derivatizace (10 minut při 55  $^{\circ}\text{C}$ ). Běžně bývá využíváno pro měření metodou HPLC-MS. Jeho použití bylo standardizované, a proto nebyla nutná optimalizace

derivatizačního kroku. Využívalo se reakčního činidla 6-aminochinolylné-N-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC), který snadno reaguje s primárními i sekundárními aminokyselinami a poskytuje stabilní nesymetrické deriváty močoviny. (Obr. 10) [26]

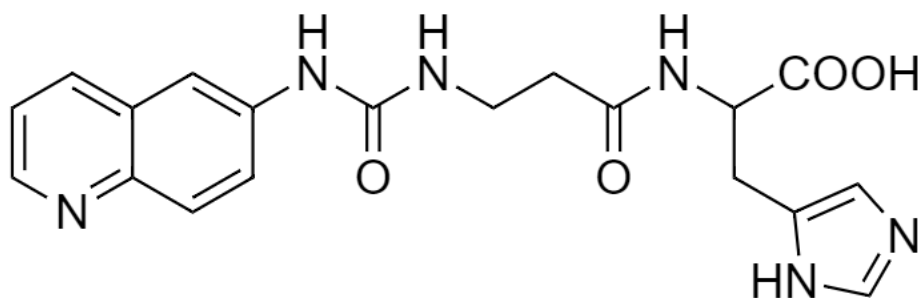


Obrázek 10: Názorné schéma derivatizace aminokyselin pomocí činidla AQC

Derivatizované aminokyseliny mají volnou karboxylovou skupinu, tudíž byla možná jejich analýza ve formě aniontů pomocí CE. V případě použití ESI v MS se aminokyseliny analyzovaly při negativní polaritě. Derivatizovaný  $\beta$ -alanin (Obr. 11) má molární hmotnost 259 g/mol, ale stanovovaný byl jako aniont bez vodíku, a proto se sledovala pro tento analyt hmotnost 258 g/mol. Derivatizovaný L-karnosin (Obr.12) má molární hmotnost 396 g/mol a sledovanou hmotností byla hodnota 395 g/mol.



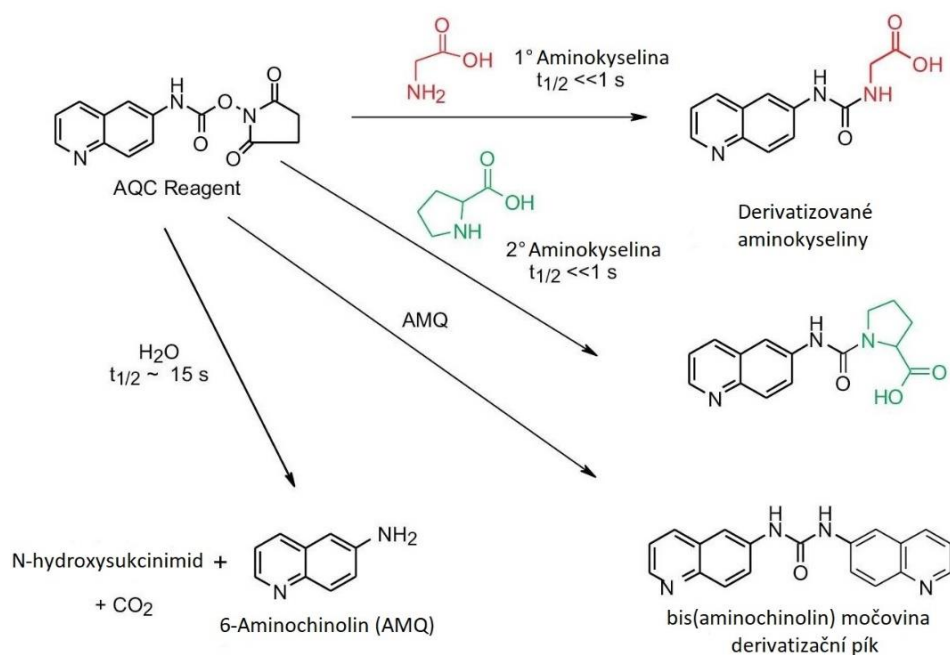
Obrázek 11: Derivatizovaný  $\beta$ -alanin



Obrázek 12: Derivatizovaný L-karnosin

Výhodou tohoto způsobu derivatizace je dobrá opakovatelnost, citlivost a relativně i reprodukovatelnost. Vzorky bylo možné znovu použít díky malému množství potřebnému pro separaci CE. Nevýhodou by však byla časová náročnost manuální derivatizace vysokého počtu vzorků a vyšší riziko chyb při pipetování malých objemů pufru, vzorku a reagentu. Problematickou byla také rozpustnost AQC reagentu, který je dodáván ve formě prášku z důvodu zajištění maximální stability. Opakované použití reagentu vyžadovalo jeho opětovné rozpuštění, dokud roztok nedosáhl homogenity. Otázkou zůstala také stabilita derivátů pro detekci v MS, které muselo být přizpůsobeno napětí na fragmentoru.

AQC reagent nejdříve reaguje s aminokyselinami, což je rychlá reakce. Následně přebytek činidla AQC pomalu reaguje s vodou, která byla použita jako rozpouštědlo standardů aminokyselin a tvoří se vedlejší produkty 6-aminochinolin (AMQ), N-hydroxysukcinimid (NHS) a oxid uhličitý. Poslední reakcí, která v roztoku probíhá, je reakce AMQ s přebytkem nezreagovaného AQC, kterou vzniká vysoce stabilní bis(aminochinolin) močovina. (Obr.13) [26, 27]



Obrázek 13: Reakce činidla AQC se směsí v roztoku [27] – upraveno

### 5.2.3 Derivatizační činidlo

Aby bylo možné  $\beta$ -alanin a L-karnosin zkoumat musí projít derivatizací, která byla prováděna ručně s využitím AccQ Tag Ultra Derivatization Kit. Nejprve bylo připraveno činidlo AQC rozpuštěním práškového AQC reagentu (AccQ Tag Reagent Powder – vial 2A) v 1 ml rozpouštědla (AccQ Tag Ultra Reagent Diluent - vial 2B), které bylo převedeno do vialky 2A. Takto připravená směs byla promíchána na vortexu a zahřívána na topném bloku předem nahřátém na 55 °C do rozpuštění veškerého reagentu (avšak ne déle než 15 minut).

