

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Josef Jureček**
Osobní číslo: **C10918**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Stanovení cyklosporinu metodou přímého nástřiku ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) Úvod do hmotnostní spektrometrie TDM
 - b) Význam imunosupresivní léčby
 - c) Metody stanovení Cyklosporinu
 - d) Metody přímého nástřiku ve spojení s MS
- 2) Praktická část
 - a) optimalizace podmínek MS
 - b) optimalizace metody přímého nástřiku
 - c) validace metody
 - d) srovnání s LC/MS metodou
 - e) aplikace na vzorky pacientů

Rozsah grafických prací: **schémata, grafy, obrázky dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. David Friedecký, Ph.D.**

Fakultní nemocnice Olomouc

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Kateřina Míčová**

Fakultní nemocnice Olomouc

Datum zadání diplomové práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

**Stanovení cyklosporinu metodou přímého nástřiku ve
spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií**

Bc. Josef Jureček

**Diplomová práce
2012**

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 04. 05. 2012

Josef Jureček

Poděkování:

Největší poděkování patří vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Davidu Friedeckému, Pd.D. za jeho trpělivost a cenné rady při provádění všech experimentů. Děkuji také Mgr. Kateřině Mičové a Mgr. Haně Janečkové za pomoc při studiu a plnění zadaného úkolu, ale i ostatním pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch, FN Olomouc.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Obsah:

1. Cíle práce.....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1 Cyklosporin A.....	9
2.1.1 Co je to CyA.....	9
2.1.2 Využití CyA.....	10
2.1.3 Nežádoucí účinky CyA.....	11
2.1.4 Mechanismus účinku CyA.....	12
2.1.5 Syntéza a biotransformace CyA.....	13
2.1.6 Stanovení CyA.....	14
2.2 Hmotnostní spektrometrie.....	16
2.2.1 Princip.....	16
2.2.2 Instrumentace.....	16
2.2.3 Ionizační techniky.....	17
• Ionizace elektrosprejem (EI).....	17
• Chemická ionizace (CI).....	18
• Chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI).....	18
• Fotoionizace za atmosferického tlaku (APPI).....	19
• Ionizace elektrosprejem (ESI).....	19
• Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI).....	20
• Další ambientní ionizační techniky (DESI, DART).....	21
2.2.4 Hmotnostní analyzátoři.....	22
• Magnetický analyzátoř s jednoduchou fokusací.....	23
• Elektrostatický analyzátoř.....	23
• Kvadrupólový analyzátoř (Q).....	24
• Iontová past (IT).....	26
• Lineární iontová past.....	27
• Analyzátoř doby letu (TOF).....	28
• FT-ICR.....	28

2.2.5	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	29
•	Trojítý kvadrupólový analyzátor (QqQ).....	30
2.3	Přímý nástřik ve spojení s MS.....	31
2.3.1	FIA metody.....	31
2.3.2	FIA-ESI-MS.....	33
2.3.3	Použití FIA-ESI-MS.....	34
3.	Experimentální část.....	36
3.1	Materiál.....	37
3.2	Deproteinace krve.....	37
3.3	Metoda.....	38
3.4	Kvantifikace.....	38
3.5	Validace metody.....	39
3.5.1	Linearita.....	39
3.5.2	Návratnost (recovery).....	40
3.5.3	Preciznost.....	40
3.5.4	Iontové suprese.....	40
3.6	Výsledky.....	41
3.6.1	Optimalizace MS/MS podmínek.....	41
3.6.2	Validace metody.....	46
3.6.3	Analýza reálného vzorku.....	49
3.7	Srovnání metod.....	50
4.	Diskuse.....	52
5.	Závěr.....	54
6.	Požítá literatura.....	55
7.	Seznam použitých zkratek.....	60

1. Cíle práce:

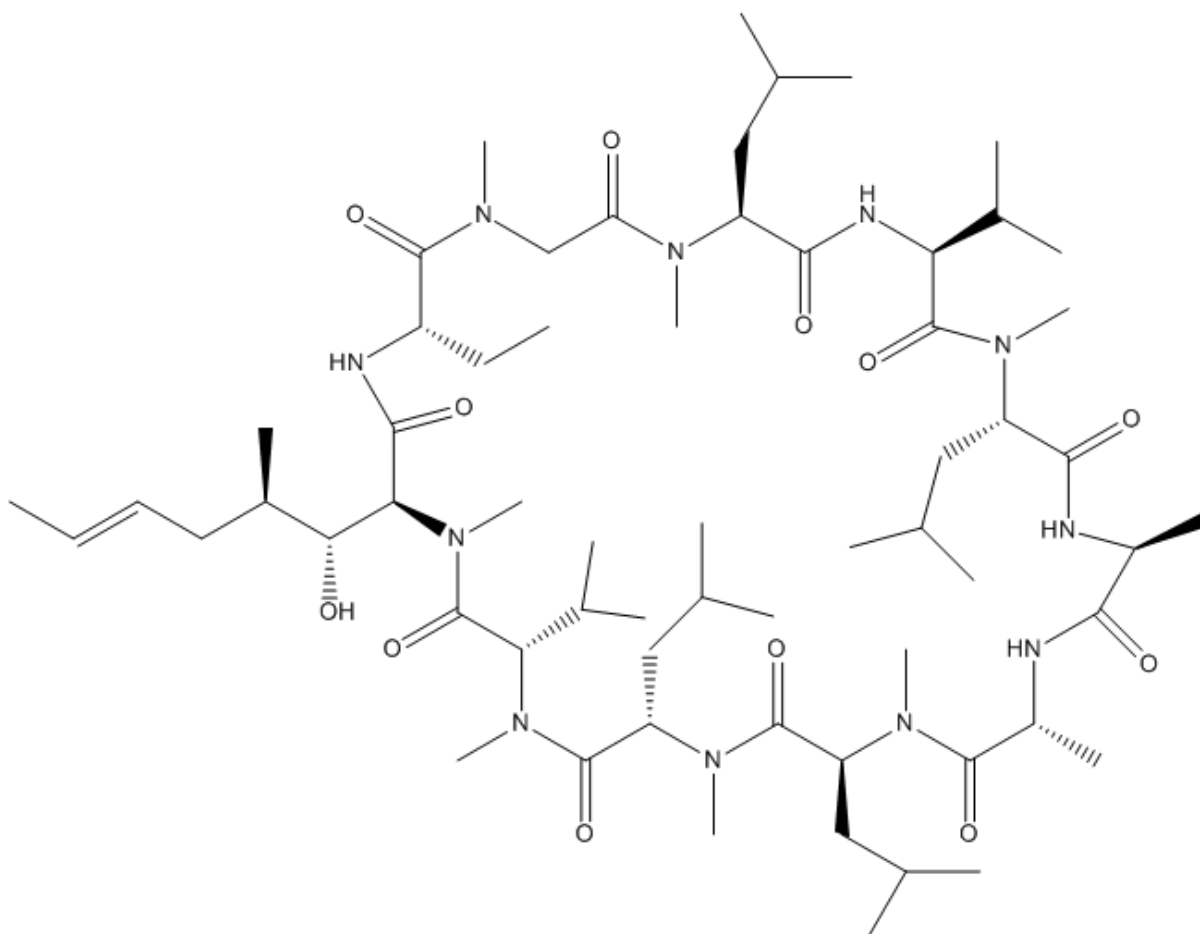
- Vypracování rešerše na téma Cyklosporin A, hmotnostní spektrometrie a metoda přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru
- Vývoj a optimalizace metody pro stanovení Cyklosporinu A
- Validace metody
- Aplikace metody na vzorky krve pacientů

2. Teoretická část:

2.1. Cyklosporin A

2.1.1. Co je to CyA

Cyklosporin A (CyA) (Obr.1) je přírodní cyklický polypeptid se selektivním imunosupresivním účinkem. Cyklosporiny jsou produkovány vláknitými houbami *Cylindrocarpon lucidum*, *Trichoderma reesei* a dalšími.



Obr. 1: Cyklosporin A

(<http://images.rxlist.com/images/rxlist/restasis1.gif>)

2.1.2. Využití CyA

CyA se váže na buněčné cytoplazmatické proteiny cyklofiliny patřící mezi imunofiliny. Může se dále vázat s kalcineurin-kalmodium-kalciovým komplexem a způsobovat nekompetitivní inhibici aktivity kalcineurin fosfatázy. Kalcineurin fosfatáza je nutná k aktivaci intrabuněčných faktorů, jako je např. NFAT (nuclear factor of activated T-cells), který po vstupu do buněčného jádra aktivuje transkripci cytokinů jako je interleukin 2 (IL-2), což je důležitý krok aktivace T-lymfocytů. Biologická dostupnost CyA, průměrně kolem 30 %, je nesmírně variabilní v rozmezí 5 až 70 %.

Imunosupresivní účinky byly u Cyklosporinu A objeveny již v lednu roku 1972 firmou Sandoz v Bazileji a jeho první využití u orgánových transplantací velmi zlepšilo přežití transplantovaných orgánů i pacientů po transplantaci. Poprvé byl užit k prevenci rejekce orgánů v roce 1980 při transplantaci ledvin (1) a transplantaci jater (2).

Dva roky po jeho objevu v roce 1974 byl u CyA objeven i protizánětlivý účinek při léčbě autoimunitních chorob.

Použití CyA k léčbě akutní rejekce po transplantaci plic bylo dalším krokem po jeho aplikaci při transplantacích jater a ledvin. Dobré výsledky léčby přinesly značný nárůst počtu transplantací plic ve světě z 33 operací v roce 1988 až na 1486 roku 2007. Bohužel je akutní buněčná rejekce již v prvním roce po transplantaci u tohoto typu transplantace běžná. Vyskytuje se až v 90 % případů (3), kde se projevuje perivaskulární infiltrací tkáně monokleárními buňkami imunitního systému vedoucí ke vzniku zánětu v okolní tkáni a následné rejekci orgánu (4). Užití CyA vede k zamezení této reakce a tedy i k výraznému prodloužení doby života transplantátu (5).

Naproti akutní rejekci chronická rejekce orgánu probíhá zcela jiným mechanismem. Například takzvaná obliterující bronchiolitida (BOS – bronchiolitis obliterans syndrom) se projevuje obstrukcemi dýchacích cest a je spíše než zánět fibroproliferativní porucha plicní tkáně (6). Bohužel medián přežití při diagnóze BOS je pouze 2 roky a navzdory dosaženému pokroku v léčbě akutní rejekce zůstává v podstatě beze změny (7). Zjištění, že CyA ve formě aerosolu může bránit či zdržet rozvoj chronické rejekce plic vedlo k vzestupu užití aerosolu CyA,

kdy v současné době probíhá několik studií zabývajících se využitím CyA aerosolu nebo prášku v této oblasti.

Dnes se CyA využívá také při léčbě onemocnění jako je atopická dermatitida, pyoderma gangrenosum, psoriáza (8), nebo těžké případy revmatoidní artritidy (9). Mimo to byl úspěšně použit u pacientů s těžkou akutní ulcerózní kolitidou, kteří nereagovali na léčbu steroidy (10).

Také při léčbě suchého zánětu rohovky je možno využít terapie pomocí očních kapek obsahujících CyA jako alternativu k obvyklé léčbě pomocí steroidních preparátů (11).

Při léčbě pacientů s těžkým astmatem bylo použito CyA jak orálně, tak inhalační cestou. Nevýhodou orální aplikace CyA je častý výskyt vedlejších účinků na organismus (12). Tomuto se lze vyhnout inhalační aplikací, kde jsou cíleně cyklosporinu vystaveny přímo plíce pacienta, a hladina CyA v krvi zůstává pod hranicí toxicity (13).

Další zajímavá vlastnost CyA je jeho neuroprotektivní působení u traumatických poškození mozku. Jak bylo prokázáno v experimentu na zvířatech, CyA snižuje toto poškození (14).

CyA může být využit i u léčby srdečních obtíží. Otevření mitochondriálních permeabilních převodních pórů (PTP – permeability transition pore), k němuž dochází při ischemii, reperfučním poškození tkáně (15) nebo po infarktu myokardu (16), je fyziologickou reakcí na tyto stavy. Zvýší se koncentrace intracelulárního Ca^{2+} , který zrychlí srdeční cyklus (17), ale nadměrné otevření PTP vede k hypertrofii srdeční svaloviny. CyA vážící se na cyklofilin D blokuje pomocí vazby na PTP jejich nadbytečné otevírání a tím nejen snižuje koncentraci Ca^{2+} v buňce, ale také zabraňuje hypertrofování srdce jako odpovědi na ataku (18). Blok PTP dále vede k zmírnění vylití cytochromu C, který může způsobovat programovanou buněčnou smrt (15).

2.1.3. Nežádoucí účinky CyA

Jedním z častých vedlejších účinků CyA je poškození ledvin. Mechanismus tohoto efektu není zcela objasněn, ale je známo, že zahrnuje zvýšení vaskulárního odporu, vedoucí ke snížení průtoku krve ledvinami, produkci reaktivních volných

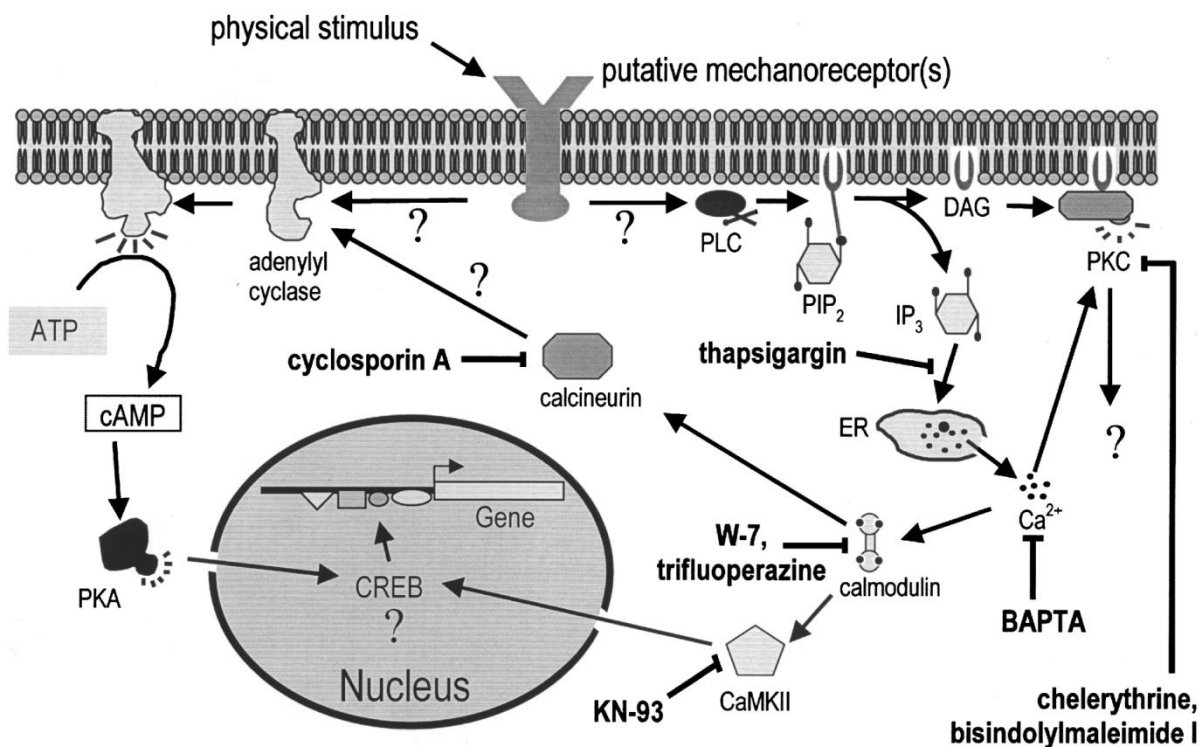
radikálů a aktivaci cytochromu P450. Dále dochází ke zvýšené expresi fibrotizujících růstových faktorů, stimulaci vazokonstrikce zásahem do buněčné koncentrace Ca^{2+} a zvýšené expresi receptorů pro angiotensin II. Bylo též zjištěno, že CyA podporuje ovlivněním Fas molekul, apoptózu renálních buněk. Nefrotoxicita CyA se tedy projevuje především apoptózou buněk a vazokonstrikcí ledvin (19).

2.1.4. Mechanismus účinku CyA

Jak již bylo popsáno výše, CyA tlumí otevření PTP (permeabilních převodních pórů mytochondrií) a tím inhibuje vylití cytochromu C a posílí apoptózy buňky.

Dále spolu s cyklofilinem D tvoří komplex, který se zabudovává do PTP a inhibuje fosfatázu (kalcineurin) (Obr. 2). PTP se vyskytují v mitochondriální membráně buněk myokardu, kde slouží k transportu Ca^{2+} iontů do mitochondrií (15). Ca^{2+} vstupující do mitochondrií mění transmembránový potenciál mitochondrií a není-li regulován, vede k poruše funkce mitochondrií (18). Ca^{2+} v mitochondrii ovšem také aktivuje kalcineurin, což je fosfatáza, jejíž vysoká aktivita stojí za hypertrofií myokardu. Kalcineurin defosforyluje NFAT a tento defosforylací aktivovaný faktor se váže na transkripční faktor GATA, jehož funkcí je exprese genu zodpovědného za hypertrofii myokardu (20).

Přes tato působení našel CyA hlavní uplatnění jako imunosupresivum snižující aktivitu T-lymfocytů. Toto působení je opět založeno na kalcineurinu, který kromě genu kódujícího hypertrofii, aktivuje toutéž cestou i transkripci interleukinu 2 (IL-2). Aktivace receptorů T-lymfocytů vede ke zvýšení nitro-buněčné koncentrace Ca^{2+} a tedy ke vzrůstu aktivace kalmodulinu a následně vzniku IL-2 tak, že kalmodulin aktivuje NFATc, faktor zodpovědný za zvýšení transkripce genů pro IL-2 a další cytokiny. CyA do této dráhy zasahuje vazbou na kalmodulin, která mu zamezí defosforilovat NFATc (21).



