

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022

Bc. Viktor Kubeček

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení aminokyselin v biologických vzorcích metodou kapalinové
chromatografie s hmotnostní detekcí

Bc. Viktor Kubeček

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Viktor Kubeček**
Osobní číslo: **C20454**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Stanovení aminokyselin v biologických vzorcích metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí**
Téma práce anglicky: **Determination Of Amino Acids In Biological Samples By Liquid Chromatography With Mass Detection**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Možnosti stanovení aminokyselin v biologických vzorcích, zaměření se na metody HPLC-MS bez předchozí derivatizace aminokyselin.
Příprava biologického vzorku před vlastní analýzou.

Experimentální část:

Příprava vybraných biologických vzorků pro analýzu aminokyselin metodou HPLC-MS.
Validace metody HPLC-MS pro stanovení aminokyselin v různých biologických vzorcích.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Michal Kopčil**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Viktor Kubeček

Chtěl bych poděkovat prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, Mgr. Michalu Kopčilovi, odbornému konzultantovi mé diplomové práce, za cenné připomínky, odborné vedení a trpělivost. Dále děkuji prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc. a jeho spolupracovníkům za pomoc s odbornou literaturou. Také bych rád poděkoval mé rodině za vytrvalou podporu během celého mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací metody stanovení aminokyselin ve vzorku suché kapky krve kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aminokyseliny, suchá kapka krve, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

TITLE

Determination of amino acids in biological samples by liquid chromatography with mass detection

ANNOTATION

This thesis deals with development and optimization of method for the determination of amino acids in dried blood spot sample by liquid chromatography with mass detection.

KEYWORDS

Amino acids, dried blood spot, liquid chromatography, mass spectrometry

OBSAH

0	Úvod.....	13
1	Teoretická část	14
1.1	Aminokyseliny	14
1.1.1	Metabolismus vybraných aminokyselin	17
1.2	Suchá kapka krve	23
1.3	Metody stanovení aminokyselin v biologických vzorcích.....	26
1.3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	27
1.4	Hmotnostní spektrometrie	29
2	Cíl práce.....	32
3	Experimentální část.....	33
3.1	Chemikálie	33
3.2	Pomůcky a přístroje.....	34
3.3	Vzorky krve.....	35
3.3.1	Odběr vzorků na odběrovou kartu	35
3.3.2	Odběr plné krve	35
3.4	Pracovní roztoky	36
3.4.1	Příprava fyziologického roztoku.....	36
3.4.2	Příprava mobilních fází.....	36
3.4.3	Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu DL-norvalinu	36
3.4.4	Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu fenylalaninu D5	36
3.4.5	Příprava elučního činidla	36
3.4.6	Příprava směsi acetonitrilu a vody v různém poměru.....	36
3.4.7	Příprava zásobních roztoků aminokyselin	37
3.4.8	Příprava směšného pracovního roztoku aminokyselin o koncentraci asi 100 µmol/l.....	37

3.4.9	Příprava směšného standardu aminokyselin o různé koncentraci pro určení vlivu hematokritu, výtěžnosti a účinku matrice	37
3.4.10	Příprava směsi acetonitrilu a vody pro test výtěžnosti metody a účinku matrice	38
3.4.11	Příprava kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky pro stanovení vybraných aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve	38
3.5	Postup pro stanovení koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve.....	39
3.5.1	Příprava vzorků suché kapky krve pro analýzu aminokyselin kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí.....	39
3.5.2	Příprava vzorků pro testování vhodného elučního činidla.....	39
3.5.3	Příprava vzorků pro testování účinnosti sonikace při eluci aminokyselin ze vzorku DBS	40
3.5.4	Příprava vzorků pro testování vlivu objemu nanesené krve na odběrovou kartu na koncentraci aminokyselin	40
3.5.5	Příprava vzorků pro určení přesnosti metody	40
3.5.6	Příprava vzorků pro testování vlivu hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích DBS.....	40
3.5.7	Příprava vzorků pro testování výtěžnosti metody a účinků matrice.....	41
3.6	Zpracování výsledků	41
3.7	Podmínky metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve	41
4	Výsledky a diskuze	43
4.1.1	Test elučních činidel pro extrakci aminokyselin ze vzorku suché kapky krve...	43
4.1.2	Testování sonikace při eluci aminokyselin ze vzorku suché kapky krve	44
4.1.3	Testování závislosti koncentrace na objemu nanesené krve.....	45
4.1.4	Testování přesnosti metody	46
4.1.5	Linearita metody	48

4.1.6	Testování vlivu hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve.....	51
4.1.7	Výtěžnost metody a účinek matrice.....	52
4.1.8	Stanovení koncentrace vybraných aminokyselin ve vzorcích krve získaných technikou suché kapky dobrovolných dárců.....	54
5	Závěr	55
6	Použitá literatura	56
7	Přílohy.....	63

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Reakce katalyzovaná DAAO.....	15
Obrázek 2 - Přejchod L-serinu na D-serin.....	15
Obrázek 3 – Biosyntéza katecholaminů.....	19
Obrázek 4 - Ornithinový cyklus.....	21
Obrázek 5 - Způsoby zavádění vnitřního standardu při zpracování vzorku suché kapky krve, upraveno dle (27).....	25
Obrázek 6 - a: Kolona s obrácenými fázemi; b: HILIC kolona (45).....	29
Obrázek 7 - Záznam kalibrátoru S3 měřený za podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 3.7.....	64

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 – Variační koeficient.....	47
Rovnice 2 – Výpočet maticových efektů	52

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Závislost poměru ploch píků aminokyselin a vnitřního standardu na elučním činidlu (1. část).....	43
Graf 2 - Závislost poměru ploch píků aminokyselin a vnitřního standardu na elučním činidlu (2. část).....	44
Graf 3 - Závislost poměru ploch píků aminokyselin a vnitřního standardu na způsobu eluce, tedy s nebo bez sonikace a doba sonikace (1. část).....	44
Graf 4 - Závislost poměrů ploch píků aminokyselin a vnitřního standardu na způsobu eluce, tedy s nebo bez sonikace a doba sonikace (2. část).....	45
Graf 5 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu (1. část).....	45
Graf 6 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu (2. část).....	46
Graf 7 - Výtěžnost metody pro stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve koncentrace pro jednotlivé AMK	53
Graf 8 - Maticové efekty na třech úrovních koncentrace pro jednotlivé AMK	53

Graf 9 – Tryptofan.....	66
Graf 10 – Fenylalanin.....	66
Graf 11 – Isoleucin.....	66
Graf 12 – Leucin.....	66
Graf 13 – Methionin.....	66
Graf 14 – Valin.....	66
Graf 15 – Tyrosin.....	67
Graf 16 – Prolin.....	67
Graf 17 – Kyselina 2-aminomáselná.....	67
Graf 18 – Alanin.....	67
Graf 19 – Threonin.....	67
Graf 20 – Glycin.....	67
Graf 21 – Kyselina glutamová.....	68
Graf 22 – Glutamin.....	68
Graf 23 – Serin.....	68
Graf 24 – Asparagin.....	68
Graf 25 – Citrulin.....	68
Graf 26 – Arginin.....	68
Graf 27 – Histidin.....	69
Graf 28 – Lysin.....	69

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Strukturní vzorce proteinogenních aminokyselin.....	15
Tabulka 2 - Referenční hodnoty proteinogenních aminokyselin v plazmě (séru) dospělých lidí (8).....	17

Tabulka 3 - Navážka aminokyselin pro přípravu zásobních roztoků.....	37
Tabulka 4 - Koncentrace aminokyselin ve směsném standardu (přídavek P3) použitém při testování vlivu hematokritu, výtěžnosti metody a účinku matrice.....	38
Tabulka 5 – Příprava směsného standardu pro přípravu kalibračních standardů připravených v krvi (standard S5).....	38
Tabulka 6 – Příprava kalibračních standardů připravených v krvi.....	39
Tabulka 7 - Příprava vzorků krve s různou hodnotou hematokritu.....	40
Tabulka 8 - MS parametry pro jednotlivé aminokyseliny.....	41
Tabulka 9 – Gradientový program.....	42
Tabulka 10 - Přesnost v sérii ve dnech 1 a 2 vyjádřená variačními koeficienty.....	46
Tabulka 11 – Přesnost v sérii za den 3 a mezi sériemi vyjádřená variačními koeficienty.....	47
Tabulka 12 - Parametry deseti kalibračních křivek pro stanovení vybraných aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve.....	49
Tabulka 13 – Vliv hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve (hodnoty jsou vztaženy ke koncentracím změřeným ve vzorcích krve s hodnotou hematokritu 40 %)......	51
Tabulka 14 - Vliv hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve (hodnoty jsou vztaženy ke koncentracím změřeným ve vzorcích krve s hodnotou hematokritu 40 %)......	52
Tabulka 15 – Medián a interkvartilové rozpětí jednotlivých aminokyselin stanovovaných ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců krve.....	54

Tabulka 16 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu.....	65
Tabulka 17 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 1 – 15.....	70
Tabulka 18 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 16 – 30.....	71
Tabulka 19 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 31 – 45.....	72
Tabulka 20 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 46 – 60.....	73

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2-AB	kyselina 2-aminomáselná (z angl. 2-aminobutyric acid)
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
CE	kapilární elektroforéza (z angl. capillary electrophoresis)
Cit	citrulin
CoA	koenzym A (z angl. coenzyme A)
CV	variační koeficient (z angl. coefficient of variation)
DAAO	oxidasa D-aminokyselin (z angl. D-amino acids oxidase)
DBS	suchá kapka krve (z angl. dried blood spot)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ESI	elektrosprejová ionizace
Hct	hematokrit (z angl. hematocrite)
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
IQR	interkvartilové rozpětí (z angl. interquartile range)
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
LOD	mez detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. limit of quantification)
MALDI	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (z angl. matrix assisted laser desorption and ionization)
MRM	mód monitorování vybraných reakcí (z angl. multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
Phe-D5	deuterovaný fenylalanin
SD	standardní (směrodatná) odchylka (z angl. standard deviation)
SLE	extrakce kapalina-pevná látka (z angl. solid-liquid extraction)
SUAC	sukcinylaceton
Tau	taurin
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (z angl. ultra-high performance liquid chromatography)

0 Úvod

Aminokyseliny (AMK) jsou látky, které mají v lidském organismu velmi důležité místo. Jsou např. součástí mnoha metabolických drah, stavebními kameny bílkovin nebo se podílejí na přenosu vzruchu. Stanovení hladin AMK v krvi podává významné diagnostické informace o vážných chorobách, např. o fenylketonurii nebo nemoci javorového sirupu. Jednou z možností laboratorního vyšetření je málo invazivní technika suché kapky krve (DBS), která se běžně používá při novorozeneckém screeningu. V této práci je využita právě tato technika ve spojení s kapalinovou chromatografií a hmotnostní detekcí. Je popsán vývoj metody, její optimalizace, validace a vliv několika faktorů na stanovení AMK ve vzorcích DBS.

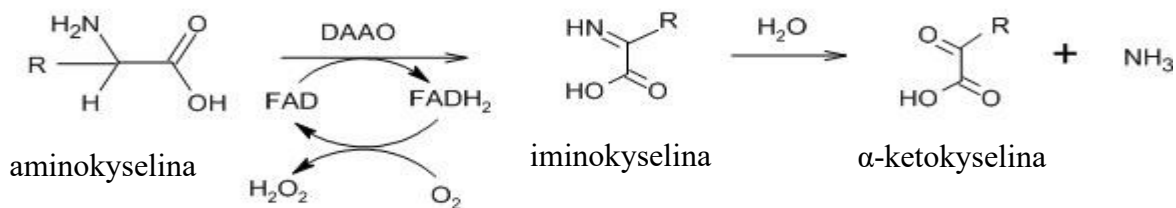
1 Teoretická část

1.1 Aminokyseliny

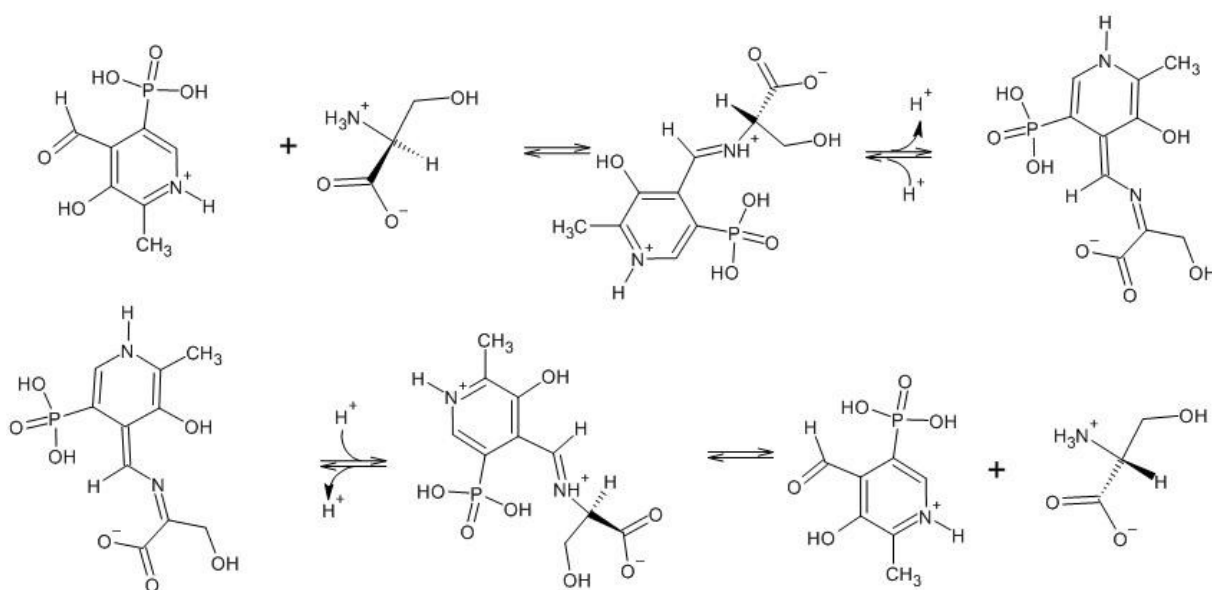
V přírodě existuje přibližně 500 AMK. Jedná se o organické látky s poměrně malou molekulovou hmotností, které jsou odvozené od uhlovodíků, obsahují aminoskupinu a karboxylovou skupinu a jsou dobře rozpustné ve vodě. V peptidech a bílkovinách jsou obsaženy α -aminokyseliny, jejichž obě funkční skupiny se vážou na stejný atom uhlíku. Karboxylové skupiny a aminoskupiny se mohou vyskytovat ve formě aniontů, kationtů nebo neutrálních zwitteriontů podle toho, jaké je pH roztoku, v němž jsou rozpuštěny. Přibližně 75 % AMK, které vznikají odbouráním bílkovin, je využito pro resyntézu proteinů, zbylých asi 25 % je odbouráno za vzniku energie, či jsou prekurzory syntézy biologicky významných látek. (1–5).

Všechny AMK mimo glycinu obsahují ve své molekule jeden, nebo v případě threoninu a isoleucinu dva chirální uhlíky. Enantiomery se obecně neliší svými fyzikálními nebo chemickými vlastnostmi, liší se pouze v tom, na kterou stranu stáčí rovinu polarizovaného světla, zda po směru hodinových ručiček (D-forma), nebo v protisměru (L-forma). V živých organismech jsou L-aminokyseliny substrátem pro vznik D-aminokyselin. Tato přeměna je obecně katalyzována racemasou, která způsobuje změnu uspořádání substituentů na chirálním uhlíku. Mitochondriální enzym oxidasa D-aminokyselin (DAAO) katalyzuje reakci, při které se D-aminokyselina oxiduje za vzniku iminokyseliny. Ta následně podléhá hydrolyze za vzniku amoniaku a odpovídající α -oxokyseliny (Obrázek 1). Vzniklá α -oxokyselina podléhá buď transaminaci, čímž vznikne odpovídající L-aminokyselina, nebo dojde k jejímu odbourání, např. dekarboxylací. DAAO jsou vysoce specifické pro D-aminokyseliny. L-Enantiomery u savců převládají, ale vyskytují se u nich i D-enantiomery, a to ve vyšších hladinách, než se uvažovalo dříve. První D-aminokyselina určená u savců byl D-aspartát, ze kterého vzniká *N*-methyl-D-aspartát. Za katalýzy serinové racemasy vzniká z L-serinu D-serin (Obrázek 2), který je agonistou receptoru pro *N*-methyl-D-aspartát a souvisí tak s regulací nervového systému. V endokrinním systému D-aspartát podporuje tvorbu testosteronu. D-Aminokyseliny mohou být

také ukazateli nemoci nebo ukazovat na stárnutí některých tkání. Dále existují antibiotika na bázi peptidů, které obsahují D-aminokyseliny (1, 2, 6, 7).



Obrázek 1 - Reakce katalyzovaná DAAO



Obrázek 2 - Přechod L-serinu na D-serin

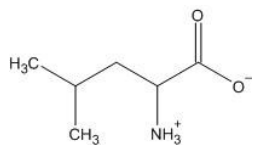
AMK v organismu slouží jako stavební kameny proteinů, zdroj energie (glukoneogeneze), prekurzory při syntéze celé řady biologicky významných látek nebo se uplatňují při regulaci genové exprese. Osm proteinogenních AMK je esenciálních, dvě semiesenciální (nutné přijímat v potravě v dětství). Strukturální vzorce proteinogenních AMK jsou uvedeny v Tabulce 1, v Tabulce 2 referenční hodnoty v plazmě (séru) dospělých lidí.

Tabulka 1 - Strukturální vzorce proteinogenních aminokyselin

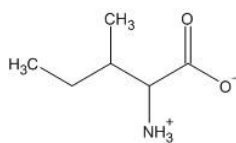
Glycin (Gly)	Alanin (Ala)	Valin (Val)

Tabulka 1 - pokračování

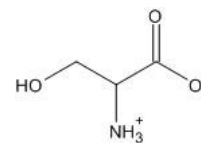
Leucin (Leu)



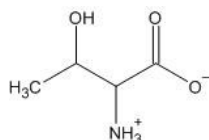
Isoleucin



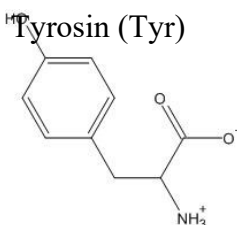
Serin (Ser)



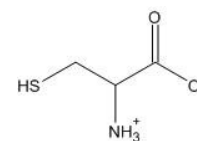
Threonin (Thr)



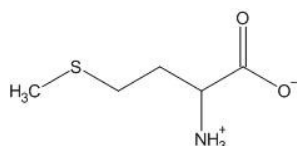
Tyrosin (Tyr)



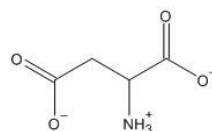
Cystein (Cys)



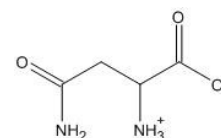
Methionin (Met)



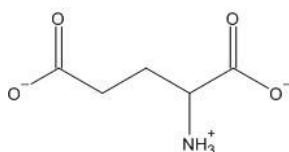
Asparagová kyselina (Asp)



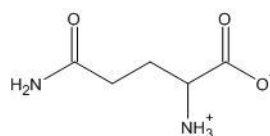
Asparagin (Asn)



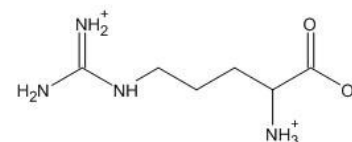
Glutamová kyselina (Glu)



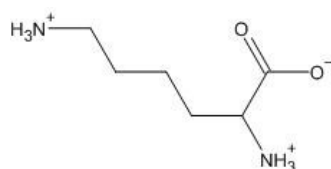
Glutamin (Gln)



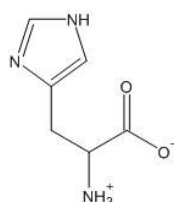
Arginin (Arg)



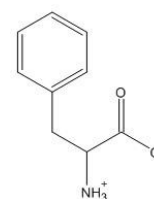
Lysin (Lys)



Histidin (His)



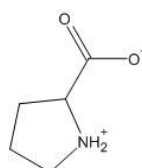
Fenylalanin (Phe)



Tryptofan (Trp)



Prolin (Pro)



Tabulka 2 - Referenční hodnoty proteinogenních aminokyselin v plazmě (séru) dospělých lidí (8)

aminokyselina	koncentrace (μmol/l)
Gly	271,1–282,1
Ala	406,4–438,4
Val	213,1–297,2
Leu	124,0–154,1
Ile	56,6–79,1
Ser	115,0–124,2
Thr	108,9–127,6
Tyr	58,9–61,8
Met	22,7–27,1
Asp	15,9–16,1
Asn	58,3–64,5
Glu	48,7–62,6
Gln	617,0–683,4
Arg	62,4–63,6
Phe	67,4–78,5
Trp	22,9–27,3

1.1.1 Metabolismus vybraných aminokyselin

Glycin

V postranním řetězci této AMK je pouze jeden vodík. Glycin je tvořen z glutamátu, glyoxylátu nebo alaninu. Dalšími zdroji jsou serin a cholin. Katabolismus glycinu zahrnuje tři dráhy: (1) odbourání glycinu na CO₂ a NH₃, což je pravděpodobně u člověka hlavní katabolická cesta, (2) převedení na serin a (3) glyoxylát (5, 9, 10).