### 5.2.4 Derivatizace standardů

Vzorky aminokyselin se smíchaly ve vialkách s pufrem (AccQ Tag Ultra Borate Buffer – vial 1), aby měly optimální pH pro derivatizaci, které by mělo být v rozmezí 8,2 – 10. Roztok byl promíchán na vortexu a ke směsi se přidalo činidlo AQC. Vialky s derivatizovanými standardy se zahřívaly na topném bloku nahřátém na 55 °C po dobu 10 minut. Byly použity velmi malé objemy jednotlivých složek roztoku, tj. 70  $\mu$ l pufru, 10  $\mu$ l vzorku a 20  $\mu$ l AQC reagentu.

### 5.2.5 Příprava kalibrační řady $\beta$ -alaninu a L-karnosinu

Navážené hmotnosti 0,88 mg  $\beta$ -alaninu a 2,28 mg L-karnosinu byly rozpuštěny v 10 ml vody, přičemž výsledné zásobní roztoky měly každé koncentraci  $10^{-3}$  mol/l. Následným ředěním zásobních roztoků byla připravena kalibrační řada směsných roztoků  $\beta$ -alaninu a L-karnosinu podle tabulky I:

*Tabulka I: Příprava kalibračních roztoků*

| Koncentrace roztoku     | $\beta$ -alanin | L-karnosin  | Voda        |
|-------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| $10^{-4}$ mol/l         | 100 $\mu$ l     | 100 $\mu$ l | 800 $\mu$ l |
| $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l | 30 $\mu$ l      | 30 $\mu$ l  | 940 $\mu$ l |
| $10^{-5}$ mol/l         | 10 $\mu$ l      | 10 $\mu$ l  | 980 $\mu$ l |

Nachystané kalibrační roztoky byly ve skleněných vialkách derivatizovány obdobně jako standardy a vzorky (viz 4.2.4).

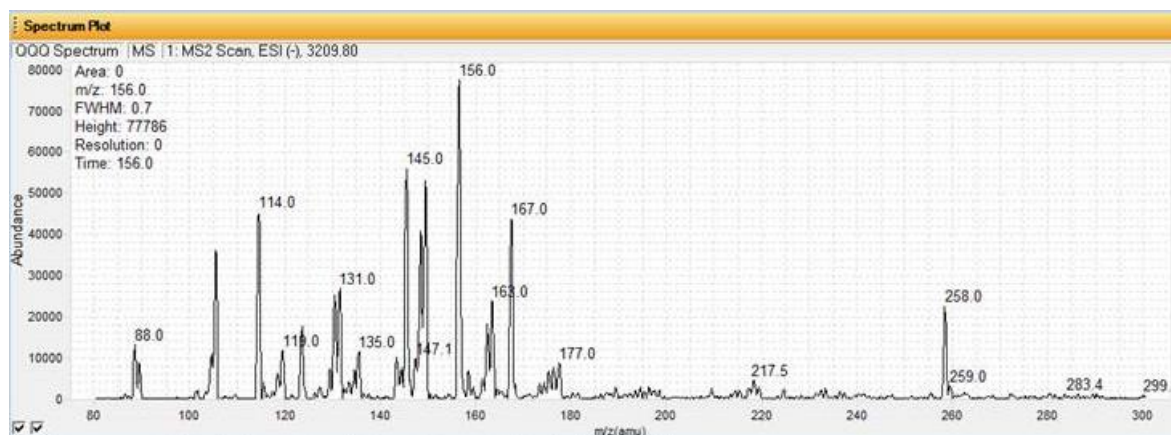
### **5.2.6 Derivatizace vzorků moči**

Vzorky moči, uchovávané v lednici, byly ponechány 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly nabrány do stříkačky pomocí jehly a přefiltrovány přes mikrofiltr, aby se předešlo výskytu sražených bílkovin v roztocích. Z připravených vzorků bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  do skleněné vialky a k nim bylo přidáno 70  $\mu\text{l}$  AccQ BB. Tato směs se promíchala několik sekund na vortexu a po přidání 20  $\mu\text{l}$  činidla AQC byla zahřívána 10 minut na topném bloku při 55 °C.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

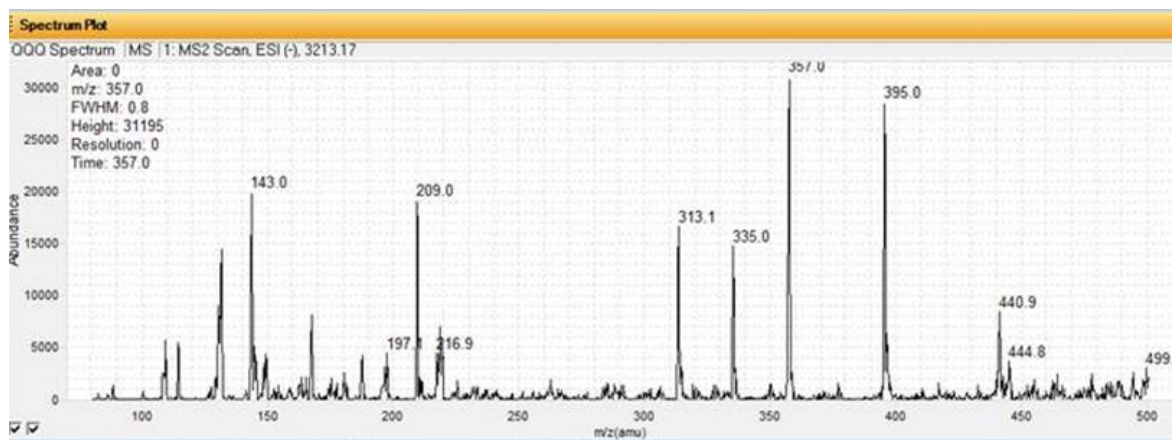
### 6.1 Ověření derivatizace

Pro ověření funkčnosti derivatizace byl proveden přímý nástřik derivatizovaných standardů  $\beta$ -alaninu a L-karnosinu do ESI-MS a monitorovalo se celé spektrum. Na výsledném hmotnostním spektru derivatizovaného  $\beta$ -alaninu je viditelný molekulový pík  $m/z$  258 derivatizovaného analytu i naznačený fragment  $\beta$ -alaninu o  $m/z$  88. (Obr. 14) Ostatní píky odpovídají reakční směsi a případným nečistotám, které pro stanovení  $\beta$ -alaninu nejsou podstatné (vybere se MRM přechod  $m/z$  258  $\rightarrow$   $m/z$  88). Tento přechod potvrdila i fragmentace molekulového iontu  $m/z$  258 (fragменты  $m/z$  88 a 59 při 20 eV). Důležitým faktorem však byla nutnost optimalizace napětí na fragmentoru (uvedené výsledky jsou při 70 V, při standardním nastavení 135 V signál molekulového iontu i signál fragmentu nevykazoval dostatečnou odezvu). Další parametry: teplota nebulizačního plynu: 200 °C, sprejovací napětí: - 4 kV, tlak nebulizačního plynu: 15 psi, průtok pomocné kapaliny: 10  $\mu$ l/min, složení pomocné kapaliny: voda-methanol 1:1 (v/v).