Obr. 2: Mechanismus účinku CyA

(<http://www.biochemj.org/bj/361/0689/bj3610689a07.gif>)

2.1.5. Syntéza a biotransformace CyA

Biosyntézu CyA zajišťuje cyklosporinsyntáza, což je neribozomální syntáza.

Biotransformace CyA probíhá v játrech, kde je zpracováván systémem jaterních monooxidáz cytochromu P450. Jeho enzymy metabolizují CyA na třicet metabolitů s různou toxicitou i terapeutickou účinností. Sám CyA má kromě imunosupresivních účinků i některé účinky toxické, jako neurotoxicitu, nefrotoxicitu, hepatotoxicitu (22).

Metabolizování CyA cytochromem P450 obnáší hydroxylaci aminokyselinových zbytků číslo 1, 4, 6, 9, demethylaci na AMK-zbytku č. 4 a oxidaci na AMK zbytku č. 1, vedoucí k nové cyklizaci molekuly. K hlavní části degradace dochází přerušením vazby mezi AMK-zbytky 1-11, 2-3 a 5-6. Odpovídající fragmenty molekuly lze nalézt v hmotnostním spektru. Štěpení v pozici 1-11 lze podpořit zavedením laktózy do molekuly během konverze na isocyklosporin (23).

Všechny metabolity vznikající degradací CyA jsou více hydrofilní než původní molekula, avšak imunosupresivní efekt a vedlejší účinky v porovnání CyA a jeho metabolitů je stále diskutované téma. Zdá se, že některé metabolity vykazují dokonce vyšší imunosupresivní aktivitu než CyA, jiné naopak výrazně nižší až nulovou. Změny na pozici 4, 6 a 11 vedou k úplné ztrátě imunosupresivity, avšak při změně v pozici 1 zůstává imunosupresivita zachována.

K degradaci CyA při orálním podání dochází i kvůli HCl a enzymům přítomným v žaludku. Tomuto lze účinně bránit a zlepšit tak farmakokinetický profil a dostupnost CyA v organismu jeho navázáním na nanočástice menší než 100 nm. Nanočástice neposkytují jen ochranu proti přímému působení žaludeční kyseliny a nízkému pH, ale díky vysoké adhezi urychlí i vstřebávání (23).

2.1.6. Stanovení CyA

Kvůli toxicitě a potřebě udržet terapeutické okno v úzkém intervalu po celou dobu imunosupresivní léčby, která trvá v případě transplantovaných pacientů po zbytek života, jsou hladiny CyA v krvi průběžně monitorovány.

Terapeutický index CyA má úzké rozmezí a u každého pacienta je individuální, stejně tak existuje u jednotlivých pacientů i značná variabilita v absorpci, distribuci organismem, metabolismu a eliminaci CyA. Bez monitorování hladiny CyA a jeho metabolitů by byla volba vhodné terapeutické dávky nemyslitelná. Je tedy zřejmé, že terapeutické monitorování léčiv (TDM – therapeutic drug monitoring) je důležitou součástí potransplantační léčby.

Existuje několik běžně používaných metod monitoringu CyA.

Imunoanalýza, ač díky své nenáročnosti na provedení často používaná, vykazuje nižší specifitu a díky výskytu křížových reakcí mezi protilátkami testu a různými metabolity přítomnými ve vzorku může docházet k velmi významnému nadhodnocení koncentrace CyA. Nevýhoda tohoto typu metod spočívá také ve vyšší ceně oproti ostatním alternativám.

Imunoanalýza je nahrazována vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí (HPLC-UV), která se zdá být vhodnější pro tento typ analýz. V poslední době se rozvíjí použití kapalinové chromatografie ve spojení

s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), případně LC-MS/MS. V porovnání s HPLC-UV, se LC-MS/MS se zdá být více než devětkrát citlivější.

Identifikace CyA a jeho metabolitů v biologickém vzorku je komplikovaná záležitost a HPLC-UV není již v důsledku vývoje na poli tandemové hmotnostní spektrometrie nejvhodnější technikou pro takové stanovení. LC-MS poskytuje díky použití měkkých ionizačních technik výrazně lepší specifitu pro kvantitativní analýzu v oblasti stopových koncentrací a navíc dodává velké množství strukturálních informací. Tato technika je pro svoji kombinaci separačních možností chromatografie s možnostmi hmotnostního spektrometru v dnešní době první volbou při strukturní a kvantitativní analýze CyA a jeho metabolitů (23).

Nevýhodou LC-MS/MS pro analýzu většího množství vzorků je vyšší technická náročnost, spojená s potřebou online extrakce vzorku, která vyžaduje navíc použití dodatečných zařízení. Činí tak tuto metodu poněkud náchylnější ke vzniku technických komplikací. Mimoto, použití pro více imunosupresiv než pouze CyA (Tacrolimus, Everolimus, Sirolimus) by vyžadovalo změnu nastavení LC-MS/MS (24).

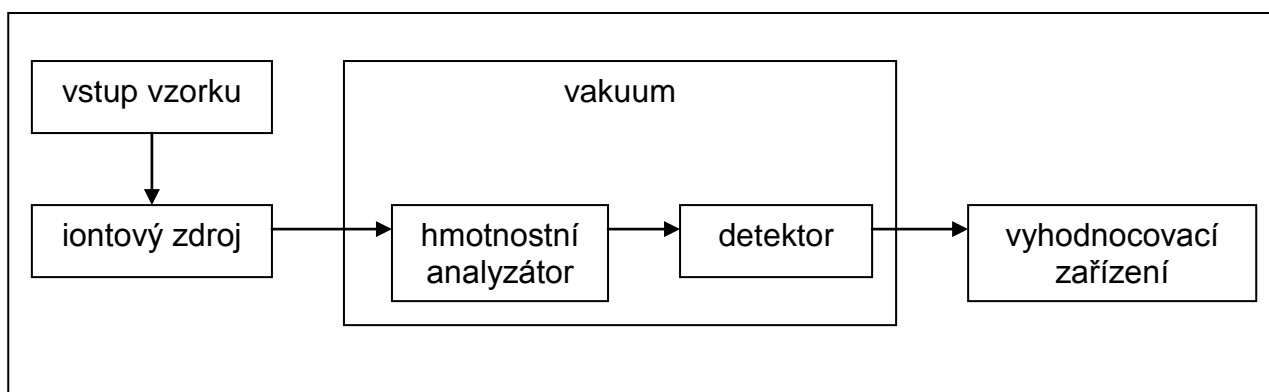
2.2. Hmotnostní spektrometrie

2.2.1. Princip

Princip hmotnostní spektrometrie spočívá v separaci a analýze molekul a jejich fragmentů podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z) ve hmotnostním spektrometru za hlubokého vakua. K tomu je třeba molekuly převést na kladně či záporně nabitě ionty (ionizovat). Během ionizace se molekulové ionty postupně rozpadají (fragmentují) na menší nabitě či nenabitě části – fragmenty. Vzniklé nabitě molekulové ionty a fragmenty jsou od sebe separovány podle jejich hmotností m , připadajících na náboj z odpovídající jednomu elektronu, tedy podle efektivních hmotností m/z (25)

2.2.2. Instrumentace

Hmotnostní spektrometr obsahuje iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vyhodnocující zařízení (Obr. 3).



Obr. 3: Obecné schéma hmotnostního spektrometru

Vzorek je přiváděn do iontového zdroje, kde se různými mechanismy vytváří ionty, které jsou dále v iontově optickém systému fokusovány na úzký svazek a urychleny do hmotnostního analyzátoru. Následně jsou ionty separovány jedním či více analyzátorů, které mohou ionty dělit podle jejich různých rychlostí letu, nebo podle trajektorií jejich pohybu v elektrickém a magnetickém poli.

Ionty putující analyzátořem k detektoru musí překonat určitou vzdálenost. Aby nedocházelo ke ztrátám iontů vlivem srážek s neutrálními molekulami plynu, musí být zajištěna dostatečná střední volná dráha letu iontů. Je tedy třeba aby hmotnostní spektrometr pracoval za nízkých tlaků. Obvykle mezi 10^{-3} až 10^{-6} Pa.

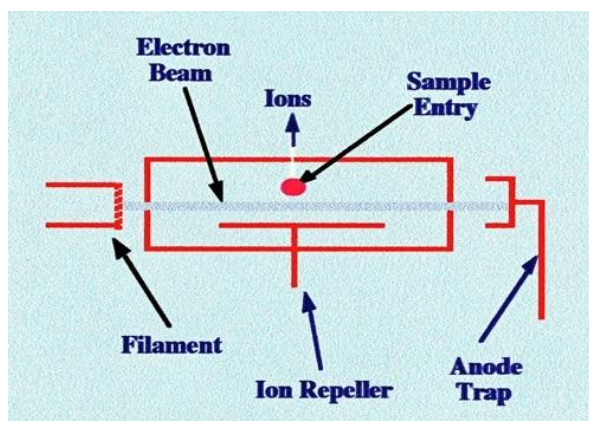
2.2.3. Ionizační techniky

Elektronová ionizace (EI)

Elektronová ionizace patří mezi tvrdé ionizační techniky. Díky velkému přebytku získané ionizační energie dochází k fragmentaci iontů. Podmínkou EI je těkavost analytu, protože k ionizaci dochází v plynné fázi za vakua.

Žhavená katoda emituje elektrony, jejichž přiblížením k valenčním elektronům molekuly může dojít k ovlivnění magnetických polí elektronů, vypuzení elektronu z valenční slupky a vzniku radikál-kationtu.

Jestliže molekula získá příliš velký přebytek energie, může dojít k její fragmentaci a v případě rozsáhlé fragmentace molekulární ion zcela chybí.



Obr. 4: Princip elektronové ionizace

(http://www.analyticalspectroscopy.net/ap8_html_m28d4b6e1.jpg)

Chemická ionizace (CI)

Chemické ionizace lze použít pouze pro plynné směsi látek. Princip a konstrukce zdroje je zde podobná s EI, ovšem v cele je přítomen reakční plyn, obvykle methan, isobutan, nebo amoniak, o tlaku 50 až 100 Pa. Nejprve jsou (díky velkému nadbytku) ionizovány molekuly reakčního plynu, které dále ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu.

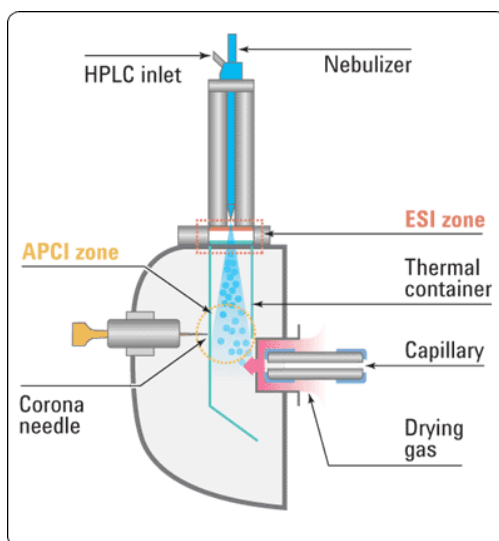
V iontovém zdroji probíhá řada konkurenčních reakcí, tou nejčastější je protonace. Vznikají, na rozdíl od EI, pouze ionty se sudým počtem elektronů. CI je měkká ionizační technika, vznik různých aduktů molekulových iontů je závislý na použitém reakčním plynu.

Chemická ionizace za atmosferického tlaku (APCI)

Princip APCI je stejný jako u CI, pouze dochází k ionizaci za atmosferického tlaku a průtoku eluentu z HPLC. APCI je tedy metoda ionizace kapalných vzorků látek.

Na elektrodu – jehlu – je vloženo napětí, které způsobí koronový výboj, ten ionizuje nejprve molekuly rozpouštědla a následně dojde ion-molekulárními reakcemi k ionizaci molekul vzorku.

Vzniklé ionty jsou elektrodami usměrňovány do analyzátoru proti proudu sušícího plynu, který slouží k rozbití možných nekovalentních klastrů.



Obr. 5: Chemická ionizace za atmosferického tlaku

(http://www.chem.agilent.com/SiteCollectionImages/cag/wad/pharma8/article4_fig1.gif)

Fotoionizace za atmosferického tlaku (APPI)

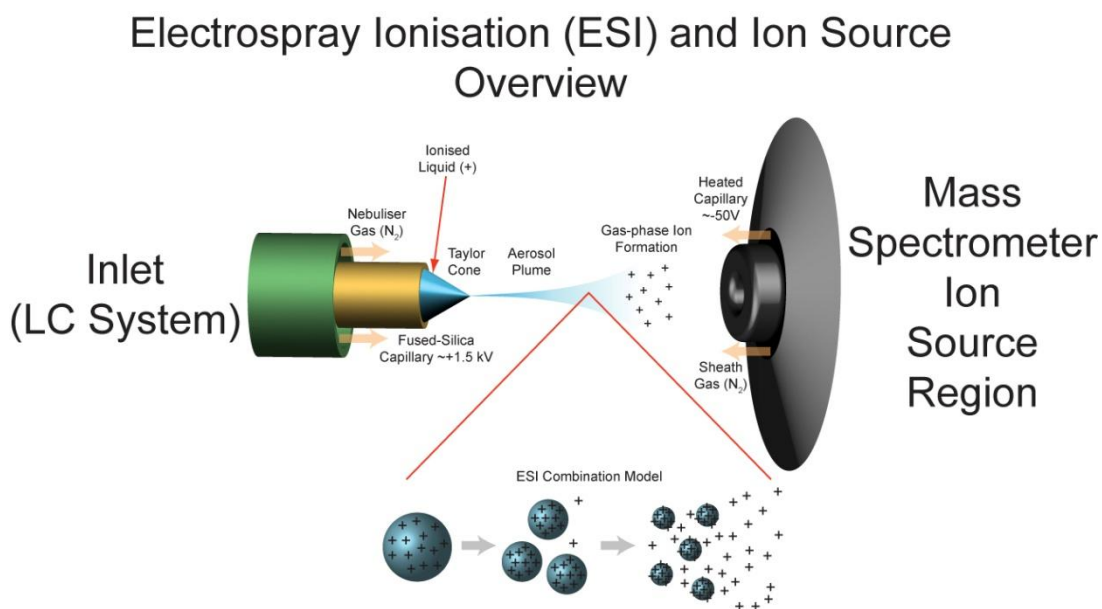
K ionizaci APPI se používá kryptonové výbojky, jejíž energie je větší než ionizační energie nepolárních organických molekul, ale menší než ionizační energie složek mobilní fáze. Dochází tedy k selektivní ionizaci pouze analytu.

Lze zde využít přidání dopantu (benzen, toluen), jenž je také ionizován a poté ion-molekulárními reakcemi interaguje s analytem a tím zvyšuje citlivost.

Při APPI obecně vznikají ionty s lichým počtem elektronů a tato metoda je vhodná pro méně stabilní a nepolárnější látky než ACPI.

Ionizace elektrosprejem (ESI)

Eluent z kolony je do iontového zdroje přiváděn úzkou kapilárou, na niž je vloženo napětí 3 – 5 kV. Na konci kapiláry dojde pomocí proudu zmlžujícího plynu ke vzniku aerosolu. Vzniklé kapičky, nesoucí náboj se odpařováním zmenšují a roste tedy na jejich povrchu hustota náboje, až dojde k tzv. Coulombické explozi, čili rozpadu na menší kapičky, nesoucí poměrnou část náboje. Opakováním tohoto děje dojdeme až ke vzniku kvazimolekulárních iontů.



Obr. 6: Princip ionizace elektrosprejem

(<http://www.lamondlab.com/MSResource/images/lcms/ESI.jpg>)

Mechanismus fungování elektrospreje lze tedy rozdělit na tři základní kroky: zmlžování vzorku na malé nabitě kapičky, odpaření těchto kapiček a uvolnění iontů.

Tvorba nabitých kapének závisí na mnoha faktorech, ať již na geometrii a průměru kapiláry, průtoku a složení eluentu, zejména na obsahu aditiv, jako například povrchově aktivních látek, nebo na typu analytu a použitém zmlžovacím plynu.

Zmlžování může probíhat přímo pouze výstupem eluentu z kapiláry vytažené do velmi úzkého konce (nanoelektrosprej), tato metoda je výhodná díky minimální spotřebě vzorku, vyšší citlivosti a menším nárokům na úpravu vzorku. Nevýhodou ESI je nižší robustnost metody, způsobovaná ucpáváním kapiláry. Ve spojení HPLC/MS se používá pneumatické podpory zmlžení plynem proudícím ve směru výstupu z kapiláry. Třetí možností zmlžování je přídavný proud kapaliny, toto uspořádání je vhodné, je-li potřeba podpořit ionizaci a v případě vodivého spojení pro CZE/MS (kapilární zónová elektroforéza s hmotnostní detekcí).

Při vstupu iontů z iontového zdroje do vakua dochází k velkému ochlazení a tvorbě nežádoucích klastrů. Tomu lze zamezit vyhřátím iontového zdroje. Pro odstranění neutrálních molekul a vodní páry z transportní části ESI je možné s výhodou použít protiproud dusíku (26).

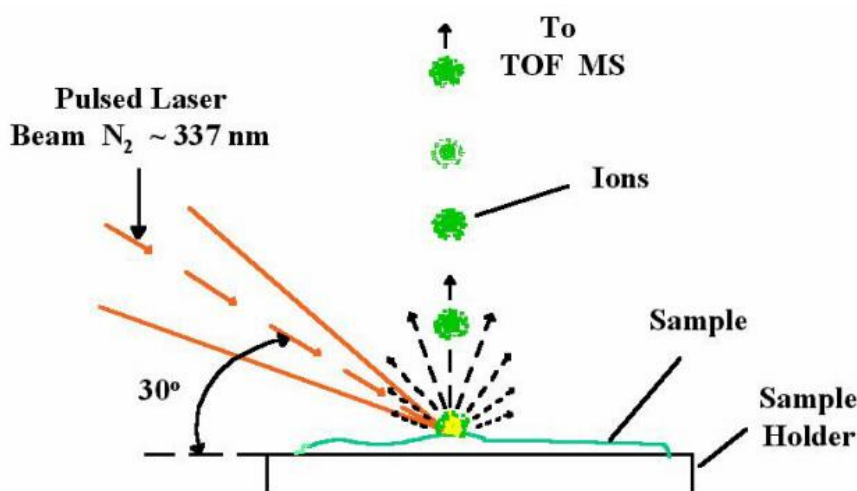
ESI je šetrná ionizační technika hodící se i pro těkavé a termálně méně stabilní látky. Je použitelná pro široké pole analytů, látek polárních až iontových. Velkou předností ESI je možnost vzniku vícenásobně nabitých molekulových iontů látek s více potenciálními nábojovými centry (biomolekuly jako např. peptidy). Získáme tedy spektrum kvazimolekulárních iontů s různými počty nábojů. Díky tomuto jevu je ESI také vhodná pro analýzu biopolymerů s velikostí molekuly v tisících až desetitisících Daltonů (27).