Alanin

Alanin vzniká transaminací z pyruvátu. Aminokupina pochází z aspartátu nebo glutamátu. Reakce může probíhat i opačným směrem, reakci katalyzuje alaninaminotransferasa (5, 11).

Valin

Transaminací vzniká z valinu α-oxoisovalerát. Následuje dekarboxylace na isobutyryl-CoA, který je postupně přeměněn na sukcinyl-CoA (12).

Leucin

Při transaminaci vzniká α-oxoisokaproát. Dále jsou dvě možnosti. Buď vznikne dekarboxylací isovaleryl-CoA, který je postupně přeměněn na acetyl-CoA a acetoacetát, nebo za katalýzy

dioxygenasou β -hydroxy- β -methylbutyrát, který je dále přeměněn na 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (12).

Isoleucin

Tranasminací vzniká α -oxo- β -methylvalerát. Dekarboxylací vzniká α -methylbutyryl-CoA, který se postupně přemění na acetyl-CoA a sukcinyl-CoA (12).

Serin

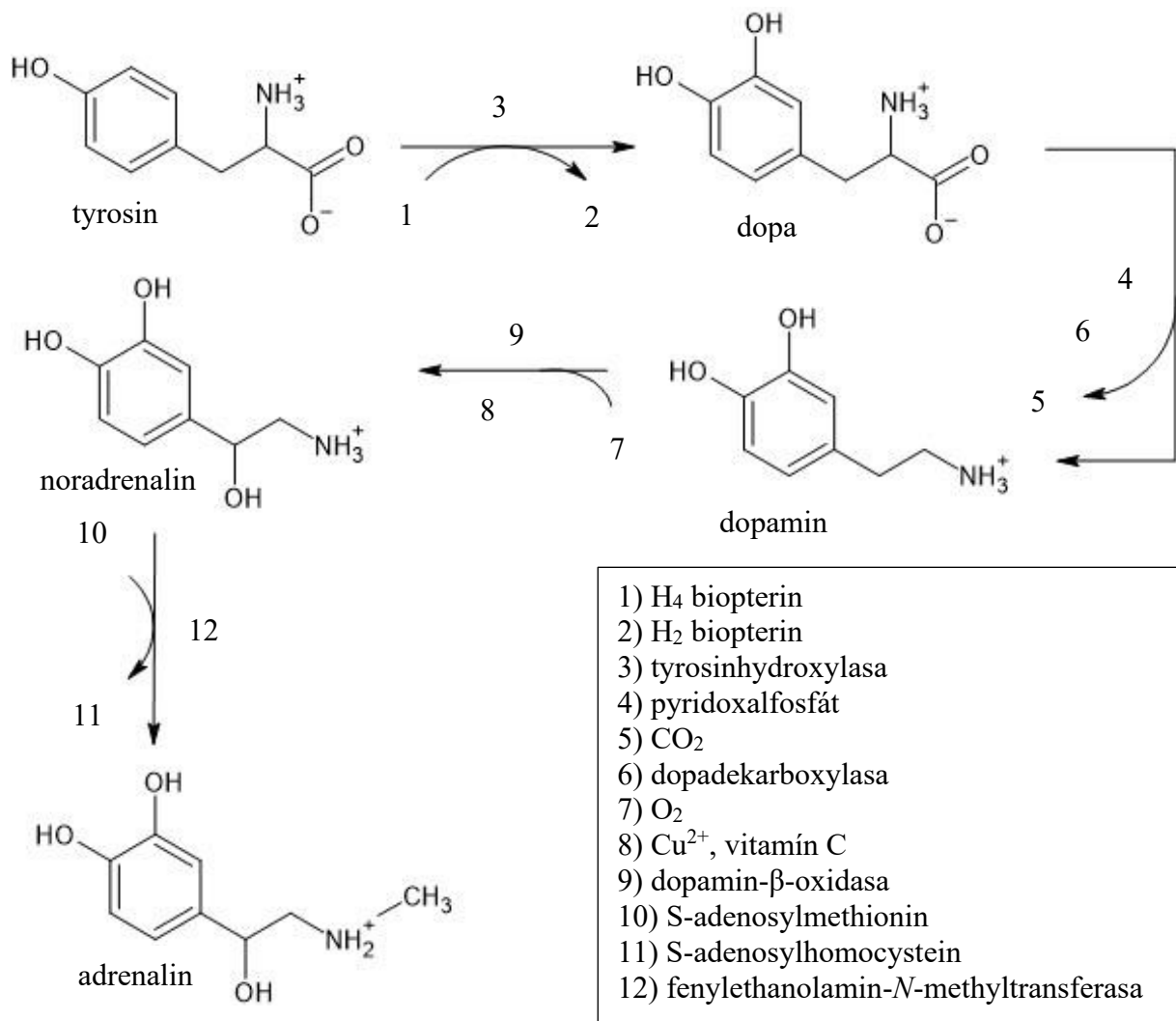
Serin se tvoří z D-3-fosfoglycerátu, což je meziprodukt glykolýzy. α -Hydroxyskupina se oxiduje na oxoskupinu a přenosem aminoskupiny vzniká fosfoserin, následuje jeho defosforylace na serin. Odbourání serinu probíhá primárně na glycin (5).

Threonin

Threonin se odbourává za katalýzy threoninaldolasou na glycin a acetaldehyd. Acetaldehyd se pak oxiduje na acetát a ten se mění na acetyl-CoA (5).

Tyrosin

Tyrosin vzniká z fenylalaninu za katalýzy fenylalaninhydroxylasou. Za katalýzy tyrosin- α -oxoglutaráttransaminasou vzniká z tyrosinu p-hydroxyfenylpyruvát. Dále dojde k hydroxylaci na benzenovém jádře a přemístění postranního řetězce, čímž vznikne homogentisát. Ten je za katalýzy homogentisátóxygenasou přeměněn na maleinylacetacetát, z něhož za katalýzy maleinylacetacetát-*cis,trans*-isomerasou vzniká fumarylacetacetát, fumarylacetacetáthydrolasa katalyzuje vznik acetacetátu a fumarátu. Nakonec za katalýzy β -oxothiolasou vzniká z acetacetátu acetát a acetyl-CoA. Na Obrázku 3 je uvedena syntéza katecholaminů (5).



Obrázek 3 - Biosyntéza katecholaminů

Cystein

Cystein se tvoří ze serinu a methioninu. Meziproduktem je cystathionin a druhým produktem homoserin. Katabolismus cysteinu zahrnuje dvě metabolické dráhy: (1) dráhu cysteinsulfinátovou a (2) transaminační. Vznik cysteinsulfinátu z cysteinu je katalyzován cysteindioxygenasou. Z této molekuly postupně vznikne pyruvát a siřičitan. Co se týká transaminační dráhy, enzym cysteintransaminasa katalyzuje vznik thiolpyruvátu, který je za katalýzy L-laktátdehydrogenasou redukován na 3-merkaptolaktát (5).

Methionin

Reakcí s ATP vzniká *S*-adenosylmethionin, významné metylační činidlo. Při reakcích, kde je donorem methylové skupiny, z něj vzniká *S*-adenosylhomocystein. Následuje hydrolýza vazby S-C za vzniku L-homocysteinu a adenosinu. Homocystein kondenzuje se serinem za vzniku cystathioninu, hydrolýzou cystathioninu vzniká homoserin a cystein, za katalýzy homoserindeaminasou vznikne z homoserinu α -oxobutyryát, který se přemění na propionyl-CoA a ten na sukcinyl-CoA (5).

Kyselina asparagová

Aspartát vzniká z oxalacetátu transaminací. V opačném směru se jedná o odbourání aspartátu (5).

Asparagin

Asparagin se tvoří z aspartátu za katalýzy asparaginsynthetasou, která využívá glutamin jako zdroj dusíku. Asparagin se přeměňuje zpět na aspartát za katalýzy asparaginasou (5).

Kyselina glutamová

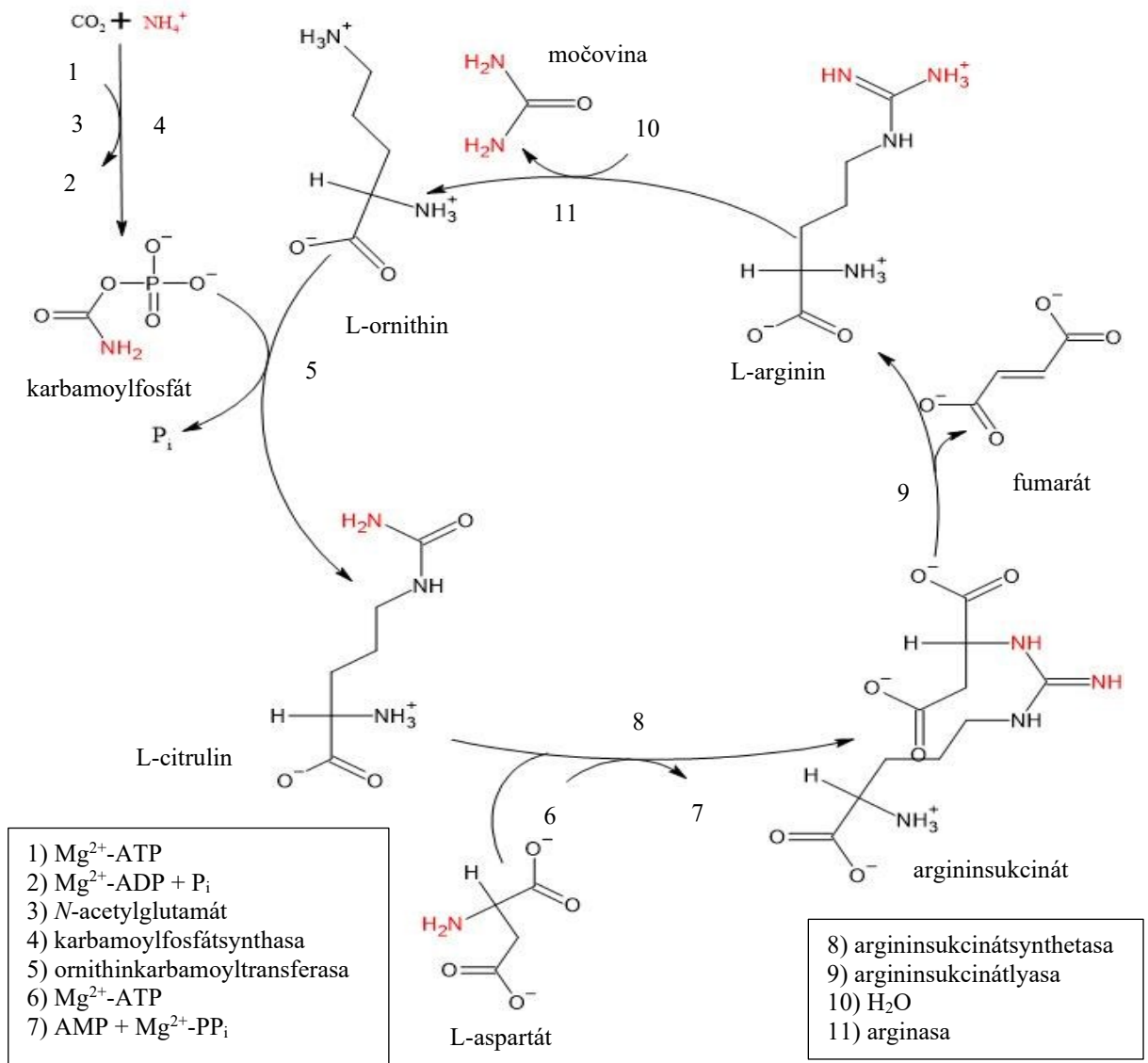
Glutamát vzniká redukční aminací α -oxoglutarátu, reakci katalyzuje glutamátdehydrogenasa. Při katabolismu vzniká z glutamátu opět α -oxoglutarát za katalýzy transaminasou (5).

Glutamin

Glutamin se tvoří z glutamátu za katalýzy glutaminsynthetasou, obráceně se glutamin přeměňuje na glutamát za katalýzy glutaminasou (5, 13).

Arginin

Za katalýzy argininsukcinátsynthetasou 1 se z citrulinu postupně tvoří arginin. Při odbourávání argininu je hydrolyticky odstraněna guanidinová skupina, tato reakce je katalyzována arginasou, vzniká ornithin, který podléhá transaminaci (ϵ -aminoskupina), vzniká glutamát-5-semialdehyd a poté α -oxoglutarát. Přechod argininu na ornithin je také součástí ornithinového cyklu, který je znázorněn na Obrázku 4 (5, 14).



Obrázek 4 - Ornithinový cyklus

Lysin

Při odbourávání lysinu vzniká nejprve Schiffova báze a α -oxoglutarát, báze se redukuje na sacharopin a ten se pak oxiduje, hydrolýzou vzniká L- α -aminoadipát-6-semialdehyd a glutamát. Transaminace α -aminoadipátu vede ke vzniku α -oxoadipátu (5).

Histidin

Deaminace histidinu vede ke vzniku urokanátu, za katalýzy urokanáthydrolasou vzniká 4-imidazol-5-propionát, hydrolýzou vzniká N-formiminoglutamát. Formiminová skupina se přenesse na tetrahydrofolát a vzniká glutamát. Transaminace glutamátu pak vede ke vzniku α -oxoglutarátu. Histidin může být také methylován nebo z něj vznikají další látky jako imidazolpyruvát, histamin nebo karnosin (5, 15).

Fenylalanin

Za katalýzy fenylalaninhydroxylasy vzniká z fenylalaninu tyrosin. Výslednými produkty odbourání fenylalaninu (tyrosinu) jsou fumarát a acetacetát. Aktivita fenylalaninhydroxylasy je striktně regulována (5, 16).

Tryptofan

Indolové jádro tryptofanu se štěpí za katalýzy tryptofan-2,3-dioxygenasou 2. Během této reakce dochází k inkorporaci dvou atomů kyslíku, čímž vznikne N-formylkynurenin. Deriváty kyseliny nikotinové 2,3-dioxygenasu 2 inhibují. Dále se za katalýzy kynureninformylasou z N-formylkynureninu hydrolyticky odstraní formylová skupina a vzniká kynurenin, který může podstoupit transaminaci, vzniká 2-amino-3-hydroxybenzoylpyruvát, uvolní se molekula vody a kruh se spontánně uzavře za vzniku kyseliny kynurenové (5, 17).

Prolin

Prolin se tvoří z glutamátu. V prvním kroku se glutamát redukuje za účasti redukovaného nikotinamidadeninukleotidu (NADH) na glutamát- γ -semialdehyd. Uvolněním molekuly vody vzniká Δ^2 -pyrrolidin-5-karboxylová kyselina. V dalším kroku opět redukcí za účasti

NADH vzniká prolin. Odbourání prolinu probíhá obráceně a glutamát se nakonec za katalýzy odpovídající transaminasou přeměňuje na α -oxoglutarát (5, 18).

Taurin

Taurin je AMK, která má aminoskupinu na β uhlíku. Ve většině buněk se nachází ve velmi vysoké koncentraci. U savců plní taurin mnoho funkcí. Systematický název taurinu je 2-aminoethylsulfonová kyselina. Taurin se tvoří z cysteinu (19–21).

Hypotaurin

Hypotaurin je neurotransmitter, který obsahuje ve své struktuře skupinu SOOH a aminoskupinu na β uhlíku. Hypotaurin je meziproduktem syntézy taurinu z cysteinu, hypotaurin je za katalýzy hypotaurindehydrogenasou přeměněn na taurin (22–25).

1.2 Suchá kapka krve

Příprava vzorku je velmi důležitým krokem jakéhokoli pracovního postupu v bioanalýze. Přípravných operací by mělo být co nejméně, aby se předcházelo chybám a aby se šetřilo časem. Současným trendem jsou metody šetrnější vůči životnímu prostředí, použití organických rozpouštědel a toxických činidel se omezuje. Optimální příprava by měla umožňovat jednoznačnou kvantifikaci a identifikaci AMK a také zvyšovat citlivost. Některé kroky přípravy vzorku jsou však nezbytné, aby se snížila interference matrice (2, 26).

Volba metody přípravy vzorku v případě stanovení AMK v biologických vzorcích záleží na tom, jaká je matrix vzorku. Každopádně je potřeba oslabit nebo odstranit interferující látky. Většinou se hladiny AMK stanovují ve vzorcích moče, krve nebo mozkomíšního moku (2, 26).

Jednou z možných málo invazivních metod odběru vzorků krve a s tím i spojená následná příprava vzorků je technika suché kapky krve (DBS, z angl. dried blood spot). Vzorek DBS je v ideálním případě jedna kapka krve získaná píchnutím do prstu nebo patičky a nanesená na speciální odběrovou kartu z filtračního papíru. Vzorek kapky krve se nechá jednoduše zaschnout. Krevní elementy a látky obsažené v krvi se při tom adsorbují na celulózovou matici. Pevná povaha DBS a zmíněná adsorpce způsobují, že na rozdíl od kapalné krve jsou zde analyty méně reaktivní, tedy stabilnější, často po dobu několika dnů, nebo dokonce měsíců, a to za

dodržení pouze jednoduchých podmínek utěsněného skladování se sušidlem. V biologických kapalinách existují analyty, které jsou *ex-vivo* nestabilní, ovšem ve vzorcích DBS daleko stabilnější než v biologické tekutině. Jsou to například látky citlivé na světlo nebo konjugáty s kyselinou glukuronovou. Na rozdíl od jiných vzorků založených na krvi (sérum, plazma), je zpracování vzorků DBS jednodušší a není k němu zapotřebí použití chladicích zařízení, centrifug ani homogenizátorů. Je zde také snížené riziko virové nákazy. Zaslání vzorků DBS může být provedeno dokonce poštou v běžných obálkách a takřka civilním způsobem. Odběr krve technikou DBS má také své výhody spočívající v jednoduchosti, může se ho naučit provádět i samotní pacienti. Objem odebrané krve se pohybuje v rozsahu několika desítek mikrolitrů (27, 28).

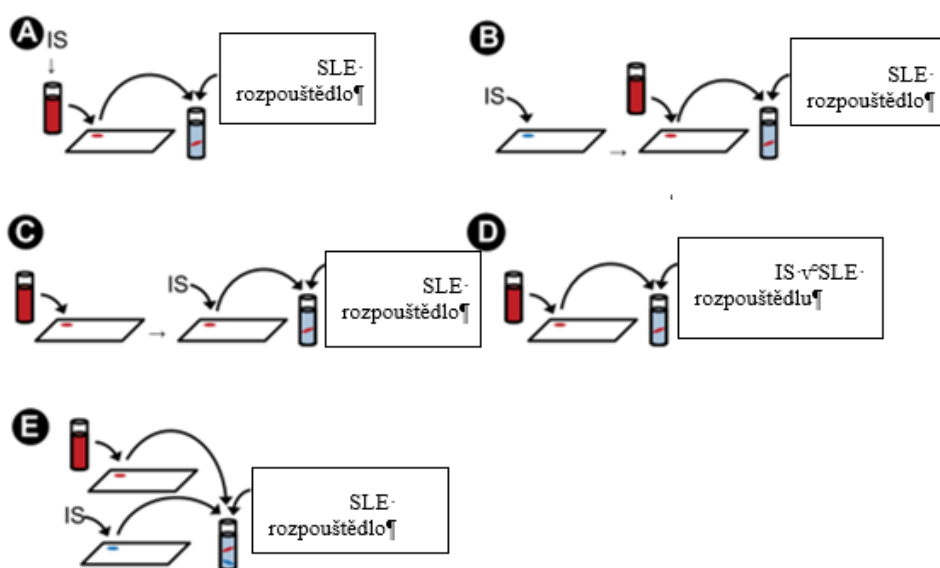
Pro analýzu se ze vzorku DBS obvykle vyrazí terčík nebo se analyzuje celá skvrna. Analyty jsou ze vzorku DBS extrahovány různými extrakčními metodami, při sledování vrozených metabolických poruch se většina analytů extrahuje směsí organických rozpouštědel (většinou acetonitril nebo methanol) s vodou. K extrakci AMK se může použít 80% methanol nebo směs acetonitrilu, vody a kyseliny mravenčí, která obsahuje někdy hydrazin. Extrakce může být podpořena sonikací. Organické rozpouštědlo se zpravidla odpaří v atmosféře dusíku a odparek rozpustí v mobilní fázi. Technika DBS se využívají při novorozeneckém screeningu na vrozené metabolické choroby. Analyty jdou po extrakci derivatizovány (29, 30).