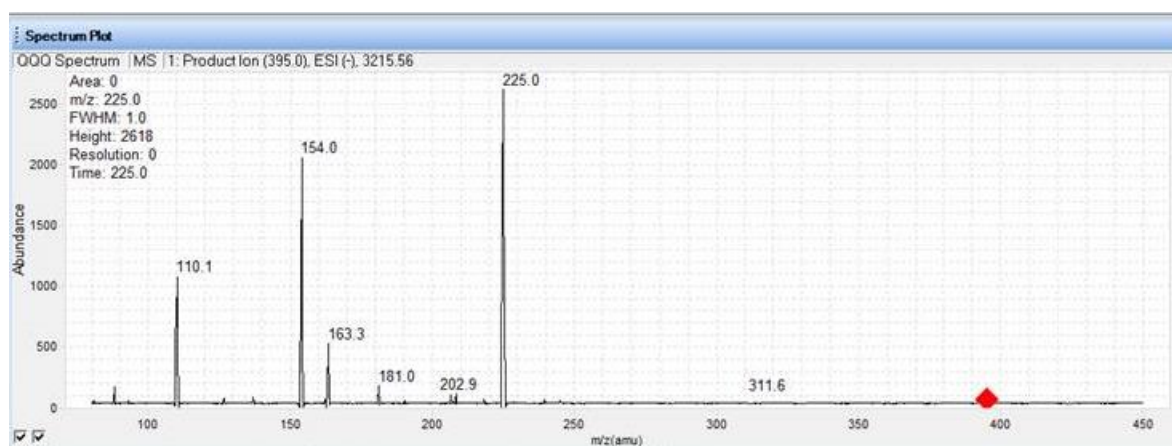
Obrázek 14: Hmotnostní spektrum derivatizovaného standardu  $\beta$ -alaninu

Hmotnostní spektrum derivatizovaného L-karnosinu (Obr. 15) zobrazuje poměrně intenzivní molekulový pík o hodnotě  $m/z$  395 patřící derivatizovanému analytu. Ostatní majoritní píky odpovídají reakční směsi a případným nečistotám.



Obrázek 15: Hmotnostní spektrum derivatizovaného standardu L-karnosinu

Pro výběr správného přechodu pro kvantifikaci a identifikaci analytu byla provedena fragmentace iontu o  $m/z$  395. Na výsledky referuje následující hmotnostní spektrum (Obr. 16). Je zde patrný fragment o  $m/z$  225 (naznačený na předchozím obrázku (Obr. 15)) a dále fragment o  $m/z$  154, odpovídající pravděpodobně histidinu, který má molární hmotnost 155 g/mol. Právě fragmenty o těchto  $m/z$  by mohly být využity pro příčné MRM přechody. Parametry: teplota nebulizačního plynu: 200 °C, sprejovací napětí: - 4 kV, tlak nebulizačního plynu: 15 psi, průtok pomocné kapaliny: 10  $\mu$ l/min, napětí na fragmentoru: 135 V, složení pomocné kapaliny: voda-methanol 1:1 (v/v).

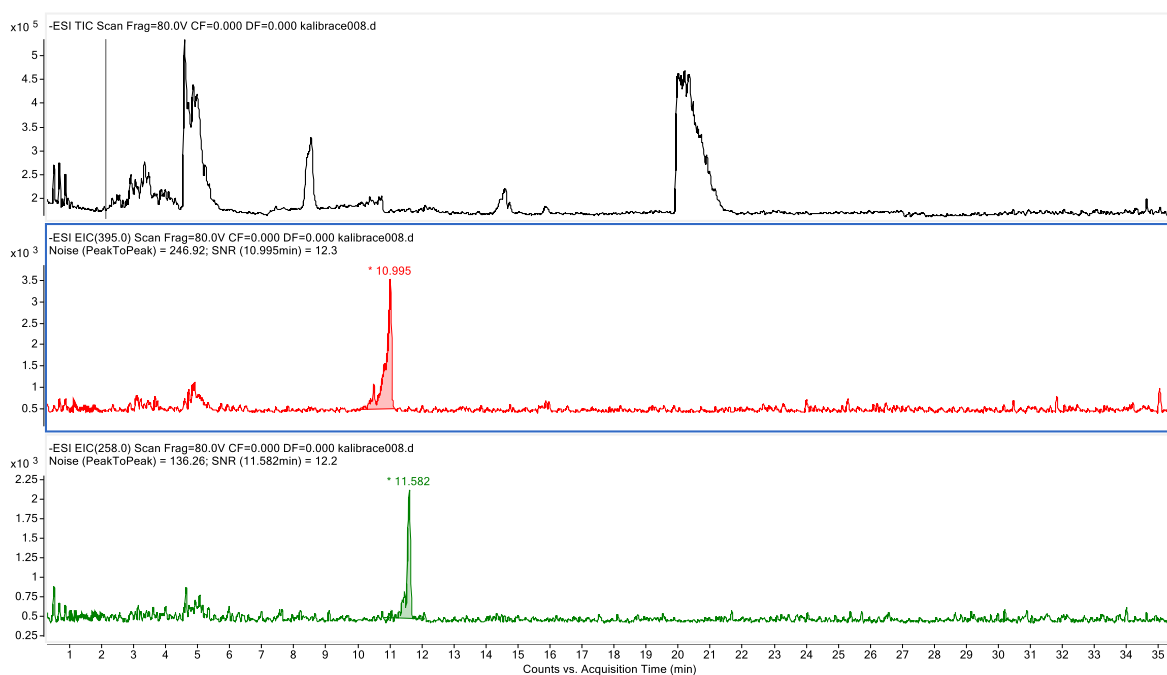


Obrázek 16: Hmotnostní spektrum s fragmentací iontu o  $m/z$  395

Závěrem je možné tvrdit, že byla prokázána funkčnost derivatizace zvoleným způsobem, a proto by mohla být využita pro další vývoj metody pro separaci a stanovení  $\beta$ -alaninu a L-karnosinu pomocí CE-MS. Následuje tedy optimalizace tohoto způsobu analýzy.