Ionizace a desorpce laserem za účasti matrice (MALDI)

Použití matrice je výhodné v tom, že energie dodaná laserem je absorbována složkami matrice a až poté předána molekulám. Energie dodaná matricí už nedostačuje k fragmentaci molekul. Ve spektru proto pozorujeme molekulové ionty. Jde tedy o měkkou ionizační techniku.

Pro MALDI je důležitá správná příprava vzorku a výběr vhodného rozpouštědla a matrice. Rozpuštěný vzorek se smíchá s matricí a odpaří se přebytečné rozpouštědlo. Následně je krátký laserový pulz absorbován matricí a dojde k přenosu absorbované energie a desorpci a ionizaci molekul vzorku a jejich ion-molekulárním reakcím.

Jak je patrné, MALDI je pulzní ionizační technika, používá se téměř výhradně s TOF analyzátory. Je vhodná obzvláště pro velké molekuly, jako jsou biopolymery s hmotnostní v desítkách a stovkách tisíc Daltonů.



Obr. 7: MALDI ionizace

(<http://www.psrc.usm.edu/mauritz/images/maldi2b.jpg>)

Další ambientní ionizační techniky (DESI, DART)

Od objevu DESI (desorpční ionizace elektrosprejem) se vyvíjí celá skupina desorpčně-ionizačních metod, zvaných ambientní ionizační techniky. Název ambientní je odvozen od přítomnosti analytu na povrchu vně hmotnostního spektrometru před přímým vstupem API (atmospheric pressure inlet), kterým jsou analyzátory vybaveny kvůli kompatibilitě s ESI. Laserem desorbovaný analyt tudý vstupuje do hmotnostního spektrometru (28).

DESI je alternativa klasického elektrospreje, kdy je kapilárou přiváděno pouze rozpouštědlo a vzorek se nachází na destičce mezi ústím kapiláry a vstupem do analyzátoru pod takovým úhlem, aby byly ionizované molekuly analytu strhávány dále do přístroje. Jelikož u tohoto uspořádání odpadá úprava vzorku, je metoda vhodná například pro analýzu rostlinných a živočišných tkání.

DART (přímá analýza v reálném čase) funguje na podobném principu jako DESI, kdy vzorek bez úprav vpravíme do prostoru před vstup do analyzátoru a necháme na něj působit proud ionizovaného plynu (He či N₂) (26).

2.2.4. Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem a slouží k rozdělení iontů o různém poměru hmoty a náboje (m/z), vystupujících z iontového zdroje. Mírou tohoto rozdělení je rozlišovací schopnost (RP – resolving power).

Existují dvě možnosti definice rozlišovací schopnosti analyzátoru.

Výpočet založený na překryvu dvou píků využívá poměr hmotnosti m_1 a rozdíl hmotností m_1 a m_2 s jednotkovým nábojem, kdy oba píky jsou stejně vysoké, překrývají se z 10 % (tj. „údolí“ mezi nimi je 10 %) a mají jednotkový náboj.

$$RP = m_1 / (m_1 - m_2)$$

Tento druh výpočtu se používá pouze u magnetických analyzátorů.

Univerzálně používaná je definice založená na šířce jednoho píku (FWHM – Full Width at Half Maximum), čili poměr hmotnosti iontu m a šířky píku tohoto iontu Δm v polovině jeho výšky.

$$RP = m / \Delta m$$

Správnost určení hodnoty m/z (Mass Sccuracy) lze vypočítat jako rozdíl hodnoty získané experimentem a hodnoty vypočtené, vztažený k této teoretické hodnotě.

$$\text{Správnost } m/z = \frac{(m/z)_{\text{exp.}} - (m/z)_{\text{teor.}}}{(m/z)_{\text{teor.}}} \cdot 10^6$$

Jak je patrné z rovnice, jde o bezrozměrnou veličinu.

Díky vysoké přesnosti určení hmoty iontu lze určit jeho složení. Jako minimum, dostačující k přesnému určení hmoty, se uvádí přesnost 5 ppm s externí kalibrací hmotnostní stupnice. V současnosti však některá řešení poskytují přesnost i pod 1 ppm.

K rozdělení iontů lze použít hmotnostních analyzátorů, fungujících na základě různých fyzikálně chemických principů.

- magnetické analyzátory - zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli

- kvadrupóly a iontové pasti – různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo troj- rozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí
- analyzátoři na principu doby letu iontu (TOF – time of flight) - doba letu iontů po definované dráze bez přítomnosti pole závisí na poměru m/z
- iontová cyklotronová rezonance – ICR – různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném elektrickém a magnetickém poli

Magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací

Magnetické pole interaguje s prolétávajícím iontem a zakříví jeho dráhu. Míra zakřivení je nepřímo úměrná hmotnosti iontu – na těžší iont působí větší odstředivá síla. Kinetická energie iontu vstupujícího do analyzátoru E_k je ovlivněna nábojem iontu z a potenciálem urychlujícího pole V . Nikoli však hmotností iontu m .

$$E_k = 1/2 m \cdot v^2 = z \cdot V$$

Dostředivá síla magnetického pole $B \cdot z \cdot v$ musí být v rovnováze se silou odstředivou $m \cdot v^2/r$, tedy:

$$B \cdot z \cdot v = m \cdot v^2/r$$

Z čehož lze odvodit základní rovnici pro magnetický analyzátor:

$$m/z = B^2 \cdot r^2 / 2V$$

Poloměr dráhy iontů tedy závisí na m/z , B , V a pokud plynule měníme B (magnetické skenování), nebo V (potenciálové skenování), při zachování poloměru dráhy r , projdou postupně všechny ionty výstupní štěrbinou analyzátoru a zaznamenáme jednotlivá m/z . Tímto způsobem získáme hmotnostní spektrum.

Elektrostatický analyzátor

Tento typ analyzátoru slouží k energetickému sjednocení iontů ze zdroje, neboť ty mají po ionizaci určitou distribuci energií. Zde opět musí platit rovnost dostředivé a odstředivé elektrické síly.

$$z \cdot E = m \cdot v^2/r$$

kde E je intenzita elektrického pole.

Energie iontů po urychlení potenciálem je:

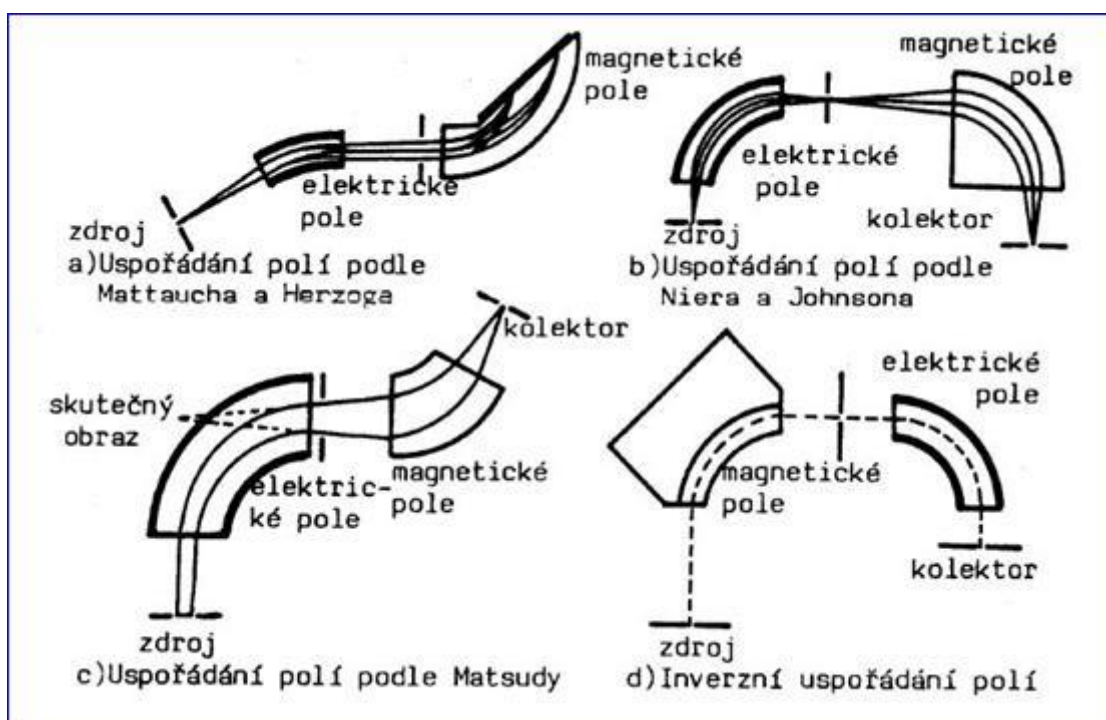
$$E_k = z \cdot V = 1/2 m \cdot v^2$$

Poloměr zakřivení dráhy letu iontu v elektrickém poli lze tedy dopočítat jako:

$$r = 2 \cdot V/E$$

Jak vidíme, dráha iontu zde není závislá na m/z , ale pouze na jeho kinetické energii.

Spojením elektrostatické (E) a magnetické (B) fokusace dosahujeme výrazného zvýšení RP. Geometrie E-B sektorových analyzátorů se značně různí, jak je vidět na obrázku č. 8.



Obr. 8: Uspořádání E-B sektorových analyzátorů

(http://www.okbpavlin.cz/prirucka/JVATO_soubory/image004.jpg)

Kvadrupólový analyzátor (Q)

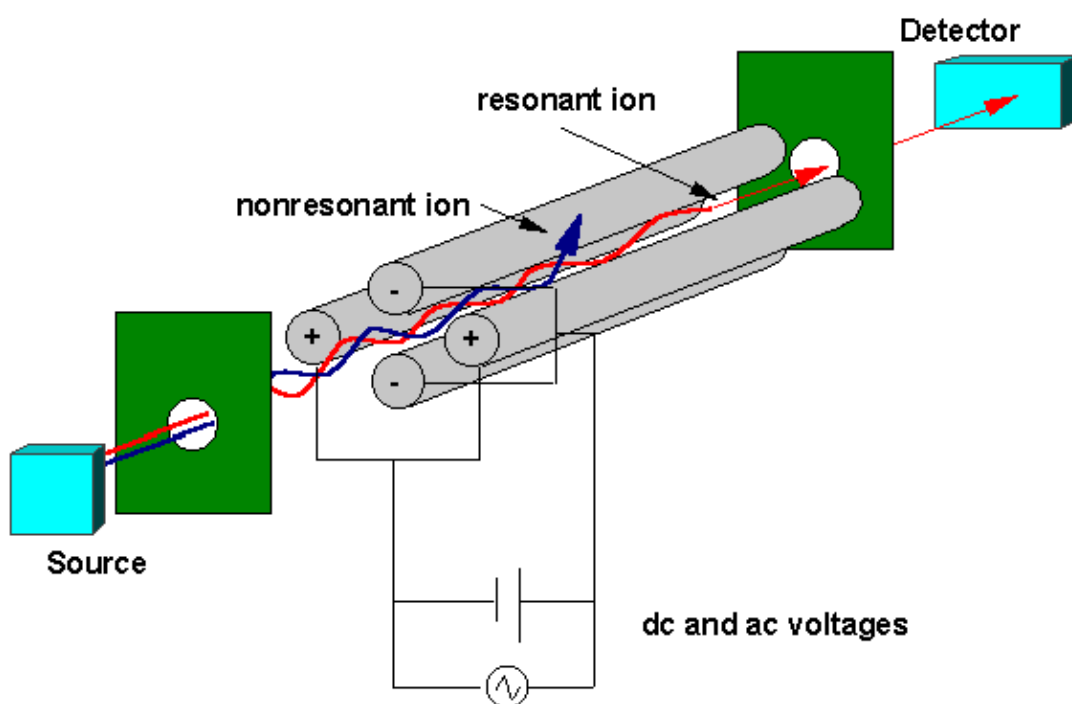
Jde vlastně o hmotnostní filtr, kdy iont, přivedený mezi čtyři kovové tyče projde po stabilní dráze k detektoru pouze při určité hodnotě napětí U a amplitudy V . Všechny ostatní ionty vykáží nestabilní dráhy oscilací a jsou zachyceny tyčemi (elektrodami).

Skenování MS spektra je možno plynulou změnou U a V , kdy ale jejich poměr zůstane zachován. V takovém případě jsou postupně všechny ionty postupně propuštěny k detektoru.

Na dvě protilehlé elektrody je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na druhé dvě elektrody záporné stejnosměrné napětí. Na všechny je také superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí.

Přestože pro maximalizaci RP by byl optimální hyperbolický průřez elektrod, v praxi se toto řešení nevyužívá kvůli technické náročnosti výroby.

Skenujeme-li v rozsahu např. $1000 m/z$, na detekci iontu máme pouze $1/1000$ času skenu, po zbytek doby jsou ionty s tímto m/z zachyceny elektrodami. Pro zvýšení citlivosti skenu tedy snížíme rozsah detekce (zvýšíme dobu registrace daného iontu).



Obr. 9: Schéma kvadrupólu

(<http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/ms/graphics/quad-sch.gif>)

Selektivní záznam iontu (SIM, Selected Ion Monitoring) sice výrazně zvýší citlivost ovšem na úkor měření pouze jednoho, popřípadě několika iontů. Tento záznam intenzity určité m/z v čase je vhodný pro kvantitativní a stopovou analýzu za předpokladu, že známe strukturu iontu.

Jednoduchost, rozměry a relativně nízká cena kvadrupólu vedly k jeho masovému rozšíření zejména u tzv. stolních hmotnostních spektrometrů pro spojení se separačními technikami (GC/MS, HPLC/MS, CZE/MS).

Iontová past (IT)

Iontová past je v podstatě trojrozměrný kvadrupól. Ionty jsou ze zdroje pulzně vypuzeny do prostoru pasti, kde všechny ionty o hodnotě m/z vyšší než je amplituda vloženého vysokofrekvenčního napětí oscilují po stabilních drahách v pasti a jsou postupně zvyšováním amplitudy vypuzovány k detektoru (jejich dráhy se stávají nestabilními).

U iontové pasti lze použít i interní ionizace – ionizace molekul přímo v prostoru pasti, tohoto je běžně používáno u GC/MS (plynová chromatografie s hmotnostní detekcí) s EI.

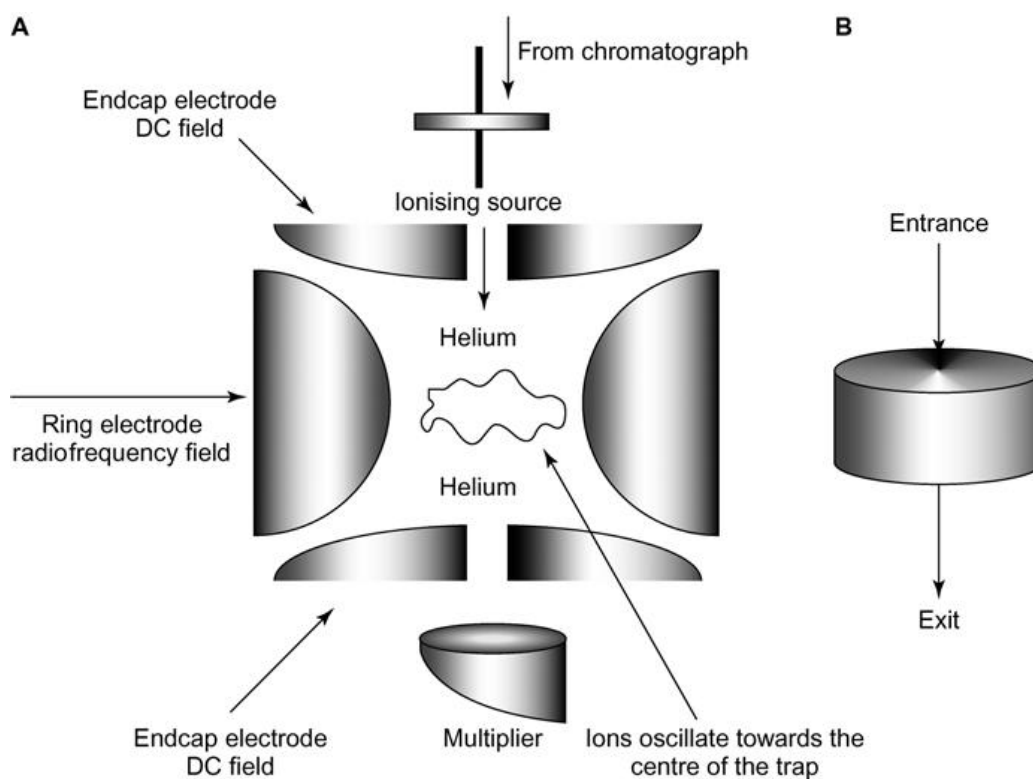
Sférická iontová past je uspořádání s externí ionizací, kdy jsou ionty pulzně dávkovány otvorem v koncové elektrodě do iontové pasti, složené z kruhové elektrody s vloženým střídavým napětím a dvou uzemněných koncových hyperbolických elektrod. Vložením napětí o vhodných poměrech na elektrody pasti jsou uvnitř zadrženy ionty (s účinností cca 5 %), které jsou poté postupnou změnou napětí vypuzovány k detektoru. Do pasti se zavádí helium, jako tlumící plyn, výrazně zlepšuje RP a záchyt iontů tak, že tlumí oscilace iontů. I zde se popis oscilací řídí Mathieuovými rovnicemi.