Hematokrit (Hct) je objemová část krve (vyjadřuje se v procentech), která je tvořena červenými krvinkami. Brzy se přišlo na to, že tento parametr má významný vliv na stanovení celé řady analytů. Hodnota Hct se mění podle zdravotního stavu, věku, pohlaví a lehce podle etnika. Co se týká referenčního rozmezí, záleží na zdroji, i když jen do malé míry, typicky je to pro dospělého ženu mezi 35 % a 45 % a pro dospělého muže mezi 40 % a 50 %. U novorozenců narozených v termínu je hodnota Hct poněkud vyšší, pohybuje se mezi 42 % a 65 % a během prvních 28 dnů života téměř lineárně klesá (27, 31).

Hodnota Hct ovlivňuje viskozitu krve a tím také rychlost prosakování krve filtračním papírem. Pokud se na odběrovou kartu FTA Elute nebo Whatman 903 nanese 15 μ l krve, plocha DBS se téměř lineárně zmenšuje s rostoucí hodnotou Hct. Například pokud hodnota Hct vzroste z 30 % na 70 % (většina situací se do tohoto rozsahu vejde), plocha DBS se zmenší o přibližně 15 % na kartách FTA a Whatman 903. Mezi kartami FTA a Whatman 903 byly plochy DBS porovnatelné, rozdíl velikosti plochy v závislosti na hodnotě Hct byl u odběrové karty FTA

Elute vyšší, navíc se zde krev šíří zvláštním způsobem, na vnějším okraji je viditelná „svatozář“ (32, 37). Podobné výsledky byly získány s odběrovými kartami FTA DMPK-A a DMPK-B nebo Ahlstrom 226. Vzorky krve lze nanášet také na odběrové karty, které neobsahují celulosu (Agilent Bond Elut DMS). V porovnání s papírovými kartami byly na těchto kartách DBS menší a byl zde i jiný trend, co se týká hodnoty Hct: s rostoucí hodnotou Hct se plocha DBS zvětšovala (27, 33).

U vzorků plné krve nebo plazmy se vnitřní standard (IS) přidává přímo ke vzorkům v malém objemu, a tak se IS koriguje účinky matrice a ztrátu analytu při přípravě vzorku. V tom případě ionizace a výtěžnost extrakce ovlivní rovnoměrně IS i stanovovaný analyt a poměr jejich signálů bude konstantní. Ovšem vzorky DBS jsou pevného charakteru, a tak nemůžeme použít stejný přístup aplikace IS jako u kapalných vzorků. Je běžnou praxí, že se IS přidá k extrakčnímu činidlu, avšak při tom postupu nebude mít IS vliv na ztrátu analytu související s přípravou vzorku (extrakce pevná látka-kapalina, SLE. Existují čtyři způsoby, jak se dá zapojit IS do procesu SLE, s tím, že IS není součástí extrakčního roztoku. Ideálním postupem je přidání vnitřního standardu do krve ještě před jejím nanesením na odběrovou kartu, ale to je v klinické praxi těžko aplikovatelné. Takový postup se většinou používá jako referenční strategie při hodnocení jiné techniky zavedení IS. Jinými postupy jsou nanesení IS na odběrovou kartu před nanesením vzorku krve, přidání IS k zaschlé krvi na odběrové kartě a nanesení na odběrovou kartu zvlášť krev a zvlášť IS, přičemž vyseknuté terčíky obsahující DBS a IS analyzujeme společně. Způsoby zavádění IS jsou zobrazeny na Obrázku 5 (27, 28, 35, 36).



Obrázek 5 - Způsoby zavádění vnitřního standardu při zpracování vzorku suché kapky krve, upraveno dle (27)

Kvantitativní výsledky jsou také ovlivněny objemem krve, který se na odběrovou kartu aplikuje. Erythrocyty zabírají menší objem na filtračním papíru než plazma, což je ovlivněno hodnotou Hct, krev se tak filtračním papírem šíří nehomogenně, erythrocyty se koncentrují na okraji skvrny. Proto pro analyty, jejichž hladina je v erythrocytech v porovnání s plazmou významně vyšší, nacházíme nižší koncentraci v centrální oblasti DBS (28, 37).

1.3 Metody stanovení aminokyselin v biologických vzorcích

Stanovení AMK v různých biologických vzorcích se využívá pro diagnostiku vrozených poruch jejich metabolismu. Separace a detekce jednotlivých AMK je ztížena nepřítomností chromoforů v jejich molekule, a tím, že se jedná o látky vysoce polární. AMK mají v různých biologických vzorcích různé koncentrace, což přináší výzvu v oblasti cílené analýzy. Hladiny AMK jsou ovlivněny dietou, zvláště v případě AMK esenciálních, např. lysinu, tryptofanu nebo threoninu. Pro stanovení hladin AMK v biologických vzorcích se používají separační techniky, jako je například kapilární elektroforéza (CE) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s různými detekčními technikami: elektrochemická, hmotnostní, fluorescenční nebo UV/Vis detekce. Poslední dobou je vynakládáno velké úsilí v analýze AMK bez předchozí derivatizace. Stanovení AMK bez derivatizace je prakticky možné jen kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (2, 43–45). MS detekce je vysoce selektivní, citlivá a dobře se kombinuje s chromatografickými technikami a CE. Dalším důvodem použití MS detekce je, že není třeba analyty od sebe úplně separovat. Tím, že u MS detekce není nutná derivatizace AMK, je příprava vzorku jednodušší (41).

Většina AMK významně neabsorbuje v UV-Vis oblasti elektromagnetického záření, a proto musejí být při použití fluorimetrické nebo spektrofotometrické detekci derivatizovány. Derivatizace AMK vede ke zlepšení selektivity a senzitivity metody. K běžným derivatizačním činidlům pro derivatizaci AMK patří ninhydrin, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen, dansylchlorid, fenylisothiokyanát a *o*-ftaldialdehyd. Nevýhodou některých těchto činidel je, že fenylisothiokyanát je vysoce toxický, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen se v roztoku methanolu a vody a při vystavení dennímu světlu rozkládá, s dansylchloridem se musí pracovat v zatemněné místnosti a deriváty s *o*-ftaldialdehydem jsou nestabilní, což u neautomatizované derivatizace znemožňuje reprodukovatelnost. Derivatizace je také časově náročná (42).

1.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Tato technika umožňuje separovat jednotlivé AMK z komplexní směsi. Její výhody vzhledem k jiným metodám spočívají ve vyšší citlivosti, lepším rozlišení a kratší době analýzy. Během let se testovaly různé stacionární fáze zvětšující specifitu a citlivost metody stanovení AMK, a také různé detekční systémy (2).

Nejběžnějším chromatografickým módem v HPLC jsou obrácené fáze (RP), kde dochází k chemické modifikaci stacionární fáze, která se tak stává nepolární, většinou se k tomu používají alkyly (oktadecyl, C18 nebo oktyl, C8). V poslední době se u stacionární fáze C18 redukuje aktivita silanolu, čímž se zvýší hydrofobicita kolony. Na kolonách s reverzní fází lze dobře separovat celou škálu analytů. Potíže jsou se strukturně podobnými AMK, které se polaritou liší jen nepatrně, řešením je často derivatizace (2). Kolony s obrácenými fázemi se liší vnitřním průměrem, velikostí částic, délkou a materiálem. Při analýze biologických vzorků se používají částice o velikosti 1,7-3 μm . Pokud je vzorek nedostatečným způsobem zbaven proteinů, může docházet k ucpání kolon. Z toho důvodu se upřednostňují kolony s větší velikostí pórů nebo se před analytickou kolonu předřazuje ochranná kolona. Existuje také uspořádání, kde jsou spojeny dvě kolony za sebou, z nichž první kolona slouží pro odstranění interferujících látek, a na druhé dochází k separaci analytů (2, 43).

Mobilní fází je většinou směs vody a organických rozpouštědel. Často se při separaci používá gradientová eluce. Podle detekční techniky se utváří složení mobilní fáze. Když se používá MS detekce, mobilní fáze se upravuje přidáním kyseliny mravenčí nebo octové, jejich amonných solí nebo při ion-párové chromatografii přidáním tridekafluoroheptanové kyseliny. Tím je podpořena ionizace a zlepší se tvar chromatografických píků, je to zřejmě hlavně, když se pH nachází pod úrovní pK_a AMK (2).

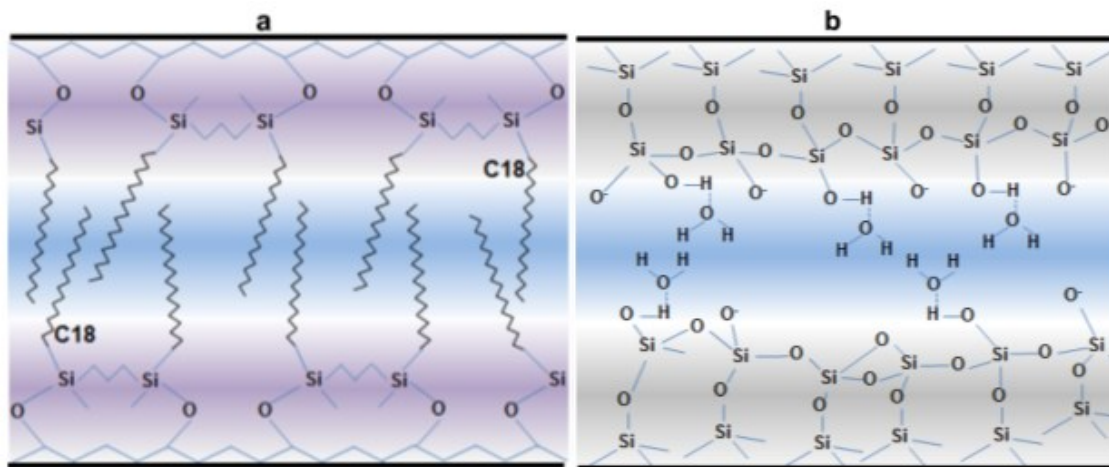
Pro analýzu AMK se velmi často používá spojení ninhydrinové postkolonové derivatizace s ion-párovou HPLC, které se vyznačuje dobrou separací AMK, linearitou v širokém rozsahu a snadnou přípravou vzorku. Protože elují interferující látky s negativním nábojem s mrtvým objemem, je tak ninhydrinová metoda chráněna před účinky matrice. Tato metoda má mnohé výhody, ale používané pufrы a reagentie jsou drahé a analýza trvá dlouho. Alternativou je předkolonová derivatizace s *o*-ftalaldehydem a deriváty AMK jsou separovány na koloně s vázanou RP. Tato metoda je relativně rychlá a dostatečně citlivá. Nevýhodou je příprava vzorku

spojená s derivatizací, na druhou stranu je možné pro derivatizaci využít autosampler a derivatizaci tak automatizovat. S tímto typem derivatizace se také často pojí tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) (43, 44).

Použití LC-MS/MS při analýze AMK je v současné době nejlepší strategií. Zde se spojují vlastnosti postkolonové a předkolonové HPLC a kromě analýzy derivatizovaných AMK je možné AMK analyzovat i bez derivatizace. AMK nebo deriváty AMK jsou obvykle separovány HPLC nebo ultraúčinnou kapalinovou chromatografií (UPLC) na kolonách s obrácenými fázemi. Jako vnitřní standardy se používají stabilní isotopově značené AMK (^{13}C , ^{15}N a ^2H). K obtížím při stanovení AMK bez derivatizace patří možné účinky matrice biologických vzorků, nedostatek standardních matričních vzorků a skutečnost, že kolony s RP zadržují nederevatizované AMK jen slabě (30, 39, 43).

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je vhodná pro separaci nederivatizovaných AMK kvůli tomu, že polární sloučeniny zde mají lepší retenci a také nejsou zapotřebí reagenty pro iontové párování. HILIC je separačním módem, který zlepšuje analýzu hydrofilních látek a je velmi dobře slučitelný s MS detektorem. Tento mód kombinuje mobilní fáze, které se používají v systému obrácených fází, se stacionárními fázemi používanými v systémech normálních fází. Tedy mobilní fáze v HILIC je většinou polární organické rozpouštědlo, což může být např. acetonitril. Voda obsažená v mobilní fázi tvoří až 30 %. Stacionární fáze bývají značně hydrofilní, mají na křemíku navázanou hydroxyskupinu, ke které se vodíkovými vazbami připojují molekuly vody (Obrázek 6). Silikagel může být také chemicky upravený navázáním například kyanoskupiny, diolové skupiny, amidu nebo aminu. Stacionární fáze obsahuje různé polární skupiny, k nimž přitahované molekuly vody vytvářejí na vnitřním povrchu vodnou vrstvu. V případě polárního analytu je mobilní fáze jeho rozpouštědlem a analyt se rozděluje mezi vodným podílem mobilní fáze a vodnou vrstvou stacionární fáze. Analyt je tím více zadržován, čím více je hydrofilní, neboť tím více je rozdělovací rovnováha posunuta směrem ke stacionární fázi. Při separaci se uplatňuje nejen rozdělovací rovnováha, ale společně s ní má důležitou úlohu také adsorpce, jejíž mechanismy

jsou mezimolekulární, jsou to např. slabé hydrofobní interakce, dipól-dipólové interakce, vodíkové můstky nebo elektrostatické interakce (45–47).



Obrázek 6 - a: Kolona s obrácenými fázemi; b: HILIC kolona (45)

Díky silné retenci polárních látek je HILIC alternativou ke LC s RP. V HILIC módu je také možné analyzovat látky s nábojem, podobně jako u iontové chromatografie. Mezi nevýhody použití tohoto módu patří např. analytický drift, horší reprodukovatelnost a retenční časy (39, 45, 48).

1.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemickou metodou, která určuje hmotnost molekul nebo jejich částí. Ovšem za tímto účelem musí být zmíněné částice převedeny na záporné nebo kladné ionty. Hmotnostní spektrometr je zařízením iontově-optickým, ionty vytváří nebo uvolňuje do plynného stavu a částice s nábojem dělí podle jednotlivých poměrů hmotnosti a náboje (m/z) ze směsi iontů, molekul a jejich nenabitých fragmentů, která je v plynném stavu. Tento analytický přístroj také dává možnost, aby se stanovila hodnota efektivní hmoty nebo aby se zjistilo, jak jsou relativně zastoupeny ionty určité hmotnosti v rámci celkového souboru molekul a iontů nacházejících se ve směsi, a konečně abychom zjistili vztahy mezi ionty. Když se převádějí molekuly na ionty, dojde ke vzniku jednak molekulárních iontů, jednak mnohých fragmentů molekul, nabitých i nenabitých. Záleží na typu ionizace a látky, zda vzniknou vícenásobně nabitě ionty nebo molekulární ionty s adukty, případně bez jednoho atomu vodíku. Ionty, které vznikají ve zdroji iontů, lze dělit na nestabilní, stabilní nebo metastabilní, záleží na tom, kde dojde k jejich fragmentaci v rámci jejich existence ve hmotnostním spektrometru. Ionty stabilní existují tak dlouho, že projdou celým spektrometrem až do detektoru. Pokud

dojde k rozpadu ve zdroji iontů, jedná se o ionty nestabilní. Když nastane disociace iontů mezi detektorem a iontovým zdrojem, mluvíme o iontech metastabilních a můžeme zaregistrovat jejich rozpadové produkty (49).

Druh iontového zdroje se vybírá na základě toho, jaký je typ analyzované látky a požadavek na analýzu máme. Zdroje iontů se dají dělit na základě několika hledisek, např. podle stability a těkavosti měřených látek. Můžeme tak rozlišit zdroje pro stanovování látek poměrně stabilních, které se vypařují ve vakuu, pokud se nejedná o plyny. V další třídě jsou zdroje, které měří netěkavé a labilní látky, které se dostávají do plynu jako ionty. Zdroje iontů by se daly také rozdělit na základě tlaku, ve kterém probíhá ionizace, tj. atmosférický nebo vakuu, ale např. laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI) může pracovat v obojím uspořádání (49, 50, 51).

Ionizace elektrosprejem (ESI) je měkká ionizační technika za atmosférického tlaku, která se běžně využívá pro analýzu biomolekul. Ve spojení ESI s LC je kapalný vzorek přiváděn jehlou do prostředí cylindrické elektrody, elektrosprejován, což je dáno tím, že mezi výstupní chromatografickou kapilárou a zevním pláštěm elektrospreje je vloženo napětí 3 000-5 000 V. Následně se vzorek dostává do prostoru, kam je přiváděn sušící plyn, vznikají tak rychle se vypařující nabitě kapičky. Při zmenšování kapiček narůstá hustota povrchového náboje, čímž vznikne dostatečně silné elektrické pole k tomu, aby se rozpuštěné ionty desorbovaly (49, 52, 53).

Ionty s různými hmotami a s jedním nebo více náboji se musí před vstupem do detektoru separovat. K tomu slouží hmotnostní analyzátory. Analyzátory můžeme dělit do čtyř tříd: s principem uchovávání iontů, průletové, kvadrupólové a sektorové. Ionty se mohou dostat do prostředí elektrického pole, kde se molekulový kation i jednotlivé fragmenty urychlují podle toho, jak velký mají náboj, procházejí také magnetickým polem, které působí kolmo a ve kterém dochází k vychýlení podle hmotnosti. Následuje dopad na detektor a vzniká spektrum. Iontová past je složena ze střední elektrody ve tvaru prstence a dále z dvou elektrod kruhových, které mají hyperbolický průřez a volně uzavírají prstenec. Původně se horní a dolní elektroda uzemnila a vysokofrekvenční napětí se přivedlo na střední prstenec. Průletový analyzátor je letová trubice, kde se měří čas dopadu iontů na detektor (49, 51).

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř tyčových elektrod, které jsou rovnoběžné a je na ně přivedeno určité napětí a definované radiofrekvenční pole. Jejich změnou se dá určit, jaký poměr hmotnosti a náboje iontů detektor zachytí. Existuje uspořádání trojitého kvadrupólu. V tomto uspořádání jsou tři kvadrupóly seřazeny za sebe a prostřední z nich je kolizní celou. Z iontového zdroje jdou ionty do prvního kvadrupólu chovajícího se jako hmotnostní filtr, kde jsou vybrány ionty s určitou efektivní hmotností, tedy s daným poměrem hmoty a náboje, v kolizní cele dochází k fragmentaci a třetí kvadrupól analyzuje tyto fragmenty (51, 54).

