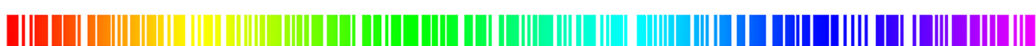
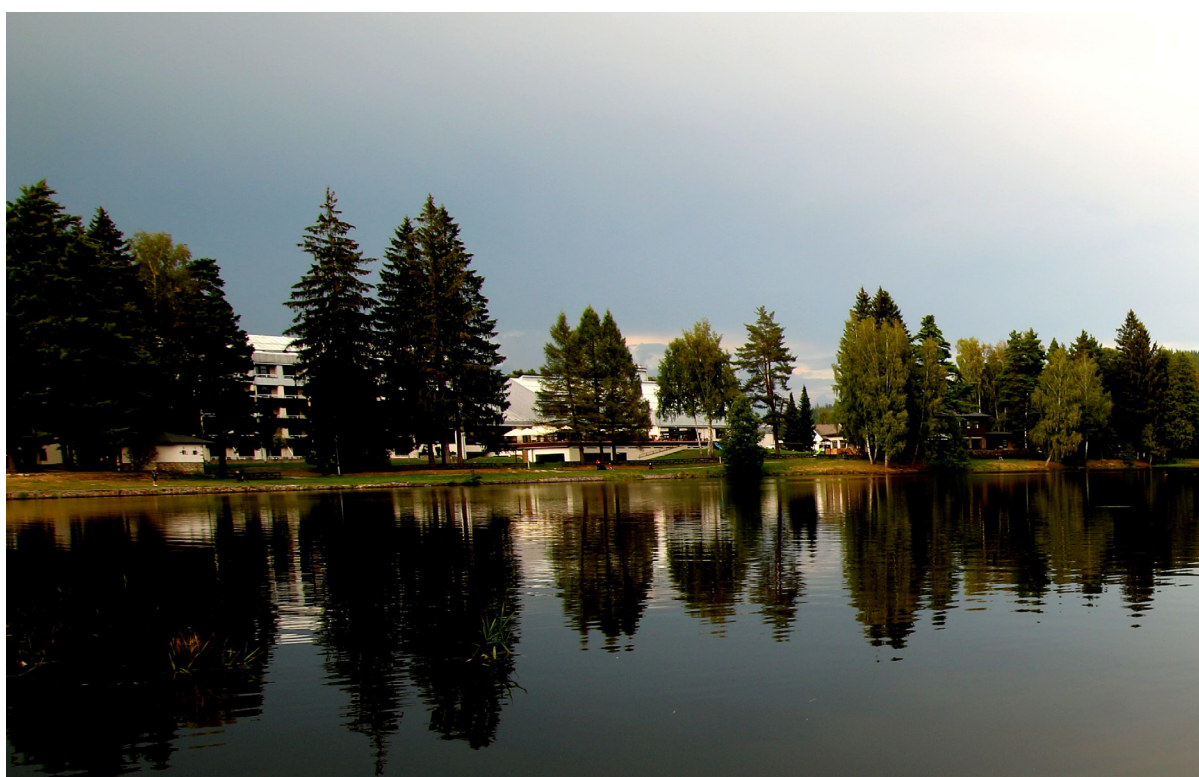


SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



Abstrakty přednášek v sekci Mládí vpřed a plakátových sdělení

24. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie



Editoři: Josef Cvačka, Vladimír Vrkoslav, Martin Hubálek,
Mikuláš Vlk

Milovy, 11. - 15. září 2023



ÚOCHB ^{AV}_{ČR}
IOCB PRAGUE



© Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2023

ISBN: 978-80-88195-43-6

Mládí vpřed

Mladí výzkumníci budou prezentovat své výsledky formou krátkých přednášek v sekci „Mládí vpřed“ ve čtvrtek 14. září 2023. Nejlepší přednáška bude oceněna „Cenou za nejlepší přednášku v sekci Mládí vpřed“. Výherce získává hrazenou účast a možnost přednášet na 25. Škole hmotnostní spektrometrie v roce 2024. Sponzorem soutěže je společnost Pragolab s.r.o.

- | | |
|----------------------|---|
| 16:30 - 16:45 | Focusing on membrane peptides in standard proteomic workflows
<i>Jana Březinová</i> |
| 16:45 - 17:00 | Separace sfingolipidů a rozlišování jejich isomerních tříd v plazmě a buněčných liniích pomocí HILIC/MS
<i>Denisa Kolářová</i> |
| 17:00 - 17:15 | Přímá analýza pylových zrn s využitím modifikované ASAP-MS techniky
<i>Petra Krejčí</i> |
| 17:15 - 17:30 | Lipidomic profiling of less abundant lipids in human blood by HILIC/MS
<i>Ondřej Peterka</i> |
| 17:30 - 17:45 | Rapid and efficient LC-MS/MS diagnosis of inherited metabolic disorders: a semi-automated workflow for analysis of organic acids, acylglycines, and acylcarnitines in urine
<i>Barbora Pisklákova</i> |
| 17:45 - 18:00 | Digitální zobrazování nanočásticových značek pomocí IR laserové ablace spojené s SP ICP MS
<i>Marek Stiborek</i> |



FOCUSING ON MEMBRANE PEPTIDES IN STANDARD PROTEOMIC WORKFLOWS

JANA BŘEZINOVÁ^{1,2}, MICHAL KORECKÝ¹, MARTIN HUBÁLEK¹

¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo náměstí 542/2, Praha 6, Czech Republic

²Faculty of Science, Charles University, Albertov 6, 128 00 Praha 2, Czech Republic

e-mail: jana.brezinova@uochb.cas.cz

What is the main cause of poor membrane peptide identifications in bottom-up proteomics? There are many reasons why analysis of membrane protein segments using mass spectrometry is laborious. First, protein digestion is usually performed in aqueous buffers where hydrophobic membrane proteins/peptides might precipitate or adhere to plastic surfaces. Second, hydrophobic membrane regions often contain less trypsin cleavage sites which leads to generating long peptides. This could be overcome by employing different digestion techniques. However, small number of basic residues harbouring positive charge in electrospray ionization make lower charge states more prominent. Additionally, singly charged ions are often not targeted in standard proteomic approaches. The combination of all effects can limit membrane peptide detection in typical proteomic MS experiment.

By fine tuning already available sample preparation techniques and developing a new LC-MS/MS method we were able to overcome some sources of poor membrane peptide identifications. By not limiting our scope we compared membrane protein and peptide identification in our standard workflow - enhanced filter aided sample preparation (eFASP)¹ with a newer filter-less solid-phase-enhanced sample preparation protocol SP3² now widely used.

Contrary to the general belief eFASP enabled more membrane protein/peptide identifications for standard sample amounts (50-100 ug of proteins). eFASP was therefore further modified and additional fractions generated by the workflow collected. Filter washes became valuable source of membrane peptides and together with chymotrypsin digestion more membrane proteins and peptides were identified. Further improvements are being tested which include analysis of ethyl acetate fraction generated by final liquid-liquid extraction of peptides during eFASP to remove deoxycholic acid as detergent and modifications on liquid chromatography conditions.

¹Erde J., Loo R. R., Loo J. A.: J Proteome Res 13, 1885 (2014).

²Hughes C. S., Moggridge S., Müller T., Sorensen P. H., Morin G. B., Krijgsveld J.: Nature Protocols 14, 68 (2019).

SEPARACE SFINGOLIPIDŮ A ROZLIŠOVÁNÍ JEJICH ISOMERNÍCH TŘÍD V LIDSKÉ PLAZMĚ A BUNĚČNÝCH LINIÍCH POMOCÍ HILIC/MS

DENISA KOLÁŘOVÁ¹, ONDŘEJ PETERKA¹, ROBERT JIRÁSKO¹, MICHAL HOLČAPEK¹

¹ Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie, Studentská 573, Pardubice, 532 10, Česká republika

e-mail: Denisa.Kolarova@upce.cz

Lipidy jsou biologicky aktivní látky, které se nacházejí ve všech eukaryotických buňkách a hrají významnou roli v buněčné signalizaci, tvorbě membrán a mechanismech ukládání energie¹. Soubor lipidů uvnitř buňky se nazývá lipidom a zahrnuje tisíce jednotlivých lipidů. Dysregulace lipidů může souviset se závažnými onemocněními, jako je například rakovina². Sfingolipidy (SP) jsou běžně detekovány v lipidových extraktech z biologických vzorků. Tyto lipidy se obvykle nacházejí v buněčných membránách, což jsou mechanicky stabilní a chemicky rezistentní dvojvrstvy složené převážně z fosfolipidů a okolních prokaryotických nebo eukaryotických buněk. V současné době je zaznamenána alterace metabolismu SP u pacientů s nádorovými onemocněními, což vede k rostoucí popularitě jejich analýzy. Primární technikou analýzy lipidů je hmotnostní spektrometrie, která ve spojení se separačními metodami umožňuje stanovení velkého počtu lipidů z různých lipidových kategorií.

V rámci naší práce byla vyvinuta HILIC/MS metoda pro identifikaci a kvantifikaci rozmanitého spektra SP ve vzorcích lidské plazmy a buněčných liniích. Z lidské plazmy byly SP izolovány a extrahovány pomocí směsi ethanol-voda, následované čištěním na C18 kolonkách s pevnou fází, z buněčných linií podle modifikovaného Folchova postupu, kde byla oddělována organická fáze^{3,4}. Pro optimalizaci chromatografických podmínek jsme zohlednili výběr kolony, složení mobilních fází, gradient, průtok mobilních fází a koncentraci pufru, abychom dosáhli nejlepšího možného chromatografického rozlišení. Nejvyšší rozlišení bylo dosaženo pomocí kolony Acquity UPLC BEH HILIC (150 x 2.1 mm; 1.7 µm). Zvláštní důraz byl kladen na rozlišení izomerních tříd, jako například glukosylceramidy od galaktosylceramidů a laktosylceramidy od digalaktosylceramidů. Díky optimalizované metodě jsme byli schopni identifikovat více než 100 sfingolipidů z 11 lipidových tříd v plazmě i buněčných liniích. Identifikace byla založena na jejich retenčním čase, vysoké přesnosti hmotnosti a fragmentačním chování pomocí MS/MS. Pro více polární sfingolipidy, konkrétně gangliosidy, byla modifikována a optimalizována další HILIC/MS metoda⁵. Tyto lipidy byly izolovány a extrahovány z buněčných linií podle Folchova postupu a byla odebírána vodná fáze. Bylo identifikováno 15 lipidových podtříd gangliosidů.

¹ Wolrab D., Chocholoušková M., Jirásko R., Peterka O., Holčapek M.: Anal. Bioanal. Chem. 412, 2375 (2020).

² Holčapek M., Liebisch G., Ekroos K.: Anal. Chem. 90, 4249 (2018).

³ Hořejší K., Jirásko R., Chocholoušková M., Kahoun D., Holčapek M.: Metabolites 11, 140 (2021).

⁴ Wolrab D., Chocholoušková M., Jirásko R., Peterka O., Mužáková V., Studentová H., Melichar B., Holčapek M.: Anal. Chim. Acta 1137, 74 (2020).

⁵ Hájek R., Jirásko R., Lísa M., Cífková E., Holčapek M.: Anal. Chem. 89, 12425 (2017).

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (projekt GAČR 21-20238S) a Studentské grantové soutěže (projekt SGS_2023_001).

PŘÍMÁ ANALÝZA PYLOVÝCH ZRN S VYUŽITÍM MODIFIKOVANÉ ASAP-MS TECHNIKY

PETRA KREJČÍ¹, JANA NÁDVORNÍKOVÁ¹, MATĚJ TESÁREK¹, PETR BEDNÁŘ¹

¹ Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 17. listopadu 12, Olomouc, 771 46, Česká republika

e-mail: petra.v.krejci@gmail.com

Mikroskopická analýza je běžně využívaným nástrojem pro identifikaci pylových zrn, kde jsou jednotlivé druhy pylových zrn identifikovány na základě jejich morfologie bez znalosti chemického složení pylového zrna. Za účelem studia chemického složení pylových zrn je nejčastěji využíváno spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)¹. Doposud však nebyla realizována studie, která by se zabývala analýzou taxonomicky odlišných druhů pylových zrn se zaměřením na jejich chemickou odlišnost. Navíc využívané GC/MS přístupy vyžadují extrakci analytů z pylových zrn do kapalné fáze, což může vést k diskriminaci některých analytů na základě použitých extrakčních rozpouštědel.

Tento příspěvek se zabývá studiem chemického složení vybraných druhů pylových zrn zvolených na základě taxonomické odlišnosti/příbuznosti, zbarvení a vzhledu povrchu. Pro účely rychlé a přímé analýzy pylových zrn byla modifikována kapilára pro hmotnostní spektrometrii s přímou sondou (analýzu pevných vzorků za atmosférického tlaku, ASAP-MS). S využitím elektronicky řízeného mikromanipulátoru byly vyizolovány klastry o definovaném počtu pylových zrn, které byly následně umístěny do modifikované kapiláry a přímo analyzovány technikou ASAP-MS. ASAP-MS analýza poskytla informace o chemickém složení studovaných druhů pylových zrn a s využitím PCA analýzy experimentálně získaných dat bylo dosaženo dělení jednotlivých druhů na základě jejich chemické odlišnosti. Byly identifikovány biomarkery, které byly pro daný druh buď specifické nebo byly ve spektrech pozorovány se značně vyšší intenzitou oproti ostatním druhům. Na základě PCA plotu se nejvíce odlišoval borovicový pyl, jediný zástupce jehličnanů a nahosemenných rostlin. Jeho výrazná odlišnost je způsobena malou chemickou variabilitou, která souvisí jak se způsobem šíření pylu, tak i s evoluční zastaralostí a vývojovou izolací studovaného druhu. Ostatní studované druhy, zástupci krytosemenných rostlin, byly děleny na základě chemických odlišností souvisejících s jejich taxonomickou klasifikací, přičemž značnou chemickou odlišnost vykazoval slunečnicový pyl, který je bohatý na charakteristické látky lipidické povahy. Modifikovaná ASAP-MS technika se ukázala jako vhodný nástroj ke studiu chemické variability a charakterizace různých druhů pylu.

Současně byly s využitím mikromanipulátoru izolovány definované počty pylových zrn slunečnice (1 - 10 pylových zrn), které byly vždy vloženy do modifikované kapiláry a následně přímo analyzovány technikou ASAP-MS. Přičemž pozornost byla zaměřena na přítomnost signálu odpovídající helianyl oktanoátu jakožto specifické složky pylového zrna slunečnice. Signál zmíněné látky byl pozorován ve všech spektrech s klesající intenzitou v závislosti na snižujícím se počtu analyzovaných pylových zrn, avšak vždy dostatečně odlišený od pozadí ve spektru. Dosažené výsledky potvrdily využitelnost zavedeného postupu k analýze jednoho pylového zrna umožňující jeho identifikaci a klasifikaci.