Druhou možností uspořádání je lineární iontová past, což je obdoba kvadrupólu s vstupní a výstupní diskovou elektrodou a bez stejnosměrného napětí na tyčích.

Množství iontů, dávkovaných do pasti je třeba regulovat, protože v případě přeplnění pasti dochází ke vzniku prostorového náboje, který ovlivní harmonický pohyb iontů. Rezonance iontů přes hodnoty m/z bude vyšší a dojde k rozšíření píků. Dojde tedy ke snížení citlivosti a rozlišení, může dojít i k posunu m/z k vyšším hodnotám.

Vzniku prostorového náboje lze předejít velmi krátkým předskenu, kdy se podle množství iontů v tomto předskenu automaticky upraví doba dávkování do pasti tak, aby nedošlo k jejímu přeplnění. Alternativní možností je automatická úprava plnění pasti podle množství nábojů v předchozím skenu. Obě tyto možnosti

umožní stanovení hlavního píku i kontaminantu vedle sebe aniž by docházelo k přeplnění pasti.



Obr. 10: Iontová past

(http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke/current/images/Clkmass_spectrometryF007_default.png)

Lineární iontová past

Přístroj QTRAP, použitý při všech experimentech pracuje na principu QqQ, s tím že poslední kvadrupól může fungovat jako lineární iontová past.

Lineární iontová past je v podstatě konstrukčně shodná s klasickým kvadrupólovým analyzátozem, který má ovšem navíc na tyčích i stejnosměrnou složku napětí. Hlavním rozdílem proti kvadrupólu je vložení stejnosměrného napětí na vstupní a výstupní štěrbinu analyzátozu. Toto má za následek uvěznění částic v analyzátozové pasti.

Analyzátor doby letu (TOF)

Jak už název napovídá, TOF určuje hmotnost iontu z doby letu částice. Iont s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se bude pohybovat v oblasti bez pole rychleji, takže dříve doputuje k detektoru. Ionty jsou urychleny krátkým pulzem a vstupují do analyzátorové trubice, kde se měří čas jejich dopadu na detektor. Z času se určí poměr m/z . Skenování spektra je rychlé a rozsah m/z je omezen v podstatě pouze dobou analýzy. Čím delší čas skenování, tím vyšší poměr m/z lze získat, lze i více než $m/z = 10^6$.

Molekuly, urychlené elektrickým potenciálem V , získají ionizací přibližně stejnou energii a platí tedy:

$$E_k = 1/2m \cdot v^2 = z \cdot V$$

Při dráze letu l a rychlosti v je tedy doba letu iontu $t = l/v$. Z těchto rovnic získáme vztah pro m/z :

$$m/z = 2 \cdot V \cdot t^2 / l^2$$

RP není u tohoto typu analyzátoru příliš vysoké, ale lze dále několikanásobně zvýšit z cca 1000 - 3000 na 25000 až 50000 ve speciálních případech.

První možností jak toho dosáhnout je použití reflekttronového (nebo též iontového) zrcadla, tzv. rTOF. Reflekttron vyrovná distribuci energií iontů, vzniklou během ionizace a tím zlepšuje RP analyzátoru. Ionty s vyšší E_k proniknou hlouběji do reflekttronu než ionty s nižší E_k (hloubka průniku nezávisí na m/z), čímž dojde k opoždění jejich odrazu a vyrovnání distribuce energií.

Druhou možností je opožděná extrakce iontů (DE), která koriguje disperzi kinetických energií tak, že se extrakční napětí na MALDI zdroji neaplikuje hned po ozáření laserovým paprskem. Toto zpoždění způsobí změnu distribuce iontů. Ionty o stejném m/z , ale s vyšší E_k se budou nacházet dále od nosiče a po aplikaci napětí se počáteční distribuce E_k pro ionty o stejné m/z vyrovná. Nevýhodou této metody je její fungování pouze v předem zvoleném intervalu m/z (26).

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)

Dostane-li se iont do silného magnetického pole (cca 7 Tesla), začne se pohybovat po cykloidální trajektorii o určité frekvenci, kolmé na směr vloženého magnetického pole. Úhlová frekvence ω_c iontů je nepřímo úměrná jejich m/z .

$$\omega_c = 2 \cdot \pi \cdot v = \frac{v}{r} = \frac{z \cdot B}{m}$$

Kde r je průměr magnetického pole, v postupová rychlost a B indukce magnetického pole. Vzhledem ke dráze, kterou ionty opisují, je jejich doba setrvání v analyzátoru relativně dlouhá (5 - 10 ms). Dojde-li k rezonanci frekvence pohybu iontu a frekvence vloženého radiofrekvenčního pole, absorbuje iont energii z tohoto pole. Absorbce vyvolá indukci proudu v přijímači, kterou lze registrovat. Záznam MS spektra lze provést plynulou změnou radiofrekvenčního pole při konstantní indukci pole magnetického.

Celu pro FT-ICR tvoří dvě destičky, čelní a zadní, kolmé na směr magnetického pole, dvě boční transmisní destičky, sloužící k buzení iontů a dvě destičky detekční, přijímající signál od již vybuzených iontů. Supravodivých podmínek je dosaženo uložením cely v kapalném heliu.

Krátký pulz elektronů přes otvory v čelní a zadní destičce ionizuje molekuly. Poté následuje vystavení ionizovaných molekul radiofrekvenčnímu střídavému napětí s frekvencí rostoucí od nuly do několika MHz, díky kterému dojde k excitaci iontů. Po skončení excitace nastává fáze detekční – zaznamenání signálu vybuzených iontů. Časová závislost proudu obsahuje informace o frekvencích iontů s různými m/z a je řešena Fourierovou transformací.

Výhodou cyklotronové rezonance je to, že vznik iontů a jejich MS i MSⁿ probíhá v jednom místě. Navíc jsou všechny ionty detekovány zároveň. Umožňuje tedy rychlé snímání a akumulaci spekter. Vedle vysoké citlivosti se vyznačují i výbornou rozlišovací schopností. Nevýhodou jsou vysoké nároky na vakuum a vysoká cena přístrojů (25, 26).

2.2.5. Tandemová hmotnostní spektrometrie

Za tandemovou hmotnostní spektrometrii se označuje taková technika, kdy je zapojeno více analyzátorů za sebe, přičemž jeden či více analyzátorů vyberou z ionizované směsi hledaný prekurzor a následující analyzátor separuje ionty, vzniklé z tohoto prekurzoru. Tento proces se může několikrát opakovat. Počet opakování je dán pouze množstvím analyzátorů a citlivostí detekce, neboť výtěžek

jednotlivých kroků je pouze v jednotkách procent z množství iontů v předcházejícím stupni.

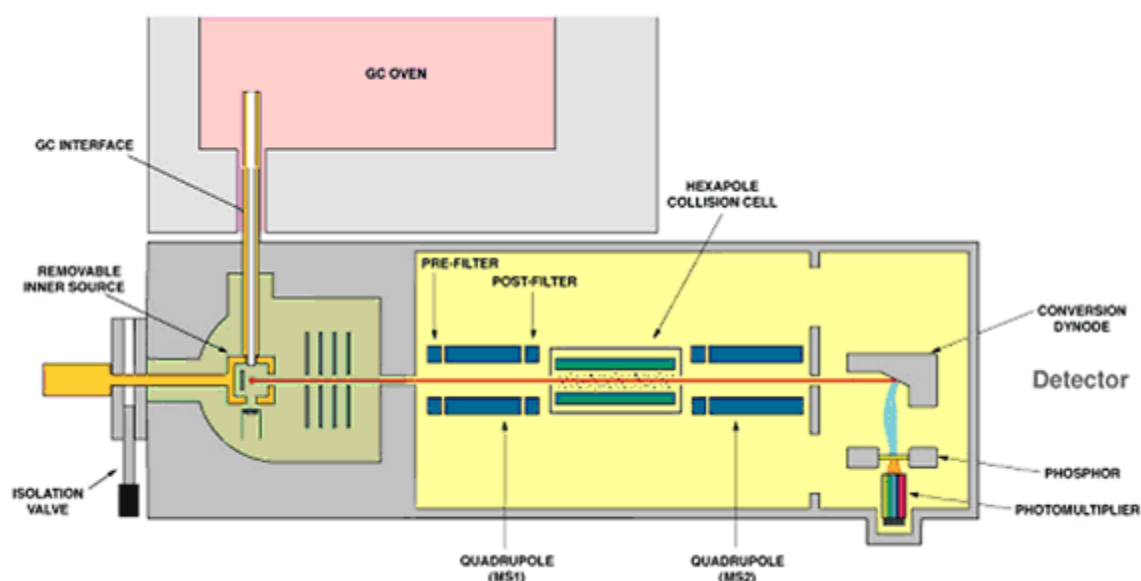
Použití tandemové hmotnostní spektrometrie našlo uplatnění v identifikaci látek ve směsích, strukturním studiu iontů a kvantitativní analýze. Identifikace jedné složky směsi pomocí MS/MS je rychlá a efektivní, ovšem MS/MS analýza není vhodná pro analýzu více složek, zde se s výhodou dá použít kombinace hmotnostní spektrometrie s některou ze separačních technik (HPLC, GC, CZE).

Trojítý kvadrupólový analyzátor (QqQ)

Toto uspořádání získáme, zařadíme-li za sebe tři kvadrupóly, přičemž prostřední z nich slouží po zavedení kolizního plynu jako kolizní cela. Ionty vybrané analyzátozem Q1 vstupují do kolizní cely q2, kde dochází ke srážkám s molekulami kolizního plynu a fragmentaci iontů – kolizně indukovaná disociace. Díky opakovaným srážkám jak prekurzorového, tak produkovaného iontu s molekulami plynu vzniká mnohem více fragmentových iontů než u MS/MS měření s iontovou pastí.

QqQ nám umožňuje více možností analýzy. Lze skenovat produktové ionty, prekurzorové ionty, případně využít možnosti skenu neutrálních ztrát.

Pro měření MS³ by bylo třeba uspořádání QqQqQ, čili 5 kvadrupólů za sebou, toho se v praxi nevyužívá, neboť je výhodnější použít iontovou past nebo FT-ICR.



Obr. 11: Schéma tandemového hmotnostního spektrometru

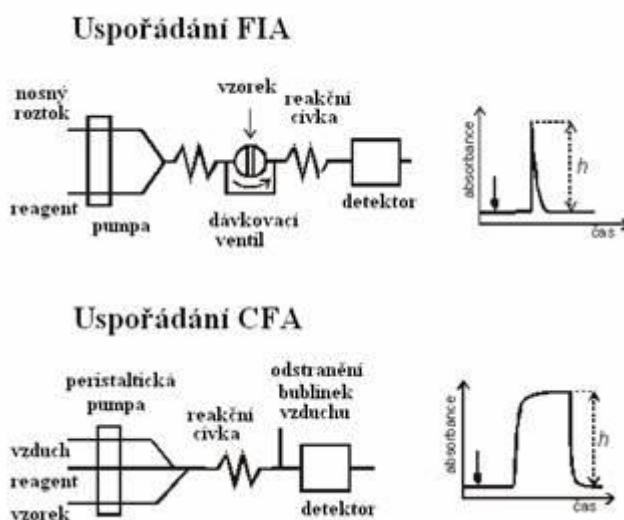
(<http://www.caslab.com/Pesticide-Testing/triple-quad-LVI-GC-MS-MS.gif>)

2.3 Přímý nástřik ve spojení s MS

2.3.1. FIA metody

Přímý nástřik vzorku do hmotnostního spektrometru, tedy bez předchozí separace, spadá do FIA analýz (Flow Injection Analysis), což je jedna z možností automatizace analýzy poskytující velké množství analýz v krátkém čase a s dostatečnou spolehlivostí, přesností, citlivostí a minimálními nároky na cenu analýzy a lidskou práci. Je tedy vhodná pro rutinní provoz například klinických laboratoří.

Do proudu nosné kapaliny čerpané čerpadlem se nadávkuje pomocí dávkovacího ventilu takový definovaný objem vzorku, aby došlo k minimální změně průtoku. Do směsi vzorku a nosného média je dále možné dávkovat reakční činidla. Poté, byla-li činidla přidána, projde směs reaktorem, kde dojde k míchání a potřebným reakcím a vzorek pokračuje dále k detektoru, jímž je v našem případě QqQ hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem.



Obr. 12: Schéma FIA

(http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab_soubory/image002.jpg)

Základní charakteristikou sestavy pro FIA je disperze D , jež je definovaná jako poměr koncentrace vzorku nenaředeného (c_0) k jeho koncentraci v detektoru (C_{max}).

$$D = C_0 / C_{max}$$

Disperzi systému ovlivňuje mnoho faktorů, jak průtoková rychlost, objem vzorku, tak délka a tvar reaktoru, případně objem celého systému. Podle hodnoty disperze systémy dělíme na nízkodisperzní s vysokou průtokovou rychlostí, velkým objemem vzorku a s malým či žádným reaktorem. Je vhodný, pokud nepotřebujeme před detekcí provádět žádnou reakci a jde nám pouze o transport vzorku do detektoru. Předností je zde vyšší citlivost a vzorkovací rychlost.

Střední disperzi vykazují systémy, kdy v reaktoru probíhá chemická reakce. Vyžadují nižší průtokovou rychlost a delší reaktor, případně více mísících stupňů.

Vysocedisperzní systémy s míchací komůrkou či dlouhým reaktorem se obvykle nevyužívají, významu nabývají u FIA titrací (29).

FIA dosahuje velmi dobrých výsledků v kombinaci s technikami s vysokou detekční silou, jako je hmotnostní spektrometrie.

Injektování vzorku do toku nosného roztoku vstupujícího do iontového zdroje zabezpečuje ochranu před ovlivňováním se vzorků navzájem (jsou odděleny množstvím kapaliny). Efektivita FIA-MS umožňuje měření za použití standardů i izotopově značených vnitřních standardů, vše bezprostředně v řadě za sebou, což snižuje možnost kontaminace, minimalizuje systematické chyby a zjednodušuje kvantifikaci. Další výhodou je omezení driftu základní linie přístroje během analýz (30, 31). Díky rychlosti analýzy a potřebě malého objemu vzorku bylo vyvinuto množství metod spojení s MS, což vedlo k vylepšení možností zavádění vzorku, odstraňování obtíží s efekty matrice u komplikovaných směsí a zavádění možností on-line kalibrace (32).

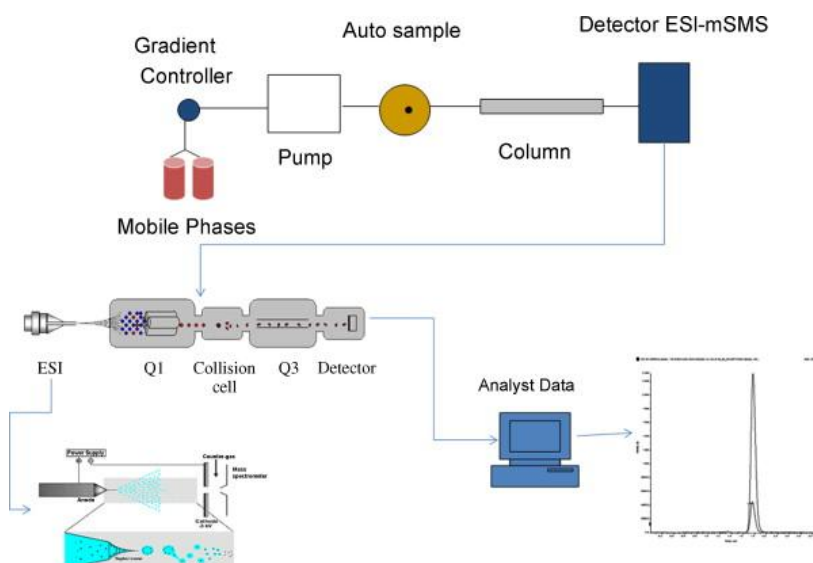
Pro použití pro nestálé analyty byla vyvinuta FIA-MS s propustnou membránou a prostupem těkavých analytů přes tuto membránu z FIA prostoru do prostoru iontového zdroje. Výhodou FIA se selektivní membránou je segmentace vodou k promytí membrány. Voda oddělí vzorky a standardy a nemůže dojít k přenosu analytu mezi vzorky. Dávkováním vzorků o objemu 200 μ l oddělených vodou dostačuje k zavádění neředeného vzorku do ionizační komory. Je k tomu potřeba membrána selektivně propustná pro analyt vyhřátá na 75-90°C. Molekuly analytu prostupují membránou do vakua, které zvyšuje účinnost extrakce (28).

Užití membrány je omezeno její selektivitou, proto se častěji využívá externího iontového zdroje. Ať již nejčastějšího elektrospreje, tak ACPI, APPI, ale i méně obvyklé FIA-ICP-MS, tedy použití indukčně vázané plazmy k ionizaci molekul. Tato možnost je však využitelná pouze pro kovové ionty.

2.3.2. FIA-ESI-MS

FIA lze snadno spojit s ESI zdrojem hmotnostního spektrometru při následném průtoku kolem 1 ml mobilní fáze za minutu. Místo specializované FIA části lze užít i kapalinového chromatografu, kdy sampler chromatografu nedávkuje vzorek do kolony, ale přímo do výstupu z přístroje. Mobilní fází jsou obvykle polární roztoky, jako acetonitril, methanol, směs ethanol - voda atd.

S výhodou lze toto uspořádání použít jako alternativu k LC (kapalinová chromatografie) nebo GC (plynová chromatografie), kdy nám odpadá zdlouhavý separační krok. Přítomnost matrice může buď snižovat odezvu analytu nebo zvýšit vliv pozadí. Při použití izotopicky značeného vnitřního standardu je tento efekt méně významný a lze dále potlačit vložení pryskyřicové kolonky nebo odpařovacího zařízení. Tímto způsobem lze dosáhnout při potlačení efektu matrice i zlepšení detekčních limitů. Velký přínos FIA-ESI-MS je v několikanásobném zrychlení analýzy oproti LC (nebo GC)-MS (33).