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo zavést, optimalizovat a validovat metodu kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vybraných aminokyselin ve vzorku suché kapky krve.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Acetonitril pro LC-MS (C_2H_3N), Mr 41,05 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Deionizovaná voda (H_2O), Mr 18,00; $G = 0,055 \mu S$
- DL-Norvalin ($C_5H_{11}NO_2$), Mr 117,15 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
- Ethanol (C_2H_6O), Mr 46,07 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Chlorid sodný (NaCl), Mr 58,44 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (HCl), $\rho = 1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $w = 0,366$, Mr 36,45 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS (CH_2O_2), Mr 46,03, $w = 0,98-100,00$ (Merck-Darmstadt, Německo)
- Mravenčan amonný pro LC-MS (CH_5NO_2), Mr 63,06 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Methanol (CH_4O), Mr 32,04 (Merck, Darmstadt, Německo)
- L-Alanin ($C_3H_7NO_2$), Mr 89,09 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Arginin monohydrochlorid ($C_6H_{14}N_4O_2\cdot HCl$), Mr 210,66 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Asparagin ($C_4H_8N_2O_3$), Mr 132,12 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Asparagová kyselina ($C_4H_7NO_4$), Mr 133,11 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-2-Aminomáselná kyselina ($C_4H_9NO_2$), Mr 103,12 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Citrulin ($C_6H_{13}N_3O_3$), Mr 175,20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Fenylalanin ($C_9H_{11}NO_2$), Mr 165,191 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Fenylalanin-D5 ($C_9H_{11}NO_2$), Mr 170,22 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glutamin ($C_5H_{10}N_2O_3$), Mr 146,14 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glutamová kyselina ($C_5H_9NO_4$), Mr 147,13 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Glycin ($C_2H_5NO_2$), Mr 75,07 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Histidin ($C_6H_9N_3O_2$), Mr 155,15 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Isoleucin ($C_6H_{13}NO_2$), Mr 131,17 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Leucin ($C_6H_{13}NO_2$), Mr 131,17 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Lysin ($C_6H_{14}N_2O_2$), Mr 146,19 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

- L-Methionin (C₅H₁₁NO₂S), Mr 149,21 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Prolin (C₅H₉NO₂), Mr 115,13 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Serin (C₃H₇NO₃), Mr 105,09 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Taurin (C₂H₇NO₃S), Mr 125,15 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Threonin (C₄H₉NO₃), Mr 119,12 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Tyrosin (C₉H₁₁NO₃), Mr 181,19 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Tryptofan (C₁₁H₁₂N₂O₂), Mr 204,23 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- L-Valin (C₅H₁₁NO₂), Mr 117,151 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

3.2 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy AdventureTM Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Analytická kolona Discovery[®] HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Analytická kolona Ascentis[®] Express OH5 (150 × 2,1 mm; 3 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- Odstředivka FC5706 (Ohaus, Parsippany, USA)
- Děrovací kleště, pinzeta
- Filtrační papír na odběr krve, odběrová karta (Whatman 903TM, GmbH, Dassel, Německo)
- Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Hmotnostní spektrometr LCMS 8045 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Řídící systém CBM-20A
- Odplyňovač mobilní fáze DGU-20A
- Termostat kolon CTO-40AC
- Vysokotlaká analytická čerpadla LC-20AD
- Autosampler SIL-20AC
- Software LC solution
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Laboratorní sklo (kádinky, zkumavky, odměrné baňky, odměrné válce)
- Lyofilizátor SCANAVAC CoolSafeTM (Labogene APS, Allerød, Dánsko)
- Magnetické míchadlo Heidolph (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo)

- Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze, porozita 0,20 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Zkumavky s EDTA, Vacuette (Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Rakousko)
- pH-metr inoLab, level 2, (WTW, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo)
- Polypropylenové (PP) zkumavky s víčkem typu Eppendorf; 1,5 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Rotační olejová vývěva CLASSIC VRO-4 (LAVAT, a.s., Radim u Kolína, ČR)
- Skleněné vialky se šroubovacím víčkem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Vialky se skleněnými inserty (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Ultrazvuková čistička ECOSON (ECOSON, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)
- Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

3.3 Vzorky krve

3.3.1 Odběr vzorků na odběrovou kartu

Vzorky krve byly od 60 dárců (32 žen, průměrný věk 39 let a 28 mužů, průměrný věk 39 let). Všichni účastníci podepsali informovaný souhlas. Odběr probíhal tak, že se sterilní lancetou napíchl po vydezinfikování prostředník nedominantní ruky a první kapka krve se setřela buničinou. Další kapka krve byla nanesena na odběrovou kartu. Vzorek krve byl nechán schnout při pokojové teplotě na vzduchu po dobu alespoň 2,5 hodiny. Vzorky DBS byly uchovávány před analýzou při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se sušidlem v plastovém zapečetěném sáčku.

3.3.2 Odběr plné krve

Plná krev použita pro přípravu standardů suché kapky krve a vzorků pro validaci metody byla odebrána z kubitální žíly dárce do vakuovaných zkumavek s EDTA. Dárce krve podepsal informovaný souhlas a odběr byl proveden oprávněnou osobou. Žilní krev byla ihned zpracována.

3.4 Pracovní roztoky

3.4.1 Příprava fyziologického roztoku

Navážka 0,09 g chloridu sodného byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Roztok byl uchováván při 4 °C maximálně po dobu 1 týdne.

3.4.2 Příprava mobilních fází

Navážka 0,95 g mravenčanu amonného byla rozpuštěna ve 150 ml deionizované vody. Pro přípravu 500 ml mobilní fáze B bylo smícháno 50 ml roztoku mravenčanu amonného a 450 ml acetonitrilu, pro přípravu 500 ml mobilní fáze A 50 ml roztoku mravenčanu amonného a 450 ml deionizované vody. Hodnota pH mobilních fází byla upravena na 4,5 koncentrovanou kyselinou mravenčí.

3.4.3 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu DL-norvalinu

Navážka 0,0120 g norvalinu byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Vzniklý roztok měl koncentraci 10 243 $\mu\text{mol/l}$. Roztok byl skladován při -80 °C, ne déle než 1 rok.

3.4.4 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu fenylalaninu D5

Navážka 0,0170 g fenylalaninu-D5 byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Vzniklý roztok měl koncentraci 9 987 $\mu\text{mol/l}$. Roztok byl skladován při -80 °C, ne déle než 1 rok.

3.4.5 Příprava elučního činidla

Elučním činidlem byla směs vody a acetonitrilu v poměru 75:25 (v/v) obsahující vnitřní standard (norleucin nebo Ph-D5) o koncentraci asi 10 $\mu\text{mol/l}$. K 10 μl zásobní roztok vnitřního standardu (9 987 $\mu\text{mol/l}$) bylo přidáno 2,5 ml deionizované vody a 7,5 ml acetonitrilu.

3.4.6 Příprava směsi acetonitrilu a vody v různém poměru

Pro přípravu směsi acetonitrilu a vody v poměru 90:10 (v/v) bylo smícháno 900 μl acetonitrilu a 100 μl vody, poměru 85:15 (v/v) 850 μl acetonitrilu a 150 μl vody a poměru 80:10 (v/v) 800 μl acetonitrilu a 200 μl vody.

3.4.7 Příprava zásobních roztoků aminokyselin

Navážky aminokyselin pro přípravu zásobních roztoků, které jsou uvedeny v Tabulce 3, byly rozpuštěny v 25 ml deionizované vody.

Tabulka 3 - Navážka aminokyselin pro přípravu zásobních roztoků

	M (g/mol)	Navážka (g)	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)		M (g/mol)	Navážka (g)	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
Asp	133,10	0,0317	9527	Ala	89,09	0,0237	10641
Glu	147,13	0,038	10331	Tyr	181,19	0,0044	971
Asn	132,12	0,034	10294	Tau	125,15	0,0321	10260
His	155,15	0,038	9797	2-AB	103,12	0,0242	9387
Gln	146,15	0,0385	10537	Val	117,15	0,0288	9834
Ser	105,09	0,0289	11000	Met	149,21	0,0382	10241
Cit	175,19	0,0433	9886	Trp	204,23	0,0501	9812
Arg.HCl	210,66	0,0514	9760	Ile	131,18	0,0321	9788
Gly	75,07	0,019	10124	Phe	165,19	0,0413	10001
Thr	119,12	0,0292	9805	Leu	131,18	0,0342	10428

3.4.8 Příprava směsného pracovního roztoku aminokyselin o koncentraci asi 100 $\mu\text{mol/l}$

K přípravě směsného pracovního roztoku AMK bylo do zkumavky pipetováno 10 μl zásobního roztoku jednotlivé AMK (100 μl zásobního roztoku tyrosinu) a objem doplněn do 1 ml acetonitrilem. Pro určení retenčních časů AMK a IS bylo smícháno 10 μl Phe-D5 s 990 μl směsného pracovního roztoku AMK.

3.4.9 Příprava směsného standardu aminokyselin o různé koncentraci pro určení vlivu hematokritu, výtěžnosti a účinku matrice

Byl připraven směsný standard s koncentracemi AMK, uvedených v Tabulce 4 (přídavek P3). Přídavek P2 je dvakrát naředěný přídavek P3 a přídavek P1 desetkrát naředěný přídavek P3.

Tabulka 4 - Koncentrace aminokyselin ve směsném standardu (přídavek P3) použitým při testování vlivu hematokritu, výtěžnosti metody a účinku matrice

	P3 (μmol/l)		P3 (μmol/l)
Arg	1366	Ile	979
2-AB	375	Leu	1564
Ala	4256	Lys	1475
Asn	721	Met	512
Asp	191	Phe	700
Cit	395	Pro	1920
Glu	930	Ser	1320
Gln	6849	Tau	1231
Gly	4050	Thr	1765
His	980	Trp	589

3.4.10 Příprava směsi acetonitrilu a vody pro test výtěžnosti metody a účinku matrice

K 7,5 ml acetonitrilu bylo přidáno 2,5 ml deionizované vody.

3.4.11 Příprava kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky pro stanovení vybraných aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

Byl připraven směsný standard AMK (Tabulka 5). Do lahvičky byl přenesen 1 ml a obsah lyofilizován. Lyofilizovaný standard byl rozpuštěn v 1 ml plné krve, a získán tak kalibrační standard s nejvyšší koncentrací. Příprava dalších kalibračních standardů je uveden v Tabulce 6. Nulový standard, S0, je plná krev bez přídavku směsného standardu AMK. Na odběrové karty bylo nanášeno 30 μl takto připravených kalibračních standardů, další pracovní postup v přípravě vzorků je uveden v kapitole 3.3.1.

Tabulka 5 – Příprava směsného standardu pro přípravu kalibračních standardů připravených v krvi (standard S5)

AA	Zás. roztok V (μl)	S5 (μmol/l)	AA	Zás. roztok V (μl)	S5 (μmol/l)
Asp	20	38	Ala	400	851
Glu	90	186	Tyr	800	155
Asn	70	144	Tau	120	246
His	100	196	2-AB	40	75
Gln	650	1370	Val	300	590
Ser	120	264	Met	50	102
Cit	40	79	Trp	60	118
Arg	140	273	Ile	100	196

Tabulka 5 - pokračování

AA	Zás. roztok V (μl)	S5 (μmol/l)	AA	Zás. roztok V (μl)	S5 (μmol/l)
Gly	400	810	Phe	70	140
Thr	180	353	Leu	150	313

Zásobní roztoky jednotlivých aminokyselin byly pipetovány do odměrné baňky o objemu 5 ml a objem doplněn po rysku deionizovanou vodou.

Tabulka 6 – Příprava kalibračních standardů připravených v krvi

	V_{S5} (μl)	plná krev (μl)
S4	250	250
S3	100	400
S2	50	450
S1	25	475
S0	-	500

3.5 Postup pro stanovení koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

3.5.1 Příprava vzorků suché kapky krve pro analýzu aminokyselin kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí

Vyražený terčík byl vložen do polypropylenové (PP) 1,5ml zkumavky, bylo přidáno 150 μl elučního činidla, obsah sonikován po dobu 30 minut, odstředěn ($X \times g$, 5 minut) a supernatant (100 μl) přenesen do insertu vialky.

3.5.2 Příprava vzorků pro testování vhodného elučního činidla

Analýzy byly provedeny v duplikátech. Pro testování vhodného činidla pro eluci AMK byl zvolen kalibrační standard S4. Byla testována směs acetonitrilu a vody v poměru 90:10, 85:15, 80:20 a 75:25 (v/v) a také směs acetonitrilu a kyseliny chlorovodíkové (10mmol/l nebo 1mmol/l nebo 0,1mmol/l) v poměru 80:20 (v/v). Jako eluční činidla byly testovány také směsi alkoholů a vody: methanol/voda 90:10, v/v a ethanol/voda 75:25, v/v. Objem elučního činidla byl 300 μl v případě směsi alkoholů a 150 μl v případě směsi acetonitrilu. Postup přípravy vzorku je uveden v kapitole 3.5.1.

3.5.3 Příprava vzorků pro testování účinnosti sonikace při eluci aminokyselin ze vzorku DBS

Vzorky DBS byly analyzovány v duplikátech. Vzorky DBS byly zpracovány postupem uvedeným v kapitole 3.5.1. Byla testována doba sonikace (10, 20, 30 a 45 minut) a eluce bez sonikace.

3.5.4 Příprava vzorků pro testování vlivu objemu nanesené krve na odběrovou kartu na koncentraci aminokyselin

Pro toto testování byl použit kalibrační standard S3. Analýzy byly provedeny v duplikátu a byly testovány tyto objemy: 15, 20, 30, 40, 50 a 75 μ l. Ze vzorku DBS, kde bylo naneseo 75 μ l krve, byl vyražen terčík nejen ze středu, ale také z periferie. Vzorky DBS byly zpracovány postupem uvedeným v kapitole 3.5.1.

3.5.5 Příprava vzorků pro určení přesnosti metody

Analýzy byly provedeny v pentaplikátech. Přesnost metody byla testována na dvou hladinách koncentrací (15 vzorků DBS bez přídavku AMK a 15 vzorků DBS s přídavkem AMK). Vzorky DBS byly zpracovány postupem uvedeným v kapitole 3.5.1.

3.5.6 Příprava vzorků pro testování vlivu hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích DBS

Vzorky krve s různou hodnotou Hct byly připraveny tak, že plná krev byla odstředěna (4 430 \times g, 5 minut), plazma přenesena do čisté zkumavky a zbytek plazmy s leukocyty a trombocyty odstraněn z frakce erytrocytů. Frakce erytrocytů a plazmy byly smíchány tak, jak je uvedeno v Tabulce 7. Od každého vzorku krve s různou hodnotou Hct byly připraveny formou přídavků směsného standardu AMK vzorky krve s různou koncentrací AMK (kapitola 3.4.9 a Tabulka 4). Takto připravené vzorky krve s různou hodnotou Hct a koncentrací AMK byly naneseeny na odběrovou kartu (40 μ l). Vzorky DBS byly analyzovány v triplikátu.

Tabulka 7 - Příprava vzorků krve s různou hodnotou hematokritu

	V_{erytrocyty} (μl)	V_{plazma} (μl)
hematokrit 30	300	700
hematokrit 40	400	600
hematokrit 50	500	500
hematokrit 60	600	400

3.5.7 Příprava vzorků pro testování výtěžnosti metody a účinků matrice

Analýzy byly provedeny v triplikátech. Pro testování výtěžnosti metody a účinku matrice byly použity vzorky krve s přídavky směsného standardu AMK připravené stejně jako v kapitole 3.5.6. Takto připravené vzorky krve byly na neseny na předem vyseknutý terčík (10 μ l) a nechány zaschnout. AMK byly eluovány 150 μ l elučního činidla obsahující IS (kapitola 3.4.5). V případě určení účinků matrice bylo přidáno 10 μ l směsného standardu AMK u různé koncentraci (P1, P2 a P3), v případě vzorku DBS, který sloužil pro odečet endogenní koncentrace AMK, bylo přidáno 10 μ l deionizované vody. Další postup zpracování vzorku je uveden v kapitole 3.5.1.

3.6 Zpracování výsledků

Pro zpracování získaných výsledků byl použit program MS Excel.

3.7 Podmínky metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

Pro získání co největší odezvy detektoru pro stanovované AMK byla optimalizována celá řada parametrů hmotnostního spektrometru. Nejdříve se provedl SCAN (v negativním i pozitivním módu) směsného roztoku standardů AMK v mobilní fázi, při kterém byla zjištěna vyšší intenzita signálu a menší poměr signál/šum v pozitivním módu ionizace pro všechny aminokyseliny. Při měření byl využit mód monitorování vybraných reakcí MRM, kdy jednotlivé přechody pro všechny AMK byly optimalizovány automaticky softwarem. Optimalizací získané přechody společně s kolizní energií jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8 - MS parametry pro jednotlivé aminokyseliny

	prekurzor (m/z)	kolizní energie (V)	produkt (m/z)	
Arg	175	12	70	60
2-AB	104	11	58	41
Ala	90	22	44	-
Asn	133	15	74	87
Cit	176	23	70	159
Glu	148	15	84	56
Gln	147	16	84	130
Gly	76	13	30	-
His	156	14	110	83
Ile	132	86	86	69

Tabulka 8 - pokračování

	prekurzor (m/z)	kolizní energie (V)	produkt (m/z)	
Leu	132	11	86	44
Lys	147	17	84	130
Met	150	16	56	104
Phe	166	11	72	103
Pro	116	15	70	43
Ser	106	11	60	42
Thr	120	12	74	56
Trp	205	8	188	146
Tyr	182	13	136	91
Val	118	12	72	55

- Pro separaci AMK byly testovány dvě analytické kolony. Nejprve se testovala separace AMK na koloně Discovery® HS-F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm) s různými mobilními fázemi a gradientovými elucemi. Separace AMK nebyla dobrá, retenční časy byly nestálé a byl pozorován výrazný vliv interferujících látek. Z tohoto důvodu byla testována separace na jiné koloně, Ascentis® Expres OH5 (150 × 2,1 mm; 3 μm). Na této koloně bylo pozorováno typické chování HILIC u všech AMK. Jako mobilní fáze byla použita směs deionizované vody a acetonitrilu s různými aditivy. Pro dosažení nejlepší retence, tvaru píků a intenzity signálu MS byla testována celá řada mobilních fází s různou iontovou silou. Byly testovány různé koncentrace mravenčanu amonného (5, 10 a 15 mmol/l) a při čtyřech různých hodnotách pH (4,5; 4,0; 3,5 a 3,0). Změny v iontové síle a hodnotách pH mobilní fáze měly velký vliv na retenci sledovaných AMK a také na jejich intenzitu signálu, kdy s rostoucí koncentrací mravenčanu docházelo ke snižování intenzity signálu MS. Pro separaci byla nakonec zvolena gradientová eluce, mobilní fáze B byla směs vody a acetonitrilu 10:90 (v/v) s 10mmol/l mravenčanem amonným, mobilní fáze A byla voda s 10mmol/l mravenčanem amonným, přičemž hodnota pH obou mobilních fází byla 4,5. Gradient, při kterém bylo dosaženo nejlepší separace s nejvyšší intenzitou signálu MS pro všechny AMK, je uveden v Tabulce 9. Chromatografický záznam vzorku DBS dárce krve a vzorku standardu je uveden v Příloze 1.