Modifikovanou ASAP-MS techniku je možno využít k rychlé a přímé mikroanalýze rozmanitých pevných materiálů rostlinného původu bez předchozí úpravy studovaného vzorku a současně nabízí další možnosti pro analýzu struktur na úrovni jedné buňky nebo buněčné struktury.

¹ Schulz S., Arsene C., Tauber M., McNeil J. N.: Phytochem. 54, 325 (2000).

Poděkování patří grantovému projektu Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2023_027).

LIPIDOMIC PROFILING OF LESS ABUNDANT LIPIDS IN HUMAN BLOOD BY HILIC/MS

ONDŘEJ PETERKA¹, ALESSANDRO MACCELLI¹, ROBERT JIRÁSKO¹, ZUZANA VAŇKOVÁ¹, JAKUB
IDKOWIAK¹, ROMAN HRSTKA², MICHAL HOLČAPEK¹

¹ University of Pardubice, Department of Analytical Chemistry, Pardubice, Czech Republic.

² Research Centre for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

e-mail: ondrej.peterka@upce.cz

The full characterization of the human lipidome is an actual challenge in the lipidomics, but lipids are highly diverse biomolecules with various concentration levels in the biological matrix, making it difficult to determine large numbers of lipids in one analytical method. Injection of the concentrated extract leads to the saturation of the detector or contamination of the mass spectrometer, and signal of a low-abundant lipids is missing in diluted extracts. However, the lipidomic composition usually reflects the actual state of the organism caused by various diseases, such as cancer, neurodegenerative diseases, and cardiovascular diseases. Analysis of all lipid classes within their biosynthetic pathways is therefore essential for understanding lipid dysregulations in human metabolism.

The new hydrophilic interaction liquid chromatography – mass spectrometry (HILIC/MS) method was developed with a focus on the less abundant lipid species in human plasma and serum. The chromatography and mass spectrometry conditions were optimized using 32 standards representing the same number of lipid subclasses. The method is based on the switch of highly abundant lipid classes to the waste, preventing contamination of the mass spectrometer, which enables injection of concentrated lipidomic extract. Highly confident identification based on the combination of high mass accuracy, retention time and retention dependencies in positive and negative ion modes was used, resulting in the identification of 246 lipid species from 24 lipid subclasses in pooled human plasma. The method was validated based on human plasma spiked by 31 internal standards and used for quantitative analysis of SRM 1950 human plasma. In total, 169 lipid species were quantified, and generated results of obtained concentrations were comparable with literature.

Finally, the method was used for the investigation of the lipidomic profile of serum samples obtained from 25 pancreatic cancer patients (PDAC) and 25 healthy controls. Statistical analysis (p-value, VIP values, and fold change) and statistical projection methods (PCA-X, OPLS-DA, S-plot, box plots, and network maps) revealed significant differences in lipid concentrations. In the PDAC samples, the dysregulation corresponding with bonding of fatty acid, where phosphatidylethanolamines (PE) with acyl bonds are upregulated, while PE with ether/plasmenyl bond are downregulated. Downregulations are also observed for lysophospholipids containing C18:2. Moreover, we observe significant downregulation of sphingolipids (SL) with very-long N-acyl chains, together with upregulation of SL with shorter N-acyl chains. These dysregulations are observed in the whole metabolic cascade of SL from ceramide to glycosylated ceramide, indicating the metabolic disorder in the synthesis of ceramide caused by cancer.

This work was supported by Czech Science Foundation (GAČR) project No. 21-20238S.

RAPID AND EFFICIENT LC-MS/MS DIAGNOSIS OF INHERITED METABOLIC DISORDERS: A SEMI-AUTOMATED WORKFLOW FOR ANALYSIS OF ORGANIC ACIDS, ACYLGLYCINES, AND ACYLCARNITINES IN URINE

BARBORA PISKLÁKOVÁ¹, JAROSLAVA FRIEDECKÁ¹, ELIŠKA IVANOVOVÁ¹, EVA HLÍDKOVÁ², VOJTĚCH BEKÁREK², MATÚŠ PRÍDAVOK^{1,3}, ALEŠ KVASNIČKA¹, TOMÁŠ ADAM^{2,4,5} DAVID FRIEDECKÝ^{1,2}

¹Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Czech Republic

²Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc

³Department of Laboratory Medicine, Centre for Inherited Metabolic Disorders, National Institute of Children's Diseases, Bratislava, Slovakia

⁴Institute of Molecular and Translational Medicine, Czech Advanced Technology and Research Institute (CATRIN), Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic

⁵Faculty of Health Care, Slovak Medical University, Banská Bystrica, Slovakia

e-mail: barbora.pisklakova@upol.cz

Urinary organic acid (OA) analysis is an important part of the diagnosis of inherited metabolic disorders (IMDs), treatment monitoring and detecting possible metabolic crisis. Clinical manifestations of IMD are usually non-specific, thus laboratory analysis of specific biomarkers is crucial for the differential diagnosis. Routinely, OA analysis is performed by GC-MS, which has certain advantages, however, it also has certain shortcomings such as the time-consuming sample preparation and data evaluation and a low sensitivity for OA conjugates. Therefore, an LC-MS/MS method has been developed covering a total of 146 metabolites from a range of urinary organic acids, acylglycines and acylcarnitines. Sample preparation only includes urine dilution to same creatinine concentration and addition of internal standards. Analytes are separated in 26 minutes on the Acquity UPLC HSS T3 C18 (1.8 µm, 100 x 2.1 mm) Waters column using Exion LC (Sciex) and analysed by QTRAP 6500+ (Sciex) in scheduled MRM mode. Raw data processing is quick and easy as well as the actual data evaluation and diagnostics. A robust standardised value calculation as a data transformation was applied for easy evaluation of complex data. Multiple variables plots in GraphPad Prism software were introduced for simple and automatic data visualisation. The workflow also includes plotting the IMD metabolic network created in Cytoscape software, which can be used to monitor changes in biomarker levels in individual patients and to evaluate dysregulations in their metabolism. The method has been analytically and clinically validated, more than 800 clinical urine samples have already been analysed and 34 IMDs have been correctly diagnosed by this platform. The combination of three groups of biomarkers and the fact that all isomers can be separated allows to diagnose more than 80 IMDs. This work was published in May this year in D1 journal¹.

¹Pisklákova, B., Friedecká, J., Ivanovová, E., Hlídková, E., Bekárek, V., Prídavok, M., Kvasnička, A., Adam, T. & Friedecký, D.: Clin. Chem. Lab. Med. (2023). DOI: 10.1515/cclm-2023-0084.

This work was supported by the Czech Health Research Council AZV CR, NU20-08-00367 and by the Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (FNOL, 00098892).

DIGITÁLNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NANOČÁSTICOVÝCH ZNAČEK POMOCÍ IR LASEROVÉ ABLACE SPOJENÉ S SP ICP MS

MAREK STIBOREK¹, LENKA JINDŘICHOVÁ¹, STANISLAVA MELIORISOVÁ¹, ANTONÍN
BEDNAŘÍK¹, VADYM PRYSIAZHNYI¹, JIŘÍ KROUPA², PAVEL HOUŠKA², BARBORA ADAMOVÁ³,
JARMILA NAVRÁTILOVÁ³, VIKTOR KANICKÝ¹, JAN PREISLER¹

¹Masarykova univerzita, Ústav chemie, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, ČR

²Vysoké učení technické v Brně, Výzkumné centrum automatické manipulace, Technická 2896/2, 616 69 Brno, ČR

³Masarykova univerzita, Ústav experimentální biologie, Kamenice 753/5, 625 00, Brno, ČR

e-mail: m.stiborek@mail.muni.cz

V této práci je prezentována nová technika digitálního mapování biomarkerů ve tkáních založená na desorpci a přesném počítání značek zlatých nanočástic (Au NP) za pomoci infračervené laserové ablace spojené se zobrazovací hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem v režimu detekce jednotlivých částic (IR LA SP ICP MS).¹ Transportní účinnost Au NP optimalizovaného IR ablačního systému včetně ablační cely dosahuje 83 %. Ve srovnání s konvenční ultrafialovou (UV) LA dochází během procesu laserové ablace k minimálnímu rozpadu zlatých nanočástic díky jejich nízké absorpci při vlnové délce 2 940 nm. Tento přístup k detekci NP je demonstrován na zobrazování proliferačního markeru jaderného proteinu Ki-67 ve 3D buněčných agregátech (sféroidech) buněčných linií kolorektálního karcinomu HT29 a HCT116 pomocí dvoustupňové metody barvení s biotinylovanou monoklonální protilátkou anti-Ki-67 a konjugátu streptavidinu s Au NP. Výsledky jsou porovnávány s běžnými technikami, jakými jsou konfokální fluorescenční mikroskopie (CFM) a UV LA ICP MSI. Protein Ki-67 byl vybrán díky jeho charakteristickému rozložení ve sféroidu, kde jeho nejvyšší koncentrace je ve vnější proliferační zóně sféroиду a rychle klesá směrem k nekrotickému jádru. Přesné počítání 20nm Au NP s detekčním limitem jedné částice na pixel umožňuje vytvářet ostré digitální mapy distribuce specifických biomarkerů ve tkáni. Kromě toho je v důsledku nepřítomnosti specií absorbujících IR záření silně potlačena desorpce nespecificky vázaných NP značek z oblasti mimo sféroid (sklíčko).

¹ Stiborek M., Jindřichová L., Meliorisová S., Bednařík A., Prysiazhnyi V., Kroupa J., Houška P., Adamová B., Navrátilová J., Kanický V., Preisler J.: Anal. Chem. 94, 51 (2022).

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury České republiky (18-16583S a 21-12262S) a Grantové agentury Masarykovy univerzity (MUNI/A/1325/2021).

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

Sdělení s lichými pořadovými čísly budou prezentována v úterý 12. září 2023, 13:00 - 13:45 a ve čtvrtek 14. září 2023, 18:30 - 19:15. Sdělení se sudými pořadovými čísly budou prezentována v úterý 12. září 2023, 18:15 - 19:00 a ve čtvrtek 14. září 2023, 13:00 - 13:45. Tři nejlepší plakátová sdělení budou oceněna „Cenou za nejlepší plakátové sdělení“. Výherci získají hrazený registrační poplatek na příští Školu hmotnostní spektrometrie v roce 2024. Sponzorem soutěže je společnost Pragolab s.r.o.

1. **Behner A**, Palicova J., Tobolkova A., Chrpova J., Stranska M.

Metabolomic fingerprinting of fusarium isolates after pulsed electric field (PEF) treatment performed by UHPLC-HRMS/MS

2. **Brtková B.**, Bajerová M., Šimek M., Nešporová K., Šulc P., Kulhánek J., Skuhrovcová K., Hermanová M.

Characterization of the 3-(2-furyl)acrylic derivative of hyaluronan using MS techniques

3. **Budíková B**, Novák O., Šířoká J.

Using mass spectrometry for study of salicylic acid metabolism in plants

4. **Camfrlová M.**, Kvasnička A., Friedecký D., Brumarová R., Pavlíková M., Pavelcová K., Mašíňová J., Hasíková L., Závada J., Pavelka K., Ješina P., Stibůrková B.

Lipidomická analýza pacientů s hyperuriémií a dnou

5. **Cermanová K.**, Novák O., Karady M.

Quantification of Yang cycle intermediates and related compounds by LC-MS/MS in plants

6. **Coufalíková K.**, Koudelka Š., Vidová V., Přibyl D., Dvrtělová G., Hecht H., Klánová J., Price E. J.

Central Czech node of European Environmental Exposure Assessment Research Infrastructure (EIRENE-CZ)

7. **Dobešová D.**, Brumarová R., Prídavok M., Kvasnička A., Pisklákova B., Ivanovová E., Friedecký D.

Komplexní metabolická studie vzorků moči a séra pacientů trpících deficitem ATP syntasy

8. **Dohnalová K.**, Klíma K., Chalupský K., Procházka J., Sedláček R.

Flow injection analysis of lipids in INSIG1 gene-deficient mice

9. **Doležalová T.**, Průšová N., Behner A., Stránská M.

High performance liquid chromatography coupled with Q-orbitrap mass spectrometry

10. **Gazárková T.**, Kočová V., Vlčková H., Švec F., Nováková L.

Can implementation of post-column infusion in LC-MS/MS workflow enhance the ionizability of endogenous steroids?

11. Horáček N., Kyjaková P.

Clustering of molecular networks for GCxGC-MS data processing

12. Meledina A., Korecký M., Květoň M., Fabián O., Kubánek M., Melenovský V., Cvačka J., Hubálek M.

Proteomická analýza srdeční tkáně postižené amyloidózou. Porovnání výsledků analýzy řezů ze zmražené tkáně a vzorků fixovaných formaldehydem (FFPE)

13. Ivanovová E., Hlídková E., Bekárek V., Kotková M., Friedecký D.

Rychlé a spolehlivé rozlišení galaktitolu od mannitolu a sorbitolu pomocí LC MS/MS metody aplikované do klinické praxe pro diagnostiku galaktosémie a dalších poruch metabolismu sacharidů

14. Ondráková K., Javorek M., Preisler J., Bednařík A.

MALDI MSI lipidů a jejich izomerů pomocí nové duální matrice basic blue 7

15. Keršňáková Z., Lemak I., Vabcová J., Lučivjanská V., Hrouzková S.

One single run analysis of selected emerging organic pollutants in groundwater samples by LC-MS/MS

16. Knížková K., Cihlářová P., Kuchař M.

Stanovení vybraných biologicky aktivních látek maralího kořene (*Rhaponticum carthamoides*) metodou HPLC-MS/MS

17. Koltavá M., Peška J., Bednařík A., Preisler J., Dryahina K., Španěl P.

Využití tenkých vrstev kovů k ionizaci a stanovení těkavých látek pomocí LDI MS

18. Kubát M., Česla P., Roušar T.

Optimisation of Gradient Hydrophilic Interaction High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Method for Analysis of Glutathione Metabolism

19. Letocha P., Matějková A., Stáník J., Tomanienková A., Navrátilová J., Preisler J.

Stanovení transportní účinnosti SPIRLA ICP MS

20. Libenská L., Pulkrabová J., Drábová L.

Optimalizace metody stanovení vitaminu B9 v zelenině

21. Loučková A., Sedlák J., Hajšlová J.

Metabolomická analýza sekundárních metabolitů plodů slivoně švestky napadených virem šarky švestky za účelem objevení nových látek s antivirovými účinky

22. Maříková T., Pintová A., Rathouský J., Kuchař M.

Fotokatalytická degradace metamfetaminu z vody

23. Martiník J., Svoboda Z., Pernica M.

Využití hmotnostní spektrometrie v pivovarsko-sladařské praxi

24. Meledina A., Kučková Š.

Určení zvířecího původu tepelně opracovaných kostí pomocí proteomického přístupu

25. Pavlíček V., Suchanová M.

Stanovení obsahu kanabinoidů v konopí a konopných produktech pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

26. Pilařová V., Plachká K., Gazárková T., Garrigues J.C., Nováková L.

Effect of make-up solvent on UHPSFC-MS response: comparison of ESI and APCI

27. Plachká K., Pilařová V., Gazárková T., Garrigues J.C., Nováková L.

Artificial neural networks to study correlations between molecular descriptors and responses in SFC-MS with electrospray and unispray ionization

28. Řehulka P., Klimentová J., Vozandychová V., Řehulková H., Pudil R., Stulík J.