## 6.2 Kalibrační řada

Připravené a derivatizované kalibrační roztoky byly postupně změřeny pomocí CE-ESI-MS, přičemž MS byl nastaven na skenování všech  $m/z$ . Na následujícím obrázku (Obr. 17) je výsledný TIC (total ion current) sken pro kalibrační roztok o koncentraci  $10^{-4}$  mol/l. Ze zmíněného skenu byly poté vybrány EIC (extracted ion chromatogram) chromatogramy poměrů  $m/z$  derivatizovaného  $\beta$ -alaninu (258) a L-karnosinu (395), kde jsou jasně viditelné píky sledovaných analytů. První byl ze skenu vybrán  $m/z$  395, který představuje derivatizovaný L-karnosin a jeho pík dosáhl své maximální výšky v čase 10.995 minut.

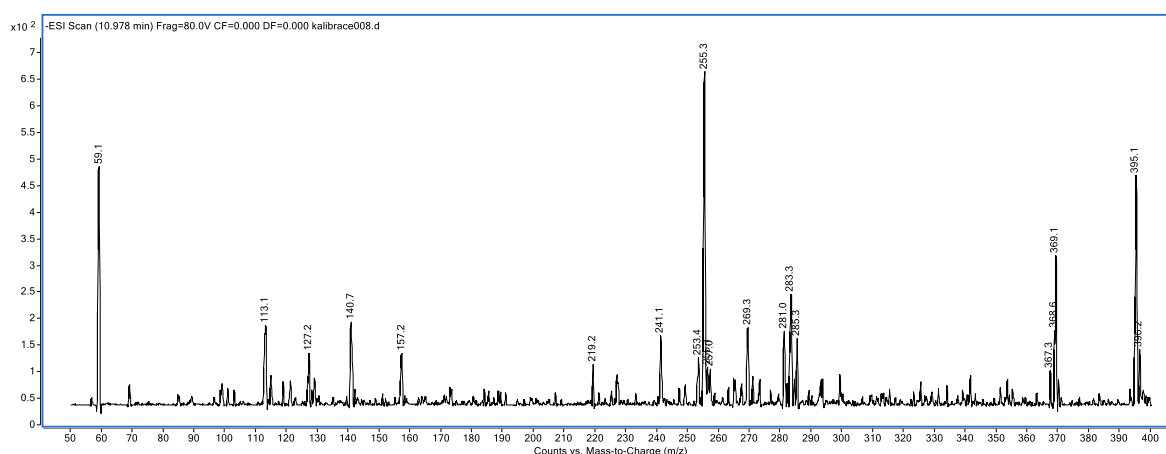


Obrázek 17: TIC sken vzorku a EIC chromatogramy pro L-karnosin (červeně) a  $\beta$ -alanin (zeleně)



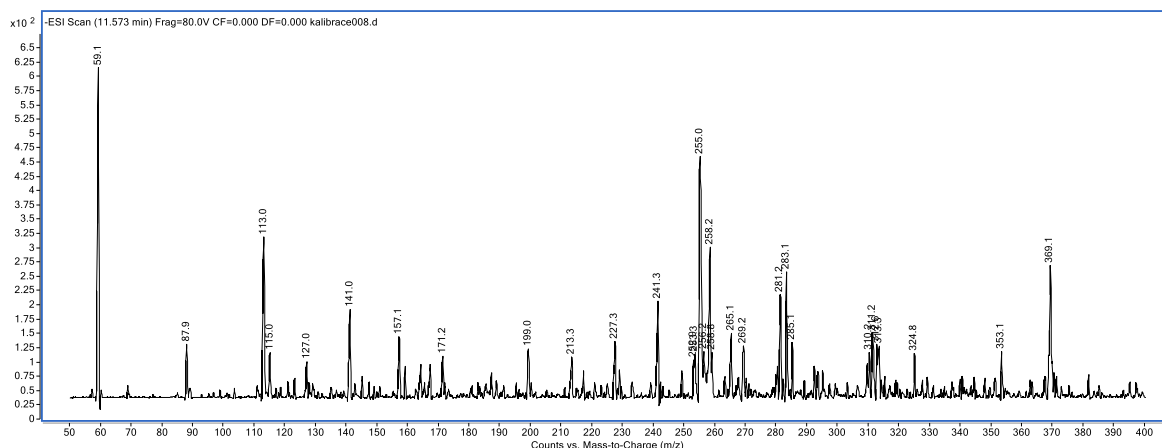
Druhým vybraným  $m/z$  byl 258 představující  $\beta$ -alanin, pro který pík dosáhl maximální výšky v čase 11,582 minut. Pro měření kalibrační řady bylo zvoleno napětí na fragmentoru 80 V. Z obrázku (Obr. 17) je rovněž viditelné, že  $\beta$ -alanin a L-karnosin lze od sebe za těchto podmínek odseparovat. Parametry: napětí na ESI: -4 kV, teplota nebulizačního plynu: 200 °C, průtok nebulizačního plynu: 5 l/min, tlak nebulizačního plynu: 15 psi, průtok pomocné kapaliny: 1,0  $\mu$ l/min, složení pomocné sprejovací kapaliny: 50:50 (v/v) methanol:voda.

Na následujícím obrázku (Obr. 18) bylo zobrazeno hmotnostní spektrum v čase 10,978 minut, kde se nachází oblast nejvyššího píku v EIC spektru (Obr. 17) pro derivatizovaný L-karnosin. Na tomto spektru je mimo jiné dobře viditelný pík pro jeho  $m/z$  395 a pík o  $m/z$  225 odpovídající jeho fragmentaci na L-karnosin odštěpením derivatizačního činidla.