Tabulka 9 – Gradientový program

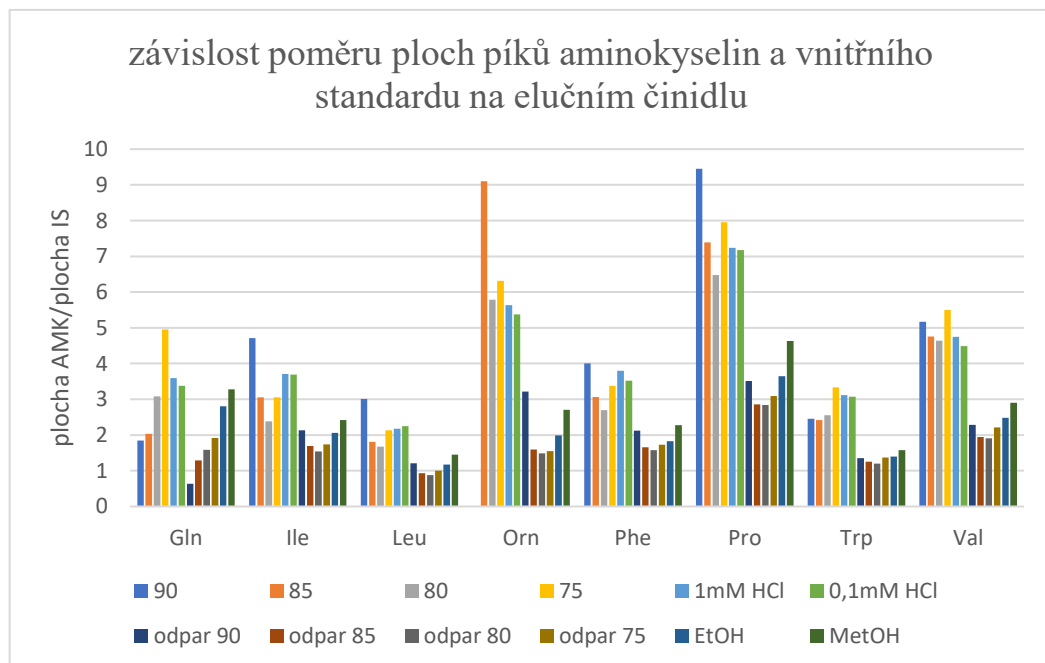
čas (min)	mobilní fáze B (%)
0,00	95
8,00	47
8,50	47
8,51	95
15,00	95
15,01	stop

4 Výsledky a diskuze

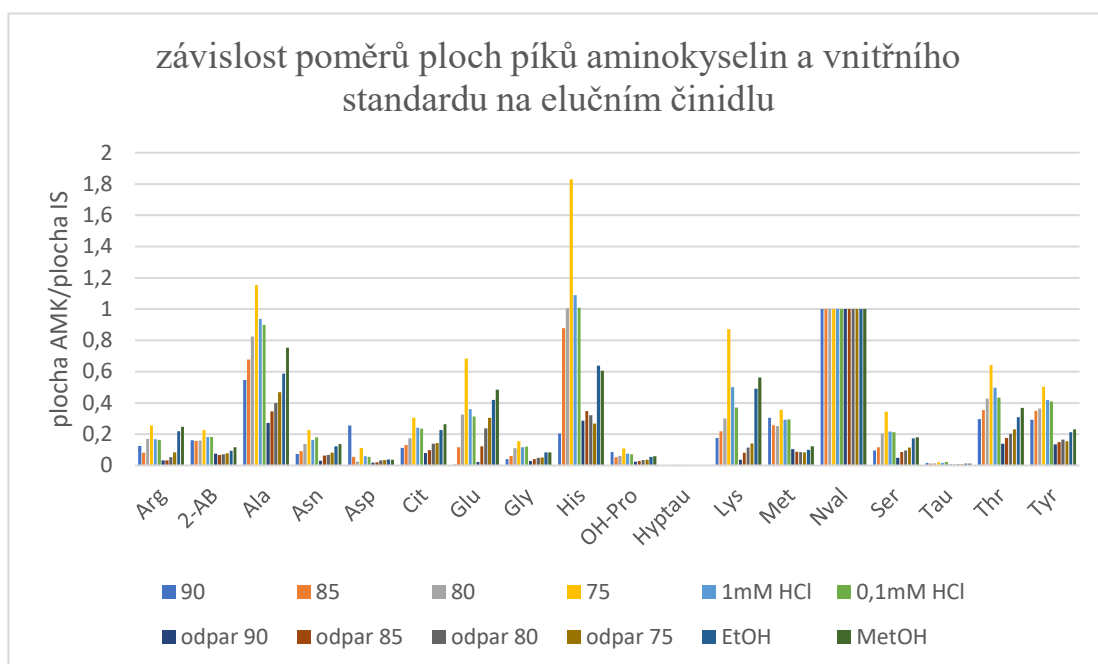
Pro stanovení hladin AMK v vzorcích DBS jsme použili metodu HPLC-MS/MS. Podařilo se nám separovat a kvantifikovat celkem 20 AMK v krvi získané technikou DBS všech dobrovolných dárců. Kyselina asparagová byl sice detegována, ale nebyla kvantifikována díky nízké intenzitě signálu MS a nízkým hodnotám v krvi lidí.

4.1.1 Test elučních činidel pro extrakci aminokyselin ze vzorku suché kapky krve

Jako eluční činidlo byla testována směs acetonitrilu a vody, acetonitrilu a kyseliny chlorovodíkové o různé koncentraci, methanolu a vody, a ethanolu a vody. V případě nejvyšší koncentrace HCl ve směsi s 80% acetonitrem, tedy 10mM, nedošlo k precipitaci, a tak se vzorky dále nezpracovávaly. V případě použití směsi ethanolu a vody (75:25, v/v) nedošlo k úplné precipitaci proteinů, což se poznalo podle načervenalé barvy směsi, před analýzou musela být směs filtrována, aby nedošlo k ucpaní kolony. Změna eluční síly činidla měla největší vliv na polární aminokyseliny. Kompromisním elučním činidlem byla směs acetonitrilu a vody v poměru (75:25, v/v). V Grafech 1 a 2 je uvedena závislost poměru ploch pík AMK a IS na použitém elučním činidle. Je patrné, že většina AMK byla ze vzorku DBS nejlépe eluována směsí acetonitrilu a vody v poměru 75:25, v/v. Ve studiích zabývajících se stanovením AMK ve vzorcích DBS byl pro eluci AMK ze vzorků DBS nejčastěji testován acetonitril, jelikož se používá jako organický modifikátor v mobilní fázi (2, 39, 43).



Graf 1 - Závislost poměru ploch pík aminokyselin a vnitřního standardu na elučním činidle (1. část)

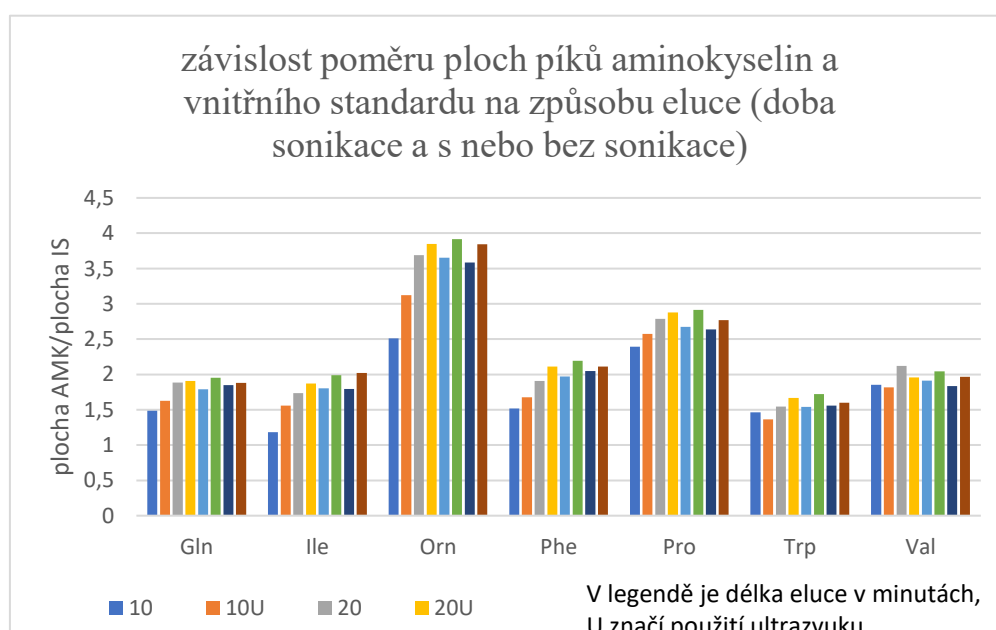


Graf 2 - Závislost poměru ploch píků aminokyselin a vnitřního standardu na elučním činidlu (2. část)

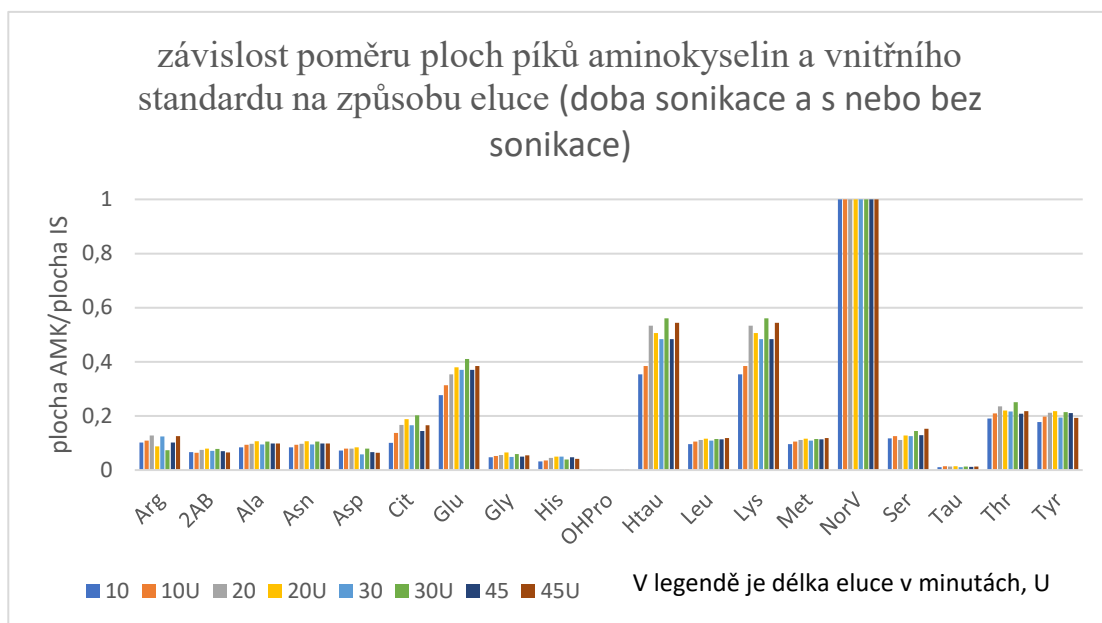
V Grafech 1 a 2 v legendě vyjadřují čísla 90, 85, 80 a 75 koncentraci acetonitrilu v %, HCl byla ve směsi s 80% acetonitrilem.

4.1.2 Testování sonikace při eluci aminokyselin ze vzorku suché kapky krve

Z grafu 3 je patrné, že nejlepší eluce AMK ze vzorku DBS byla dosažena sonikací po dobu 30 minut.



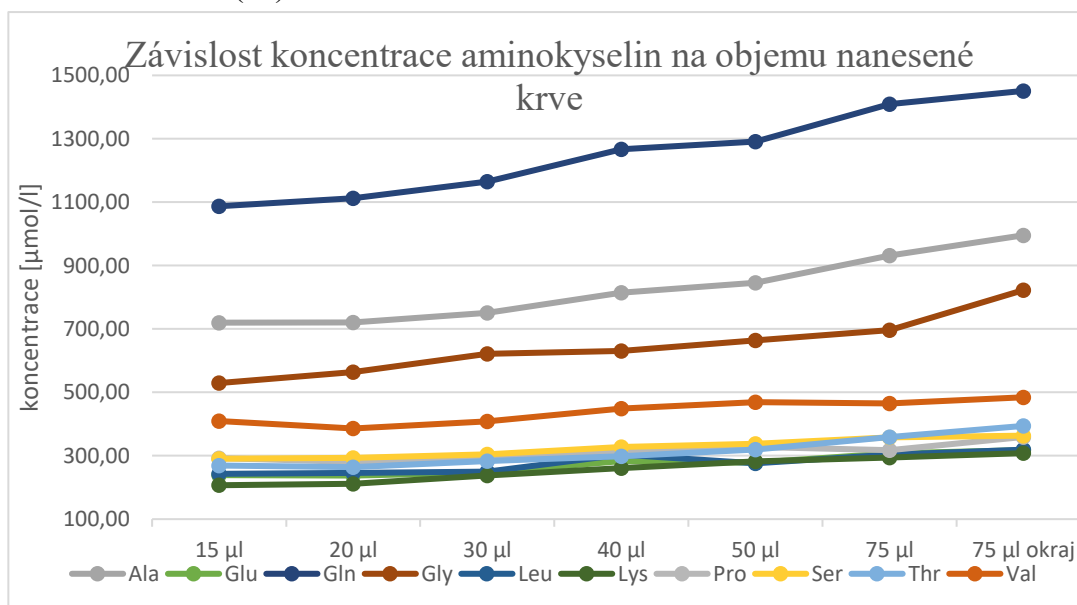
Graf 3 - Závislost poměru ploch píků aminokyselin a vnitřního standardu na způsobu eluce, tedy s nebo bez sonikace a doba sonikace (1. část)



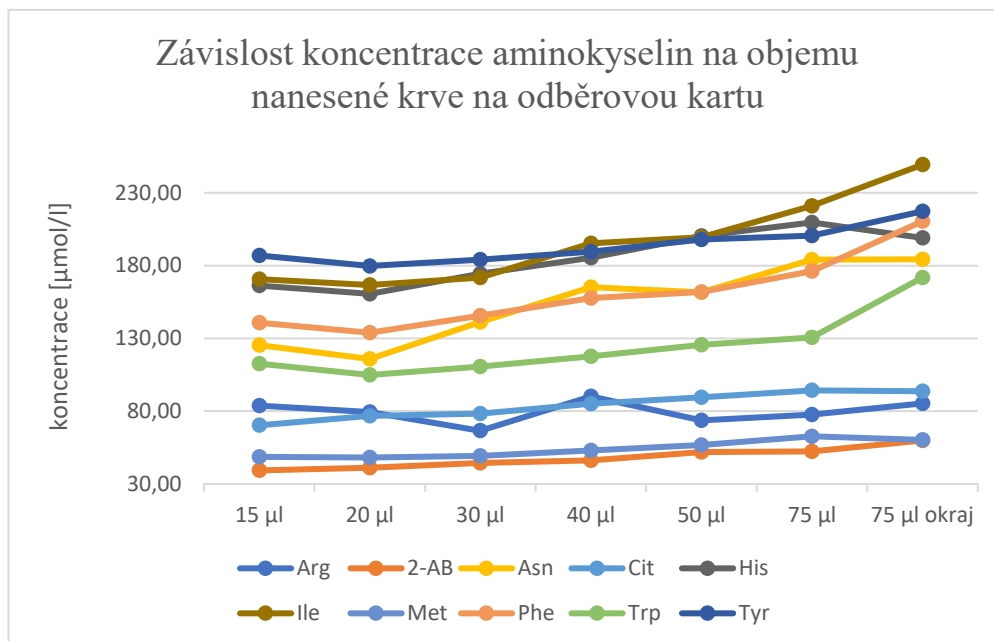
Graf 4 - Závislost poměrů ploch pík aminokyselin a vnitřního standardu na způsobu eluce, tedy s nebo bez sonikace a doba sonikace (2. část)

4.1.3 Testování závislosti koncentrace na objemu nanesené krve

Dle očekávání, čím více krve bylo na filtrační papír nanášeno, tím vyšší koncentrace AMK byla naměřena, u některých AMK jen nepatrně (Tabulka 16 v Příloze 2 a Grafy 5 a 6). Je to dáno tím, že filtrační papír je krví zcela nasycen až po nanášení určitého objemu krve (tzv. plató), obecně to je něco mezi 80-100 μl krve, což je problém, jelikož objem běžné kapky krve je něco mezi 20-40 μl . Vliv objemu nanesené krve na odběrovou kartu na koncentraci AMK podtrhuje i studie z roku 2019 (55).



Graf 5 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu (1. část)



Graf 6 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu (2. část)

4.1.4 Testování přesnosti metody

Přesnost metody stanovení AMK ve vzorcích DBS byla určena analýzou vzorků DBS během tří dnů. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 10 a v Tabulce 11.

Tabulka 10 - Přesnost v sérii ve dnech 1 a 2 vyjádřená variačními koeficienty

	den 1		HC		den 2		HC	
	LC CV (%)	c, μmol/l	CV (%)	c, μmol/l	LC CV (%)	c, μmol/l	CV (%)	c, μmol/l
Arg	0,53	42	2,55	335	1,13	22	7,37	317
2-AB	1,66	27	9,28	91	9,49	24	1,89	105
Ala	2,93	528	1,94	1363	3,75	441	3,52	1485
Asn	9,06	106	3,38	274	5,22	100	4,75	274
Cit	0,24	64	2,61	143	3,04	54	3,98	151
Glu	3,25	186	5,49	436	3,06	168	2,02	391
Gln	5,47	764	3,09	2637	3,94	531	4,11	2100
Gly	1,20	406	2,97	1403	2,38	439	4,27	1481
His	3,08	141	1,80	346	4,69	123	4,03	322
Ile	2,70	127	4,71	351	4,26	140	4,98	408
Leu	3,77	169	5,19	559	2,90	177	2,29	572
Lys	4,01	180	1,69	437	1,62	301	4,41	666
Met	4,05	29	5,66	139	3,12	37	2,98	163

Tabulka 10 - pokračování

	den 1			den 2					
	LC	HC		LC	HC		LC	HC	
	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$	CV (%)
Phe	1,75	108	4,81	269	5,11	92	2,49	269	
Pro	3,64	171	4,24	673	2,72	114	1,93	527	
Ser	1,54	218	4,57	553	6,08	255	4,86	736	
Thr	5,74	179	2,96	593	3,84	185	5,48	725	
Trp	3,85	79	4,22	237	5,80	58	2,71	196	
Tyr	2,45	122	5,23	410	5,01	71	3,61	252	
Val	2,66	242	3,80	963	4,51	222	0,95	846	

Tabulka 11 – Přesnost v sérii za den 3 a mezi sériemi vyjádřená variačními koeficienty

	den 3				všechny dny			
	LC	HC			LC	HC		
	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$	CV (%)	c, $\mu\text{mol/l}$
Arg	2,89	36	4,69	312	7,69	39	3,06	321
2-AB	3,26	19	3,95	93	6,19	25	6,45	97
Ala	2,15	427	1,73	1238	9,54	465	7,41	1362
Asn	2,84	82	4,87	211	10,58	96	0,03	274
Cit	4,43	41	1,18	126	9,10	59	7,63	140
Glu	1,56	134	2,44	352	5,11	177	8,73	393
Gln	0,70	447	1,90	1810	8,54	489	7,42	1955
Gly	4,76	284	1,20	1002	3,99	423	2,69	1442
His	5,01	96	4,28	303	6,94	132	5,49	324
Ile	3,19	89	4,77	292	4,81	134	7,60	380
Leu	2,00	130	3,90	443	2,47	173	1,12	565
Lys	2,53	203	3,37	507	6,12	191	7,38	472
Met	0,66	30	3,60	144	2,37	30	7,01	149
Phe	3,02	73	2,30	213	8,02	100	0,09	269
Pro	2,73	114	1,97	498	0,05	114	2,85	513
Ser	1,47	104	9,23	682	7,85	236	3,81	709
Thr	5,54	119	1,00	496	1,49	182	8,96	545
Trp	6,88	48	4,30	165	8,78	53	8,67	180
Tyr	0,27	65	2,89	223	4,45	68	6,06	237
Val	3,08	204	2,85	818	7,01	223	7,18	876

Variační koeficient, CV, se spočítá podle následující Rovnice 1. V Tabulce 10 LC značí nízkou koncentraci (z angl. low concentration), HC vysokou koncentraci (z angl. high concentration). Průměrné koncentrace dosazované při výpočtu variačního koeficientu jsou rovněž uvedeny.

$$CV = \frac{SD}{\text{průměr}} * 100$$

Rovnice 1 – Variační koeficient

4.1.5 Linearita metody

Parametry 10 kalibračních křivek jsou shrnuty v Tabulce 12. Hodnoty LOD a LOQ jsou vysoké a nepřijatelné. V závorce jsou uvedeny hodnoty získané z parametrů 10 kalibračních křivek, kdy kalibrační standardy byly připraveny ve vodě.