Profilování plazmatických vzorků pacientů s dilatační kardiomyopatií pomocí relativní proteomické analýzy

29. Řehulková H., Dlabková A., Vlčková V., Matula M.

Stanovení thiodiglykolu jako biomarkeru expozice sirnému yperitu

30. Škamor J., Bendařík A., Preisler J.

Zobrazovací hmotnostná spektrometrie nanočástic za použití laserové desorpce/ionizace a analyzátoru doby letu

31. Šmak P., Fačkovcová D., Kostolanská K., Gregorová J., Bartečková E., Juřica J., Ustohal L., Hořínková J., Linhartová P., Peš O.

Segmented hair cortisol analysis by online solid phase extraction liquid chromatography mass spectrometry

32. Seličová H., Coufalíková K., Koudelka Š., Klánová J., Price E. J.

Sledování vlivu užívaných léčiv na souhrn hostitele a jeho střevní mikrobioty pomocí automatizované funkční metabolomiky

33. Smolkova D., Chmelik R., Gregus M., Vesely H., Pizova H., Bobal P., Lavicka J.

Characterization of newly synthesized labels for analysis of oligosaccharides and glycans by LC/FLD-MS

34. Sovová K., Španěl P., Jašík J., Dryahina K.

Vysoce citlivé a robustní hmotnostní spektrometrické metody pro rychlé analýzy stopových VOC ve vzduchu

35. Spesyvyi A., Žabka J., Polášek M., Charvat A., Schmidt J., Postberg F., Abel B.

Mass spectrometry methods and instrumentation for the space dust generation

- 36. Svojanovský V.,** Stiborek M., Krásenský P., Kroupa J., Houška P., Kanický V., Mašlaňová I., Farka Z., Macháčková E., Máčala J., Preisler J.

Detekce jednotlivých značek v imunostanovení pomocí LA ICP MS

- 37. Vágnerová M.,** Nemeškalová A., Sýkora D., Kuchař M.

Analýza fytoalkanabinoidů v kosmetických krémech s využitím metody UHPLC MS/MS

- 38. Vaňková Z.,** Peterka O., Idkowiak J., Jirásko R., Mohelníková Duchoňová B., Loveček M., Melichar B., Holčápek M.

Reversed-phase UHPLC/MS Approach for the Analysis of Lipids in Human Plasma from Pancreatic Cancer Patients and Long Survivors

- 39. Vosáhllová Z.,** Studzińska S., Gilar M., Kalíková K.

Analýza terapeutických oligonukleotidů v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii

- 40. Vrkoslav V.,** Strnad S., Menger A., Fabián O., Rybáček J., Kubánek M., Melenovský V., Maletínská L., Cvačka J.

Napařování stříbra pro zobrazování distribuce cholesterolu v živočišných tkáních s využitím laserové desorpce/ionizace

METABOLOMIC FINGERPRINTING OF *FUSARIUM* ISOLATES AFTER PULSED ELECTRIC FIELD (PEF) TREATMENT PERFORMED BY UHPLC-HRMS/MS

ADAM BEHNER¹, JANA PALICOVA², ANNA TOBOLKOVA¹, JANA CHRPOVA², MILENA STRANSKA¹

¹ Department of Food Analysis and Nutrition, University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28, Prague, Czech Republic

² Crop Research Institute, Drnovská 507/72, 161 06, Prague, Czech Republic

e-mail: Adam.Behner@vscht.cz

Micromycetes of the genus *Fusarium* are widespread pathogens that cause fungal diseases in a wide range of crops. Such contaminations are associated with economic losses and the formation of mycotoxins, the latter of which poses a serious health risk to people and farm animals. A decontamination method that offers a potential solution is pulsed electric field (PEF). Here, we investigate the metabolomic changes of *Fusarium* isolates (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*) after the PEF treatment of spores and cultivation on PDA media (each experiment in ten replicates). The mycelia of treated and untreated *Fusarium* fungi, together with their culture media, were extracted by methanol and analyzed by metabolomic fingerprinting performed by ultrahigh-performance liquid chromatography and high-resolution tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS). To acquire MS and MS/MS data, the TOF MS method (*Full scan*) and the Information Dependent Acquisition (IDA) method were used. The MS/MS spectra were collected for the eight most intensive ions of the MS spectra throughout the chromatographic run. For data processing and interpretation, the freely available MS-DIAL – MS-CleanR – MS-Finder software platform was used. Additional software utility MS-CleanR able to effectively filter the ‘blank’ ions, improbable ions and various artefacts, finally reduced the number of input variables by 85%, preventing overfitting of multivariate statistical models and improving the annotation rate of biomarkers. After creating the OPLS-DA models separately for each *Fusarium* species, statistically significant features were selected using variable importance in the projection (VIP, VIP score>1) and the receiver operating characteristic (ROC, AUC=1) methods. Both filters were applied simultaneously in an orthogonal way to ensure proper statistical filtration and to keep only the really strong biomarkers relevant for further data interpretation. The metabolomes of the treated and untreated samples showed significant differences for each *Fusarium* species, enabling tentative identification of about 25 biomarkers upregulated by the PEF treatment, including methoxyanilines, aryl thioethers, and oligopeptides. The biochemical interpretation of these biomarkers is planned as a next future step.

Acknowledgement: Acknowledgement: This work was financially supported by the Czech Science Foundation (project No 20-14649S), METROFOOD-CZ research infrastructure project (MEYS Grant No: LM2018100)

CHARACTERIZATION OF THE 3-(2-FURYL)ACRYLIC DERIVATIVE OF HYALURONAN USING MS TECHNIQUES

BARBORA BRŤKOVÁ^{1,2}, MARTINA BAJEROVÁ^{3,4}, MATĚJ ŠIMEK¹, KRISTINA NEŠPOROVÁ¹, PETR
ŠULC¹, JAROMÍR KULHÁNEK¹, KRISTÝNA SKUHROVCOVÁ¹, MARTINA HERMANNOVÁ¹

¹Contipro a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 51 Dolní Dobrouč, Czech Republic

²Faculty of Science, Palacký University, 17. Listopadu 12, 779 00 Olomouc, Czech Republic

³Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, 612 65 Brno, Czech Republic

⁴Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

barbora.brtekova@contipro.com

Hyaluronic acid (HA) is a biodegradable polymer naturally occurring in the human body, where it fulfills a whole range of functions, from joint lubrication to angiogenesis. One of its considered uses within the category of medical preparations is also as a carrier of active substances. However, its naturally high solubility in water is a disadvantage for this use in terms of long-term stability. By hydrophobizing HA using 3-(2-furyl) acrylic acid, we obtain a furanoyl derivative of HA (F-HA). This polymer is capable of crosslinking under the influence of UV light, which results in increased resistance and stability of this derivative in an aqueous environment.

The aim of this study is to create a methodology suitable for the characterization, quantification of F-HA, as well as detection of its degradation products and possibly harmful metabolites using available LC-MS/MS instrumentation and to apply this methodology for analysis of samples in an *in vitro* and *in vivo* study.

The tested material was F-HA with a mass of 96.5 kDa and a degree of substitution of 4.9% (according to NMR). The parameters were selected based on previous use in the development of a potential nanofibrous medical device ¹. A methodology for the determination of an octasaccharide with one furanoyl group (F-AN8) was also created, based on our previous work ². In these analyses, degradation by BTH and SpHyl hyaluronidases was used in sample preparation. Separation was carried out in a Vanquish-H system on reversed phase column, with subsequent detection using LTQ Fortis Plus and Orbitrap Exploris 240 systems. *In vitro* study was performed using HepG2 cells and S9 fraction. *In vivo* study was performed, utilizing intravenous and intraperitoneal application of tested material on a mouse model C57Bl/6J.

Our results show that F-HA is rapidly degraded by both tested enzymes in an acetate buffer environment of pH 5.3. The main products of SpHyl degradation are the unmodified unsaturated hyaluronan disaccharide (dHA2) and dHA2 with one substituted group (dHA2-F). dHA2 with a benzoyl group, occurring as a by-product of F-HA synthesis, was also present. A novel method, suitable for quantification of the main products of SpHyl degradation, was developed using a triple quadrupole, with a linear range of 10-10,000 ng.mL⁻¹. A simple method for the determination of free furan and 3-(2-furyl)acrylic acid in plasma was also developed, by GC-MS and LC-MS respectively.

Among the detected BTH enzymatic degradation products were unmodified saturated oligosaccharides (oHA), along with oHAs with 1-2x substituted groups. It was hypothesized that these degradation products would also be formed in a living organism during an *in vivo* study, hence the metabolic screening for both expected and unexpected metabolites was carried out in *in vitro* and *in vivo* samples, using Thermo's Orbitrap Exploris 240.

¹Skuhrovcová S. and 10 co-authors: Carbohydr. Polym. 276, 118785 (2022),

²Brtková B., Hermannová M., Chmelař J., Nešporová K., Kocurková A., Kubala L., Ambrožová G., Velebný V., Šimek M.: Carbohydr. Polym. 299, 120201 (2023)

USING MASS SPECTROMETRY FOR STUDY OF SALICYLIC ACID METABOLISM IN PLANTS

BEATA BUDÍKOVÁ¹, ONDŘEJ NOVÁK¹, JITKA ŠIROKÁ¹

¹ Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences & Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

e-mail: beata.budikova@upol.cz

Plant immunity is defined as the capacity of plants to prevent or ward off biological attacks by pathogens. It involves the recognition of the pathogen by specific receptors and the triggering of signalling pathways leading to processes that help plants to defend themselves. The defence signalling is mediated by cross-communication of groups of plant hormones. Salicylic acid (SA) is one of the most pronounced plant hormones involved in control of immunity and defence mechanisms in plants. Defence related SA accumulation comes from its biosynthesis, transport and possible release from some of its metabolites. The involvement of SA biosynthetic pathways as well as extend of SA metabolism in various plant species are still under investigation. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is one of the most commonly used analytical technics in plant hormone quantification. The selectivity and high sensitivity enables to track typically low concentrations of phytohormones. The comprehensive multiclass phytohormone LC-MS/MS profiling methods usually include only SA (as the active compound) from the group of SAs. LC-MS/MS methods for determination of defence related phytohormones focus on SA, or some on its biosynthetic precursors or metabolites. In this study, we focus on identification of new SA metabolites and development of liquid chromatography mass spectrometry methods for targeted, semi- or untargeted analysis of biosynthetic precursors and metabolites of SA in plants.

The authors thank Palacký University (IGA_PrF_2023_031) and grant (22-17435S) from the Czech Science Foundation (GAČR) for funding.

MARKÉTA CAMFRLOVÁ¹, ALEŠ KVASNIČKA¹, DAVID FRIEDECKÝ¹, RADANA BRUMAROVÁ¹,
MARKÉTA PAVLÍKOVÁ², KATEŘINA PAVELCOVÁ³, JANA MAŠÍNOVÁ³, LENKA HASÍKOVÁ³,
JAKUB ZÁVADA³, KAREL PAVELKA³, PAVEL JEŠINA⁴, BLANKA STIBŮRKOVÁ^{3,4}

¹Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

²Katedra pravděpodobnosti a matematické statistiky, Matematicko-fyzikální fakulta, Univerzita Karlova

³Revmatologický ústav, Praha

⁴Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN, Praha

e-mail: camfrlova.marketa01@upol.cz

Dna je jedním ze závažných civilizačních onemocnění, které je způsobeno vysokou koncentrací kyseliny močové v krvi (hyperurikémie). Jakmile tato koncentrace přesáhne rozpustnost v tělních tekutinách, tak dochází k ukládání ve formě krystalů solí urátů do kloubů, které způsobuje pacientům velké bolesti a chronické záněty. V této práci byly zkoumány změny lipidomického profilu krevní plazmy pacientů v závislosti na patologických stavech spojených s abnormální koncentrací kyseliny močové v organismu (hyperurikémie a dna), které byly porovnávány se zdravými kontrolami.

Cílem této práce bylo popsat patobiochemii těchto onemocnění a navrhnout potencionální lipidomické markery sloužící ke včasné diagnostice a sledování progresu onemocnění hyperurikémie a dny, které se často vyskytují ve stavech latence, kdy k jejich projevu dochází až při rozvinutí závažnějších stádií v podobě dnových záchvatů a chronických bolestí kloubů.

V experimentální části byla provedena lipidomická analýza krevní plazmy pomocí kapalinové chromatografie na koloně s reverzní fází následované tandemovou hmotnostní spektrometrií za účelem cílené lipidomické analýzy. Bylo semikvantifikováno přes 600 lipidů z celkem 15 lipidových tříd ve 271 vzorcích krevní plazmy pacientů s hyperurikémií a dnou, 70 zdravých kontrolách, 68 vzorcích kontroly kvality a 5 vzorcích SRM plazmy. U vzorků pacientů byly pozorovány systematické změny v lipidových třídách glycerofosfolipidů (PC, PE, PS, LPC, LPC O-/P-) a triacylglycerolů.

Tyto výsledky potvrdily hypotézy předešlých vědeckých prací, které se snažily nalézt lipidové markery pro diagnostiku patologií spojených s narušením homeostázy metabolismu lipidů spojených s hyperurikémií a dnou. Byly potvrzeny stejné změny v lipidomu u pacientů jako byly dříve popsány v literatuře na myších modelech a byly také objeveny nové systematické změny v lipidomu v souvislosti s patologií. Lyso- formy fosfatidylcholinů a jejich plasmalogenů a plasmanylů (LPC, LPC O- a LPC P-) by mohly sloužit jako potenciální markery onemocnění a poukazují také na dysregulaci enzymu LPCAT3 vlivem zvýšené koncentrace kyseliny močové.

Grantová podpora: AZV NU22-01-00465, DRO (FNOL 00098892) a DRO (Institute of Rheumatology 00023728, VFN 64165).