Obr. 13: FIA-ESI-MS

(<http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S157002320900539X-gr3.jpg>)

2.3.3. Aplikace FIA-ESI-MS

Tato metoda nachází uplatnění mimo jiné v oblasti metabolomiky, která se stává významným nástrojem v diagnostice chorob.

Subjektem zkoumání metabolomiky je metabolom, tedy soubor všech malých molekul – metabolitů – produkovaných buňkami. Význam metabolomiky spočívá především v objasnění buněčných funkcí, kdy na rozdíl od jiných vědních oborů, jako například proteomiky, metabolom reflektuje aktuální stav buňky, který se soustavně mění. Metabolický pool nereaguje pouze na genovou expresi ale i změny v životním prostředí, vývojové změny nebo je ovlivněn genetickou mutací. Je tedy nasnadě užití metabolomiky v medicíně jako nástroje pro stanovení markerů chorob, zejména dědičných metabolických poruch. Dále je možno použít možností metabolomiky pro monitorování hladin léčiv a odpovědi organismu léčivem zprostředkované.

Dědičné metabolické poruchy jsou způsobeny defektem biochemických pochodů. Jejich frekvence v populaci je různá od ojedinělých případů až po velmi vážné a často se vyskytující poruchy. Tyto poruchy jsou v dnešní době odhalovány právě novorozeneckým screeningem založeným obvykle na přímém nástřiku vzorku do tandemového hmotnostního spektrometru (FIA-TMS, neboli průtoková analýza s tandemovou hmotnostní spektrometrií) (34, 35). Tato metoda se běžně využívá i v mnoha metabolických studiích. Pro snížení vlivu iontové suprese se při screeningu jako standardů užívá deuterovaných analogů stanovovaných látek.

Pomocí FIA-TMS lze odhalit defekty aminokyselin. Jedním z nich je fenylketonurie způsobená defektem fenylalaninhydroxylázy, který může za hromadění fenylalaninu. Dále homocystinurie, porucha cystathion- β -synthasy, projevující se vzestupem koncentrací homocysteinu a methioninu. Leucinóza, nemoc javorového sirupu, je defektem dehydrogenázy větvených α -keto kyselin (izoleucin, leucin) vedoucím ke vzrůstu jejich koncentrace v plazmě. Tyrosinemie je charakterizována vysokou koncentrací tyrosinu v plazmě vlivem defektu fumarylacetoacetáthydroxylázy.

Další možnost využití FIA-TMS je odhalení mitochondriálních defektů a organických acidurií. Například propionová a methylmalonová acidemie, kdy se poruchy methylmalonyl-CoA-mutázy a propionyl-CoA-karboxylázy jež se účastní

metabolizmu aminokyselin (valin, isoleucin, methionin, threonin), dále cholesterolu a mastných kyselin, projeví vzestupem koncentrace propionylkarnitinu v krvi pacientů (36).

3. Experimentální část

3.1. Materiál

Vzorky krve pacientů byly získány z III. Interní kliniky, FN Olomouc. Pacientům byla odebrána nesrážlivá krev do zkumavek s EDTA.

Všechny reagenty byly získány od firmy Sigma (St. Luis, MO, USA) a měly analytický stupeň čistoty. Mobilní fáze obsahovala 50 % acetonitrilu (CH_3CN) a 50 % 20 mM acetátu amonného, pH 9,45.

Standardy byly získány z kalibrátorového setu pro imunosupresiva od firmy Chromsystems (Mnichov, Německo). Interní standard Cyklosporin D byl rozpuštěn v methanolu na výslednou koncentraci 20 ng/ml.

Přístrojové vybavení:

- Analytické váhy (KERN ABT 120-5DM, Belling, Německo)
- Příprava deionizované vody (Werner Reinstwassersystem, Německo)
- pH metr Cyberscan ph 510 (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)
- Magnetická míchačka RCT Basic (IKA labortechnik, Staufen, Německo)
- Vortex (IKA Works, USA)
- Centrifuga (Micro 120, Hettich, Německo)
- Sonifikátor (Kraintek s.r.o., Slovensko)
- UHPLC Dionex Ultima 3000 RS (Sunnyvale, CA, USA)
- Hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB Sciex, USA)

3.2. Deproteinace krve

Po vytemperování krve pacientů na laboratorní teplotu bylo odebráno 10 μl vzorku. K odebranému vzorku bylo přidáno 5 μl směsi pro podporu ionizace (směs obsahovala 2,1 % hydroxidu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí) a 90 μl methanolu, sloužícího k samotné deproteinaci, s přidavkem interního standardu (ISTD), kterým byl cyklosporin D (CyD). Poté byl roztok 5 minut sonifikován, následně vortexován a umístěn po dobu 30 minut do mrazicího boxu při -20°C .

Po zmrazení byl vzorek 5 minut centrifugován při 14 000 RPM. Vzniklý supernatant byl oddělen od pevné fáze do vialek s insertem a analyzován nebo uschován pro další analýzu při – 20°C.

3.3. Metoda

Veškeré experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru QTRAP 5500 ve spojení s kapalinovým chromatografem Dionex Ultra 3000 RS.

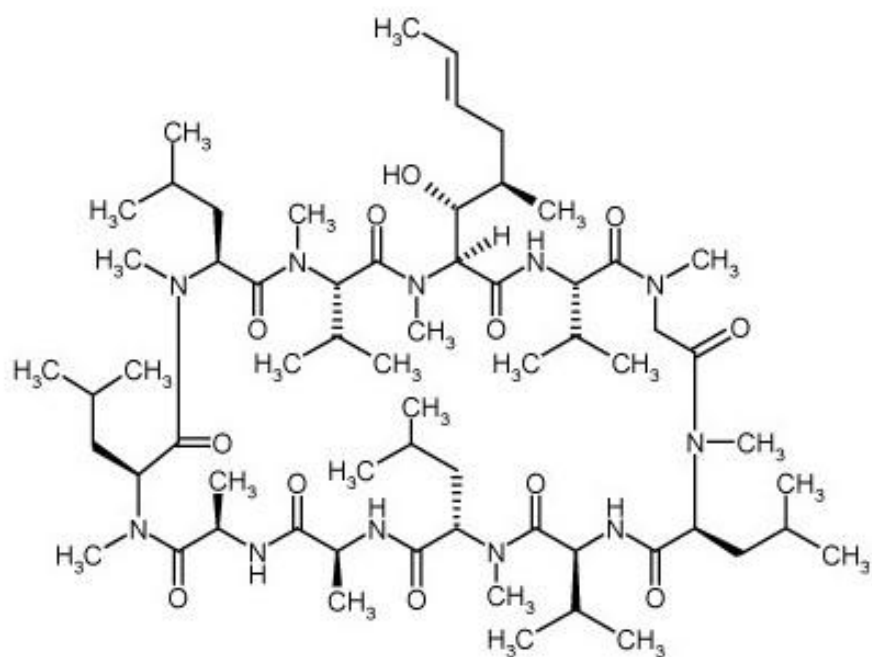
V této práci použitá metoda přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru (FIA – Flow injection analysis) byla porovnávána s rutinně používanou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS).

Mobilní fáze pro metodu přímého nástřiku obsahovala 50 % acetonitrilu (CH_3CN) a 50 % 20 mM acetátu amonného, pH 9,5. Průtok mobilní fáze byl do 0,25 minuty nastaven na 0,15 ml/min a poté byl zvýšen na 0,50 ml/min až do konce analýzy v čase 0,60 minuty. Zvýšením průtoku byl zabezpečen jednak lepší tvar píků analytu a také díky dostatečné době, po kterou byl průtok zvýšen, byla kapilára dostatečně propláchnuta před další analýzou.

Do hmotnostního analyzátoru bylo nastříkováno bez předchozí separace 0,5 μl vzorku a celková doba analýzy trvala 0,6 minuty do nástřiku dalšího vzorku. Jako hmotnostní analyzátor byl pro detekci a kvantifikaci použit přístroj QTRAP 5500 (AB Sciex Instruments, USA) s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. Pro analýzu byl použit mód MRM (multiple reaction monitoring). Optimalizace MS/MS podmínek je popsána níže.

3.4. Kvantifikace

Všechny kvantifikace analytu při validačních experimentech a měření reálných vzorků krve pacientů byly provedeny vztahením k internímu standardu. Výsledné koncentrace byly vypočteny pomocí programu Analyst 1.5 z ploch píků Cyklosporinu A a interního standardu, kterým byl Cyklosporin D (obr. 14)



Obr. 14: Cyklosporin D

(<http://www.antialabs.com/img/p/40-69-thickbox.jpg>)

3.5. Validace metody

3.5.1. Linearita

Výpočet linearity metody byl proveden metodou nejmenších čtverců a pro vyhodnocení kalibrační přímky byla použita rovnice $y = ax + b$.

K ověření linearity metody bylo užitó komerční koncentrační řady v rozmezí 0 až 757 $\mu\text{g/l}$ (0, 24, 124, 296, 480, 757 $\mu\text{g/l}$) kalibrátorového setu pro

imunosupresiva od firmy Chromsystems (Mnichov, Německo). Všechny vzorky byly připravovány v triplikátech.

3.5.2. Návratnost (recovery)

K měření a výpočtu návratnosti (recovery) metody bylo použito vzorků obsahujících biologickou matici a analyt o koncentraci v různých hladinách (nízká, střední a vysoká koncentrace).

V tomto případě byla k měřením použita krev pacientů neléčených Cyklosporinem A. Hladina CyA ve vzorcích byla upravena na koncentrace 50, 200 a 500 $\mu\text{g/ml}$. Bylo připraveno 10 vzorků pro každou koncentrační hladinu.

3.5.3. Preciznost

Preciznost metody byla měřena v sérii (within-run, intraassay), kdy byl vzorek o jedné koncentraci měřen opakovaně jedním pracovníkem v jeden den, jednou metodou, na tomtéž přístroji, při stejné kalibraci a v jedné laboratoři.

Dále bylo provedeno měření preciznosti mezi sériemi (between-run, interassay), kdy byl vzorek o téže koncentraci měřen jedním pracovníkem, toutéž metodou, na jednom přístroji, ve stejné laboratoři, v různé dny a při různé kalibraci.

Preciznost v jednom dni a po dobu devíti dnů byla měřena s využitím tří vzorků pacientské krve adované Cyklosporinem A na výsledné koncentrace 50, 200 a 500 $\mu\text{g/l}$, stejně jako v případě měření nepřesnosti.

3.5.4. Iontová suprese

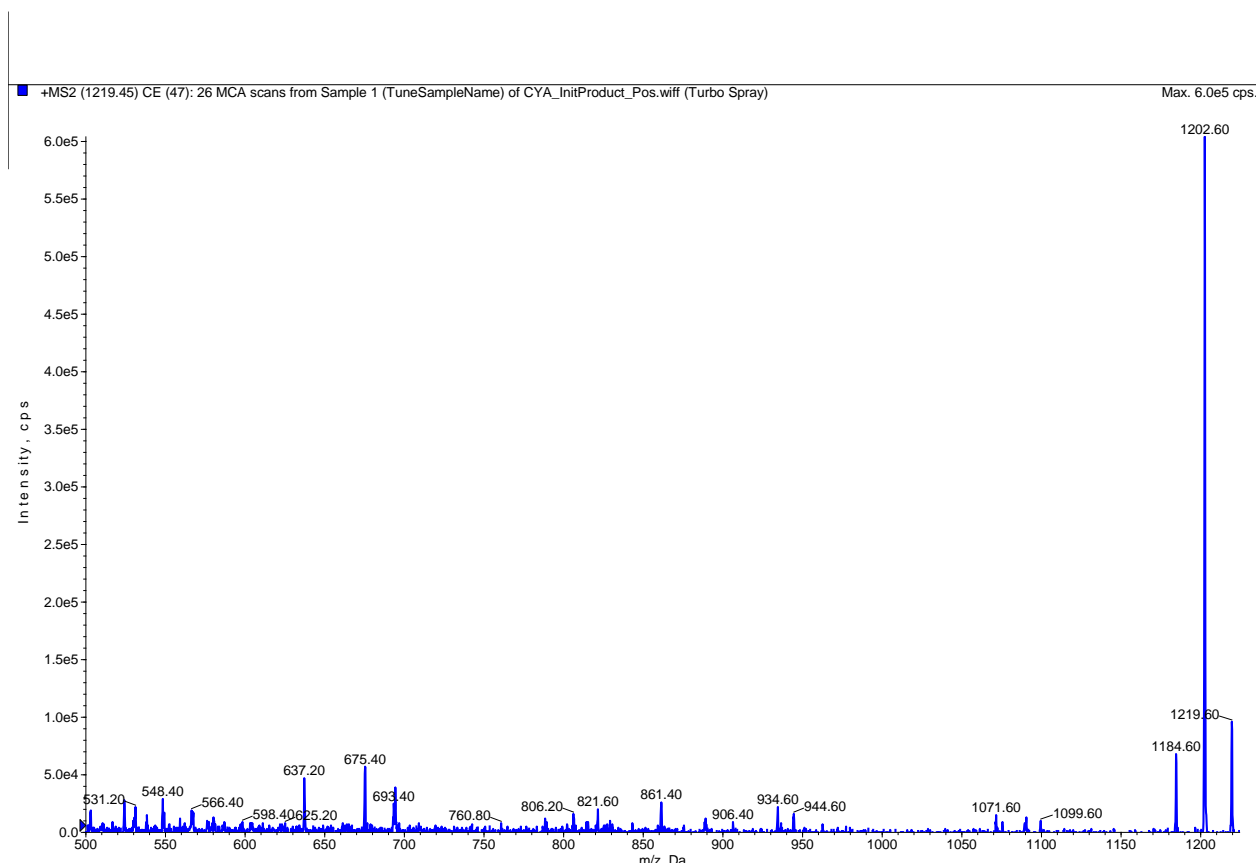
Iontová suprese popisuje vlivy matrice komplexního vzorku na ionizaci a tedy na analýzu vzorku. Byly připraveny triplikáty vzorku o koncentraci CyA 50, 200 a 500 ng/ml . Dále byly připraveny další triplikáty vzorků o těchto koncentracích s potlačeným vlivem iontové suprese. Iontová suprese byla dopočítána jako podíl

výšek píků vzorku připraveného obvyklým způsobem a vzorku s potlačeným vlivem iontové suprese.