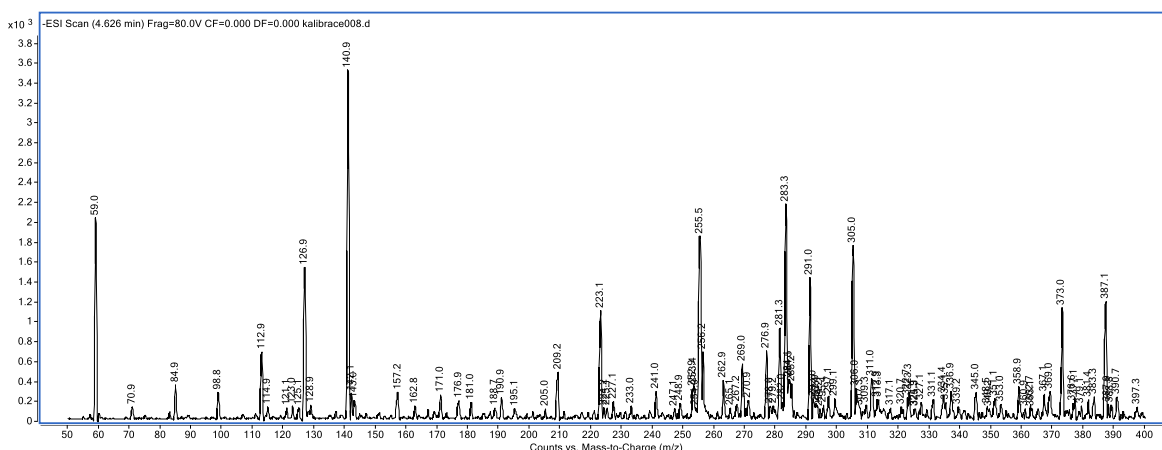
Obrázek 18: Hmotnostní spektrum v čase 10,978 minut pro EIC pík L-karnosinu

Další spektrum (Obr. 19) bylo zvoleno v čase 11,573 minut, což je oblast píku v EIC spektru (Obr. 17) pro derivatizovaný  $\beta$ -alanin. Zde je kromě ostatních iontů dobře viditelný pík o  $m/z$  258 představující právě sledovaný analyt a stejně tak pík o  $m/z$  88 představující fragment  $\beta$ -alaninu po odštěpení derivatizačního činidla.



Obrázek 19: Hmotnostní spektrum v čase 11,573 minut pro EIC pík  $\beta$ -alaninu

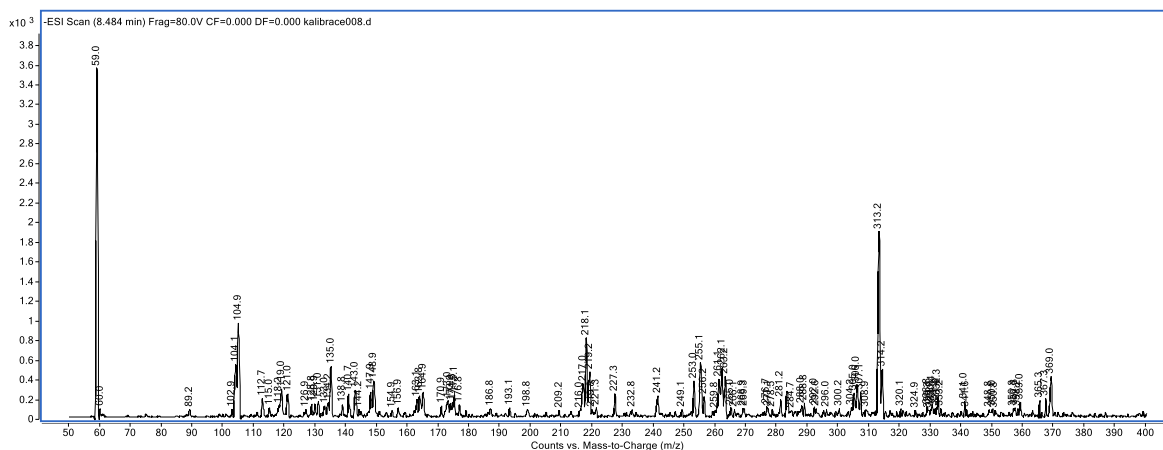
V okolí 5. minuty na TIC skenu (Obr. 17) se zobrazil první velký pík, jehož okolí bylo zároveň oblastí s nejvyšší odezvou. Hmotnostní spektrum okolí maxima tohoto píku v čase 4,626 minut je znázorněno na následujícím obrázku (Obr. 20). Největší zastoupení v zobrazeném spektru píku má  $m/z$  140,9, který pravděpodobně náleží neznámému interferentu vyskytujícímu se ve směsi. Zároveň je viditelný poměrně vysoký fragment o  $m/z$  59 stejně jako na předchozích dvou spektrech (Obr. 18, Obr. 19), což by mohla být s největší pravděpodobností kyselina octová, která má molární hmotnost 60 g/mol. Kyselina octová se do MS podle všeho dostala použitím octanového pufru během CE (viz 4.2.1).



Obrázek 20: Hmotnostní spektrum pro nejvyšší pík TIC skenu v čase 4,626 minut

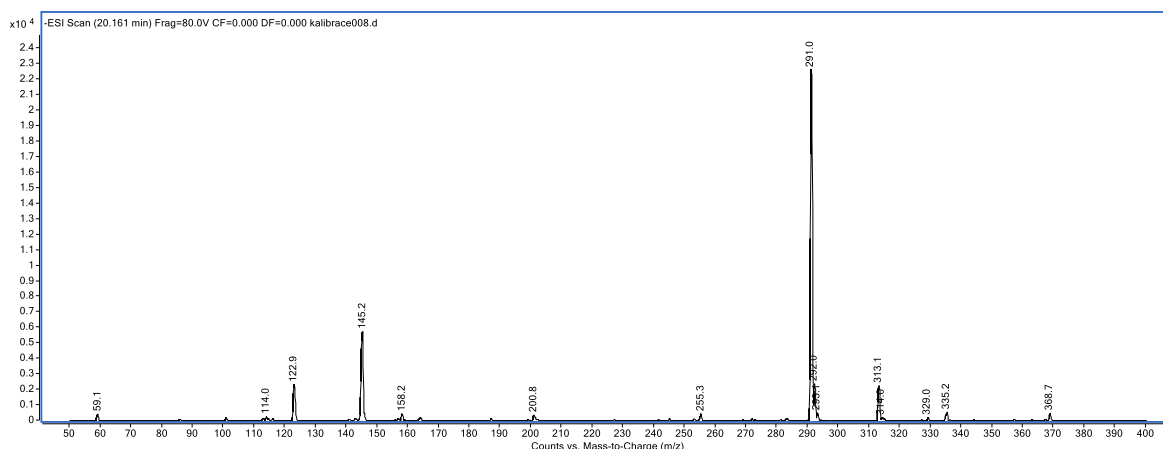
Další výraznější pík se nacházel v oblasti mezi 8. a 9. minutou TIC skenu (Obr. 17), avšak není tak vysoký jako dříve komentovaný. Jeho hmotnostní spektrum zobrazuje následující obrázek. (Obr. 21) Největší zastoupení měly látky o  $m/z$  59 a  $m/z$  313,2. Ion