QUANTIFICATION OF YANG CYCLE INTERMEDIATES AND RELATED COMPOUNDS BY LC-MS/MS IN PLANTS

KATEŘINA CERMANOVÁ¹, ONDŘEJ NOVÁK¹, MICHAL KARADY¹

¹Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences & Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

e-mail: katerina.cermanova01@upol.cz

As a primary source of sulfur, the amino acid methionine represents a fundamental compound in plant metabolism. Through a set of methionine-recycling reactions, collectively called the “Yang cycle”, and the compounds arising from them, it influences essentially all plant processes. Its first metabolite, *S*-adenosylmethionine (SAM) represents one of the most used substrates for enzymatic reactions in plants and mammals, providing the role of methyl donor. In plants, SAM serves as a precursor of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, which is converted to indispensable gaseous plant hormone ethylene. SAM also plays a crucial role in polyamine biosynthesis. Accurately determining the levels of Yang cycle metabolites is therefore very important in understanding plant ontogenesis and various aspects of plant life, however validated profiling methods are lacking. Quantification of these highly polar compounds presents a challenge due to their low retention on reversed-phase columns, as well as the chemical instability and low abundance of some of these metabolites. In this study, we have developed an UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of these metabolic intermediates based on isotope dilution. To improve retention and ionization efficiency, amino groups were derivatized and the chromatographic separation was achieved using a C18 column with water and acetonitrile containing formic acid as mobile phases. Multiple reaction monitoring mode was employed for qualitative and quantitative detection of the target metabolites. In addition to metabolic profiling of *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum* seedlings, we have further used the method to study the changes in endogenous levels of these analytes upon stress treatments.

The authors thank Palacký University (IGA_PrF_2023_031) and junior grant (20-25948Y) from the Czech Science Foundation (GAČR) for funding.

CENTRAL CZECH NODE OF EUROPEAN ENVIRONMENTAL EXPOSURE ASSESSMENT RESEARCH INFRASTRUCTURE (EIRENE-CZ)

KATEŘINA COUFALÍKOVÁ¹, ŠTĚPÁN KOUDELKA¹, VERONIKA VIDOVÁ¹, GABRIELA PŘIBYL
DOVRTĚLOVÁ¹, HELGE HECHT¹, JANA KLÁNOVÁ¹ & ELLIOTT J. PRICE^{1,*}

¹RECETOX Centre, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, Brno 60200, Czech Republic

e-mail: katerina.coufalikova@recetox.muni.cz; elliot.price@recetox.muni.cz

The exposome concept encourages holistic study of environmental exposures with potential to advance our understanding about the environmental contribution to phenotype and health. Yet, conceptual ambiguities and practical limitations remain unaddressed, slowing implementation of exposome-driven research. The establishment of a European Environmental Exposure Assessment Research Infrastructure (EIRENE; <https://www.eirene-ri.eu/>) aims to bridge and harmonize capacities of member states to address scientific and societal challenges in the areas of chemical exposure and population health. As the Czech Hub within EIRENE, initial efforts at RECETOX have focused upon i) a generalization of the exposome concept to provide a clear position within a multi-omics framework and ii) the development of open resources tailored towards high-resolution mass spectrometry (HRMS) based chemical exposomics. Through rationalizing exposures as contact events, we reattributed the exposome to represent environmental exposure events. Subsequently, by uncoupling exposure and biological response we integrated an exposomics layer into the omics layers scheme and clarified the perspective divide between metabolomics and internal chemical exposomics. Moving from concept to practice, the provision of open spectral libraries containing hundreds of anthropogenic compounds not included in alternative open resources alongside retention models for novel stationary phases is advancing the annotation capabilities for workflows employing gas and liquid chromatography coupled to HRMS. The RECETOX Biomarker Analytical Laboratories have released 19 SOPs & high-resolution substructure-annotated mass spectra of ~1000 compounds; ~80% unique with respect to other open spectral libraries (<https://zenodo.org/communities/rcx-balri>). Furthermore, the open development of data processing pipelines in the Galaxy framework enables scalable, reproducible analysis of generated data (<https://github.com/RECETOX>). The pipelines complement and extend comparable efforts within the metabolomics community, adding specific capabilities tailored towards the analysis of chemical exposure agents. Enhanced cooperation between biological (emphasizing responses) and environmental (emphasizing exposures) research communities will be necessary to advance the factoring of phenotypic variance into genetic and environmental components. Increased exchange between scientists studying metabolism and/or internalized chemical agents would provide mutual benefits. Future EIRENE-CZ developments will be presented and opportunities to enhance cooperation proposed and discussed.

RECETOX research infrastructure RECETOX RI (LM2023069), H2020 CETOCOEN Excellence 857560 and OP VVV CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_043/0009632). Computational resources provided by the e-INFRA CZ (LM2018140).

KOMPLEXNÍ METABOLOMICKÁ STUDIE VZORKŮ MOČÍ A SÉR PACIENTŮ TRPÍCÍCH DEFICITEM ATP SYNTASY

DANA DOBEŠOVÁ¹, RADANA BRUMAROVÁ¹, MATÚŠ PRÍDAVOK^{1,2}, ALEŠ KVASNIČKA¹,
BARBORA PISKLÁKOVÁ¹, ELIŠKA IVANOVÁ¹, DAVID FRIEDECKÝ¹

¹ Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Česká republika

² Centrum dědičných metabolických poruch, Národní ústav dětských chorob, Bratislava, Slovenská republika

e-mail: dobesova.dana147@gmail.com

Dědičné metabolické poruchy (DMP) tvoří velkou skupinu závažných onemocnění způsobených defekty enzymů nebo jiných proteinů. Řadí se k nim například také poruchy oxidativní fosforylace v mitochondriích. TMEM je velmi vzácné autosomálně recesivní onemocnění projevující se poruchou ATP syntasy, pátého komplexu dýchacího řetězce zodpovědného za tvorbu ATP¹. Příčinou tohoto onemocnění je mutace v genu *TMEM70*, který se podílí na stavbě struktury tohoto enzymu. Předmětem zájmu této studie bylo popsat patobiochemické procesy u pacientů trpících touto poruchou.

Pro komplexní popis změn v metabolickém profilu TMEM pacientů bylo použito 21 vzorků sér a 25 močí, které byly porovnávány s profily 38 sér a 37 močí získaných od zdravých jedinců. U pacientů se v několika případech jednalo o opakované odběry. Vzorky sér byly podrobeny cílenému metabolickému přístupu. Pro analýzu močí byla zvolena kombinace metabolomiky a metody organických kyselin². Oba typy přístupů byly provedeny pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získaná data byla následně podrobena processingu a statistickému zpracování, zahrnující jednorozměrné a vícerozměrné (ne)supervizované metody.

Cílená metabolická analýza detekovala v sérových vzorcích 124 metabolitů. Analýza močových vzorků odhalila 214 metabolitů. Jednalo se o aminokyseliny a jejich deriváty, aminy, acylkarnitiny, acylglyciny, peptidy, koenzymy, organické kyseliny, puriny a pyrimidiny a sacharidy. U obou materiálů byly zjištěny významné rozdíly v metabolickém profilu pacientů v porovnání se zdravými kontrolami, především v hladinách organických kyselin a aminokyselin. Sérový a močový profil TMEM pacientů byl výrazně ovlivněn zvýšenými hladinami meziproduktů metabolismu pyruvátu a citrátového cyklu. To mohlo souviset přímo s deficitem ATP syntasy, která je závislá v rámci dýchacího řetězce na dodávce elektronů ze zmíněného cyklu³. Buňka je následně nucena k podpoře anaerobního dýchání, a tedy k aktivaci glykolýzy a zvýšené produkci pyruvátu a laktátu. Po objasnění všech významných změn mohou výsledky naší studie přispět k pochopení patobiochemie související s tímto onemocněním a zlepšit tak i diagnostické přístupy.

¹ Hejzlarová, K. et al.: Biochim Biophys Acta. 2011, doi: 10.1016/j.bbabo.2010.10.005.

² Pisklák, B. et al.: Clin Chem and Lab Med. 2023, doi: 10.1515/cclm-2023-0084.

³ Chen, Q. et al.: Cell Metab. 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.002.

Tato práce byla podpořena Agenturou pro zdravotnický výzkum (AZV) České republiky (NU20-08-00367). Jeden z autorů tohoto projektu je členem Evropské referenční sítě pro vzácné dědičné metabolické poruchy (MetabERN).

FLOW INJECTION ANALYSIS OF LIPIDS IN *INSIG1* GENE-DEFICIENT MICE

KLÁRA DOHNALOVÁ^{1,2}, KRYŠTOF KLÍMA¹, KAREL CHALUPSKÝ¹, JAN PROCHÁZKA¹, RADISLAV SEDLÁČEK¹

¹ Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Czech Centre for Phenogenomics

² First Faculty of Medicine, Charles University

e-mail: klara.dohnalova@img.cas.cz

Insulin-induced gene 1 protein (*Insig1*) is critical for metabolism of lipids and cholesterol. This transmembrane protein is located in the endoplasmic reticulum, where it maintains the homeostasis of intracellular cholesterol by promoting or inhibiting cholesterol synthesis via multiple pathways. Reduced expression of *Insig1* is often connected with certain disorders manifested by imbalances in lipid metabolism. *Insig1* thus represents a target worth of further investigation. In order to examine the effects of reduced *Insig1* function, we used a strain of mice with a deletion of the *Insig1* gene (*Insig1* KO) and focused on lipidome of their liver, as the liver is highly metabolically active and exhibits good expression of *Insig1*.

For measurement of the hepatic lipidome, we developed a flow injection analysis method with a high-resolution mass spectrometer (Orbitrap ID-X Tribrid). The measurement was based on a full-scan experiment acquired in a single run together with targeted MS-MS experiment for a more robust identification in both positive and negative ion mode. Lipid intensities obtained from raw files by LipidXplorer were quantified, analyzed and statistically evaluated using an in-house R script and the lipidr package. Using this method, we found that the deletion of *Insig1* gene causes an accumulation of cholesteroesters, particularly CE 16:0 and CE 18:0, and triacylglycerols, leading to the development of fatty liver. Additionally, we applied the flow injection method to plasma samples from the *Insig1* KO mice, but, interestingly, found no differences in detected lipids compared to control wild-type mice.

In conclusion, our study employed a comprehensive flow injection analysis method using a high-resolution instrument to identify altered lipid compounds in *Insig1*-deficient mice, providing insight on the effects of reduced *Insig1* function on their liver and plasma lipidome.

The financial support was given to CCP by the Czech Academy of Sciences RVO 68378050; by the projects LM2018126 and LM2023036 by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MEYS CZ); by the Operational Programme Research, Development and Education project CZ.02.1.01/0.0/18_15861 by MEYS CZ and European Structural and Investment Funds. Also supported by Czech Science Foundation (GAČR) (22-05167S).

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH Q-ORBITRAP MASS SPECTROMETRY

TEREZA DOLEŽALOVÁ, NELA PRŮŠOVÁ, ADAM BEHNER, MILENA STRÁNSKÁ

Department of Food Analysis and Nutrition, University of Chemistry and Technology, Technická 5, Prague 6, Czech Republic

email: dolezaat@vscht.cz

After infection of crops by microscopic filamentous fungi, mycotoxins are produced and further modified by plant enzymes. The most common mechanism of fusarium mycotoxins modification is conjugation with glucose, oligosaccharides and polysaccharides. Although this reduces the toxicity of mycotoxins to plants, enzymes present in the gastrointestinal tract or enzymes involved in certain food processing techniques are able to hydrolyse the glycosidic linkage between the carbohydrate and the mycotoxin. While the analysis of free mycotoxins is nowadays a common practice, the quantification of oligo-/polyglycosides is rather difficult, leading to underestimation of real health risk. There is thus an urgent need to develop effective approaches for their quantification.

The aim of our study was to develop an analytical method for the indirect quantification of modified trichothecenes by enzymatic hydrolysis of the cereal matrix, and subsequently to characterize in detail the mono-/oligoglycosylated mycotoxins residues.

To assure proper separation of isobaric isomers of various mycotoxins glycosides, ultra-high performance liquid chromatography with Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm × 2,1 mm; 1,8 µm) was used. A high-resolution Q-orbitrap (Thermo Scientific) was utilized for mass spectrometric detection. For quantification, the data acquired in the fullMS mode (mass resolving power 70,000 FWHM) were primarily used. For peaks confirmation, high resolution MS/MS spectra of mycotoxins and their glycosides were acquired in paralel reaction monitoring mode (PRM), with reduced mass resolving power (17,500 FWHM).

CAN IMPLEMENTATION OF POST-COLUMN INFUSION IN LC-MS/MS WORKFLOW ENHANCE THE IONIZABILITY OF ENDOGENOUS STEROIDS?

TATÁNA GAZÁRKOVÁ¹, HANA KOČOVÁ VLČKOVÁ¹, FRANTIŠEK ŠVEC¹, LUCIE NOVÁKOVÁ¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University,

e-mail: gazarkota@faf.cuni.cz

Despite numerous studies using traditional GC-MS and LC-MS methods, the accurate determination of steroid levels in biological matrices continue to pose significant analytical challenges. The liquid chromatography method encounters challenges due to the overlapping retention times, primarily resulting from the sterane core shared among steroids with minor structural modifications. Hurdles of steroid analysis from the side of mass spectrometry represent the typical loss of up to three water molecules, resulting in similar fragmentation patterns. Furthermore, different classes of steroids, including progestogens, corticosteroids, androgens, estrogens, and synthetic steroids, vary in ionization ability under ESI conditions. Hence, a comprehensive targeted analysis of steroids must consider these aspects to mitigate observed interferences and accurately determine steroid levels in biological matrices, particularly when dealing with low concentrations. The present study aims to develop a selective and sensitive high-throughput UHPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 40 steroids in rat, mouse, and human plasma, covering all aforementioned steroid classes.

Thorough optimization on the Cortecs C18 column led to the successful baseline separation of 13 interfering pairs/groups of analytes within 20 minutes. During the development of the separation method, a total of 14 stationary phase chemistries with fully and superficially porous particles were tested, using 0.1% formic acid/acetonitrile and 0.1% formic acid/methanol mobile phases and a generic gradient program. Steroid detection was performed using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) in both positive and negative modes. Critical parameters of the ionization source were optimized step by step, and the suitability was verified through a design of experiment approach. Subsequently, post-column infusion experiments were conducted to further enhance the ionization capability of steroids. Here, the effect of additive type – ammonium fluoride, ammonium formate, and ammonia, its concentration, and infusion flow rate was tested using the design of experiment. The same design of experiment was implemented to evaluate the UHPLC-MS/MS method with and without the presence of formic acid in the mobile phases.