Tabulka 12 - Parametry deseti kalibračních křivek pro stanovení vybraných aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	pracovní rozsah kalibrační křivky ($\mu\text{mol/L}$)	průměrná směřnice	SD směřnice	úsek ($\mu\text{mol/L}$)	SD úseku ($\mu\text{mol/L}$)
Arg	74,30	24,52	74,30 (1,9)-273,27	1,67E-03	1,23E-04	3,47E-03	1,24E-02
2-AB	9,93	3,28	9,93 (1,0)-75,10	2,72E-03	1,16E-04	-3,60E-03	2,70E-03
Ala	205,75	67,90	205,75 (7,7)-851,27	1,15E-03	9,53E-05	-3,23E-03	2,36E-02
Asn	78,72	25,98	78,72 (1,2)-144,11	9,95E-04	1,73E-05	4,20E-03	7,83E-03
Cit	22,62	7,47	22,62 (0,8)-79,09	3,09E-03	3,14E-05	1,13E-02	6,98E-03
Glu	23,66	7,81	23,66 (1,8)-185,96	1,91E-03	4,76E-05	1,04E-02	4,53E-03
Gln	222,46	73,41	222,46 (7,4)-1369,82	2,62E-03	9,49E-05	-5,38E-02	5,82E-02
Gly	69,12	22,81	69,12 (17,8)-809,91	1,42E-04	1,21E-06	3,29E-03	9,82E-04
His	19,20	6,33	19,20 (1,3)-195,94	5,76E-03	5,02E-04	-6,97E-04	1,11E-02
Ile	103,44	34,14	103,44 (1)-195,76	1,30E-02	7,53E-04	8,85E-02	1,35E-01
Leu	61,52	20,30	61,52 (3,4)-312,85	5,29E-03	1,73E-04	-1,71E-02	3,25E-02
Lys	56,01	18,48	56,01 (4,4)-294,99	2,68E-03	1,86E-05	1,54E-02	1,50E-02
Met	13,96	4,61	13,96 (0,5)-102,41	4,06E-03	5,65E-05	1,33E-02	5,67E-03
Phe	38,58	12,73	38,58 (0,9)-140,01	1,55E-02	9,12E-04	-9,54E-03	5,98E-02
Pro	79,74	26,31	79,74 (2,8)-383,98	1,61E-02	9,38E-04	-2,78E-02	1,28E-01
Ser	244,05	80,54	244,05 (11,1)-264,00	6,79E-04	7,65E-05	1,69E-02	1,66E-02

Tabulka 12 - pokračování

	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	pracovní rozsah kalibrační křivky ($\mu\text{mol/L}$)	průměrná směrnice	SD směrnice	úsek ($\mu\text{mol/L}$)	SD úseku ($\mu\text{mol/L}$)
Thr	125,49	41,41	125,49 (3,7)-353,1	1,13E-03	5,81E-06	-5,24E-03	1,41E-02
Trp	35,56	11,74	35,56 (0,6)-117,75	1,68E-02	5,66E-04	-3,52E-02	5,96E-02
Tyr	69,55	22,95	69,55 (1,3)-155,42	1,81E-03	4,97E-05	-3,71E-03	1,26E-02
Val	48,21	15,91	48,21 (5,8)-590,01	7,23E-03	4,19E-04	-5,23E-02	3,49E-02

Hodnota LOD byla vypočtena ze vztahu $\text{LOD} = 3,3 \times \frac{S_a}{b}$ a hodnota $\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_a}{b}$, kde S_a směrodatná odchylka interceptu a b směrnice.

LOD, mez detekce; LOQ, mez stanovitelnosti; SD, směrodatná odchylka

4.1.6 Testování vlivu hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve

Výsledky vlivu hodnoty Hct na koncentraci AMK ve vzorcích DBS jsou uvedeny v grafech 9-28 Přílohy 3 a Tabulkách 13 a 14. Mezinárodní asociace pro monitorování hladin léčiv doporučuje sledovat vliv Hct v rozsahu hodnot 0,20-0,65, ale autoři většiny studií testují účinky Hct na koncentraci různých analytů v užším rozsahu (55).

Tabulka 13 – Vliv hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve (hodnoty jsou vztaheny ke koncentracím změřeným ve vzorcích krve s hodnotou hematokritu 40 %)

Htc	P0					P1				
	30	40	50	60	SD (%)	30	40	50	60	SD (%)
	(%)	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)	
Trp	107	100	105	115	5,3	84	100	107	117	11,9
Phe	104	100	112	113	5,5	85	100	99	114	10,1
Ile	101	100	110	115	6,3	87	100	101	110	8,1
Leu	93	100	109	113	7,8	81	100	100	109	10,0
Met	97	100	104	107	3,8	90	100	96	112	8,1
Val	92	100	103	116	8,6	79	100	106	115	13,5
Tyr	105	100	102	126	10,4	88	100	99	115	9,6
Pro	100	100	103	117	7,0	87	100	103	116	10,3
2-AB	106	100	93	111	6,6	88	100	113	124	13,5
Ala	99	100	105	115	6,4	88	100	99	115	9,7
Thr	99	100	102	119	7,9	88	100	103	117	10,4
Gly	100	100	97	125	11,2	92	100	102	117	9,1
Glu	88	100	107	117	10,5	87	100	106	125	13,8
Ser	88	100	106	90	7,3	79	100	119	110	14,9
Gln	108	100	101	109	4,0	94	100	106	114	7,5
Asn	102	100	107	132	12,8	89	100	111	135	17,0
Cit	105	100	96	111	5,6	96	100	110	115	7,4
Arg	109	100	100	89	7,1	106	100	110	93	6,6
His	114	100	104	117	6,8	94	100	106	115	7,9
Lys	113	100	93	95	7,5	99	100	102	106	2,6

Tabulka 14 - Vliv hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve (hodnoty jsou vztaheny ke koncentracím změřeným ve vzorcích krve s hodnotou hematokritu 40 %)

Hct	P2					P3				
	30	40	50	60	SD (%)	30	40	50	60	SD (%)
	(%)	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	(%)	
Trp	104	100	95	115	7,2	86	100	125	108	14,3
Phe	109	100	103	115	5,9	88	100	97	113	9,1
Ile	106	100	111	114	5,5	90	100	118	116	11,5
Leu	96	100	103	115	7,0	88	100	112	113	9,9
Met	106	100	109	115	5,3	90	100	107	113	8,4
Val	96	100	106	114	6,9	89	100	120	112	11,7
Tyr	90	100	95	103	4,8	91	100	118	107	9,8
Pro	103	100	105	114	5,2	88	100	108	107	8,2
2-AB	102	100	95	115	7,5	91	100	102	100	4,1
Ala	100	100	104	109	3,8	89	100	106	106	7,0
Thr	98	100	109	117	7,4	88	100	109	112	9,5
Gly	88	100	90	104	6,5	86	100	109	108	9,3
Glu	89	100	105	117	10,0	94	100	109	128	13,1
Ser	92	100	92,3	118	10,7	97	100	111	116	7,9
Gln	99	100	97	105	3,1	93	100	109	117	9,1
Asn	90	100	100	119	10,5	87	100	110	125	14,1
Cit	100	100	101	115	6,3	94	100	106	119	9,0
Arg	109	100	95	91	6,7	105	100	99	99	2,5
His	101	100	100	113	5,4	93	100	101	116	8,5
Lys	104	100	91	103	5,0	107	100	99	114	6,2

U většiny AMK se koncentrace zvyšuje se zvyšující se hodnotou Hct, výjimkou jsou AMK fenylalanin a arginin.

4.1.7 Výtěžnost metody a účinek matrice

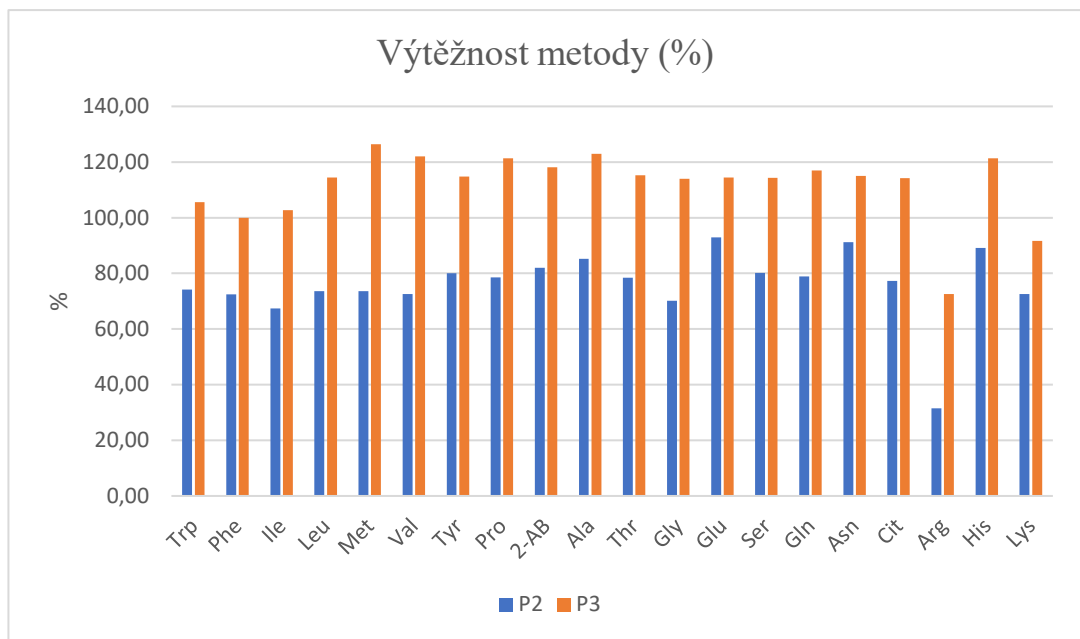
V grafu 7 jsou znázorněny výsledky výtěžnosti a grafu 8 účinky matrice metody stanovení AMK ve vzorcích DBS HPLC-MS/MS. Výtěžnost metody byla určena metodou přidavku směsného standardu AMK do krve před nanesením na odběrovou kartu (2 přidavky s různou koncentrací AMK). Účinek matrice byl určen tak, že po extrakci AMK ze vzorku DBS, bylo k extraktu přidán směsný standard AMK (3 přidavky s různou koncentrací AMK). Matricové efekty se počítaly podle Rovnice 2.

matricové efekty

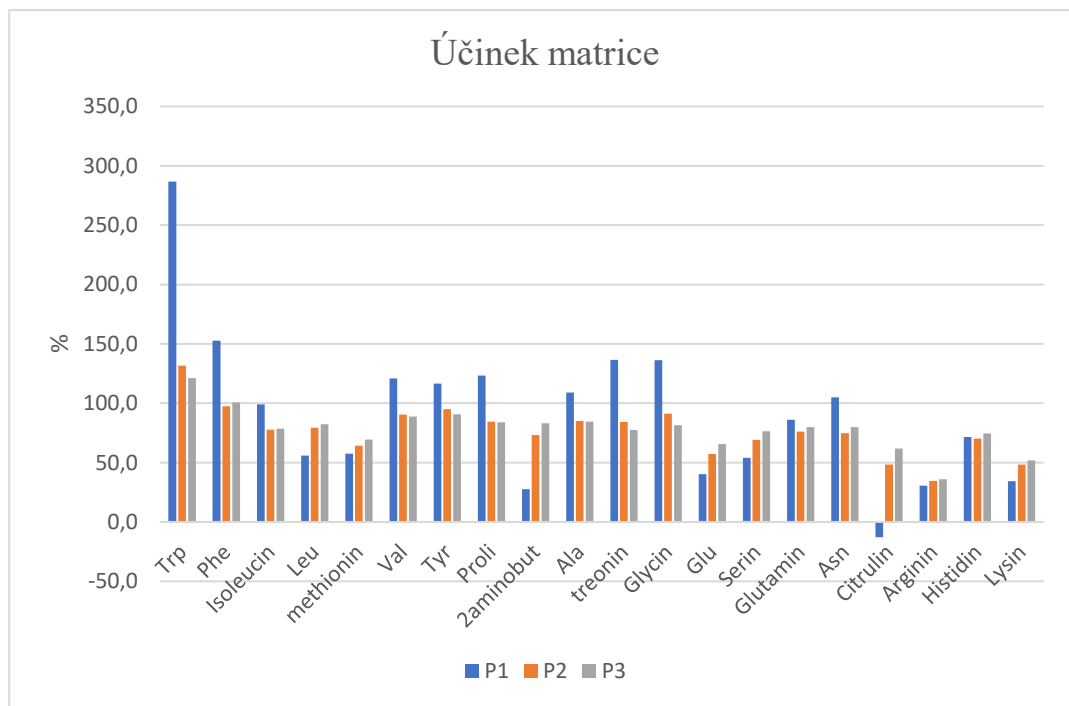
$$= \frac{\text{poměr ploch při určité koncentraci} - \text{poměr ploch bez přidavku}}{\text{poměr ploch samotného přidavku}}$$

* 100

Rovnice 2 – Výpočet matricových efektů



Graf 7 - Výtěžnost metody pro stanovení aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve koncentrace pro jednotlivé AMK



Graf 8 - Matricové efekty na třech úrovních koncentrace pro jednotlivé AMK

4.1.8 Stanovení koncentrace vybraných aminokyselin ve vzorcích krve získaných technikou suché kapky dobrovolných dárců

Bylo získáno 60 vzorků DBS od dobrovolných dárců krve (32 žen, 28 mužů) Hladiny AMK u dobrovolných dárců jsou uvedeny v Tabulkách 17-20 Přílohy 4, mediány a IQR v Tabulce 15. Koncentrace AMK v krvi dobrovolných dárců jsou srovnatelné s koncentracemi publikovanými jinými autory.

Tabulka 15 – Medián a interkvartilové rozpětí jednotlivých aminokyselin stanovených ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců krve

	všichni		ženy		muži	
	medián ($\mu\text{mol/l}$)	IQR ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	IQR ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	IQR ($\mu\text{mol/l}$)
Arg	89,5	34,8	90,4	30,6	83,8	41,7
2-AB	20,2	9,0	20,2	10,1	20,6	9,0
Ala	410,8	129,6	456,8	158,1	381,2	80,2
Asn	81,5	30,8	96,0	30,6	68,0	16,0
Cit	49,8	15,9	54,5	9,2	42,6	15,7
Glu	173,7	45,1	180,3	43,2	156,3	47,0
Gln	473,0	93,6	476,1	150,5	473,0	56,8
Gly	338,7	138,3	391,7	146,9	273,3	98,1
His	107,8	28,9	111,1	25,2	98,0	24,8
Ile	126,9	62,0	157,3	54,9	102,6	47,3
Leu	178,1	71,4	202,5	94,8	144,6	68,1
Lys	252,1	101,4	301,6	90,3	208,4	51,7
Met	29,1	10,6	32,9	13,8	25,7	8,3
Phe	88,0	28,0	94,5	31,8	80,6	27,3
Pro	219,3	98,5	217,0	92,2	219,3	104,9
Ser	223,4	176,2	306,3	99,7	131,2	44,0
Thr	124,9	42,2	128,6	50,1	122,1	35,7
Trp	59,4	14,6	62,2	16,4	56,1	13,8
Tyr	73,4	22,8	67,2	29,3	75,7	17,1
Val	251,0	71,6	263,6	81,1	235,2	64,7

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodu pro stanovení vybraných aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve. Byla zavedena metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení aminokyselin bez předchozí derivatizace. Touto metodou byly stanoveny hladiny dvaceti aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců. Význam techniky suché kapky krve pro klinickou praxi spočívá v tom, že je vyžadováno pouze několik desítek mikrolitrů krve a uchovávání i transport těchto vzorků je jednoduchý. Klíčová je příprava vzorku před vlastní analýzou. Testovali jsme různé postupy extrakce aminokyselin ze vzorku suché kapky krve s cílem, aby výtěžnost byla co nejvyšší s co nejnižšími účinky matrice. Ověřili jsme, že hodnota hematokritu a množství krve nanášené na odběrovou kartu ovlivňuje koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve. Velkým problémem jsou vysoké hodnoty meze detekce a stanovitelnosti získané z parametrů kalibračních křivek, kdy kalibrační standardy byly připraveny ve vzorku krve.

6 Použitá literatura

1. GENCHI, G. An overview on d-amino acids. *Amino Acids*. 2017, Dostupné z: doi:10.1007/s00726-017-2459-5
2. GAŁĘZOWSKA, G., J. RATAJCZYK a L. WOLSKA. Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: critical review. *Amino Acids*. 2021, **53**:993–1009. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-021-03002-x
3. TŮMA, P. Determination of amino acids by capillary and microchip electrophoresis with contactless conductivity detection – Theory, instrumentation and applications. *Talanta*. 2021, **224**(9), 121922. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2020.121922
4. KUBYSHKIN, V. a N. BUDISA. The alanine world model for the development of the amino acid repertoire in protein biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**, 5507. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20215507
5. MURRAY, R. K.; D. K. GRANNER, P. A. MAYES a kol. Harperova biochemie. Jinočany: Nakladatelství H+H, 2002.
6. YAMAMOTO, T., K. YAKU a T. NAKAGAWA. Simultaneous measurement of amino acid enantiomers in aged mouse brain samples by lc/ms/ms combined with derivatization using α -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-l-leucinamide (l-fdla). *Metabolites*. 2021, **11**(1), 1–13. Dostupné z: doi:10.3390/metabo11010057
7. SECKLER, J. M. a S. J. LEWIS. Advances in D-amino acids in neurological research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**, 7325. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21197325
8. KANĎÁR, R., P. DRÁBKOVÁ, T. TOIFLOVÁ a kol. Determination of Selected Amino Acids in Serum of Patients with Liver Disease. *Adv Clin Exp Med*. 2016, **25**(6), 1227–1239.
9. ALVES, A., A. BASSOT, A. L. BULTEAU a kol. Glycine metabolism and its alterations in obesity and metabolic diseases. *Nutrients*. 2019, **11**(6). Dostupné z: doi:10.3390/nu11061356

10. WANG, W., Z. WU, Z. DAI a kol. Glycine metabolism in animals and humans: Implications for nutrition and health. *Amino Acids*. 2013, **45**(3), 463–477. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-013-1493-1
11. DIETERLE, P., F. BRAWAND, U. K. MOSER a kol. Alanine Metabolism in Rat Liver Mitochondria. *Eur. J. Biochem*. 1978, **88**,467.-473.
12. HOLEČEK, M. Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & Metabolism*. 2018, **15**:33. Dostupné z: doi:10.1186/s12986-018-0271-1
13. YU, W., X. Y. YANG, Q. ZHANG a kol. Targeting GLS1 to cancer therapy through glutamine metabolism. *Clinical and Translational Oncology*. 2021. Dostupné z: doi:10.1007/s12094-021-02645-2
14. YANG, J. S., CH. CH. WANG, J. D. QIU a kol. Arginine metabolism: a potential target in pancreatic cancer therapy. *Chinese medical journal*. 2020, **134**(1), 28–37. Dostupné z: doi:10.1097/CM9.0000000000001216
15. MORO, J., D. TOMÉ, P. SCHMIDELY a kol. Histidine: A systematic review on metabolism and physiological effects in human and different animal species. *Nutrients*. 2020, **12**, 1414. Dostupné z: doi:10.3390/nu12051414
16. FUCHS, J. E., D. FUCHS a K. R. LIEDL. Dynamic regulation of phenylalanine hydroxylase. *Pteridines*. 2014, **25**(2): 33–39. Dostupné z: doi:10.1515/pteridines-2014-0006
17. FIORE, A. a P. J. MURRAY. Tryptophan and indole metabolism in immune regulation. *Current Opinion in Immunology*. 2021, **70**:7–14. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2020.12.001
18. ARAL, B a P KAMOUN. The proline biosynthesis in living organisms. *Amino Acids*. 1997, **13**:189-217.
19. SCHAFFER, S. a H. W. KIM. Effects and mechanisms of taurine as a therapeutic agent.