s  $m/z$  59 je pravděpodobně kyselina octová stejně jako v předchozích případech. Druhý fragment s hodnotou  $m/z$  313,2 by mohl být přiřazen bis(aminochinolin) močovině, jejíž molární hmotnost je 314,3 g/mol za předpokladu, že je schopna dosáhnout záporného náboje odtržením vodíku.



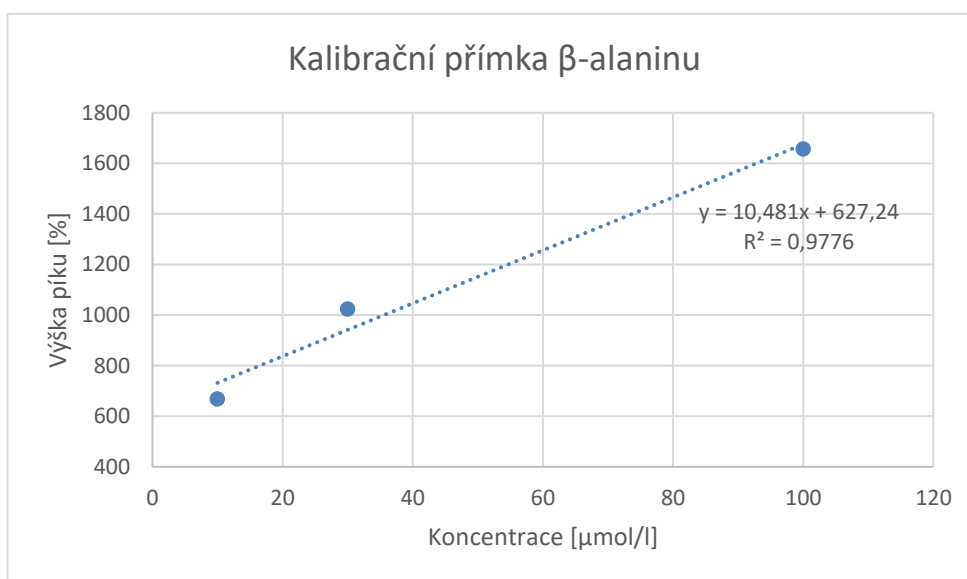
Obrázek 21: Hmotnostní spektrum v čase 8,484 minut pro druhý vyšší pik v TIC skenu

Druhý nejvyšší pik celkového TIC skenu zkoumaného roztoku (Obr. 17) a rovněž poslední vysoký pik dosahuje maxima v okolí 20. minuty. Následující obrázek (Obr. 22) zobrazuje hmotnostní spektrum zmíněného píku v čase 20,161 minut, kde je viditelný obsah zejména látky o  $m/z$  291, kterou se nepodařilo určit, a tudíž pravděpodobně patří další neznámé nečistotě. Na spektru je pozorovatelný zanedbatelný pik o  $m/z$  59,1 nejspíše patřící kyselině octové a také pik s  $m/z$  313,1, který by mohl patřit bis(aminochinolin) močovině. Obě tyto látky však nejsou zastoupeny tak výrazně jako výše zmíněný interferent s  $m/z$  291.

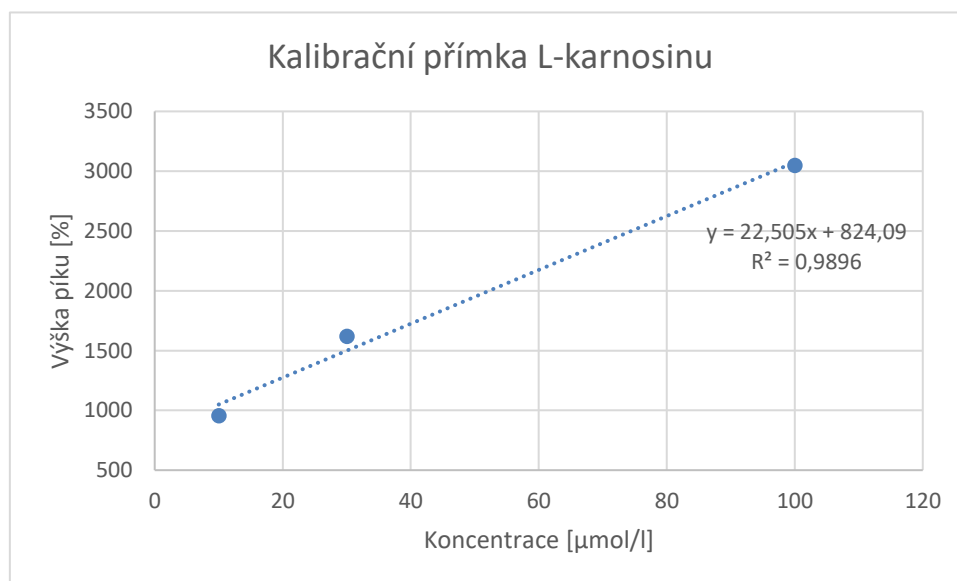


Obrázek 22: Hmotnostní spektrum v čase 20,161 minut pro třetí vysoký pik v TIC skenu

Po změření kalibračních roztoků o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l,  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $10^{-4}$  mol/l byly z naměřených výšek pík vytvořeny grafy kalibrační závislosti pro  $\beta$ -alanin a L-karnosin. Kalibrační křivka (Obr. 23, Obr. 24), resp. naměřené hodnoty vykazují lineární závislost, tudíž by bylo možné, se správně zvoleným rozsahem koncentrací kalibračních roztoků, použít zvolenou metodu pro kvantifikaci obsahu zkoumaných látek. Nižší koncentrace než  $10^{-5}$  mol/l již nevykazovaly dostatečnou odezvu a výsledkem byl pouze zvýšený šum.