When formic acid was absent, the enhancement of ionization efficiency 2x – 12x was observed for all analytes. Nevertheless, when formic acid was present in the mobile phase, post-column infusion did not increase MS response and, on the contrary, led to a significant decrease in MS response for some steroid classes, for example progestagens (pregnenolone metabolites), neurosteroids, estrogens, and androgens' metabolites. However, such an approach can be beneficially used for an analysis of steroids within one steroid class.

The study was supported by the Project of Specific Research SVV No. 260548, GA UK Project No. 348221, and project STARSS (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465).

CLUSTERING OF MOLECULAR NETWORKS FOR GCXGC-MS DATA PROCESSING

NATAN HORÁČEK^{1,2}, PAVLÍNA KYJAKOVÁ²

¹Faculty of Science, UK

²Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS

email: horacekn@natur.cuni.cz

Comprehensive GC coupled with mass spectroscopy is an analytical method capable of generating large and information filled data. This is possible due to second chromatographical dimension which increases the peak capacity of the chromatographical measurement and mass detector which increases the sensitivity and adds third dimension to the chromatographical data. All that information may help with the identification of targeted compound and data processing. Because of the size of the data and the number of peaks that are possible to detect it is necessary to use automatic data processing for peak finding and identification. This usually leads to hundreds to thousands of detected peaks in one run. Peak tailing is a problem in this automatic data processing because detected tailing peaks are split in to several smaller peaks with different retention times. This together with column bleed falsely increases the number of detected peaks and interferes with consecutive statistical processing.

To solve this problem we have used a molecular network as convenient method for displaying similarity between mass spectra of detected peaks. Then we applied classical graph theory algorithms for automatic detection of groups in the network. This paired with retention information from the first and second dimension led to completely unsupervised method for tailing peaks and column bleed detection. This method can be used for fast clustering and classification of real peaks based on spectra similarity.

PROTEOMICKÁ ANALÝZA SRDEČNÍ TKÁNĚ POSTIŽENÉ AMYLOIDÓZOU. POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ ANALÝZY ŘEZŮ ZE ZMRAŽENÉ TKÁNĚ A VZORKŮ FIXOVANÝCH FORMALDEHYDEM (FFPE)

ALENA MELEDINA¹, MICHAL KORECKÝ¹, MARTIN KVĚTOŇ³, ONDŘEJ FABIÁN^{2,3}, MILOŠ
KUBÁNEK², VOJTĚCH MELENOVSKÝ², JOSEF CVAČKA¹, MARTIN HUBÁLEK¹

¹ Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Flemingovo nám. 2, 160 00, Praha 6

² Institut Klinické a Experimentální Medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21, Praha 4

³ Ústav patologie a molekulární medicíny 3. LF UK a FTN, Vídeňská 800, 140 59, Praha 4

Amyloidóza je heterogenní infiltrativní onemocnění charakterizované ukládáním nerozpustných forem proteinů (amyloidů) v extracelulárních prostorech různých tkání. Může být součástí systémového amyloidového onemocnění nebo se rozvinout samostatně. Doposud bylo objeveno 36 různých forem proteinových depozic. Infiltrace a depozice může probíhat i v myokardu. Nejčastějšími typy v srdeční tkáni jsou AL a TTR amyloidóza. První varianta je způsobená depozicí monoklonálního kappa nebo lambda lehkého řetězce protilátek. TTR amyloidózu způsobuje depozice proteinu transthyretinu. Pro diagnostiku tohoto onemocnění je důležitá typizace. Proteomické techniky umožňují citlivou charakterizaci postižené tkáně a určení proteinu, který amyloidy tvoří¹. To je podstatné pro následnou terapii.

Materiálem pro proteomickou analýzu jsou vzorky endomyokardiálních biopsií, které mohou být zpracovány ve formě nativních mražených vzorků nebo řezů z formaldehydem fixovaných tkání (FFPE). V obou případech se jedná o nedostatkové vzorky, které mohou být použity pro zpracování pomocí histologických nebo jiných technik. Z toho důvodu je důležité používat minimální množství vzorků pro správnou typizaci onemocnění.

V naší studii zpracováváme oba typy vzorků vhodnými proteomickými metodami. V případě vzorků ze zmražené tkáně používáme metodu štěpení proteinů na filtru (eFASP²). Pro zpracování vzorků FFPE používáme metodiku se zapojením detergentu RapiGest³. Obě metodiky identifikují ve vzorcích srdeční tkáně proteiny a obě metody dokáží zachytit proteiny, které amyloid mohou způsobit.

1. Noborn, F. et al. (2023) Subtyping of cardiac amyloidosis by mass spectrometry-based proteomics of endomyocardial biopsies, *Amyloid*, 30:1, 96-108.
2. Erde, J., Loo, R. O. & Loo, J. A. (2014) Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J. Proteome Res.* **13**, 1885–1895.
3. Fahrner, M. et al (2021) Proteome biology of primary colorectal carcinoma and corresponding liver metastases, *Neoplasia*, Volume 23, Issue 12, 1240-1251.

Podpořeno projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

RYCHLÉ A SPOLEHLIVÉ ROZLIŠENÍ GALAKTITOLU OD MANNITOLU A SORBITOLU POMOCÍ LC-MS/MS METODY APLIKOVANÉ DO KLINICKÉ PRAXE PRO DIAGNOSTIKU GALAKTOSÉMIE A DALŠÍCH PORUCH METABOLISMU SACHARIDŮ

IVANOVOVÁ E.^{1, 2}, HLÍDKOVÁ E.², BEKÁREK V.², KOTKOVÁ M.², FRIEDECKÝ D.^{1, 2}

¹ Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

² Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc

e-mail: eliska.ivanovova@gmail.com

Rutinní vyšetření vybraných metabolitů z moči se v Laboratoři dědičných metabolických poruch ve Fakultní nemocnici Olomouc provádí pomocí dvou komplexních diagnostických přístupů. První RPLC-MS/MS metoda se využívá k odhalení >90 organických acidurií stanovením 147 metabolitů (organické kyseliny, acylglyciny, acylkarnitiny) v analýze trvající 26 min. Druhá diagnostická platforma založená na hydrofilní interakční chromatografii ve spojení s MS/MS rozšiřuje záchyt dědičných metabolických poruch v naší laboratoři o dalších >50. Touto platformou lze analyzovat během 11 min >60 metabolitů ze spektra purinů, pyrimidinů, N-acetylovaných aminokyselin, acylglycinů, cukrů, cukerných alkoholů a dalších diagnosticky významných markerů, avšak jednotlivé isomery acylglycinů, cukrů a cukerných alkoholů touto metodou nelze rozlišit. V případě potřeby jejich rozlišení se přistupuje ke druhostupňovým metodám. V klinické praxi se často jedná o koeluci C6 cukerných alkoholů, tedy galaktitolu, mannitolu a sorbitolu. Galaktitol je klíčový marker galaktosémie, která bez správné léčby může přejít v život ohrožující stav, zatímco mannitol/sorbitol se v moči hromadí v důsledku jejich přítomnosti v řadě potravin, potravinových doplňků a léků. Rozlišení galaktitolu od mannitolu/sorbitolu je tedy naprosto stěžejní v rámci diagnostiky galaktosémie. V laboratoři k tomu využíváme GC-MS metodu, která je však pro urgentní případy příliš zdlouhavá vzhledem k časově náročné extrakci a derivatizaci vzorku, dlouhé analýze a vyhodnocení. S cílem urychlit a zjednodušit diagnostiku poruch metabolismu sacharidů jsme vyvinuli LC-MS/MS metodu, která dokáže galaktitol od ostatních alditolů spolehlivě rozlišit pomocí jeho značeného standardu (galaktitol-13C6) na základě retenčního času. Nový LC-MS/MS přístup je schopen detekovat celkem 19 sacharidů a 10 polyolů za 17 min. Jedná se o účinný nástroj pro rychlou a spolehlivou diagnostiku poruch metabolismu sacharidů s potenciálem v budoucnu nahradit GC-MS.

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví ČR NU20-08-00367 a DRO (FNOL, 00098892).

MALDI MSI LIPIDŮ A JEJICH IZOMERŮ POMOCÍ NOVÉ DUÁLNÍ MATRICE BASIC BLUE 7

KATEŘINA ONDRÁKOVÁ, MICHAL JAVOREK, JAN PREISLER, ANTONÍN BEDNAŘÍK

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

e-mail: 521909@mail.muni.cz

e-mail: 534260@mail.muni.cz

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací za účasti matrice (MALDI MSI) je hojně využívanou metodou pro studium distribuce v tkáních; metoda umožňuje identifikovat potenciální biomarkery onemocnění.

V této práci jsme využili ke studiu polohové izomerie dvojné vazby uhlík-uhlík v lipidech Paternó-Büchi (PB) reakci s benzofenonem iniciovanou UV zářením (254 nm) přímo na řezu biologické tkáně.¹ Po reakci byla na tkáň aplikována 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) pomocí sublimace a MALDI MSI bylo měřeno na orbitální pasti Q Exactive Plus vybavené subatmosférickým zdrojem MALDI (MassTech Inc.). MS/MS reakčních produktů poskytlo diagnostické ionty specifické pro danou polohu dvojné vazby.² Podmínky PB reakce (množství nasprejovaného reagentu, složení roztoku reagentu a doba osvitu) byly optimalizovány za účelem zvýšení výtěžku reakce. Vysoký výtěžek je nezbytný pro náročné MALDI MS/MS experimenty, zvláště v případě méně zastoupených lipidů v tkáních.

Následně byla testována nová duální matrice pro MALDI MSI analýzu lipidů v tkáních – basic blue 7 (BB7), používaná komerčně jako modré barvivo. Běžné matrice se nanáší na tkáň pomocí sublimace či sprejování. Výhoda BB7 spočívá v tom, že ji lze kromě sprejování aplikovat také jednoduchým ponořením sklíčka s řezem tkáně do vodného roztoku barviva s následnou jednoduchou vizuální kontrolou homogenity nanesené vrstvy matrice. Způsob přípravy vzorku, který je řádově rychlejší, než sprejování nebo sublimace, byl optimalizován (koncentrace BB7, počet a délka ponoření) pro MALDI MSI tkáně myšího mozku. Výsledky byly srovnány s běžnou metodou sublimace DHB. Na závěr jsme využili PB reakci a matici BB7 pro MSI izomerů lipidů v myším mozku.

¹ Wäldchen F., Spengler B., Heiles S.: J. Am. Chem. Soc. **141**, 11816 (2019).

² Bednařík A., Prysiachnyi V., Bezdeková D., Soltwisch J., Dreisewerd K., Preisler J.: Anal. Chem. **94**, 4889 (2022).

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury České republiky (projekt GA21-12262S).

ONE SINGLE RUN ANALYSIS OF SELECTED EMERGING ORGANIC POLLUTANTS IN GROUNDWATER SAMPLES BY LC-MS/MS

KERŠŇÁKOVÁ Z.^{1,2}, LEMAK I.^{1,2}, VABCOVÁ J.¹, LUČIVJANSKÁ V.¹,

HROUZKOVÁ S.²

¹State Geological Institute of Dionýz Štúr, Geoanalytical laboratories, Department of Organic Analyses, Regional centre Spišská Nová Ves, Markušovská cesta 1, Slovak Republic.

²Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 2101/9, Bratislava, Slovak Republic.

e-mail: zuzana.kersnakova@geology.sk

Nowadays, emerging organic micropollutants, such as pharmaceuticals, perfluoro- and poly-fluoroalkyl substances (PFAS), residues of pesticides, herbicides, acidic herbicides are widely found in the environment (Podder et al., 2021; Borull et al., 2020). The determination and identification of organic pollutants is an important task because of adverse impact on living organisms in the environment. The challenge at present is to focus on the development of fast and “green” analytical methods for the determination of wide range of emerging micropollutants.

The contribution aims to develop the analytical method for the determination of selected pesticides, herbicides, PFAS and pharmaceutical substances in one single chromatographic run by LC-MS/MS in groundwater samples. The main task is to validate method and to show the applicability for real samples.

Analyses were performed with an Agilent Technologies 1260 Infinity II coupled with an 6470 Triple Quadrupole Mass Spectrometer. The proposed and optimized method was validated in terms of limit of detection, limit of quantification, linearity range, precision, accuracy. The special focus on matrix effects was given.

PODDER, Aditi, et al. Per and poly-fluoroalkyl substances (PFAS) as a contaminant of emerging concern in surface water: a transboundary review of their occurrences and toxicity effects. *Journal of hazardous materials*, 2021, 419: 126361.

BORRULL, Josep, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 34 priority and emerging pollutants in water from the influent and effluent of a drinking water treatment plant. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1621: 461090.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the Contract No. APVV-19-0149. The work was supported by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic (VEGA project no. 1/0412/20).

STANOVENÍ VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK MARALÍHO KOŘENE (*RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*) METODOU HPLC-MS/MS

KATEŘINA KNÍŽKOVÁ ¹, PETRA CIHLÁŘOVÁ ¹, MARTIN KUCHAR ¹

¹ Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 160 00 Praha 6-Dejvice

e-mail: knizkovk@vscht.cz

Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin je adaptogenní rostlina známá jako maralí kořen. Již od dávných dob je maralí kořen používán v tradiční medicíně pro snížení únavy, léčbu horečky, reprodukčních či sexuálních dysfunkcí nebo také pro prevenci kardiovaskulárních a ledvinových onemocnění¹. Za příznivými účinky stojí řada biologicky aktivních látek například ze skupin steroidů, flavonoidů a fenolických kyselin. Cílem této práce je stanovení vybraných bioaktivních látek metodou HPLC-MS/MS nejen v rostlině samotné, ale i v přípravcích dostupných na českém trhu.

Bylo zakoupeno několik potravinových doplňků včetně tinktur, kousků kořene, mletého kořene a kapslí. Na základě experimentů byl jako extrakční činidlo zvolen 60% ethanol a *tert*-butyl(methyl)ether. V ethanolovém extraktu bylo kvantifikováno přes 30 látek. Ze skupiny polyfenolů se jednalo například o kaempferol, kvercetin, naringenin, hesperetin, chlorogenovou, syringovou a kávovou kyselinu. Z ekdysteroidů byl v ethanolovém extraktu kvantifikován 20-hydroxyekdyson a polypodin B. Pro látky extrahované pomocí *tert*-butyl(methyl)etheru, konkrétně pro stigmasterol a β -sitosterol, bylo nutné kvůli nedostatečné ionizaci v iontovém zdroji vyvinout derivatizační metodu. Pro tyto účely byl jako derivatizační činidlo vybrán 2-fluor-1-methylpyridinium-*p*-toluensulfonát. Po optimalizaci všech podmínek byly analyzovány zakoupené vzorky a části rostlin.