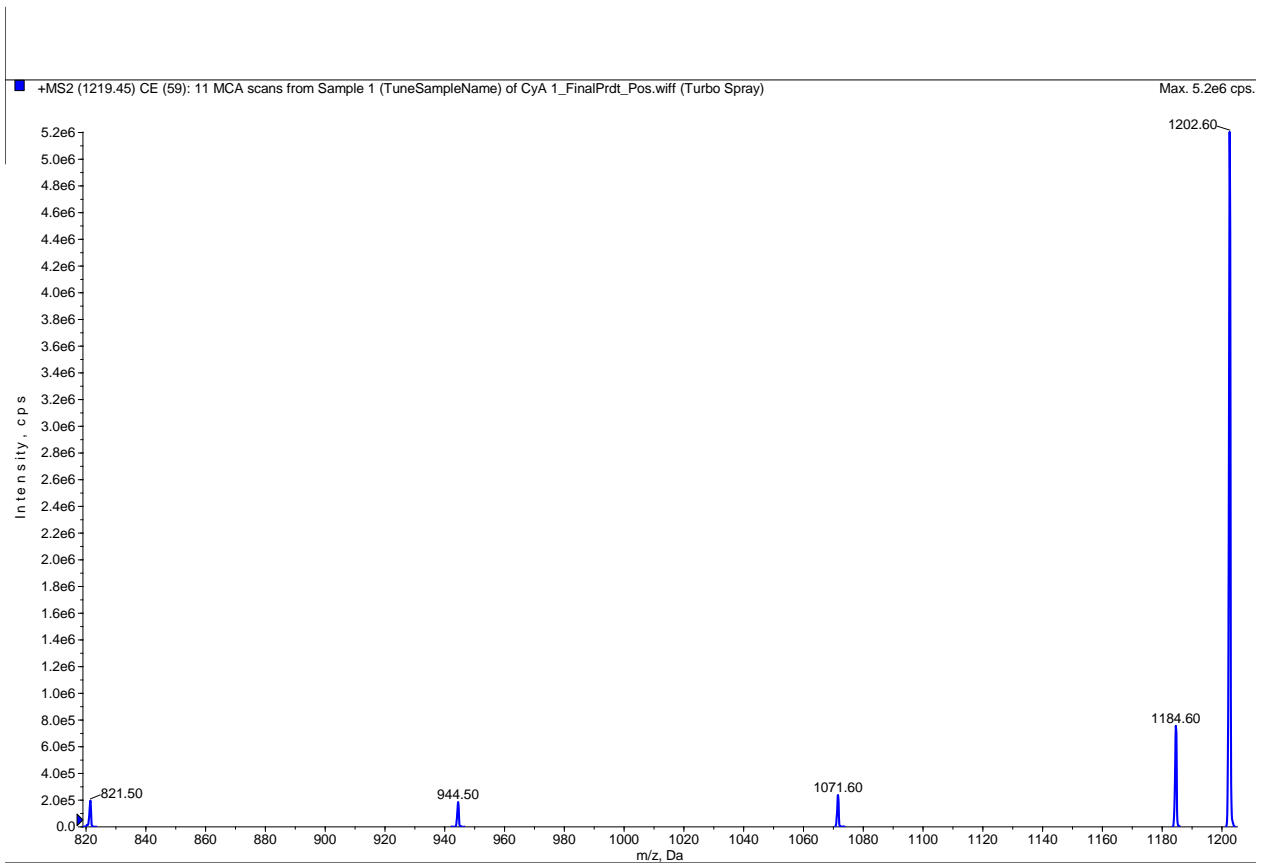
3.6. Výsledky

3.6.1. Optimalizace MS/MS podmínek

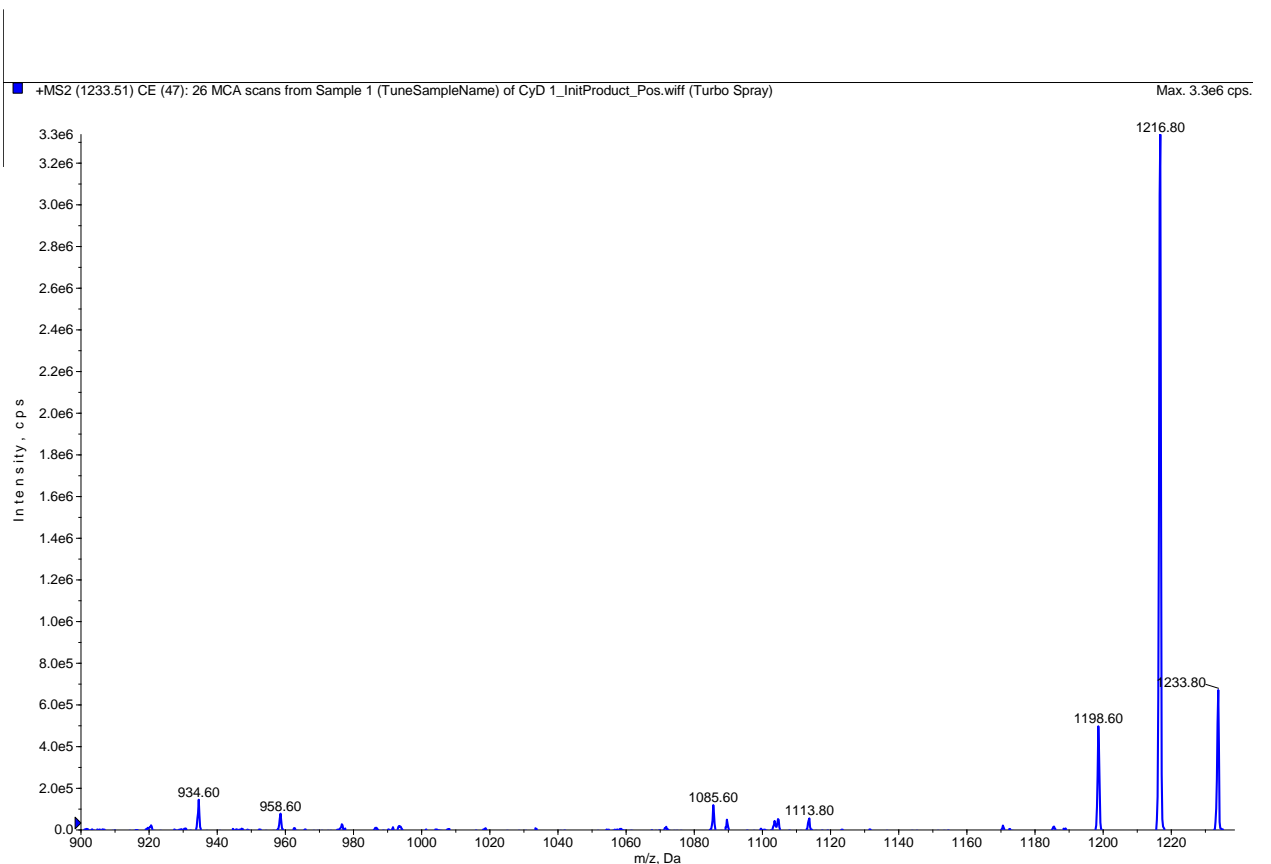
V úvodní části experimentu bylo proměřeno hmotnostní a fragmentační spektrum Cyklosporinu A (Obr. 15, 16) a Cyklosporinu D používaného jako interní standard (Obr. 17, 18) kvůli nalezení optimálních MRM přechodů ke sběru dat.



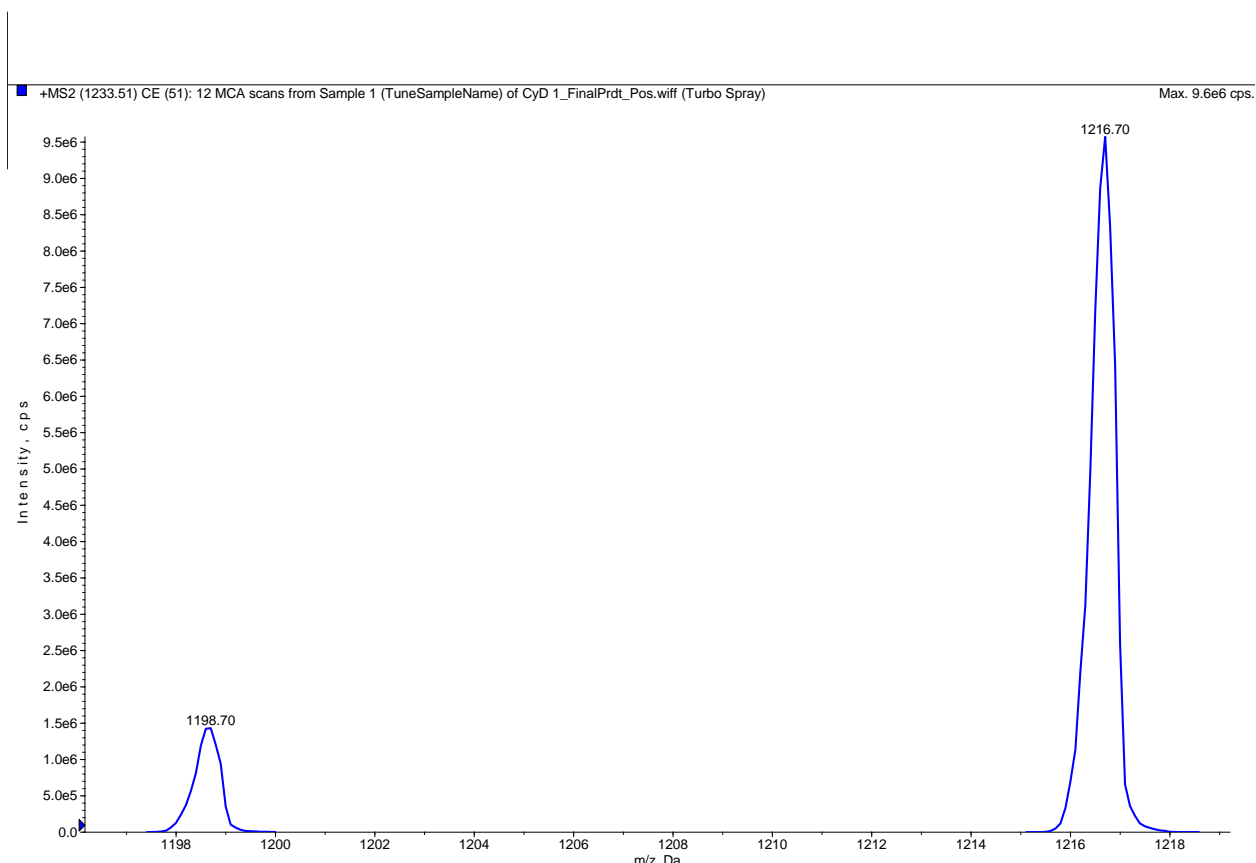
Obr. 15: Iničiální spektrum CyA



Obr. 16: Fragmentační spektrum CyA

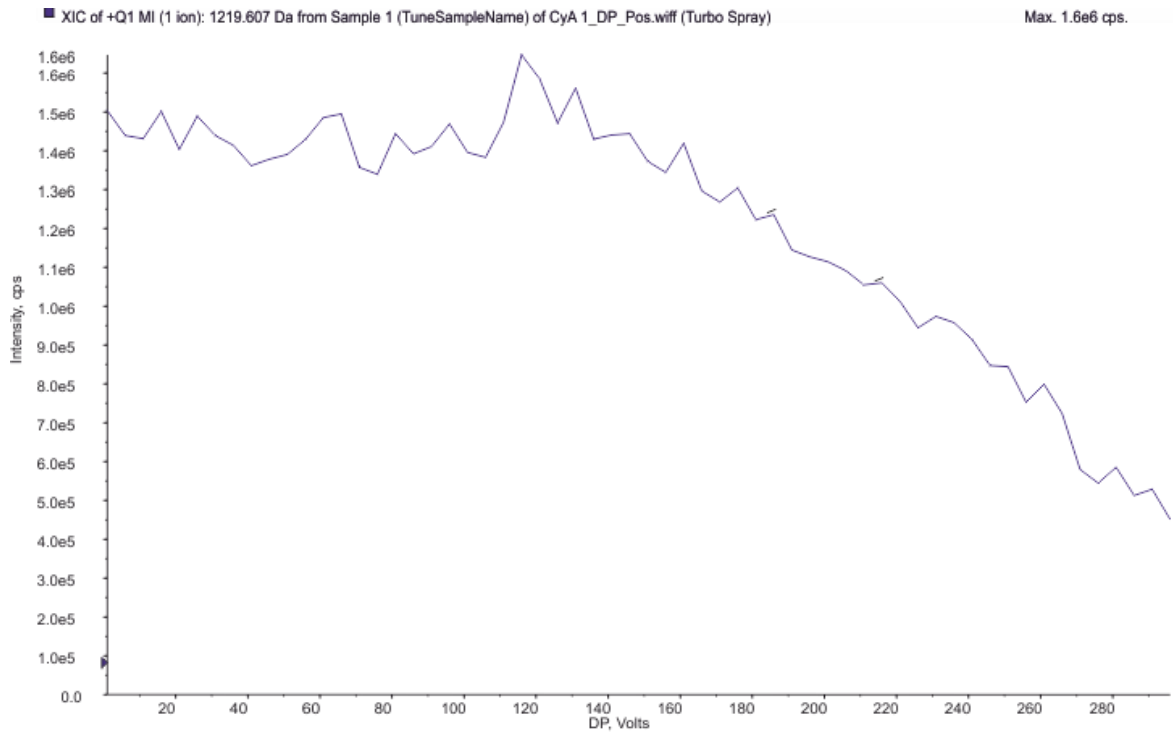


Obr. 17: Iničiální spektrum CyD

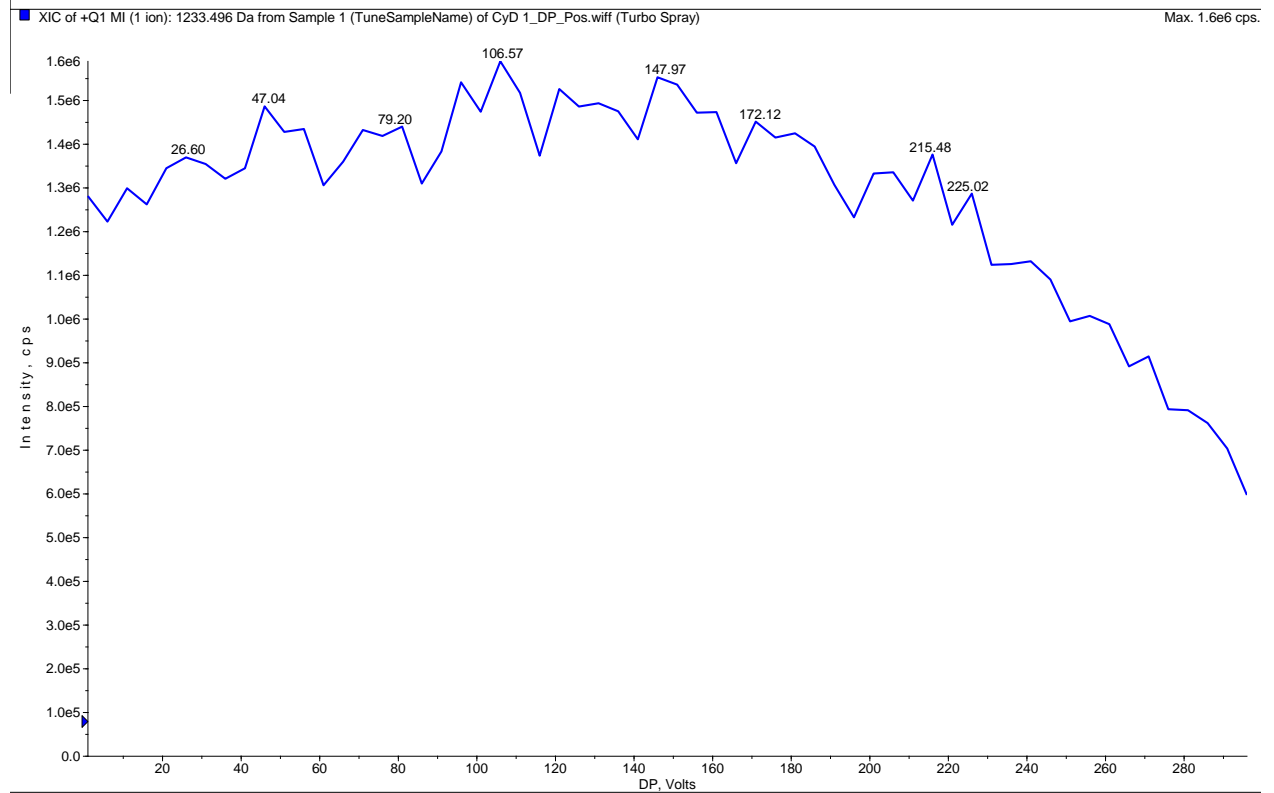


Obr. 18: Fragmentační spektrum CyD

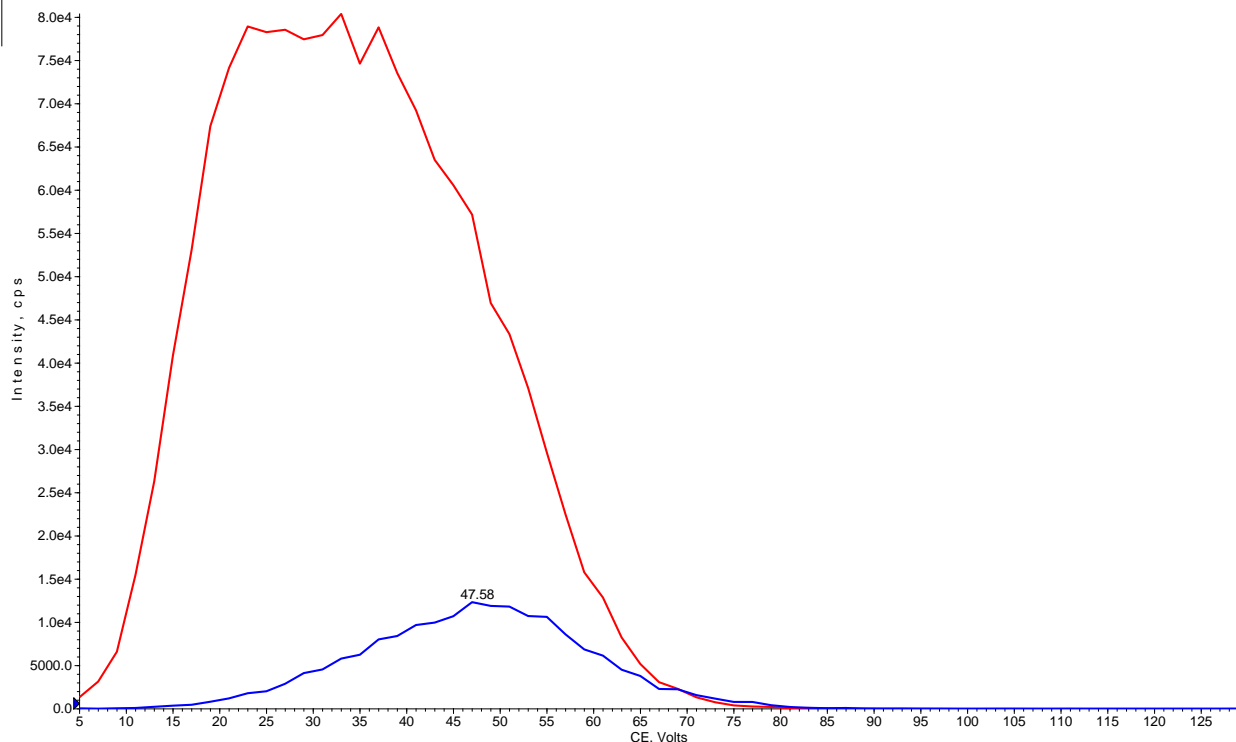
V následující části experimentu byly automaticky přístrojem optimalizovány hodnoty deklasteračního potenciálu (*DP*), kolizní energie (*CE*) a výstupního potenciálu kolizní cely (*CXP*). Jako optimální hodnota *DP* pro Cyklosporin A bylo zvoleno 116 V (Obr. 19) a pro CyD 106 V (Obr. 20). Nejlepších výsledků analýz bylo dosaženo při hodnotách $CE = 31$ V pro Cyklosporin A (Obr. 21) a pro CyD $CE = 51$ V. (Obr. 22)



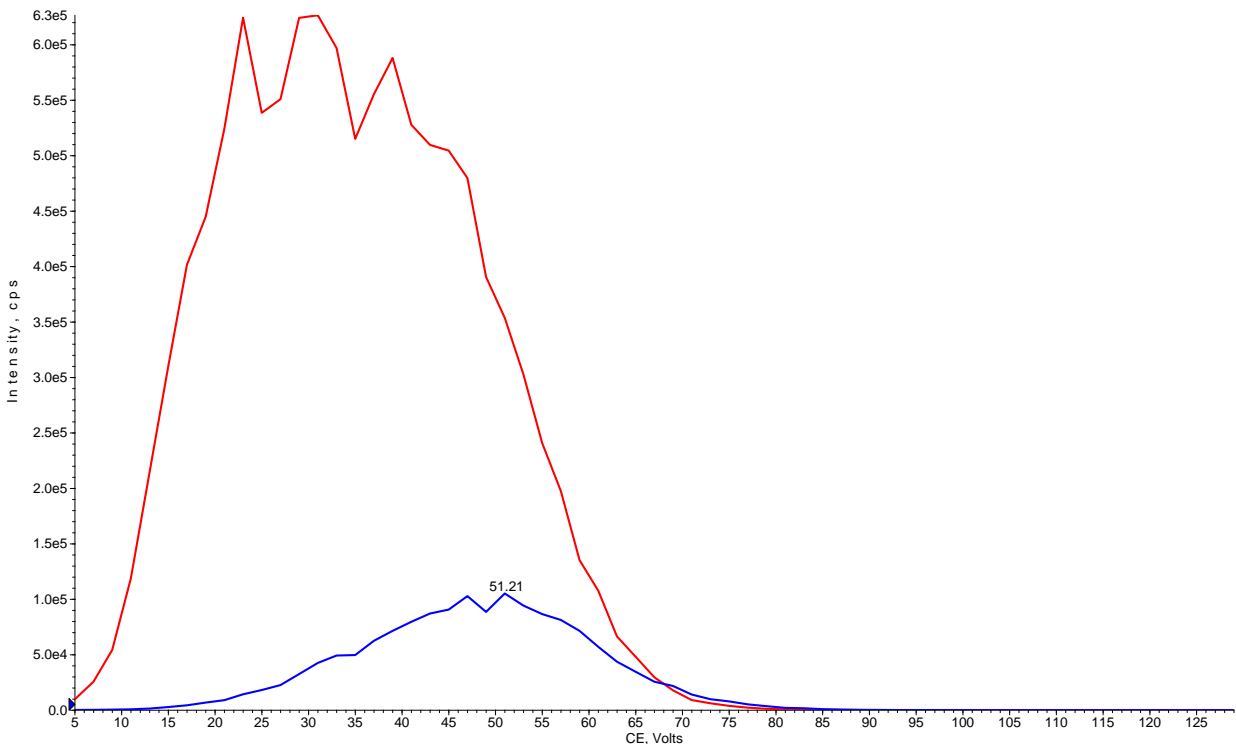
Obr. 19: DP pro CyA



Obr. 20: DP pro CyD



Obr. 21: CE pro CyA



Obr. 22: CE pro CyD

Dále byly nastaveny hodnoty tlaku kolizního plynu (*CAD*), zmlžujícího plynu (*GS1*) a sušícího plynu (*GS2*), vstupního potenciálu (*EP*), napětí na kapiláře v iontovém zdroji (*IS*), teploty zmlžujícího plynu (*TEM*) a „curtain gas“ (*CUR*). Hodnoty jsou shrnuty níže.