Obrázek 23: Graf kalibrační závislosti  $\beta$ -alaninu

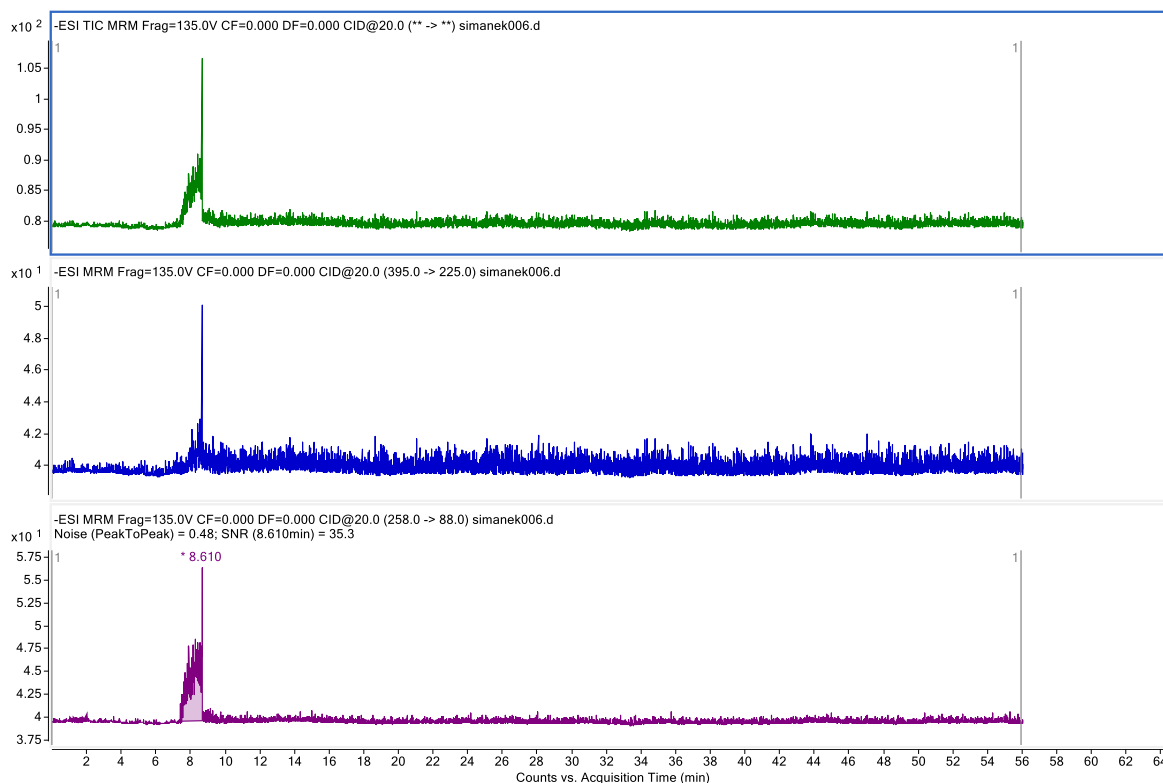


Obrázek 24: Graf kalibrační závislosti L-karnosinu

Následně byly srovnány migrační časy analytů tří po sobě jdoucích opakování analýz a byla vypočtena relativní směrodatná odchylka migračních časů. Relativní směrodatná odchylka pro  $\beta$ -alanin je rovna 1,3 % a 1,0 % pro L-karnosin. Výsledky tedy ukazují, že metodu je možné použít pro analýzu reálných vzorků.

### 6.3 Reálné vzorky

V rámci poslední části práce byl otestován derivatizovaný vzorek moči dobrovolníka, který užíval L-karnosin. Výsledky jsou na následujícím obrázku (Obr. 25). Byl využit SRM (selected reaction monitoring) mód, kdy byly monitorovány konkrétní přechody pro oba analyty, tj.  $m/z$  395  $\rightarrow$   $m/z$  225 pro L-karnosin (s napětím na fragmentoru 20 V) a  $m/z$  258  $\rightarrow$   $m/z$  88 pro  $\beta$ -alanin (s napětím na fragmentoru taktéž 20 V). Z obrázku je viditelné, že v moči je dobře detekovatelný  $\beta$ -alanin, zatímco L-karnosin už nikoliv. Pravděpodobně by to mohlo být způsobeno aktivitou enzymu L-karnosinázy v játrech, což je enzym rozkládající L-karnosin na  $\beta$ -alanin, která ale nebyla v případě analyzovaného vzorku detekována.



Obrázek 25: Výsledný SRM záznam pro reálný vzorek moči

## 7 ZÁVĚR

Na základě experimentů byla vyvinuta metoda pro stanovení  $\beta$ -alaninu a L-karnosinu v biologických vzorcích pomocí CE-ESI-MS. Zároveň byla ověřena funkčnost zvoleného způsobu derivatizace komerčním činidlem. Po ověření použitelnosti derivatizačního činidla byla změřena kalibrační řada o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l,  $3 \cdot 10^{-5}$  mol/l a  $10^{-4}$  mol/l. Vytvořením kalibrační závislosti byla prokázána lineární závislost koncentrace a výšky píku, přičemž bylo zjištěno, že nižší koncentrace již nebyla kvantifikovatelná.

Mimo jiné bylo provedeno měření derivatizovaného kreatininu pro zjištění, zda by byla tato metoda použitelná i pro jeho stanovení, ale nebyl detekovatelný pomocí MS. Tento fakt potvrzuje, že kreatinin nebude interferovat s analyty a narušovat analýzu pomocí CE-ESI-MS.

Na závěr byla provedena analýza reálného biologického vzorku vytvořenou metodou, kterou bylo prokázáno, že metodou je možné kvantitativní stanovení  $\beta$ -alaninu v moči pacientů. Stanovení množství L-karnosinu v tomto vzorku však nebylo možné, což může být způsobeno enzymem L-karnosinázou, který jej hydrolyticky rozkládá na  $\beta$ -alanin a L-histidin.