Obsah 20-hydroxyekdysonu byl ze všech látek nejvyšší, a to zejména v kořeni a přípravcích z kořene. Naopak tinktury a semena obsahovaly nejméně analyzovaných aktivních látek. Potravinové doplňky na českém trhu se výrazně liší v obsahu studovaných látek. Tato variabilita může být ovlivněna kvalitou použitého rostlinného materiálu, způsobem pěstování, lokalitou, podnebím a dalšími vnějšími podmínkami. Na základě vyvinutých metod bylo v *R. carthamoides* a potravinových doplňcích metodou HPLC-MS/MS kvantifikováno 37 bioaktivních látek.

1. Kokoska L., Janovska D.: Phytochemistry 70, 842 (2009).

VYUŽITÍ TENKÝCH VRSTEV KOVŮ K IONIZACI A STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK POMOCÍ LDI MS

MONIKA KOKTAVÁ¹, JAKUB PEŠKA¹, ANTONÍN BEDNAŘÍK¹, JAN PREISLER¹,

KSENIYA DRYAHINA², PATRIK ŠPANĚL²

¹ Ústav Chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno

² Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd ČR, Dolejškova 2155/3, 182 23 Praha 8

e-mail: 484621@muni.cz, 505238@muni.cz

Těkavé organické látky jsou skupinou malých molekul vyznačujících se vysokou tenzí par za pokojové teploty. Jsou odolné vůči degradaci, což jim umožňuje transport přes velké vzdálenosti. Halogeny se nacházejí v široké škále maticí, jsou vysoce těkavé a mají tendenci vytvářet sloučeniny s vodíkem. V jejich elementární formě mohou být buď toxické nebo esenciální, dle toho, v jaké matici se nacházejí a jaká je jejich koncentrace.

Nanášení tenkých vrstev je možné provádět mnoha různými metodami. Mezi ty nejrozšířenější a nejpoužívanější dnes patří magnetronové naprašování, které je zvoleno i v této práci.

První část plakátu se zaměřuje na studium ionizační techniky využívající iontů kovů generovaných laserovou desorcí z nanovrstev kovů¹ (Ag, Au, Cu) připravených magnetronovým naprašováním na mikroskopová sklíčka. Vzniklé ionty kovů (M⁺) v plynné fázi tvoří s těkavými látkami nabitě komplexy, které jsou následně identifikovány hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením. Potenciál této techniky je studován na několika třídách těkavých látek (alkoholy, karboxylové kyseliny, aldehydy, ketony, diony, uhlovodíky). Pozornost je věnována také mechanismu tvorby iontů. Představená technika je srovnána s ionizačními technikami SIFT a DBDI MS (hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty a hmotnostní spektrometrie s ionizací dielektrickým bariérovým výbojem). Druhá část plakátu se zabývá využitím hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací k vývoji a optimalizaci metody *headspace* stanovení bromu na stříbrném nanosenzoru. Stříbrné nanosenzory jsou připravovány pomocí magnetronového pokovování, tloušťka naprášených stříbrných vrstev se pohybuje od 1,5 do 4,6 nm. K vytvoření nanosenzorů různých tvarů jsou využívány krycí masky s obdélníkovými a kruhovými otvory, přes které je stříbro následně naprašováno. *Headspace* analýza umožňuje provádět sorpci Br₂(g) z jeho vodného roztoku na stříbrný nanosenzor, který je následně analyzován pomocí LDI MS a LDI MSI. Pro účely vývoje a optimalizace metody je použit zásobní roztok bromu o koncentraci 1,0 g/l, který slouží k přípravě roztoků o koncentracích v rozmezí 0,05 – 100 mg/l, ze kterých je Br₂(g) poté na nanosenzor sorbován.

¹ A. Bednarik, V. Prisyazhnyi, J. Preisler, *Analytical Chemistry* **2021**, 93, 9445-9453 10.1021/acs.analchem.1c01124.

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury České republiky (21-12262S).

OPTIMISATION OF GRADIENT HYDROPHILIC INTERACTION HIGH- PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY METHOD FOR ANALYSIS OF GLUTATHIONE METABOLISM

MIROSLAV KUBÁT¹, PETR ČESLA¹, TOMÁŠ ROUŠAR²

¹ Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie; Studentská 573, 53210 Pardubice, Česká republika

² Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd; Studentská 573, 53210 Pardubice, Česká republika

e-mail: miroslav.kubat@student.upce.cz

Glutathion (GSH) je hlavní nízkomolekulární thiolový antioxidant syntetizovaný v cytosolu. GSH plní mnoho životně důležitých funkcí, jako je antioxidační obrana, detoxifikace toxických elektrofilů a mnoho dalších. GSH se také vyskytuje ve formě glutathion disulfidu (GSSG). Poměr mezi GSH a GSSG je důležitým indikátorem buněčného oxidačního stresu a biomarkerem mnoha nemocí, např. katarakty, rakoviny, neurodegenerativních onemocnění, selhání ledvin, zápalu plic, cystické fibrózy, infekce jater nebo otravy těžkými kovy. K dnešnímu datu bylo popsáno již mnoho metod využívajících vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) pro stanovení GSH nebo GSSG, menší počet metod byl zaměřen také na analýzu metabolismu GSH. Mnohé z těchto metod však využívají derivatizaci, která může být komplikovaná a také časově náročná. Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat HPLC metodu pro stanovení metabolismu GSH. Primární podmínkou byla separace klíčových sloučenin metabolismu GSH bez nutnosti jejich derivatizace. Cíle bylo dosaženo využitím separace v módu hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) na koloně se zwitteriontovou stacionární fází (ZIC-HILIC) ve spojení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Byly porovnány retenční charakteristiky testovaných látek v závislosti na typu stacionární fáze a použitých iontových aditiv mobilní fáze, např. kyselina octová, octan amonný, kyselina mravenčí, mravenčan amonný, hydrogenuhličitan amonný či kyseliny difluorooctová a trifluorooctová. Dále byly optimalizovány podmínky gradientové eluce pro separaci a stanovení glutathionu (GSH), glutathion disulfidu (GSSG), γ glutamyl-cysteinu (gGC), cysteinu (Cys), glycinu (Gly), kyseliny glutamové (Glu), cystinu (CysS) a homocystinu (HCysS) a byly určeny kvantitativní charakteristiky vyvinuté metody.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České Republiky, projekt č. 22-09556S.

STANOVENÍ TRANSPORTNÍ ÚČINNOSTI SPIRLA ICP MS

PETR LETOCHA¹, ANNA MATĚJKOVÁ¹, JAROMÍR STRÁNÍK¹, ADÉLA TOMANIECOVÁ¹,

JARMILA NAVRÁTILOVÁ², JAN PREISLER¹

¹ Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

² Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

e-mail: 505699@mail.muni.cz, 505352@mail.muni.cz

V tomto posteru se zaměřujeme na využití zlatých nanočástic (*gold nanoparticle(s)*, AuNP) ke stanovení transportní účinnosti (*transport efficiency*, TE) infračervené laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem v módu detekce jednotlivých částic (*single-particle infrared laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*, SPIRLA ICP MS)¹ za pomoci skenovací elektronové mikroskopie (*scanning electron microscopy*, SEM). Existující metody stanovení TE se zaměřují na zavádění vzorku pomocí zmlžování, což není vhodné pro systémy, které k zavádění vzorku využívají laserovou ablací (*laser ablation*, LA). V naší práci jsme navrhli dva přístupy k výpočtu TE. První přístup využívá k výpočtu všechny ve vzorku přítomné AuNP, ať už samostatné, nebo agregované. Druhý přístup počítá pouze se samostatnými AuNP, případně s agregáty dvou AuNP. Druhý přístup je v souladu s pozorováním provedeným pomocí SEM, podle kterého je většina agregovaných AuNP ve formě dvojic, a poskytuje pravdivější hodnotu TE.

Spolehlivá metoda stanovení TE je nezbytná pro optimalizaci návrhu experimentu SPIRLA ICP MS a maximalizaci TE. Význam TE je ilustrován na příkladu značení 3D buněčných modelů nádorů pomocí AuNP. Proliferační marker Ki-67 je označen pomocí protilátek konjugovaných s AuNP a jeho distribuce je zobrazena pomocí SPIRLA ICP MS.

¹ Stiborek M. a 10 spoluautorů: *Anal. Chem.* 94, 18114 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05216>

Děkujeme za finanční podporu projektu Grantové agentury ČR (21-12262S). Elektronová mikroskopie byla prováděna v Cryo-Electron Microscopy and Tomography Core-facility CEITEC MU (200029C) výzkumné infrastruktury CIISB (v rámci projektu LM2018127 financovaného MŠMT ČR)

OPTIMALIZACE METODY STANOVENÍ VITAMINU B9 V ZELENINĚ

LENKA LIBENSKÁ¹, JANA PULKRABOVÁ¹, LUCIE DRÁBOVÁ¹

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika

e-mail: Lenka.Libenska@vscht.cz

Vitamin B9, také označovaný jako foláty či kyselina listová, je skupina hydrofilních esenciálních látek, které jsou známé svou důležitostí pro správný vývoj plodu, zejména v raném stádiu těhotenství, nepostradatelný je však pro všechny jedince napříč populací¹⁻³. Jak vyplývá již z názvu „kyselina listová“, dobrým zdrojem tohoto vitaminu je právě listová zelenina – např. špenát. Bohužel vitaminy nepatří mezi stabilní sloučeniny, a proto i u vitaminu B9 byly pozorovány značné úbytky při skladování a zpracování potravin. Jak se vyvíjí a optimalizuje proces výroby potravin, vyvstává otázka, jak se provedené změny projeví na obsahu nutričně důležitých složek^{1,4,5}.

Prvním cílem této práce byla optimalizace metody stanovení vitaminu B9 pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (UPLC-MS/MS). V rámci tohoto kroku byla stávající metoda pro stanovení kyseliny listové (syntetická forma vitaminu B9) a 5-methyltetrahydrofolátu (5-MTHF, biologicky aktivní forma vitaminu B9) rozšířena o 5-formyltetrahydrofolát (5-formyl-THF) a 10-formyllistovou kyselinu, které jsou spolu s 5-MTHF nejzastoupenějšími formami vitaminu B9 v zelenině¹. Nejzastoupenější formou vitaminu B9 v čerstvém špenátu a zelených fazolkách je 5-MTHF (cca 43–68 %), dále pak 5-formyl-THF (cca 17–30 %) 10-formyllistová kyselina (8–11 %)¹. Následujícím krokem byla optimalizace přípravy vzorku, která je obtížná zejména kvůli tomu, že se v přírodě vitamin B9 vyskytuje jako polyglutamová kyselina. Nutnou součástí přípravy vzorku je tedy hydrolýza z důvodu odštěpení glutamových jednotek z přirozeně se vyskytujících forem vitaminu B9, a tedy vzniku molekul, které je možné kvantifikovat. Při optimalizaci postupu byla testována kyselá hydrolýza, enzymatická hydrolýza i jejich kombinace, přičemž jako optimální byla vybrána kombinace hydrolýzy pomocí kyseliny askorbové a enzymatická hydrolýza pomocí dekonjugasy.

1. Delchier N., Ringling C., Le Grandois J., Aoude-Werner D., Galland R., George S., Rychlik M., Renard C. M.: Food Chem 139, 815 (2013).
2. Öncü-Kaya E. M.: Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 623 (2017).
3. Efsa Panel on Dietetic Products N., Allergies: EFSA Journal 12, 3893 (2014).
4. Jastrebova J., Witthöft C., Grahn A., Svensson U., Jägerstad M.: Food Chemistry 80, 579 (2003).
5. Melse-Boonstra A., Verhoef P., Konings E. J., Van Dusseldorp M., Matser A., Hollman P. C., Meyboom S., Kok F. J., West C. E.: J Agric Food Chem 50, 3473 (2002).

Dedikace: Tento výstup vznikl v rámci projektů Specifického vysokoškolského výzkumu – projekty č. A2_FPBT_2023_075 a A1_FPBT_2023_002, za podpory projektu výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ (grant MŠMT č.: LM2023064) včetně přístupu k jeho zařízením.

METABOLOMICKÁ ANALÝZA SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ PLODŮ SLIVONĚ ŠVESTKY NAPADENÝCH VIREM ŠARKY ŠVESTKY ZA ÚČELEM OBJEVENÍ NOVÝCH LÁTEK S ANTIVIROVÝMI ÚČINKY

ANNA LOUČKOVÁ¹, JIŘÍ SEDLÁK², JANA HAJŠLOVÁ¹

¹ Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 160 00, Praha 6, Česká republika

² Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s. r. o., Holovousy 129, 508 01, Hořice, Česká republika

e-mail: louckova@vscht.cz

Bakteriální a virová onemocnění se v posledních letech projevují jako velmi nebezpečná, ať už jde o napadení člověka, zvířat nebo hospodářských plodin a stávají se čím dál nebezpečnějšími z důvodu zvyšující se rezistence mikroorganismů.^{1,2} Právě z toho důvodu se v posledních letech obrací pozornost k možným novým antimikrobiálním a antivirovým látkám rostlinného původu.³ Cílem této studie proto byla necílová analýza plodů slivoně švestky napadené fytoviřem *Plum pox virus* (ssRNA+) neboli PPV za účelem nalezení látek s potenciálním antivirovým účinkem. Analyzovány byly celkem dvě odrůdy – odrůda Iriquois napadená virem PPV, odrůda Iriquois bez napadení virem a odrůda Toptaste bez napadení. Vzorky byly extrahovány 80% metanolem a poté analyzovány s využitím ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-HRMS/MS). Následně byl proveden cílový screening polyfenolů (n=93), a to především antokyanidinů (n=29) a jejich prekurzorů, neboť symptomy napadení PPV virem se projevily červenou pigmentací dužiny plodů a látky způsobující toto zbarvení byly tudíž vytipovány pro potenciální antivirové účinky. Ve všech vzorcích bylo detekováno celkem 41 látek, z toho 15 antokyanidinů, kdy nejvyšší hladiny těchto látek byly detekovány téměř výlučně v plodech napadených PPV virem. Kromě cílového screeningu byla data zpracována pomocí multivariačních statistických metod jako je analýza hlavních komponent (PCA) nebo diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA) za účelem vizualizace rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Na základě statistické analýzy byly identifikovány sloučeniny s potenciálními antivirovými účinky vyskytující se pouze v plodech napadených PPV virem (tzv. markery). V případě potvrzení jejich antivirových účinků by mohly mít sloučeniny potenciál využití ve farmaceutickém průmyslu.

1. Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M.: *Molecules* 20, 8856 (2015).
2. de Souza Z. N., de Moura D. F., de Almeida Campos L. A., Córdula C. R., Cavalcanti I. M. F.: *Archives of Microbiology* 205, 185 (2023).
3. Mitropoulou G., Stavropoulou E., Vaou N., Tsakris Z., Voidarou C., Tsiotsias A., Tsigalou C., Taban B. M., Kourkoutas Y., Bezirtzoglou E.: *Microorganisms* 11, 1156 (2023).