CAD = Medium

GS1 = 45 psi

GS2 = 45 psi

EP = 10 V

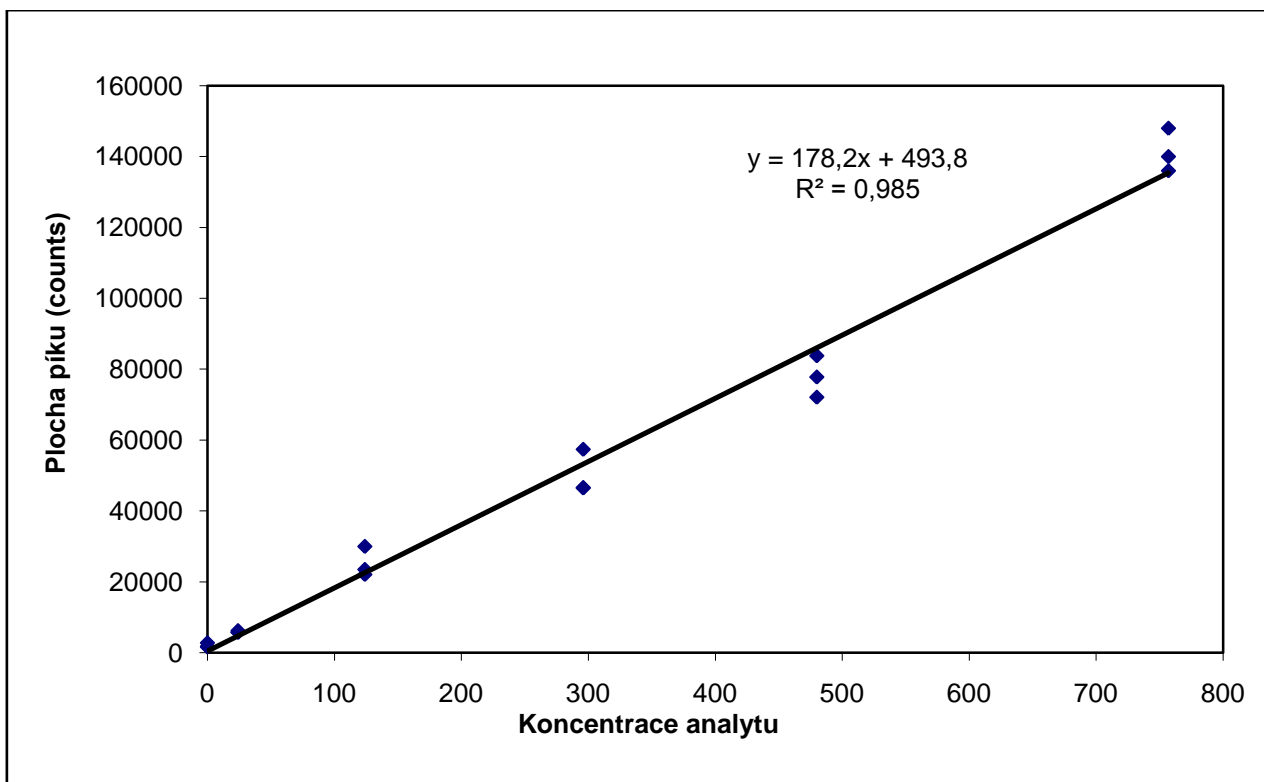
IS = 5500 V

TEM = 450 °C

CUR = 30 psi

3.6.2. Validace metody

Byla sestrojena lineární kalibrační závislost pro analýzu CyA. Rovnice kalibrační křivky má tvar $y = 178,2x + 493,8$ ($R = 0,985$) (obr. 23). Preciznost (nepřesnost) měření během jednoho dne ($n = 10$) byla 1,78 %; 1,91 %; 5,5 % (Tab. 1). Preciznost mezi jednotlivými dny ($n = 9$) byla 2,78 %; 4,14 %; 6,22 % (Tab. 2). Všechny vzorky byly získány přidáním Cyklosporinu A ke vzorku krve pacienta neléčeného CyA, aby výsledná koncentrace byla 50, 200 a 500 ng/ml. Limit detekce $LOD = 3,03$ ng/ml a limit kvantifikace $LOQ = 10,11$ ng/ml byly stanoveny na základě odstupů signálu analytu a šumu základní linie jako trojnásobek šumu (LOD) a desetinásobek šumu (LOQ) (Tab. 3). Dále byly změřeny iontové suprese (Tab. 4).



Obr. 23: Kalibrační přímka FIA metody: linearita pro koncentrace 124, 296, 480 a 757 $\mu\text{g/l}$

Tab. 1: Preciznost měřená během jednoho dne

analýza	50 ng/ml	200 ng/ml	500 ng/ml
1	47,6	200	504
2	52,7	202	514
3	48,3	210	512
4	47,4	198	501
5	47,1	208	502
6	54,5	201	509
7	52,3	207	500
8	51,8	206	488
9	53,5	205	517
10	47,7	203	487
průměr	50,29	204,00	503,40
SD	2,77	3,63	9,64
RSD	5,50	1,78	1,91
BIAS	0,58	2,00	0,68

Tab. 2: Preciznost měřená během devíti dnů

analýza	50 ng/ml	200 ng/ml	500 ng/ml
1	48,6	200	525
2	47,3	186	513
3	54,3	200	516
4	48,3	199	511
5	48,2	204	512
6	54,5	197	513
7	54,8	205	505
8	48,4	192	483
9	54,4	198	452
průměr	50,98	197,89	503,33
SD	3,17	5,53	21,09
RSD	6,22	2,79	4,19
BIAS	1,96	-1,06	0,67

Tab. 3: Výpočet LOD a LOQ

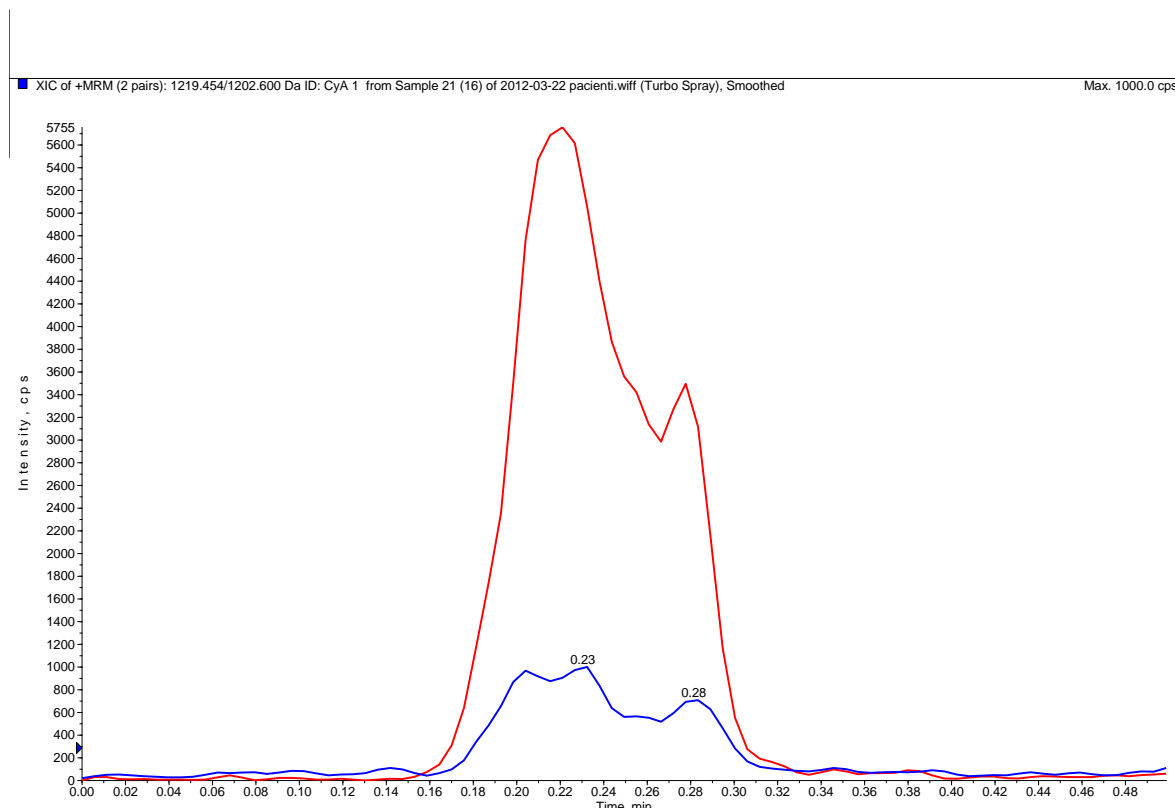
výška píku	konc. CyA (ng/ml)	šum	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1100	7,85	140	3,00	9,99
1100	7,30	150	2,99	9,95
1100	7,30	150	2,99	9,95
5000	31,20	160	3,00	9,98
4100	25,00	170	3,11	10,37
4400	26,87	170	3,11	10,38
průměr			3,03	10,11

Tab. 4: Iontová suprese – počítáno z výšky píku

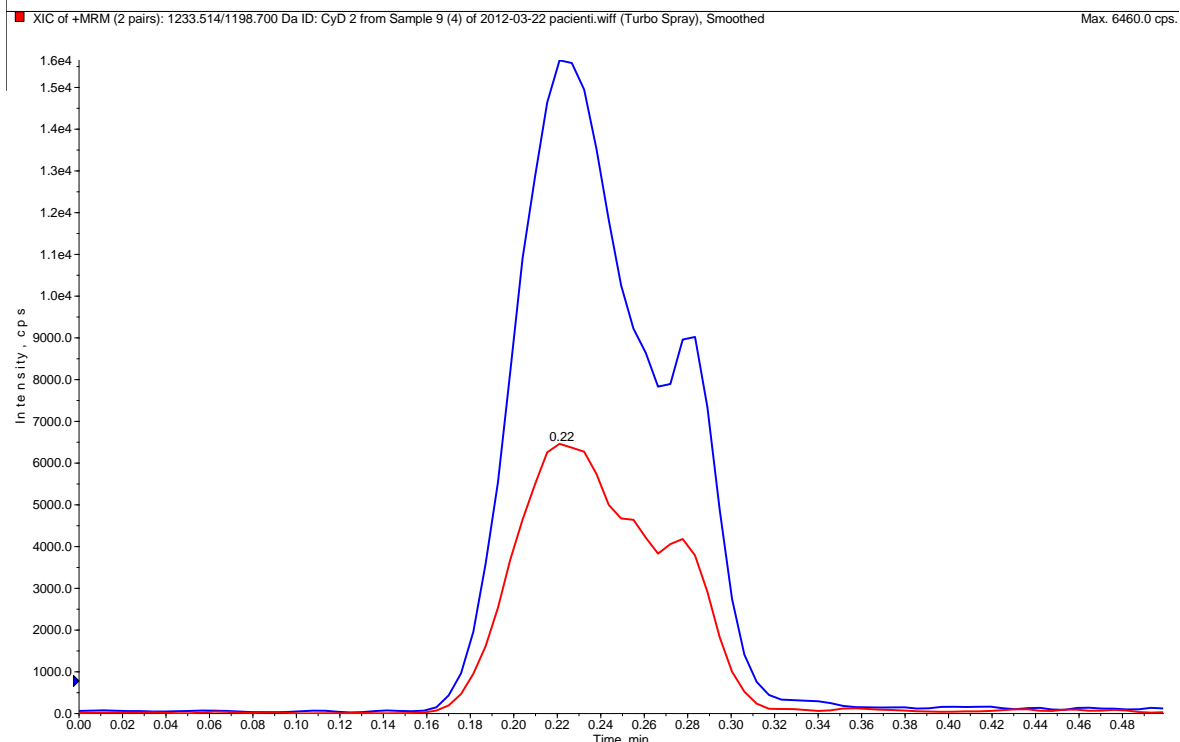
		1	2	3
50 ng/ml	standard	1880	2480	2770
	adovaná krev	20600	30400	19400
	suprese (%)	90,87	91,84	85,72
200ng/ml	standard	8230	8590	8890
	adovaná krev	38600	35400	57300
	suprese (%)	78,68	75,73	84,49
500 ng/ml	standard	26000	25100	27300
	adovaná krev	218000	272000	200000
	suprese (%)	88,07	90,77	86,35

3.6.3. Analýza reálného vzorku

Pro potřebu porovnání validované metody s metodou běžně na pracovišti používanou bylo analyzováno 400 vzorků krve pacientů v širokém rozmezí koncentrací CyA. Obrázky dále ukazují typický příklad záznamu analýzy vzorku obsahujícího nízkou (obr. 24) a vysokou (obr. 25) koncentraci analytu.



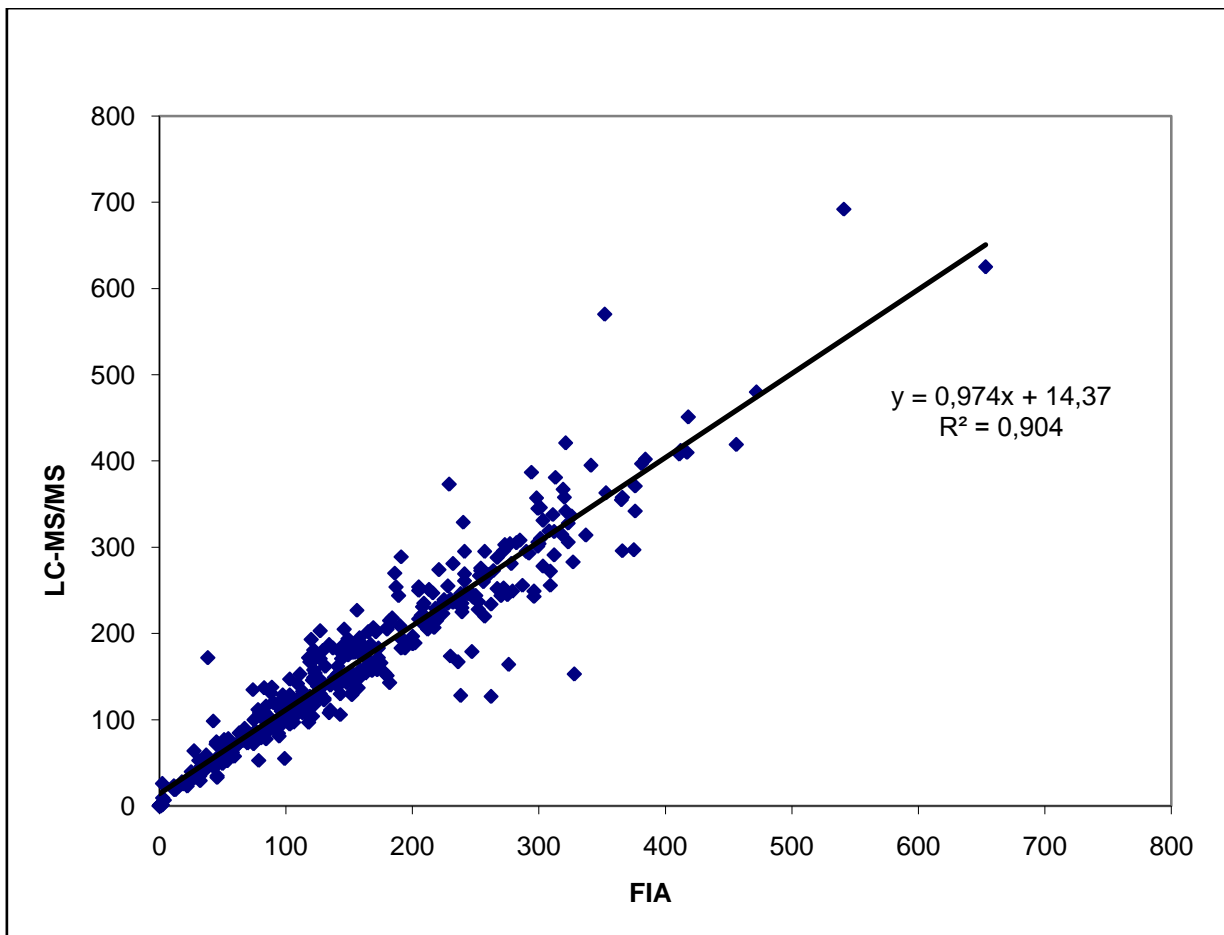
Obr. 24: Analýza vzorku pacienta, CyA = 19 ng/ml (modrá), ISD (červená)