- Biomolecules and Therapeutics*. 2018, **26**(3), 225–241. Dostupné z: doi:10.4062/biomolther.2017.251
20. WEN, CH., F. LI, L. ZHANG a kol. Taurine is Involved in Energy Metabolism in Muscles, Adipose Tissue, and the Liver. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2019, **63**(2), 1–11. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.201800536
21. KIM, S. J., C. RAMESH, H. GUPTA a kol. Taurine-diabetes interaction: From involvement to protection. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2007, **21**(3–4), 63–78. Dostupné z: doi:10.2174/157339907781368940
22. PHILLIPS, I. R. a E. A. SHEPHARD. Endogenous Roles of Mammalian Flavin-Containing Monooxygenases. *Catalysts*. 2019, **9**, 1001. Dostupné z: doi:10.3390/catal9121001
23. P. H. YANCEY. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology*. 2005, **208**, 2819-2830. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.01730
24. ACHARYA, M a C. A. LAU-CAM. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Biomedical Science*. 2010, **17**(Suppl 1):S35. Dostupné z: <http://www.jbiomedsci.com/content/17/S1/S35>
25. STIPANUK, M. H., L. L. HIRSCHBERGER a J. DE LA ROSA. Cysteinesulfinic Acid, Hypotaurine, and Taurine: Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Methods in Enzymology*. 1987, **143**, 155-160.
26. DROUIN, N., S. RUDAZ a J. SCHAPPLER. Sample preparation for polar metabolites in bioanalysis. *Analyst*. 2018, **143**, 16–20. Dostupné z: doi:10.1039/c7an01333g
27. WAGNER, M., D. TONOLI, E. VARESIO a kol. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews*. 2016, **35**(3), 361–438. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21441

28. MOAT, S. J., R. S. GEORGE a R. S. CARLING. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *International Journal of Neonatal Screening*. 2020, **6**(2), 1–17. Dostupné z: doi:10.3390/ijns6020026
29. ZOPPA, M., L. GALLO, F. ZACCHELLO a kol. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2006, **831**(1–2), 267–273. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2005.12.015
30. JOHNSON, D. W. Free amino acid quantification by LC-MS/MS using derivatization generated isotope-labelled standards. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2011, **879**(17–18), 1345–1352. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2010.12.010
31. O'BROIN, S. D., B. P. KELLEHER a E. GUNTER. Evaluation of factors influencing precision in the analysis of samples taken from blood spots on filter paper. *Clin Lab Haematol*. 1995, **17**:185–188.
32. DENNIFF, P. a N. SPOONER. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis*. 2010, **2**:1385–1395.
33. DE VRIES, R., M. BARFIELD, N. VAN DE MERBEL a kol. The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from the EBF DBSmicrosampling consortium. *Bioanalysis*. 2013, **5**:2147–2160.
34. D'ARIENZO, C. J., Q. C. JI, L. DISCENZA a kol. DBS sampling can be used to stabilize prodrugs in drug discovery rodent studies without the addition of esterase inhibitors. *Bioanalysis*. 2010, **2**:1415–1422.
35. VAN BAAR, B. L. M., T. VERHAEGHE, O. HEUDI a kol. IS addition in bioanalysis of DBS: Results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis*. 2013, **5**:2137–2145.
36. LI, Y. Y., J. HENION, R. ABBOTT a kol. Semi-automated direct elution of dried blood

- spots for the quantitative determination of guanfacine in human blood. *Bioanalysis*. 2012, **4**:1445–1456.
37. LAWSON, A. J., L. BERNSTONE a S. K. HALL. Newborn screening blood spot analysis in the UK: Influence of spot size, punch location and haematocrit. *J. Med. Screen*. 2016, **23**, 7–16.
38. PIRAUD, M., CH. VIANEY-SABAN, K. PETRITIS a kol. Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: A new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005, **19**(12), 1587–1602. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.1957
39. LIU, Z., M.-J. TU, CH. ZHANG a kol. A reliable LC-MS/MS method for the quantification of natural amino acids in mouse plasma: Method validation and application to a study on amino acid dynamics during hepatocellular carcinoma progression. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019, **1124**, 72–81. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb
40. YOSHIDA, H., K. KONDO, H. YAMAMOTO a kol. Validation of an analytical method for human plasma free amino acids by high-performance liquid chromatography ionization mass spectrometry using automated precolumn derivatization. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2015, **998–999**, 88–96. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2015.05.029
41. SONG, Y., CH. XU, H. KUROKI a kol. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, **147**, 35–49. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.08.050
42. DELGADO-POVEDANO, M. M., M. CALDERÓN-SANTIAGO, F. PRIEGO-CAPOTE a kol. Study of sample preparation for quantitative analysis of amino acids in human sweat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2016, **146**, 310–317. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.07.066
43. LE, A., A. NG, T. KWAN a kol. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of

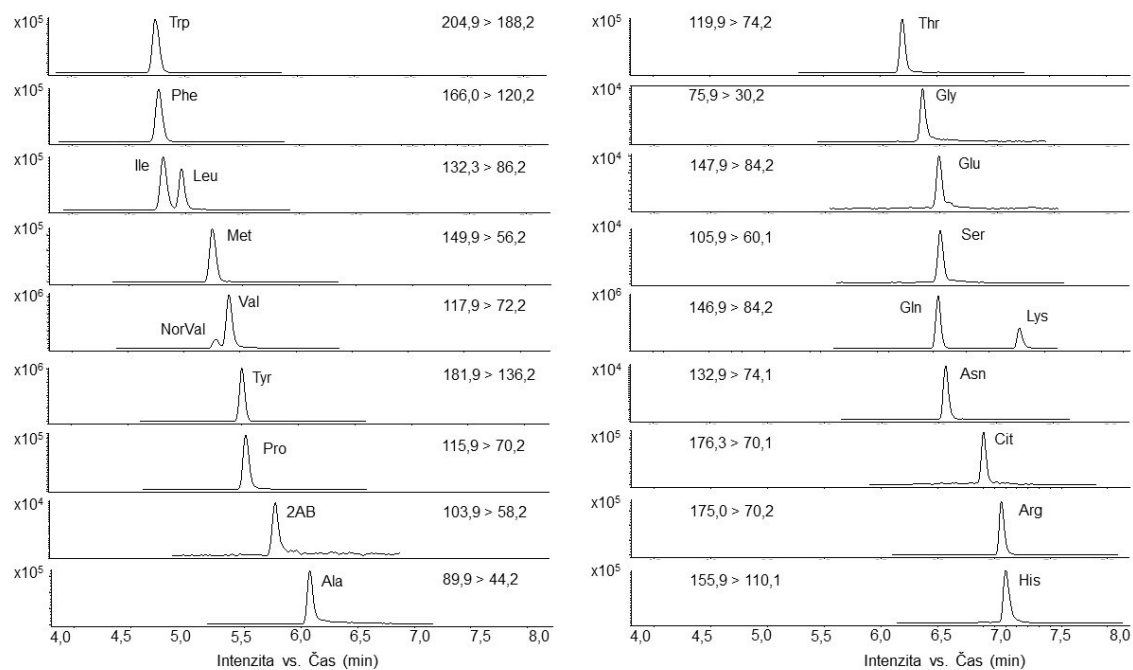
- underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2014, **944**, 166–174. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.017
44. MICHEL, M., CH. SALVADOR, V. WIEDEMAIR a kol. Method comparison of HPLC-ninhydrin-photometry and UHPLC-PITC-tandem mass spectrometry for serum amino acid analyses in patients with complex congenital heart disease and controls. *Metabolomics*. 2020, **16**(12), 1–10. Dostupné z: doi:10.1007/s11306-020-01741-8
 45. TANG, D. Q., L. ZOU, X. X. YIN a kol. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass spectrometry reviews*. 2016, **35**(5), 574–600. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21445
 46. LÄMMERHOFER, M.. HILIC and mixed-mode chromatography: The rising stars in separation science. *Journal of Separation Science*. 2010, **33**(6–7), 679–680. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201090015
 47. JANDERA, P., T. HÁJEK, V. ŠKERŤÍKOVÁ a kol. Dual hydrophilic interaction-RP retention mechanism on polar columns: Structural correlations and implementation for 2-D separations on a single column. *Journal of Separation Science*. 2010, **33**(6–7), 841–852. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200900678
 48. BUSZEWSKI, B. a S. NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **402**(1), 231–247. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5308-5
 49. HOLČAPEK, M., ed. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). In: *Michal HOLČAPEK, ed.* 2001.
 50. LEMR, K. a L. BOROVCOVÁ. Vznik iontů v hmotnostní spektrometrii: ionizace a fragmentace. *Karel Lemr a Lucie Borovcová*. 2020, **100**, 96–100.
 51. ZIMA, T., A. KAZDA, R. PRŮŠA a kol. Laboratorní diagnostika. Praha: *Galén*, 2013.
 52. ROSU, F., E. DE PAUW a V. GABELICA. Electrospray mass spectrometry to study

- drug-nucleic acids interactions. *Biochimie*. 2008, **90**(7), 1074–1087. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2008.01.005
53. WHITEHOUSE, C. M., R. N. DREYER, M. YAMASHITA a kol. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Analytical Chemistry*. 1985, **57**(3), 675–679. Dostupné z: doi:10.1021/ac00280a023
54. THURMAN, E. M. a I. FERRER. Comparison of quadrupole time-of-flight, triple quadrupole, and ion-trap mass spectrometry/mass spectrometry for the analysis of emerging contaminants. *ACS Symposium Series*. 2003, **850**, 14–31. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2003-0850.ch002
55. CAPIAU, S., H. VEENHOF, R. A. KOSTER a kol. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot–Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *The Drug Monit.* 2019, **41**(4), 409–430.

7 Přílohy

Příloha 1 - Chromatografické záznamy měřené za optimalizovaných podmínek.....	64
Příloha 2 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu.....	65
Příloha 3 – Grafy ukazující vliv hodnoty hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve.....	66
Příloha 4 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců.....	70

Příloha 1 - Chromatografické záznamy měřené za optimalizovaných podmínek



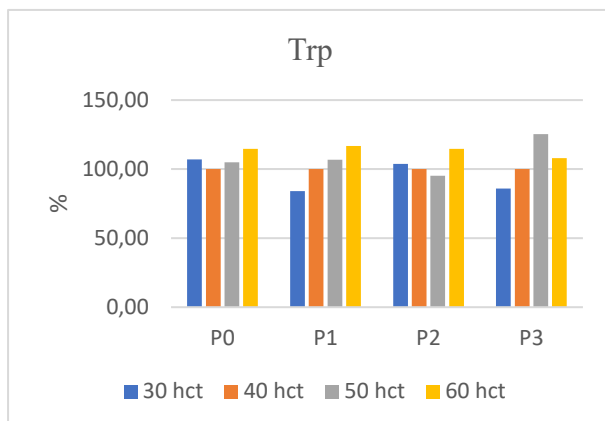
Obrázek 7 - Záznam kalibrátoru S3 měřený za podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 3.7

Příloha 2 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu

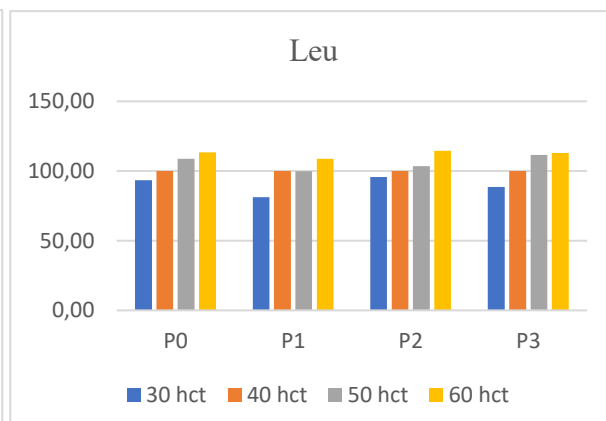
Tabulka 16 - Závislost koncentrace aminokyselin na objemu nanesené krve na odběrovou kartu

	c ($\mu\text{mol/l}$) (V = 15 μl)	c ($\mu\text{mol/l}$) (V = 20 μl)	c ($\mu\text{mol/l}$) (V = 30 μl)	c ($\mu\text{mol/l}$) (V = 40 μl)	c ($\mu\text{mol/l}$) (V = 50 μl)	c ($\mu\text{mol/l}$) (V = 75 μl)	c ($\mu\text{mol/l}$) (V = 75 μl), okraj
Arg	83,8	79,4	66,5	90,1	73,8	77,7	85,4
2-AB	39,3	41,1	44,4	46,2	51,9	52,3	59,9
Ala	719,9	720,8	751,0	814,5	846,0	931,7	995,7
Asn	125,3	115,9	141,1	165,3	161,6	184,1	184,3
Cit	70,3	76,7	78,3	85,2	89,5	94,3	93,7
Glu	238,9	237,4	247,2	282,8	278,5	307,4	317,7
Gln	1087,2	1112,3	1164,5	1266,6	1291,4	1409,0	1451,2
Gly	529,4	563,6	621,4	630,3	664,4	696,7	822,7
His	166,3	160,6	174,4	185,4	200,3	209,6	199,0
Ile	170,7	166,7	171,7	195,3	199,5	221,0	249,4
Leu	243,0	245,6	250,0	304,0	276,0	303,9	319,2
Lys	207,0	211,9	237,5	261,3	282,6	294,8	308,2
Met	48,7	48,2	49,2	52,9	56,7	62,7	60,2
Phe	140,7	133,9	145,5	157,7	161,9	176,2	210,5
Pro	291,9	280,6	295,8	315,4	327,6	317,8	359,3
Ser	290,6	293,3	304,5	328,0	338,0	357,7	363,4
Thr	269,6	264,1	282,8	298,3	319,4	358,6	394,2
Trp	112,6	104,9	110,7	117,8	125,6	130,7	171,8
Tyr	186,9	179,8	184,1	189,7	198,0	200,7	217,3
Val	409,2	386,0	408,9	449,4	468,9	465,2	484,5

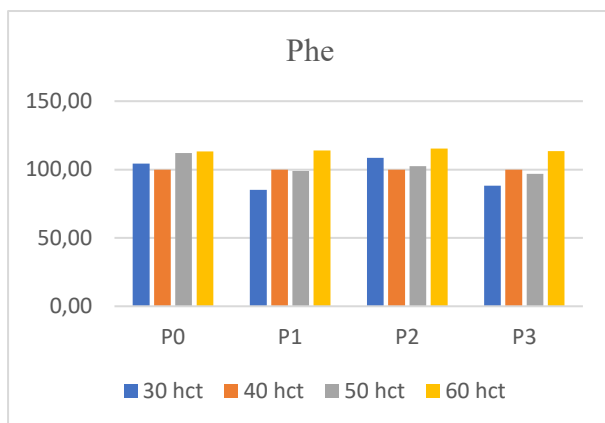
Příloha 3 – Grafy ukazující vliv hodnoty hematokritu na koncentraci aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve



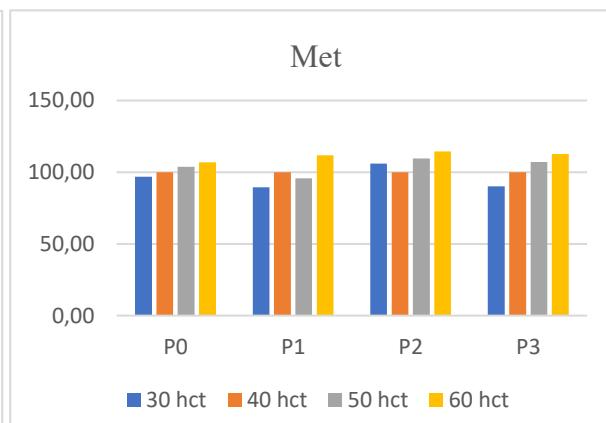
Graf 9 - Tryptofan



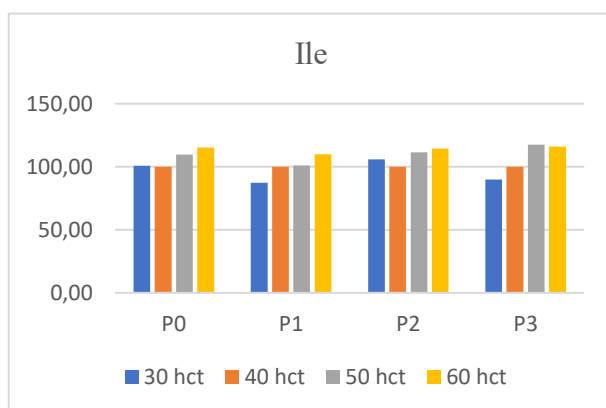
Graf 12 - Leucin



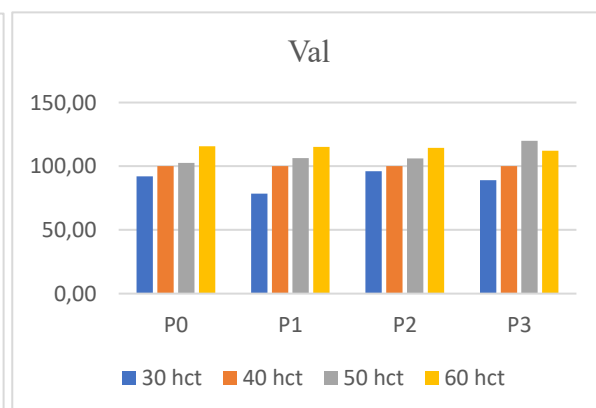
Graf 10 - Fenylalanin



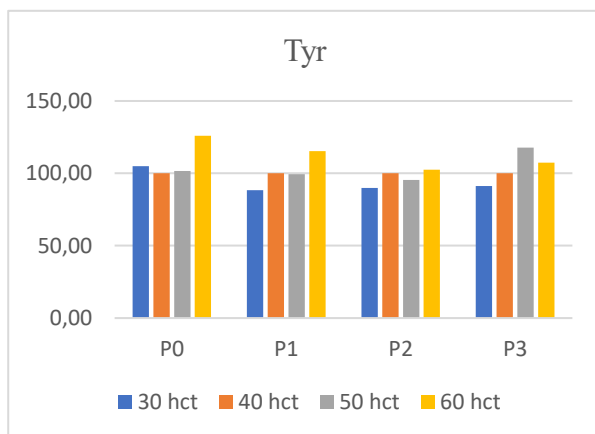
Graf 13 - Methionin



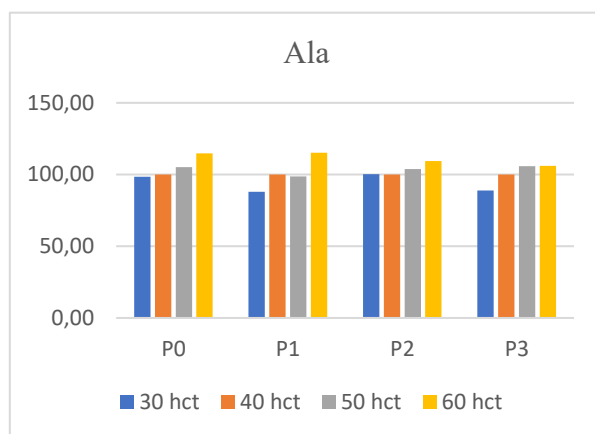
Graf 11 - Isoleucin



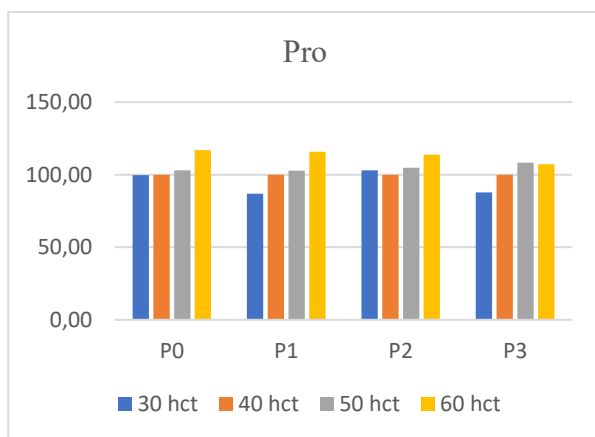
Graf 14 - Valin



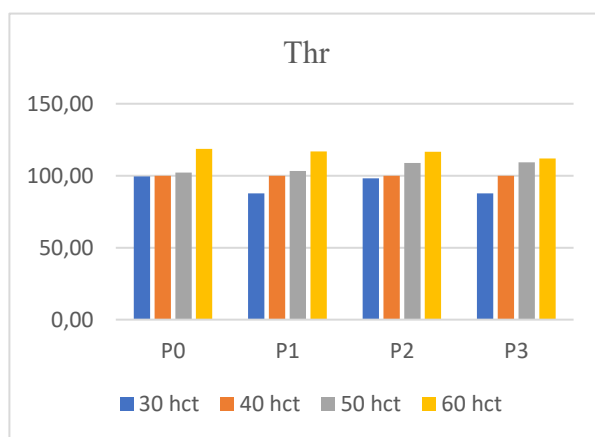
Graf 15 - Tyrosin



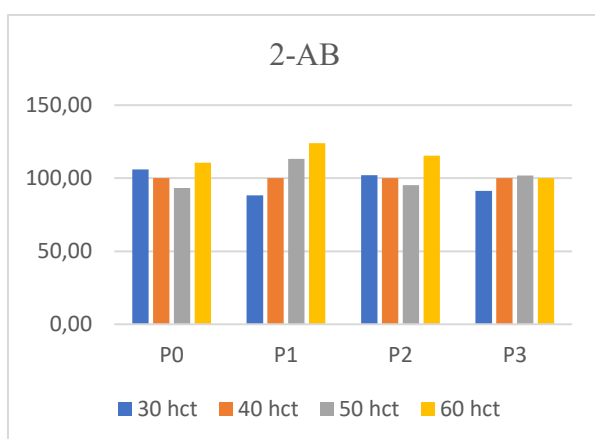
Graf 18 - Alanin



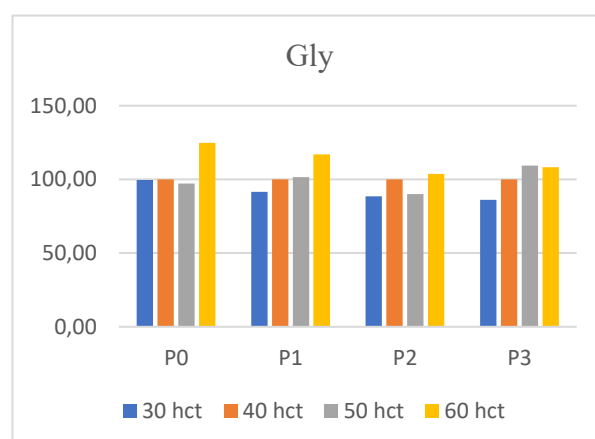
Graf 16 - Prolin



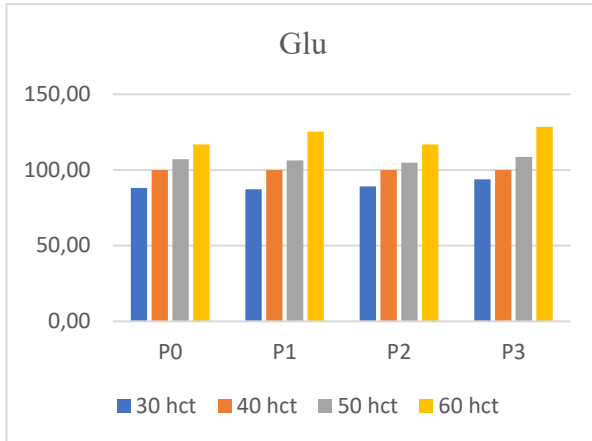
Graf 19 - Threonin



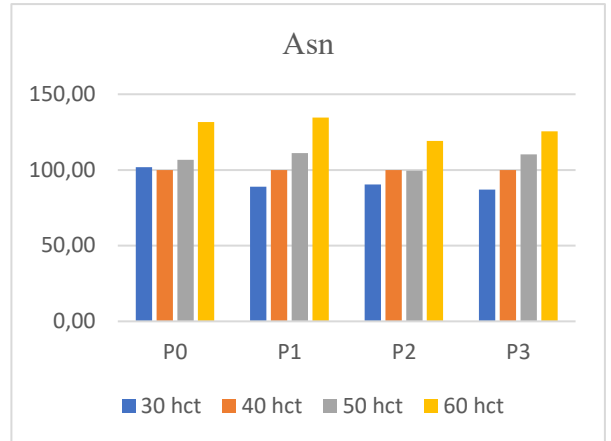
Graf 17 – 2-Aminomáselná kyselina



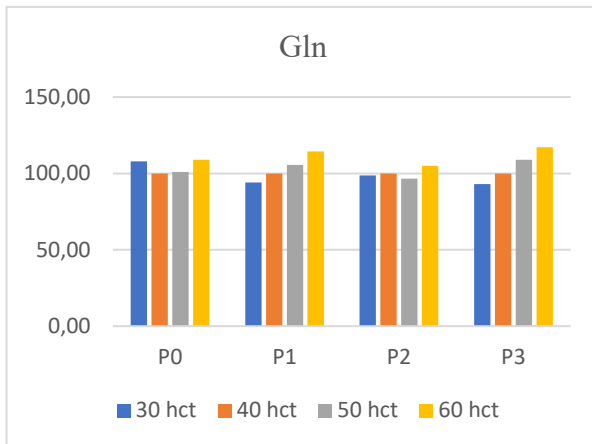
Graf 20 - Glycin



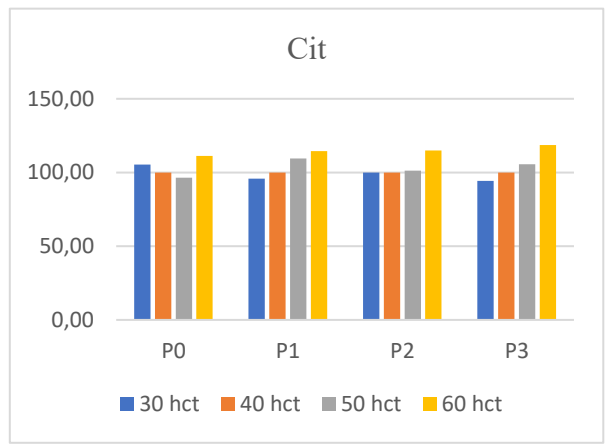
Graf 21 – Kyselina glutamová



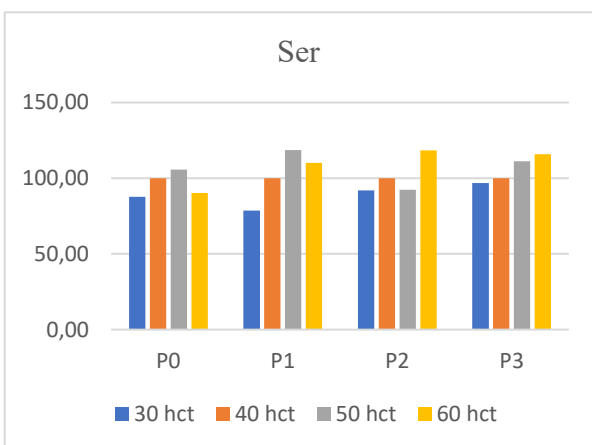
Graf 24 - Asparagin



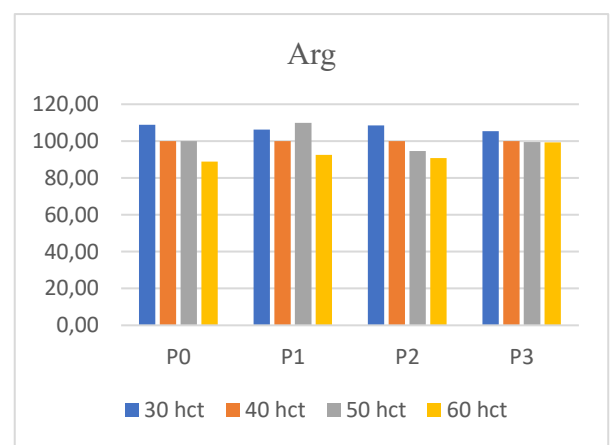
Graf 22 - Glutamin



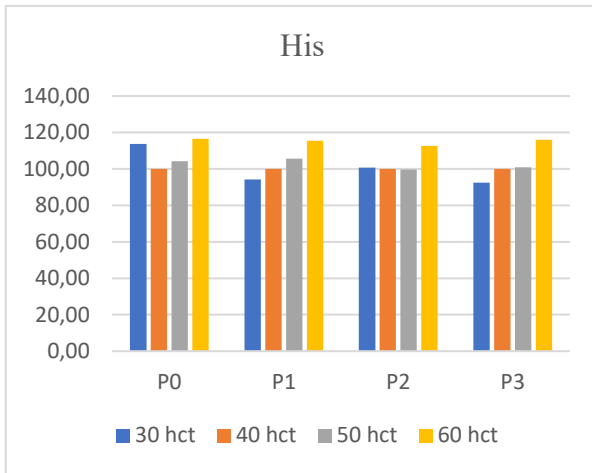
Graf 25 - Citrulin



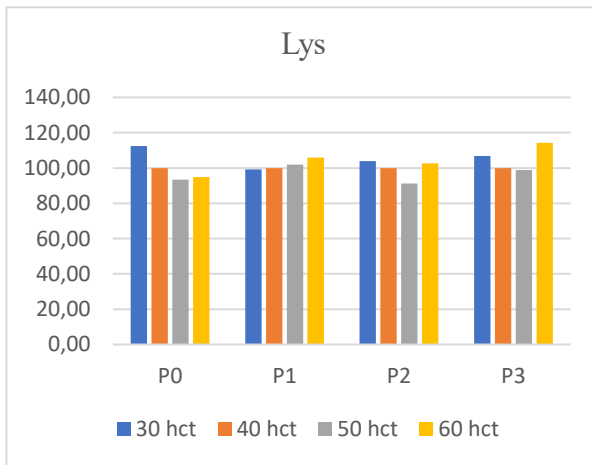
Graf 23 - Serin



Graf 26 - Arginin



Graf 27 - Histidin



Graf 28 - Lysin

Příloha 4 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců

Tabulka 17 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 1 – 15

μmol/l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Arg	84,5	102,3	119,5	90,7	64,4	88,9	55,7	72,1	98,4	105,6	102,9	67,9	92,2	126,3	135,9
2-AB	27,0	18,7	19,2	34,1	27,0	20,7	2,9	22,1	20,2	19,0	9,6	26,9	28,0	23,6	8,9
Ala	496,5	548,6	476,0	527,1	410,5	397,0	237,5	429,0	449,7	487,9	525,8	429,3	533,7	556,2	335,9
Asn	103,6	84,0	112,8	125,2	97,7	78,8	74,6	76,8	101,6	146,1	99,9	103,7	135,8	94,2	93,2
Cit	56,2	57,8	60,3	50,7	57,7	78,3	55,3	55,0	59,9	67,8	48,3	43,3	54,8	55,7	51,4
Glu	170,0	194,1	200,9	194,9	216,1	154,0	168,1	229,3	155,7	185,5	192,3	174,2	171,4	179,1	149,2
Gln	426,5	448,6	565,0	563,2	534,2	410,7	401,5	570,7	568,1	518,5	411,8	418,5	600,4	496,4	359,6
Gly	361,2	483,4	566,3	527,3	366,4	526,1	486,6	376,0	375,2	389,3	476,4	329,0	454,4	394,1	461,0
His	119,0	105,6	124,7	109,1	111,5	85,0	82,1	82,2	120,4	110,9	110,3	122,1	113,5	117,8	137,2
Ile	178,3	176,7	181,9	235,0	167,9	175,0	163,3	214,3	205,0	128,9	119,0	138,8	122,4	121,4	171,9
Leu	203,8	247,9	233,8	399,4	219,5	264,0	204,5	271,2	245,0	163,8	133,7	179,9	144,8	178,4	262,4
Lys	311,1	346,1	389,3	455,0	304,3	354,5	206,6	322,6	453,8	266,0	261,7	299,9	273,1	315,5	375,3
Met	27,6	27,3	47,1	43,7	31,7	26,0	31,8	29,5	42,4	34,7	27,9	24,8	28,9	29,1	52,3
Phe	95,6	87,6	112,0	120,8	129,3	67,1	88,4	106,8	113,7	93,4	111,6	103,9	108,2	109,7	119,8
Pro	179,7	267,1	244,9	263,0	246,1	299,7	164,6	358,0	247,0	253,1	234,6	127,2	206,7	290,9	178,9
Ser	205,6	439,0	288,2	497,8	335,1	329,0	257,0	254,1	305,7	300,0	298,3	235,0	306,9	282,1	370,6
Thr	79,9	162,8	169,9	198,5	117,0	144,1	78,1	88,7	121,7	129,7	99,2	110,8	117,9	145,2	144,7
Trp	52,9	57,6	81,3	88,9	49,7	43,0	53,9	71,0	68,5	60,2	54,1	64,1	78,4	57,0	67,0
Tyr	81,6	66,1	92,3	82,1	71,7	56,8	80,7	88,0	107,4	55,4	45,2	49,6	65,9	57,1	86,7
Val	283,3	331,2	281,5	377,2	315,6	263,4	256,0	369,5	280,8	276,0	189,6	200,4	217,3	178,7	300,9

Tabulka 18 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 16 – 30

μmol/l	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Arg	98,8	72,4	85,8	102,5	94,9	52,9	69,5	90,2	75,1	95,2	73,1	85,7	109,0	62,7	68,9
2-AB	23,1	13,5	27,3	13,0	18,5	15,6	8,3	24,0	22,2	5,1	17,7	19,2	20,2	19,3	31,4
Ala	394,6	264,8	288,6	480,1	411,1	333,7	319,0	519,1	278,1	463,8	665,8	405,2	516,2	709,7	348,8
Asn	100,4	77,6	91,8	108,5	114,5	81,4	81,0	117,1	83,3	86,9	126,3	86,4	120,0	115,1	87,4
Cit	55,6	58,7	49,7	58,4	52,3	38,0	49,8	58,0	45,1	39,3	47,5	54,2	59,6	53,1	53,1
Glu	314,2	150,2	224,0	294,4	313,9	165,4	173,2	178,8	210,3	174,1	222,9	210,3	153,8	196,6	149,2
Gln	441,9	382,2	404,6	510,3	487,2	341,3	295,4	582,7	456,6	366,8	556,1	572,6	525,4	654,1	465,1
Gly	412,9	298,7	250,6	521,1	512,1	284,8	336,5	431,2	378,5	366,6	561,0	345,9	312,9	636,3	434,7
His	124,9	108,7	111,2	89,7	119,4	88,9	84,2	135,7	94,9	122,1	109,6	95,0	117,1	148,9	92,4
Ile	137,4	156,6	121,6	134,6	197,1	111,1	152,8	157,9	94,8	185,2	138,1	125,0	181,4	162,4	174,9
Leu	177,8	214,4	142,6	158,9	248,3	122,9	208,4	201,3	124,2	250,2	190,3	142,8	237,9	195,4	223,1
Lys	242,8	324,3	276,6	219,1	303,3	281,5	279,0	375,3	267,2	354,5	256,6	236,2	362,4	349,0	282,3
Met	41,9	38,6	24,6	33,9	43,7	31,6	28,5	40,5	28,0	55,4	34,9	22,5	38,2	37,8	41,7
Phe	108,2	109,2	74,6	72,4	92,8	77,6	89,3	99,3	71,1	100,7	78,4	70,1	92,6	110,4	86,3
Pro	226,8	193,7	81,5	190,2	252,2	133,2	162,6	205,5	141,8	164,8	331,1	152,7	224,7	303,0	209,3
Ser	376,3	211,9	304,9	366,1	443,6	346,4	355,3	352,6	292,4	308,3	382,3	257,5	314,3	494,1	295,5
Thr	140,5	78,0	135,0	140,1	138,7	98,1	88,2	150,7	97,6	154,0	149,5	67,1	99,6	164,7	158,4
Trp	49,6	66,5	71,8	55,7	66,5	71,7	51,6	59,8	64,3	68,0	56,2	56,9	75,4	79,6	64,2
Tyr	95,9	67,3	27,4	49,7	65,6	52,4	67,5	59,6	40,2	86,3	40,4	67,1	86,0	87,5	74,5
Val	264,2	255,4	175,2	234,7	299,5	213,4	263,8	258,0	180,1	252,6	233,4	197,9	325,5	273,5	318,3

Tabulka 19 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 31 – 45

μmol/l	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Arg	121,0	109,2	75,3	126,7	130,3	94,0	86,0	109,0	76,4	103,3	64,2	116,0	68,0	81,5	49,0
2-AB	27,8	23,5	37,3	17,9	21,9	19,1	14,0	15,8	21,0	9,5	14,9	29,8	8,3	44,6	19,8
Ala	506,9	466,7	491,4	631,4	466,8	371,6	319,5	417,2	483,9	389,9	441,7	378,4	240,3	384,0	365,8
Asn	81,6	88,5	66,0	97,8	88,1	58,8	62,9	82,8	72,2	69,2	64,6	62,6	55,7	72,8	67,5
Cit	40,3	39,6	52,7	55,6	47,6	37,8	30,0	33,9	38,8	28,9	39,0	41,8	28,4	46,6	41,9
Glu	181,5	166,7	182,8	217,1	183,1	172,5	188,2	128,6	187,1	137,9	105,9	144,6	119,4	157,5	126,5
Gln	495,6	448,1	535,1	477,3	468,2	450,6	499,0	511,0	513,1	455,9	470,8	501,8	360,1	517,3	461,4
Gly	322,0	260,0	264,0	398,9	298,8	265,3	190,0	363,6	365,0	273,5	225,5	311,9	288,1	258,0	241,3
His	119,0	108,9	106,8	134,5	104,3	110,4	85,1	108,7	126,6	96,0	106,9	85,5	72,8	110,6	71,9
Ile	100,5	71,2	119,6	115,5	119,9	134,3	122,2	100,7	91,2	89,6	92,8	145,1	74,9	150,0	89,7
Leu	144,9	96,2	169,4	191,1	182,9	198,1	184,4	139,5	119,6	131,9	140,3	207,2	94,2	198,0	126,8
Lys	246,1	215,9	268,2	271,9	180,0	258,5	191,0	247,5	205,6	166,7	237,6	311,8	155,3	220,8	207,5
Met	29,4	68,1	30,4	33,9	29,8	21,9	22,1	29,1	37,8	25,1	27,7	35,7	19,3	27,5	21,1
Phe	75,4	69,6	80,0	101,9	89,0	99,5	69,4	106,4	83,2	59,5	93,9	85,3	51,5	92,0	63,6
Pro	341,2	198,3	258,9	363,6	313,6	264,4	167,8	243,0	301,9	188,3	328,2	214,3	127,7	266,5	201,7
Ser	188,4	169,9	137,7	234,4	122,4	125,2	151,6	153,1	195,1	154,8	106,0	152,6	127,9	212,4	98,8
Thr	127,4	126,3	135,8	157,3	129,2	98,6	68,3	124,1	140,9	107,6	128,3	137,8	125,6	121,9	87,8
Trp	52,6	50,9	65,3	73,2	50,8	62,3	52,3	66,9	83,3	57,2	47,6	59,2	53,1	52,9	52,4
Tyr	80,9	64,6	85,1	78,1	72,7	85,7	66,1	83,0	77,7	76,5	66,5	83,5	40,4	74,6	63,0
Val	278,6	184,9	287,8	249,1	239,5	297,3	227,0	235,6	214,4	190,3	224,3	264,9	159,9	326,1	244,1

Tabulka 20 - Koncentrace aminokyselin ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců; vzorky 46 – 60

μmol/l	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Arg	66,5	40,6	48,5	98,8	126,1	93,3	95,7	59,2	97,8	111,8	95,3	54,8	54,5	33,1	68,4
2-AB	9,0	19,4	26,3	16,2	39,8	17,0	20,9	20,3	23,8	25,6	24,7	59,6	22,5	23,8	17,8
Ala	358,4	364,8	355,4	433,7	394,7	309,0	486,3	392,0	260,3	377,9	437,1	341,1	415,2	295,8	362,8
Asn	53,5	55,7	66,7	68,9	68,4	77,3	81,4	53,8	70,3	76,8	64,0	69,9	85,0	58,7	51,9
Cit	29,1	34,8	43,3	55,2	55,6	51,0	47,2	48,5	53,3	44,8	38,8	44,0	34,7	31,1	56,3
Glu	155,1	146,4	130,3	201,7	185,4	197,7	179,6	153,4	163,3	139,0	137,8	140,1	129,2	198,9	170,7
Gln	331,8	424,0	475,2	476,7	466,9	634,5	628,0	468,8	426,8	514,3	484,8	486,0	373,4	391,6	463,8
Gly	172,6	220,4	215,2	367,5	281,6	294,9	292,0	322,4	127,5	381,9	340,8	194,7	186,4	273,2	270,4
His	93,7	90,5	85,7	140,9	96,1	84,2	141,6	90,2	77,1	103,1	82,8	99,9	111,9	83,6	101,3
Ile	62,8	58,6	88,5	118,2	145,9	114,7	132,6	78,0	151,0	98,9	80,8	138,3	104,5	75,2	75,9
Leu	80,9	70,1	121,3	152,1	185,7	158,9	156,3	105,6	184,9	145,5	114,7	180,7	143,7	96,1	100,9
Lys	197,2	168,7	197,5	209,2	218,2	186,5	207,6	197,9	240,3	157,8	237,8	223,7	232,6	239,8	164,6
Met	14,9	15,2	23,9	25,9	34,2	27,1	29,3	21,2	21,0	25,4	27,8	22,7	31,9	24,3	17,9
Phe	61,9	56,6	73,3	100,7	87,4	77,3	98,5	62,7	86,3	92,4	61,9	76,6	81,2	72,8	77,8
Pro	142,4	137,7	224,3	230,9	204,4	158,8	245,0	167,9	179,8	336,4	296,8	152,4	154,0	151,1	227,7
Ser	83,9	99,6	132,3	257,1	100,5	105,5	127,6	137,7	118,0	170,3	131,6	125,5	105,6	148,3	130,8
Thr	92,5	75,6	126,2	134,2	111,2	104,5	142,2	122,2	86,3	138,2	126,9	96,8	106,2	92,0	111,0
Trp	49,8	44,4	53,4	64,0	62,3	47,3	59,7	49,2	65,4	61,2	52,0	55,0	78,6	68,2	50,8
Tyr	55,0	39,4	86,3	87,1	77,2	59,0	73,4	78,4	79,1	81,1	73,3	74,9	80,9	63,2	55,6
Val	159,3	126,9	215,2	268,7	269,4	226,6	296,4	202,5	303,2	239,4	210,5	373,1	234,8	166,4	191,2