Pro další vývoj této metody by bylo vhodné použití jiného biologického vzorku než moči např. krevního séra, ve kterém by mohla být hladina L-karnosinu lépe kvantifikovatelná. Metoda CE-ESI-MS může být zároveň upravena použitím jiného pufru pro CE a optimalizací pomocné kapaliny v ESI přidáním těkavé kyseliny zvyšující iontový charakter analytů.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] P. Klouda, Moderní analytické metody, 2. upr. a dopl. vyd., Pavel Klouda, Ostrava 2003
- [2] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Analytická chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2019
- [3] P.G. Righetti, Electrophoresis – Isoelectric Focusing, v knize P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (ed.), Encyclopedia of Analytical Science, second ed., Elsevier, Amsterdam 2005, str. 382-392
- [4] D. B. Friedman, S. Hoving, R. Westermeier, Chapter 30 Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis, v knize: R. R. Burgess, M. P. Deutscher (ed.), Methods in Enzymology, Academic Press, Cambridge 2009, vol. 463, str. 515-540
- [5] Y. Yamada, Gradient flattening of sodium dodecyl sulfate (SDS) and isoelectric focusing (IEF) gels, J. Biochem. Biophys. Methods (1983), vol. 8 (3), 183-188
- [6] S. P. Radko, Proteins: Capillary Electrophoresis, v knize: I. D. Wilson (ed.), Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, Cambridge 2000, str. 4009-4014
- [7] R. Stringer, Electrophoresis: Overview, v knize: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (ed.), Encyclopedia of Analytical Science, second ed., Elsevier, Amsterdam 2005, str. 356-363
- [8] H. H. See, N. A. Ali, Electrophoresis: Capillary Electrophoresis: Principles of Capillary, v knize: P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró (ed.), Encyclopedia of Analytical Science, third ed., Academic Press, Cambridge 2019 str. 328-333
- [9] F. Tagliaro, V. L. Pascali, Analytical Techniques: Capillary Electrophoresis in Forensic Science, v knize: J. A. Siegel (ed.), Encyclopedia of Forensic Sciences, Elsevier, Amsterdam 2000, str. 135-146
- [10] Issaq H. J., A decade of capillary electrophoresis, Electrophoresis (2000), vol. 21 (10), 1921-1939
- [11] K. Štulík a kol., Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2004
- [12] H. Perreault, E. Lattová, 1.50 Mass Spectrometry, v knize: M. Moo-Young (ed.), Comprehensive Biotechnology, second ed., Elsevier, Amsterdam 2011, str. 669-677

- [13] T. Zeng, W. Guo, L. Jiang, Q. Luo, Z. Shi, B. Lei, J. Zhang, Z. Cai, Integration of omics analysis and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging reveals the cadmium toxicity on female ICR mouse, *Sci. Total Environ.* (2021), vol. 801, art. 149803
- [14] Agilent Technologies, Inc., An Application Kit for the Screening of Samples for Analytes of Forensic Toxicological Interest using LC/QQQ MS/MS with a Dynamic MRM Transition Database, [https://hpst.cz/sites/default/files/oldfiles/5990-4254en\\_0.pdf](https://hpst.cz/sites/default/files/oldfiles/5990-4254en_0.pdf), staženo 25. 6. 2022
- [15] W. Wang, F. Xu, L. Jin, C. Ding, Rapid identification of illegal drugs and explosives using resonance excitation in miniaturized photoionization ion trap mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* (2021), vol. 467, art. 116625
- [16] P. Hommerson, A. M. Khan, G. J. de Jong, G. W. Somsen, Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: principles, design, and application, *Mass Spectrom. Rev.* (2011), vol. 30, 1096–1120
- [17] R. Ramautar, A. A. M. Heemskerk, P. J. Hensbergen, A. M. Deelder, J. Busnel, O. A. Mayboroda, CE–MS for proteomics: Advances in interface development and application, *J. Proteomics* (2012), vol. 75 (13), 3814-3828
- [18] C. Zheng, H. Sun, J. Ma, X. Bi, Y. Tang, B. Shan, The achiral  $\beta$ -alanine self organizes into supramolecular helical chains in crystallized achiral  $\beta$ -alaninium inorganic/organic acid compounds, *J. Mol. Struct.* (2020), vol. 1199, art. 126920
- [19] C. Sale, B. Saunders, R. C. Harris, Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance, *Amino Acid* (2010), vol. 39 (2), 321-333
- [20] M. Vraneš, J. Panić, A. Tot, S. Papović, S. Gadžurić, Č. Podlipnik, M. Bešter-Rogač, From amino acids to dipeptide: The changes in thermal stability and hydration properties of  $\beta$ -alanine, L-histidine and L-carnosine, *J. Mol. Liq.* (2021), vol. 328, art. 115250
- [21] R. C. Harris, M. J. Tallon, M. Dunnett, L. Boobis, J. Coakley, H. J. Kim, J. L. Fallowfield, C. A. Hill, C. Sale, J. A. Wise, The absorption of orally supplied b-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis, *Amino Acids* (2006), vol. 30, 279-289
- [22] C. Suwanvichanee, P. Sinpru, K. Promkhun, S. Kubota, C. Riou, W. Molee, J.



Yongsawatdigul, K. Thumanu, A. Molee, Effects of  $\beta$ -alanine and L-histidine supplementation on carnosine contents in and quality and secondary structure of proteins in slow-growing Korat chicken meat, *Poultry Science* (2022), vol. 101 (5), art. 101776

[23] A. Stefaniu, O. Iulian, Investigations of the Properties of L-Histidine in Aqueous NaCl Solutions at Different Temperatures, *J. Solution Chem.*, (2013), vol. 42 (12), 2384-2398

[24] Y. Dong, X. Luo, Y. Liu, C. Yan, H. Li, J. Lv, L. Yang, Y. Cui, A disposable printed amperometric biosensor for clinical evaluation of creatinine in renal function detection, *Talanta* (2022), vol. 248, art. 123592

[25] R. Cánovas, M. Cuartero, G. A. Crespo, Modern creatinine (Bio)sensing: Challenges of point-of-care platforms, *Biosens. Bioelectron.* (2019), vol. 130, 110-124

[26] F. D. Jama, Evaluation of amino acids in Aminoven 10% and Vamin 18EF with UPLC using Waters AccQTag method, Uppsala Univesitet (2013)

[27] Waters corp., Derivatization of Amino Acids Using Waters AccQ•Tag Chemistry, <https://www.waters.com/nextgen/en/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/derivatization-of-amino-acids-using-waters-accqtag-chemistry.html>, staženo: 25. 6. 2022