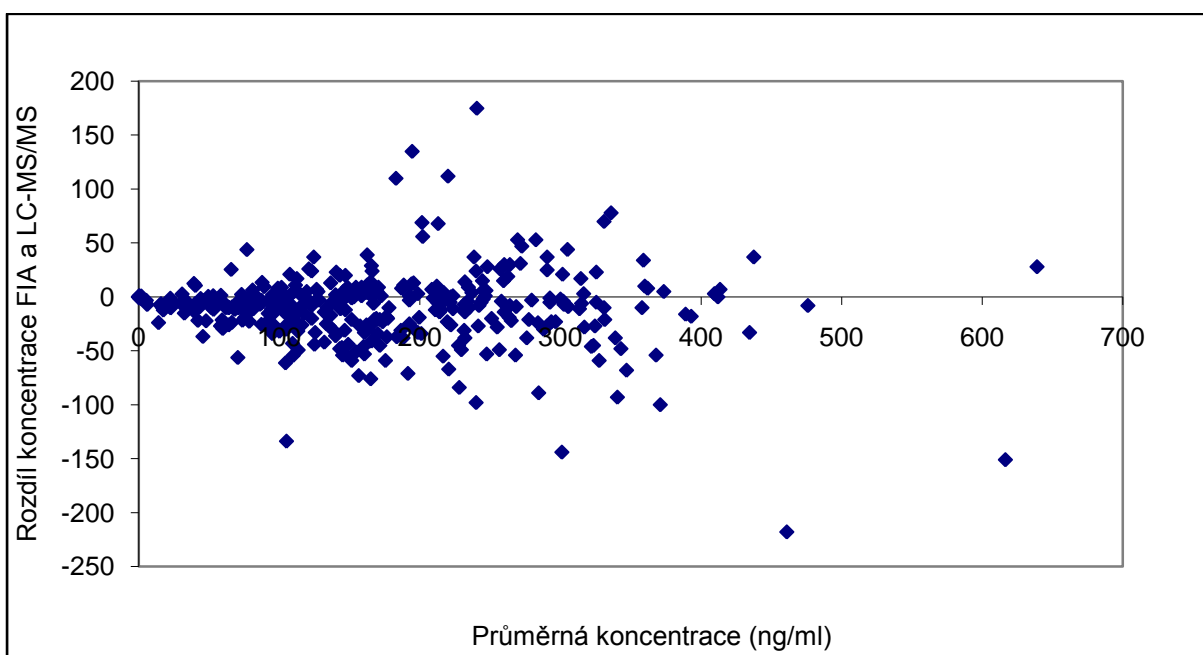
Obr. 25: Analýza vzorku pacienta, CyA = 186 ng/ml (modrá), ISD (červená)

3.7. Srovnání metod

Koncentrace Cyklosporinu A v krvi, získané z rutinního měření v laboratoři metodou LC–MS/MS a změřené výše popsanou metodou FIA byly porovnány pomocí regresní analýzy (obr. 26) a Bland Altmanova grafu (obr. 27). Průměrná odchylka FIA analýzy od LC-MS/MS je -10.22 ng/ml, SD = 33,49. Obě metody poskytují srovnatelné výsledky. Metoda FIA se tedy jeví jako vhodná pro rutinní použití v laboratoři.



Obr. 26: Korelace koncentrací CyA u pacientů, měřených pomocí LC-MS/MS a FIA metody.



Obr. 27: Bland-Altmanův graf pro srovnání FIA metody s LC-MS/MS

4. Diskuse

Terapie spojená s podáváním Cyklosporinu A tvoří významnou součást potransplantační medikace a léčby celé řady autoimunitních chorob. CyA dále nachází uplatnění například i v léčbě těžkého astmatu a srdečních obtíží. Díky širokému spektru aplikací je Cyklosporin A často využívaný lék.

Monitorování hladin léků je důležitým nástrojem péče o pacienty. Měření koncentrace CyA v krvi je užitečné ke zhodnocení reakce pacientů na denní dávku, účinnosti léčby, předcházení závažným nežádoucím účinkům spojeným s podáváním léku, a obzvláště u léků interferujících s cytochromem P450 potenciálními lékovými interakcím. Mimoto TDM slouží jako významný nástroj pro kontrolu pacientů samotných, kteří ne vždy léky užívají.

Cílem této práce bylo vyvinout novou metodu pro stanovení koncentrace Cyklosporinu A v krvi pomocí přímého nástřiku vzorku do hmotnostního spektrometru. Této problematice se věnují pouze některá pracoviště zejména kvůli nezbytné koordinaci se specializovaným zdravotnickým zařízením, náročnosti na instrumentaci a personál.

Byly optimalizovány podmínky pro detekci a pro kvantifikaci analytu pomocí MS/MS. V první části byla změřena hmotnostní a fragmentační spektra CyA a vnitřního standardu. Poté byly optimalizovány hodnoty vstupního potenciálu, tlaku kolizního plynu, sušícího a zmlžujícího plynu, teploty zmlžujícího plynu, „curtain gas“, napětí na vstupní kapiláře iontového zdroje, deklasteračního potenciálu, kolizní energie a výstupního potenciálu kolizní cely. Dále byla provedena optimalizace objemu nastříkovaného vzorku, průtoku mobilní fáze a doby analýzy.

Metoda přímého nástřiku byla porovnána s metodou LC-MS/MS, běžně v laboratoři používanou. Obě metody vykazují srovnatelné výsledky, ukazuje se tedy, že je FIA metoda vhodná i pro rutinní analýzu Cyklosporinu A. Její používání podporuje i výhoda menšího objemu nastříkovaného vzorku (0,5 μ l) a významně kratší doba analýzy (36 s) bez separačního kroku, s čímž souvisí i nižší spotřeba materiálu. Metoda je dostatečně citlivá a tedy vhodná k využití v terapeutickém monitorování hladiny CyA.

Dále byla metoda validována pomocí komerčních kalibrátorů i krve adované Cyklosporinem A a poté aplikována na reálné vzorky krve pacientů léčených CyA, čímž bylo ověřeno, že je použitelná v klinické praxi.

Mezi přednosti metody jistě patří úspora reagensů i času a tedy snížení nákladů na analýzu. To je ovšem částečně vyváženo náročností na personál a přístrojové vybavení laboratoře. Značnou nevýhodu představuje vysoká iontová suprese. Její efekt se sice při vysokých koncentracích CyA v organizmu neprojeví, avšak mohl by představovat problém v případě stanovení jiných imunosupresiv, jejichž hladiny v krvi jsou přibližně o dva řády nižší.

5. Závěr

Tato práce je zaměřena na vývoj nové analytické metody pro stanovení Cyklosporinu A v krvi pacientů po transplantaci a s autoimunitními chorobami. Byla vyvinuta metoda stanovení za pomoci přímého nástřiku vzorku do hmotnostního spektrometru.

V teoretické části byla vypracována rešerše na téma: Cyklosporin A, jeho význam a stanovení. Dále byla popsána technika hmotnostní spektrometrie a analýza přímým nástřikem do MS.

V experimentální části byla popsána optimalizace a validace metody, její aplikace na reálné vzorky a srovnání s metodou, v současné době používanou v rutinní praxi v Laboratoři dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc.

6. Použitá literatura

- (1) Calne, R. Y., White, D. J. G., Thiru, S., Evans, D. B., McMaster, P., Dunn, D. C., et al. *Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors*. *The Lancet* 1978/II:1323-1327
- (2) Starzl, T. E., Klintmalm, G. B., Porter, K. A., Iwatsuki, S., Schröter, G. P. (1981). *Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone*. *N. Engl. J. Med.* 305 (5): 266–9.
- (3) Arcasoy, S. M., *Medical complications and management of lung transplant recipients*. *Respir Care Clin N Am.* 2004 Dec;10(4):505-29. Review.
- (4) Martinu, T., Chen, D. F., Palmer, S. M. *Acute rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients*. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Jan 15;6(1):54-65.
- (5) Iacono, A. T., Smaldone, G. C., Keenan, R. J., Diot, P., Dauber, J. H., Zeevi, A., Burckart, G. J., Griffith. B. P. *Dose-related reversal of acute lung rejection by aerosolized cyclosporine*. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 May;155(5):1690-8.
- (6) Belperio, J. A., Weigt, S. S., Fishbein, M. C., Lynch, J. P. 3rd. *Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy*. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Jan 15;6(1):108-21.
- (7) Orens, J. B., Garrity, E. R. Jr. *General overview of lung transplantation and review of organ allocation*. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Jan 15;6(1):13-9.
- (8) Madan, V., Griffiths, C. E. *Systemic ciclosporin and tacrolimus in dermatology*. *Dermatol Ther.* 2007 Jul-Aug;20(4):239-50. Review.

- (9) Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis. Kitahara K, Kawai S. *Curr Opin Rheumatol*. 2007 May;19(3):238-45. Review.
- (10) Lichtiger, S., Present, D. H., Kornbluth, A., *et al.* (1994). *Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy*. *N. Engl. J. Med.* 330 (26): 1841–5.
- (11) Tatlipinar, S., Akpek, E. (2005). *Topical cyclosporine in the treatment of ocular surface disorders*. *Br J Ophthalmol* 89 (10): 1363–7.
- (12) Kay, A. B. *Immunosuppressive agents in chronic severe asthma*. *Allergy Proc.* 1994 May-Jun;15(3):147-50. Review.
- (13) Katz A., Coran, A. G., Oldham, K. T., Guice, K. S. J. *Decreased oxidized glutathione with aerosolized cyclosporine delivery*. *Surg Res.* 1993 Jun; 54(6): 597-602.
- (14) Sullivan, P. G., Thompson. M., Scheff. S. W. (2000). *Continuous infusion of cyclosporin A postinjury significantly ameliorates cortical damage following traumatic brain injury*. *Exp. Neurol.* 161 (2): 631–7.
- (15) Mott, J. L., Zhang, D., Freeman, J. C., Mikolajczak, P., Chang, S. W., Zassenhaus, H. P. (July 2004). *Cardiac disease due to random mitochondrial DNA mutations is prevented by cyclosporin A*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (4): 1210–5.
- (16) Youn, T. J., Piao, H., Kwon, J. S., *et al.* (December 2002). *Effects of the calcineurin dependent signaling pathway inhibition by cyclosporin A on early and late cardiac remodeling following myocardial infarction*. *Eur. J. Heart Fail.* 4 (6): 713–8.
- (17) Elrod, J. W., Wong, R., Mishra, S., *et al.* (October 2010). *Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca²⁺ exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice*. *J. Clin. Invest.* 120 (10): 3680–7.

- (18) Elrod, J. W., Wong, R., Mishra, S., *et al.* (October 2010). *Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca^{2+} exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice.* *J. Clin. Invest.* 120 (10): 3680–7.
- (19) Podder, H., Stepkowski, S. M., Napoli, K. L., Clark, J., Verani, R. R., Chou, T., Kahan, B. D. *Pharmacokinetics Interactions Augment Toxicities of Sirolimus/Cyclosporine Combinations* *Journal of the American Society of Nephrology* 12: 1059-1071, 2001
- (20) Mende, U., Kagen, A., Cohen, A., Aramburu, J., Schoen, F. J., Neer E.J. (1998) *Transient cardiac expression of constitutively active Galphaq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (23): 13893–8.
- (21) William F. Ganong *Review of medical physiology, 22nd edition.* Lange medical books, chapter 27, page 530. ISBN 0-07-144040-2
- (22) Christians, U., Sewing, K. F. *Cyclosporin metabolism in transplant patients.* *Pharmacol. Ther.* 57 (1993) 291.
- (23) Fang Z., You B., Chen Y, Zhang J., Liu Y, Zhang X, Zhang Q. *Analysis of cyclosporine A and its metabolites in rat urine and feces by chromatography-tandem mass spectrometry.* *Journal of Chromatography C*, 878 (2010) 1153-1162.
- (24) Koster, R. A., Dijkers, E. C. F., Uges D. R. A. Robust, *High-Throughput LC-MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine, Tacrolimus, and Sirolimus in Whole Blood* *The Drug Monit*, Volume 31, Number 1, February 2009, 116-125.
- (25) Jandera, Pavel, *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze.* Pardubice: Univerzita Pardubice, 2006. ISBN 80-7194-906-X 55-776-06

- (26) <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>
- (27) Ubik, K *Fyzikálně-chemické metody*, pp.1-105 Vydavatel cyklu: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha
- (28) http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/_KOMP_CYCLSPSC.htm#_TAB_B_CYCLSPSC_HPLC
- (29) <http://www.vscht.cz/anl/lach2/FIA.pdf>
- (30) Bier, M.E. and Cooks, R.G. (1987) *Membrane interface for selective introduction of volatile compounds directly into the ionization chamber of a mass spectrometer*. Analytical Chemistry, 59, 597-601
- (31) Wang, X., Viczian, M., Laszity, A and Barnes, R. (1988) *Lead hydride generation for isotope analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 3, 821-827
- (32) Hansen, E. H. (2005) *Use of flow injection and sequential injection analysis schemes for the determination of trace-level concentrations of metals in complex matrices by ETAAS and ICPMS*. Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 40, 1507-1524
- (33) Trojanowicz, M. *Advances in Flow Analysis*. WILEY-VCH, 2008, ISBN 978-3-527-31830-8, 553-566
- (34) Turgeon, C., Magera, M. J., Allard, P., Tortorelli, S., Gavrilov, D., Oglesbee, D., Raymond, K., Rinaldo, P., Matern D. *Combined newborn screening for succinylacetone, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots*. Clin. Chem., 54 (2008) 657
- (35) Lehotay, D. C., Hall, P., Lepage, J., Eichhorst, J. C. Etter, M. L., Greenberg, C.R. *LC-MS/MS progress in newborn screening*. Clin. Biochem., 44 (2011) 21

- (36) Janečková, H., Hron, K., Wojtowicz, P., Hlídková, E., Barešová, A., Friedecký, D., Žídková, L., Hornik, P., Behúlová, D., Procházková, D., Vinohradská, H., Pešková, K., Bruheim, P., Smolka, V., Šťastná, S., Adam, T. *Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders*. Journal of Chromatography A, 1226 (2012) 11-17

7. Seznam zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosferického tlaku ("atmospheric pressure chemical ionization")
API	ionizace za atmosférického tlaku ("atmospheric pressure inlet")
APPI	fotoionizace za atmosferického tlaku ("atmospheric pressure photoionization")
BOS	obliterující bronchiolitida ("bronchiolitis obliterans syndrom")
CAD	tlak kolizního plynu
CE	kolizní energie ("colision energy")
CI	chemická ionizace ("chemical ionization")
CUR	protiproud plynu z analyzátoru do iontového zdroje "curtain gas"
CXP	výstupní potenciál kolizní cely ("collision cell exit potential")
CyA	cyklosporin A
CyD	cyklosporin D
CZE	kapilární zónová elektroforéza ("capillary zone electrophoresis")
CZE/MS	kapilární zónová elektroforéza s hmotnostní detekcí ("capillary zone electrophoresis - mass spectrometry detection")
DART	přímá analýza v reálném čase ("direct analysis in real time")
DE	opožděná extrakce iontů ("delay extraction")
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem ("desorption electrospray ionisation")
DP	deklasterační potenciál
EI	elektronová ionizace ("electron ionization")
EP	vstupní potenciál ("entrance potential")
ESI	ionizace elektrosprejem ("electrospray ionization")
FIA	Analýza přímým nástřikem průtoková vstřikovací analýza ("flow injection analysis")
FIA-ESI-MS	přímý nástřik do hmotnostního spektrometru ("flow injection analysis-electrospray injection-mass spectrometry")
FIA-TMS	průtoková vstřikovací analýza s tandemovou hmotnostní spektrometrií ("flow injection analysis-tandem mass spectrometry")
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s fourierovou transformací ("fourier transform ion cyclotron resonance")

FWHM	spektrální rozlišení hmotnostního spektra - šířka píku v polovině výšky ("full width at half maximum")
GATA	transkripční faktor pro globin ("globin transcription factor")
GC	plynová chromatografie ("gas chromatography")
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí ("gas chromatography - mass spectrometry")
GS1	tlak zmlžujícího plynu
GS2	tlak sušícího plynu
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ("high-performance liquid chromatography")
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí ("high-performance liquid chromatography - UV detection")
ICR	iontová cyklotronová rezonance ("ion cyclotron resonance")
IL-2	interleukin 2
IS	napětí na kapiláře v iontovém zdroji
IT	iontová past ("ion trap")
LC	kapalinová chromatografie ("liquid chromatography")
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií ("liquid chromatography - mass spectrometry ")
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií ("liquid chromatography - tandem mass spectrometry ")
LOD	limit detekce ("limit of detection")
LOQ	limit kvantifikace ("limit of quantification")
MALDI	ionizace a desorpce laserem za účasti matrice ("matrix-assisted laser desorption/ionization")
MRM	sledování produktu rozpadu molekulárních iontu ("multiple reaction monitoring")
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie ("tandem mass spectrometry")
NFAT	jaderný faktor aktivace T-lymfocytů ("nuclear factor of activated T-cells")
PTP	permeabilní převodní póry mitochondrií ("permeability transition pore")
Q	kvadrupólový analyzátor ("quadrupole")
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor ("triple quadrupole")
QqQqQ	pětinásobný kvadrupól ("pentaquadrupole")

RP	rozlišovací schopnost ("resolving power")
rTOF	reflektronový analyzátor doby letu ("reflectron time of flight")
SIM	selektivní záznam iontu ("selected ion monitoring")
TDM	terapeutické monitorování léčiv ("therapeutic drug monitoring")
TEM	teplota zmlžujícího plynu
TOF	analyzátor doby letu ("time of flight")