Tento výzkum byl podpořen projektem výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ (grant MŠMT: LM2023064) včetně přístupu k jeho zařízení a specifickým univerzitním grantem A1_FPBT_2023_002.

FOTOKATALYTICKÁ DEGRADACE METAMFETAMINU Z VODY

TEREZA MAŘÍKOVÁ^{1,2,3}, ANETA PINTOVÁ², JIŘÍ RATHOUSKÝ³, MARTIN KUCHAR²

¹ Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 3, 16628 Praha, Česká republika

² Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 3, 16628 Praha, Česká republika

³ Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, Dolejškova 3, 18223 Praha, Česká republika

e-mail: marikovt@vscht.cz

Antropogenní mikropolutanty vody představují globální riziko pro životní prostředí a organismy. Stopové koncentrace těchto látek se dostávají do odpadní vody jako produkty průmyslové a nelegální výroby nebo prostřednictvím lidské exkrece. Většina těchto látek je neefektivně odstraněna během konvenčních procesů čištění odpadních vod, a proto putují do vody povrchové, podzemní i pitné. Česká republika je dlouhodobě největším evropským konzumentem i producentem metamfetaminu. Z tohoto důvodu je jeho koncentrace v českých odpadních vodách nejvyšší z celé Evropy. Během výzkumu dlouhodobé expozice metamfetaminu byly u vodních organismů pozorovány negativní důsledky, mezi které patří rozvoj závislosti a úzkosti, snížená motivace k vyhledávání potravy a rozmnožování a shlukování ryb v prostředí s vyšší koncentrací této látky^{1,2}. Fotokatalytická degradace využívající nanočástice TiO₂ a světelnou energii je jednou z účinných metod umožňující kompletní degradaci stopových koncentrací organických mikropolutantů z odpadní vody^{3,4}. Cílem práce bylo vyvinout HPLC-MS metodu pro analýzu metamfetaminu a jeho fotodegradačních meziproductů. Tato metoda byla následně využita k vyhodnocení kinetiky degradace metamfetaminu v deionizované vodě s použitím TiO₂ imobilizovaného na ocelových deskách. V poslední řadě byl zhodnocen vliv použití matrice reálné odpadní vody, čímž byla odhadnuta efektivita imobilizovaného TiO₂ pro průmyslové účely v čistírnách odpadních vod.

¹ EMCDDA: European Drug Report 2022: Trends and Developments (2022)

² Rojas S., Horcajada P.: Chem. Rev. 120, 8378 (2020).

³ Asimakopoulou A. G., Kannan K.: Environ. Chem. 13, 541 (2016).

⁴ Kuo C.-S., Lin C.-F., Hong P.-K. A.: Water Res. 74, 1 (2015).

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V PIVOVARSKO-SLADAŘSKÉ PRAXI

JAN MARTINÍK, ZDENĚK SVOBODA, MAREK PERNICA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Mostecká 971/7, 614 00 Brno, Česká Republika

* e-mail: martiník@beerresearch.cz; pernica@beerresearch.cz

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. (VÚPS) je jediný výzkumný ústav v České republice, který se od roku 1887 soustavně věnuje pivovarsko-sladařské problematice. Hlavní náplní je výzkum, vývoj, inovace a šíření znalostí v oblasti pivovarství a sladařství. Mykotoxiny, pesticidy, procesní kontaminanty a alergeny představují vážný problém pro zdraví člověka, kvůli rostoucímu zájmu jsou široce studovány vědeckými skupinami v různých aspektech. Jedním z těchto aspektů je i potravinářství a s tím spojená výroba piva. Výše uvedené cizorodé látky mohou být přítomny v základních surovinách pro výrobu piva či ve finálním výrobku samotném. Jedná se o reziduální záležitost a proto spojení kapalinové chromatografie spolu s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) nebo plynové chromatografie spolu s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) nabízí vhodný nástroj k zamýšleným účelům. Nicméně, správná interpretace výsledků ve spojení s toxikologickými daty jako je tolerovatelný denní příjem (TDI), akutní referenční dávka (ARfD), a maximálními limity reziduí (MLR) mají klíčovou roli v analýze cizorodých látek.

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, MZE-RO1923.

URČENÍ ZVÍŘECÍHO PŮVODU TEPELNĚ OPRACOVANÝCH KOSTÍ POMOCÍ PROTEOMICKÉHO PŘÍSTUPU

ALENA MELEDINA¹, ŠTĚPÁNKA KUČKOVÁ^{1,2}

¹ Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT, Technická 3 166 28 Praha, Česká republika

² Katedra chemie a didaktiky chemie Univerzita Karlova, M.D. Rettigové 4 110 00 Praha, Česká republika

e-mail: meledina@vscht.cz

Umět identifikovat druhy zvířat, ze kterých pochází tepelně opracované (ať už opálené nebo vařené) kosti je velmi potřebné hlavně pro paleoantropologii, archeologii a forenzní vědy. Kostní vzorky ošetřené tepelnou úpravou v minulosti poskytují archeologům informace o procesech domestikace a migrace zvířat a o demografii a chování minulých a současných lidských populací. Určení zvířecího původu tepelně opracovaných kostních produktů je také nesmírně důležité pro legislativu a dodržování bezpečnostních a obchodních norem. Příkladem je masokostní moučka (meat and bone meal, MBM). Po epidemiích bovinní spongiformní encefalitidy (BSE) v 80. a 90. letech 20. století a po zavedení legislativy omezující přídavek MBM do krmiva pro hospodářská zvířata, je vyvíjena snaha o určení živočišného původu MBM.

Proteiny stabilizované minerální fází kostní tkáně jsou v poslední době považovány za vhodný zdroj robustních biomarkerů pro rozlišení zvířecích druhů tepelně upravených kostí. Minerální obal poskytuje proteinům velkou odolnost vůči vlivům času, fyzikálním a environmentálním podmínkám v míře, ve které je možné charakterizovat proteiny ze současného i starověkého kontextu. V důsledku toho je možné považovat kosti za časové a tepelné kapsle, a proto se kolagen jako dominantní kostní protein považuje za nejvýhodnější cíl pro diferenciaci živočišného původu kostních vzorků a určení živočišného původu MBM v krmivech pro zvířata. Cílem této práce bylo pokusit se pomocí dvou technik hmotnostní spektrometrie - MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight) a LC-ESI-Q-TOF (Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole – Time Of Flight) určit zvířecí původ tepelně opracovaných kostí (TOK) šesti živočichů (jelena, krávy, kozy, kura, ovce a vepře), které byly vystaveny různým teplotám a způsobům ohřevu. Vzorky rozemletých kostí byly enzymaticky štěpeny trypsinem a purifikovány pomocí reverzní fáze ZipTip C18. Ve hmotnostních spektrech získaných z MALDI-TOF MS byly hledány unikátní markery v podobě m/z hodnot pro každý druh. Pomocí LC-ESI-Q-TOF byly identifikovány konkrétní proteiny a jejich peptidové fragmenty (aminokyselinové sekvence), ze kterých byly také vybrány specifické markery pro každé zvíře. Jelikož u TOK se předpokládaly změny v peptidovém složení a modifikacích aminokyselin oproti recentním kostním vzorkům, naměřená data byla porovnána s databází charakteristických hodnot m/z a peptidových markerů recentních kostí vybraných druhů.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2023_034 a č. A1_FPBT_2023_001.

STANOVENÍ OBSAHU KANABINOIDŮ V KONOPÍ A KONOPNÝCH PRODUKTECH POMOCÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ

VÁCLAV PAVLÍČEK¹, MARIE SUCHANOVÁ¹

¹ALS Czech Republic, s.r.o., Na Harfě 336/9, Praha 9, 190 00 Czech Republic

e-mail: vaclav.pavlicek@alsglobal.com

Cannabis (konopí), které dělíme na tři hlavní druhy: seté, indické a rumištní, produkuje velmi mnoho biologicky aktivních látek zvaných kanabinoidy, které jsou obsaženy nejen v pryskyřici, kterou rostlina produkuje¹. Kanabinoidy si získávají stále větší pozornost v mnoha odvětvích včetně farmaceutického, nutraceutického a kosmetického. V poslední době prudce vzrostl cílený zájem o kanabinoidy, zejména o hexahydrokanabinol (HHC). Kanabinoidy lze chemicky zařadit mezi isoprenoidy, v zjednodušeném označení za fenolické terpeny. Jejich obsah se v rostlinách výrazně liší a mají různé účinky na organismus. Zatímco hlavní, biologicky aktivní a nejznámější látka THC (Δ^9 -tetrahydrokanabinol) je psychotropní, kanabidiol (CBD) je považován za antioxidant a neuroprotektant^{1, 2}. Nejběžnější terapeutické indikace konopí a kanabinoidů jsou pro léčbu dětské rezistentní epilepsie, chronické nenádorové bolesti, roztroušené sklerózy, dyskineze Huntingtonovy a Parkinsonovy choroby³. Analýza obsahu nejen THC, ale kanabinoidů obecně v konopí, konopných produktech a extraktech nabývá na popularitě právě pro jejich příznivé vlastnosti využívané především k medicínským či relaxačním účelům. Efektivní monitorování obsahu kanabinoidů v rostlinách a výrobcích z nich je proto velmi žádoucí za účelem omezení falzifikace a regulace, resp. splnění legislativních norem. Hlavním zaměřením této práce je vývoj, optimalizace a validace metody s cílem na jednoduchou extrakci a derivatizaci s následnou kvantifikací a detekcí, která je provedena pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí, kdy na chromatografické koloně DB-5 MS; 20 m x 0,18 mm x 0,18 μ m, je dosaženo úplné separace Δ^9 -THC, CBD a dalších 12 kanabinoidních sloučenin za méně než 15 minut. Díky kombinaci moderních postupů poskytuje nová metodika účinný a rychlý nástroj pro monitoring vybraných kanabinoidů s potenciálem rozšíření o další analyty. Laboratoře ALS disponují akreditovanou (Českým institutem pro akreditaci) metodikou pro stanovení kanabidiolu (CBD), kanabichromenu (CBC), Delta-9-tetrahydrokanabinolu (Delta-9-THC), kyseliny delta-9 tetrahydrokanabinolové – A (Delta-9-THCA-A), Delta-8-tetrahydrokanabinolu (Delta-8-THC), kanabigerolu (CBG), kanabinolu (CBN), kyseliny kanabidiolové (CBDA), kyseliny kanabigerolové (CBGA), kanabidivarinu (CBDV), Delta-9-tetrahydrokanabivarinu (Delta-9-THCV), kyseliny kanabidivarinové (CBDVA), kyseliny kanabichromenové (CBCA) a kyseliny tetrahydrokanabivarinové (THCVA) s limitem reportování 0,005 hm. %. V plakátovém sdělení budou prezentována úskalí vývoje stanovení vybraných kanabinoidů, jejich derivatizace a následné stanovení pomocí plynového chromatografu s hmotnostním detektorem.

¹ <https://kont.zsf.jcu.cz/pdfs/knt/2010/03/14.pdf>, staženo dne 12.6.2023

² Fernández, N., Carreras, L. J., Larcher, R. A., Ridolfi, A. S., & Quiroga, P. N. (2020). Quantification of cannabinoids in Cannabis oil using GC/MS: Method development, validation, and application to commercially available preparations in Argentina. *Planta Medica International Open*, 7(02), e81-e87.

³ Gonçalves, J., Rosado, T., Soares, S., Simão, A. Y., Caramelo, D., Luís, Â., ... & Duarte, A. P. (2019). Cannabis and its secondary metabolites: their use as therapeutic drugs, toxicological aspects, and analytical determination. *Medicines*, 6(1), 31.

EFFECT OF MAKE-UP SOLVENT ON UHPSFC-MS RESPONSE: COMPARISON OF ESI AND APCI

VERONIKA PILÁŘOVÁ¹, KATEŘINA PLACHKÁ¹, TAŽÁNA GAZÁRKOVÁ¹, JEAN-CHRISTOPHE GARRIGUES², LUCIE NOVÁKOVÁ¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

² IMRCP Laboratory, SMODD Team, CNRS, Toulouse III Paul Sabatier University, Toulouse, France

e-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

The make-up solvent composition is a crucial factor strongly affecting the response in ultra-high performance supercritical fluid chromatography hyphenated with mass spectrometry (UHPSFC-MS). The time-consuming one-by-one testing of individual make-up solvents composed of different organic solvents and additives is typically carried out to select the most suitable composition. In our previous study, we proposed prediction equations for the optimization procedure for electrospray (ESI) facilitation¹.

In the current study, we focused on an alternative ionization technique, atmospheric pressure chemical ionization (APCI). Despite the fact APCI is not an ionization source of the first choice, it can be beneficial for the ionization of lipophilic to intermediate small compounds. Moreover, APCI is based on a different mechanism compared to ESI, thus the differences in make-up solvent effect are expected. We aimed to describe the differences using statistical data analysis and artificial neural networks.

UHPSFC-APCI-MS was used for the analysis of approximately 60 compounds with different physicochemical properties that were characterized using 207 molecular descriptors. Diol stationary phase was used for the separation with a generic gradient elution method. The mobile phase was composed of carbon dioxide and methanol with or without 10 mmol/L ammonia. 32 different make-up solvents, including neat methanol, ethanol, and isopropanol, and organic solvents with different additives varying in concentration were investigated.

The obtained MS responses were corrected using QC samples to mitigate inter-day variability of MS instrumentation and adjusted to 100 µL methanol entering the MS source to enable direct comparison of ESI and APCI. Subsequently, the correlations between physicochemical properties expressed as molecular descriptors and the responses were determined using artificial neural networks. The most important molecular descriptors were defined for each make-up solvent and their effect was compared between the two ionization sources. Finally, the prediction models based on the multi-linear regression enabling fast and simple make-up solvent optimization were created.

1. Plachká K., Gazárková T. á., Škop J., Guillaume D., Svec F., Nováková L.: Analytical Chemistry 94, 4841 (2022).

The study was supported by the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF and by the Czech Science Foundation project GA ČR n. 21-27270S.

ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS TO STUDY CORRELATIONS BETWEEN MOLECULAR DESCRIPTORS AND RESPONSES IN SFC-MS WITH ELECTROSPRAY AND UNISPRAY IONIZATION

KATEŘINA PLACHKÁ¹, VERONIKA PILAŘOVÁ¹, TAĚANA GAZÁRKOVÁ¹, JEAN-CHRISTOPHE
GARRIGUES², LUCIE NOVÁKOVÁ¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Heyrovského
1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

² IMRCP Laboratory, SMOOD Team, CNRS, Toulouse III Paul Sabatier University, Toulouse, France

e-mail: plachkka@faf.cuni.cz

Nowadays, the state-of-the-art supercritical fluid chromatography (SFC) methods usually take advantage of coupling with mass spectrometry (MS) detectors. Commercially available interfaces for SFC-MS hyphenation use a sheath pump delivering a make-up solvent. This solvent not only mitigate possible precipitation of analytes but can also affect the ionization. As the make-up solvent is delivered after the column, it can be used to affect the MS responses without any adverse effects on the separation. However, the composition of the make-up solvent is usually based on the trial-and-error experimental optimization. Overall, the observed MS response is affected by four main parameters: (i) the physicochemical properties of the analytes, (ii) the volume of eluent entering MS, (iii) the composition of make-up solvent, (iv) type of ionization source and MS set-up.

Within our study we aimed to describe the dependences and correlations between these parameters and MS responses using statistical approaches and artificial neural networks. 60 target analytes were analyzed by a generic SFC method using diol column and gradient elution of CO₂ and organic modifier, i.e., methanol or 10 mmol/L ammonia in methanol. Subsequently, the MS responses were correlated to QC samples to mitigate intra-day variability of the MS instrumentation and adjusted to 100 µL methanol entering MS to eliminate the variations caused by gradient elution. Finally, two ionization sources were used including electrospray and Unispray for testing of 25 different compositions of make-up solvent such as pure alcohols and methanol with additives in various concentrations. 207 molecular descriptors were calculated for each of 60 target analytes to describe their physicochemical properties and enable the determination of the most important molecular features affecting SFC-MS responses. The effect of each molecular descriptor on the observed MS response at each of the tested conditions was determined by artificial neural networks. The descriptors most affecting the MS responses were defined and compared for each make-up solvent and ionization source. Subsequently, these parameters were used to create prediction models based on multi-linear regression enabling a fast and simple identification of optimal conditions for various target compounds. Indeed, using the suggested prediction model and optimization processes based on the described behavioral trends, the make-up solvent composition optimal for target analyte can be easily estimated, enabling simplification of the optimizing procedure, smaller solvent consumption, and higher environmental friendliness of the SFC technique.

The study was supported by the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF and by the Czech Science Foundation project GAČR n. 21-27270S.

PROFILOVÁNÍ PLAZMATICKÝCH VZORKŮ PACIENTŮ S DILATAČNÍ KARDIOMYOPATÍÍ POMOCÍ RELATIVNÍ PROTEOMICKÉ ANALÝZY

PAVEL ŘEHULKA¹, JANA KLIMENTOVÁ^{1,2}, VĚRA VOZANDYCHOVÁ^{1,2}, HELENA ŘEHULKOVÁ^{1,2},

RADEK PUDIL², JIŘÍ STULÍK¹

¹ Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 50001 Hradec Králové

² I. Interní kardioangiologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 50005 Hradec Králové

e-mail: pavel.rehulka@unob.cz

Dilatační kardiomyopatie (DCM) je nejčastější formou kardiomyopatie. Existuje několik příčin jejího vzniku (genetické předpoklady, virová onemocnění aj.), ale v mnoha případech je její původ nejasný. Z hlediska diagnostiky a prognózy tohoto onemocnění je k dispozici několik metod. Tato práce se zaměřuje na analýzu proteinových profilů plazmy pacientů s dilatační kardiomyopatií a skupiny kontrolních vzorků.

Skupina pacientů byla seřazena podle průběhu onemocnění po jednom roce standardní léčby a do proteomického porovnání tak byly zařazeny dvě patientské skupiny (horní a dolní kvartil). Pro studii byly sbírány vzorky krve do odběrových zkumavek a získaná plazma byla depletována od abundančních proteinů, zpracována, enzymaticky naštěpena a analyzována LC-MS/MS přístupem s příslušným bioinformatickým vyhodnocením.

Relativní kvantifikace v proteomické analýze byla provedena dvěma přístupy – label free quantification (LFQ) a prostřednictvím isobarického značení peptidů (TMTpro16). V případě LFQ analýzy byly analyzovány vzorky kontrol (25), nejlépe (25 – skupina „best“) a nejhůře (25 – skupina „worst“) respondující pacienti, zatímco v případě isobarického značení byly porovnány jen skupiny pacientů (worst vs. best). Uvedeným způsobem byly identifikovány proteiny s relativní změnou zastoupení v lidské plazmě. Významné změny byly pozorovány zejména ve srovnání pacientů s DCM vůči kontrolní skupině.

Tato práce byla podpořena grantem č. NV19-02-00297 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

STANOVENÍ THIODIGLYKOLU JAKO BIOMARKERU EXPOZICE SIRNÉMU YPERITU

HELENA ŘEHULKOVÁ¹, ALŽBĚTA DLABKOVÁ¹, VERONIKA VLČKOVÁ¹, MAREK MATULA¹

¹ Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Česká republika

e-mail: helenarehulkova@unob.cz

Sirný yperit (HD) je bojová chemická látka, jejíž spolehlivá detekce při zasažení organismu je velmi důležitá v mnoha situacích. HD podléhá ve vodném prostředí poměrně snadno hydrolýze a v prostředí organismu se navíc jako velmi reaktivní látka naváže na přítomné biologické molekuly. Stanovení volného HD je proto vhodné doplnit o stanovení stabilnějšího degradačního produktu, který je možné detekovat v biologických vzorcích.

Jednou z hlavních cest, kterou se ubírá osud HD v organismu, je hydrolýza na episulfoniový ion, který se naváže na volné -SH skupiny cysteinu přítomných proteinů za vzniku S-hydroxyethylthioethylových aduktů. Hydrolýzou těchto aduktů v alkalickém prostředí dojde k uvolnění thiodiglykolu (TDG). TDG může být ve stopovém množství přítomen i v organismu neexponovaných jedinců, z tohoto důvodu navrhovaný postup obsahuje nejprve krok sloužící k odstranění volného TDG ze vzorku ještě před hydrolýzou proteinů. Následně byla optimalizována metoda pro GC-MS stanovení TDG ve vzorcích plné krve laboratorních potkanů, jako produktu degradace HD.

Vhodnost tohoto postupu pro průkaz a kvantitativní vyjádření míry zasažení organismu yperitem byla ověřena in vitro na vzorcích plazmy (plné krve) inkubovaných s přídatkem yperitu. Zavedená metoda byla použita pro stanovení TDG v krvi laboratorních potkanů vystavených sirnému yperitu a dekontaminovaných nově navrhovanými dekontaminačními činidly. Na základě naměřené hladiny TDG byla vyhodnocena účinnost testovaných dekontaminačních směsí vůči sirnému yperitu.

*Práce byla podpořena MO ČR „Dlouhodobým záměrem rozvoje organizace“ – Zdravotnická problematika ZHN“
Fakulty vojenského zdravotnictví Hradec Králové Univerzity obrany*

ZOBRAZOVACIA HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA NANOČASTÍČ ZA POUŽITIA LASEROVEJ DESORPCIE/IONIZÁCIE A ANALYZÁTORU DOBY LETU

JÁN ŠKAMOR, ANTONÍN BEDNAŘÍK, JAN PREISLER

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

e-mail: 541008@mail.muni.cz

Výskum nanočastíc z posledných období výrazne ovplyvnil diagnostiku, liečbu a prevenciu chorôb a taktiež agrotechnológiu, priemysel a ďalšie oblasti každodenného života.

K detekcii nanočastíc bola už skôr použitá metóda subatmosférickej laserovej desorpcie/ionizácie (LDI) s orbitálnou pascou^{1,2}. My sa v práci venujeme zobrazovacej hmotnostnej spektrometrii nanočastíc pomocou LDI s analyzátorom doby letu (TOF). Študované boli zlaté nanočastice s priemerom 100 nm a strieborné nanočastice s priemerom 60, 80 a 100 nm. Suspenzia nanočastíc v destilovanej vode a 2 mM citráte sodnom bola nanášaná použitím piezoelektrického pipetora umiestneného na x, y, z polohovacom systéme. Pole 5 x 5 kvapiek s objemom 65 pl boli nanášané na mikroskopové sklá pokryté vrstvou oxidu cínu a indiu (ITO) a na leštené kremíkové doštičky. Desorpcia a ionizácia bola uskutočnená pomocou hmotnostného spektrometru Autoflex Speed (Bruker, Nemecko) vybaveného pulzným laserom 355 nm Nd:YAG s frekvenciou 1000 Hz.

Dôležitou úlohou bolo stanovenie signálu jednotlivých nanočastíc, rozlíšenie signálu častice od pozadia a zlepšenie tohto rozlíšenia s cieľom detegovať čo najmenší počet nanočastíc za účelom ich využitia ako nanočasticových značiek pri značení tkanív. Boli porovnávané hodnoty signálu zodpovedajúceho jednotlivým časticiam pri použití rozličných povrchov, rozpúšťadiel a veľkostí nanočastíc. Výsledkom analýzy bolo stanovenie strieborných nanočastíc a to s priemerom 60, 80 a 100 nm vo vodnej suspenzii s koncentráciou 5 nanočastíc v 65 pl kvapke.

¹Prysiashnyi, V., Bednařík, A., Žalud, M., Hegrová, V., Neuman, J., Preisler, J.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 34, 570 (2023)

²Žalud, M., Prysiashnyi, V., Bednařík, A., Preisler, J.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. Articles ASAP (2023)

Ďakujeme za finančnú podporu Grantovej agentúry Českej republiky (projekt GA21-12262S).

SEGMENTED HAIR CORTISOL ANALYSIS BY ONLINE SOLID PHASE EXTRACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY

PAVEL ŠMAK¹, DANIELA FAČKOVCOVÁ¹, KATARÍNA KOSTOLANSKÁ², JANA GREGOROVÁ¹,
ELIŠKA BARTEČKOVÁ³, JAN JUŘICA², LIBOR USTOHAL³, JANA HOŘÍNKOVÁ³, PAVLA
LINHARTOVÁ³, ONDŘEJ PEŠ¹

¹ Department of Biochemistry, Medical Faculty, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic

² Department of Pharmacology, Medical Faculty, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic

³ Department of Psychiatry, University Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno, Czech Republic

e-mail: opes@med.muni.cz

The hypothalamic-pituitary-adrenal axis is the primary endocrine axis that regulates response of the stress. Activation of this axis leads to releasing glucocorticoid (cortisol) that regulates physiological events and inhibits further HPA axis activation. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis plays an important role in several endocrine and psychiatric disorders, such as adrenal insufficiency, (ectopic) Cushing syndrome, major depressive disorder, borderline personality disorder, or schizophrenia.

Hair cortisol concentration (HCC) belongs to relatively new methods of estimating cumulative cortisol exposure over months. While plasma, saliva, and urine cortisol levels provide immediate values in the organism, hair matrix allows for chronic exposure evaluation and longitudinal monitoring. Large inter- and intraindividual variability of the hair sampling and determination could be overcome by a segmentation approach – cutting the hair strand into smaller segments and analyzing them independently.

Online (on-column) solid phase extraction liquid chromatography mass spectrometry (SPE LC MS) using a surrogate analyte has been performed to quantify HCC in various segmented hair samples. Based on the hair length, it was possible to obtain a relatively high number (3–6) of segments possibly containing highly correlated HCC values.

Probabilistic multilevel (hierarchical) models were applied to volunteers' hair for establishing a parameter of decrease, which could then be used to correct for such a decrease in the hair of the studied population. Consequently, the deviations from the corrections could then be attributed to the effect of fluctuation or variability of HCC in a certain time point (segment), e.g. episode, intervention, etc.

This work has been supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. NU23-08-00257. All rights reserved.

SLEDOVÁNÍ VLIVU UŽÍVANÝCH LÉČIV NA SOUHRU HOSTITELE A JEHO STŘEVNÍ MIKROBIOTY POMOCÍ AUTOMATIZOVANÉ FUNKČNÍ METABOLOMIKY

HANA SELIČOVÁ¹, KATEŘINA COUFALÍKOVÁ¹, ŠTĚPÁN KOUDELKA¹, JANA KLÁNOVÁ¹ &
ELLIOTT J. PRICE¹

¹ RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 602 00 Brno Česká republika

e-mail: hana.selicova@recetox.muni.cz

Souhra člověka a jeho střevního mikrobiomu má obousměrný vliv na zdraví. Zároveň ke zdraví člověka i střevní mikrobioty značně přispívá jak strava a její složení, tak i běžně užívaná léčiva. Vzájemné interakce léčiv a živin jsou však nedostatečně studovány, částečně kvůli omezeným metodám pro jejich komplexní analýzu. Pro pokrytí této rozsáhlé skupiny metabolitů bude třeba kombinace dvou metod. První metoda se bude zabývat metabolity produktů biotransformace léčiv v lidském těle a jejich tvorbou. Biotransformační produkty léčiv mohou být generovány pomocí one-pot chemické syntézy, biomimetických reakčních souprav a rekombinantních kvasinkových expresních systémů. Vzniklé produkty budou analyzovány přístupem necílené metabolomiky za využití GC-HRMS nebo LC-HRMS. Charakterizované metabolity budou následně přidány do zdroje referenční hmotnostní spektrální knihovny s vysokým rozlišením pro zlepšení anotací v následných metabolomických studiích. Druhá metoda je zaměřená na stránku výživy, konkrétně na metabolomické profilování kyselin s krátkým mastným řetězcem vznikajících z vlákniny. Pro jejich studium bude využit test simultánního objevu a kvantifikace (SQUAD, z angl. simultaneous discovery and quantification). Bude to provedeno pomocí GC-[full scan/SIM]-MS. Kombinace těchto dvou nástrojů následně pomůže k rozvinutí komplexní analýzy interakcí léčiva-živiny možné k využití v klinických případových studiích a tím i k dalšímu vývoji personalizované medicíny.

Poděkování patří Výzkumné Infrastruktuře RECETOX RI (No LM2023069), H2020 CETOEN Excellence 857560 a OP RDE CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_043/0009632. Tato publikace odráží pouze názor autora a Evropská komise nenes odpovědnost za jakékoli použití informací, které obsahuje.

CHARACTERIZATION OF NEWLY SYNTHESIZED LABELS FOR ANALYSIS OF OLIGOSACCHARIDES AND GLYCANS BY LC/FLD-MS

DENISA SMOLKOVA^{1,2}, RICHARD CMELIK¹, MICHAL GREGUS³, HUBERT VESELY³, HANA PIZOVA³, PAVEL BOBAL³, JANA LAVICKA¹

¹ Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Veveri 97, 602 00 Brno, Czech Republic

² Department of Chemistry, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

³ Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Palackého třída 1, 612 00 Brno, Czech Republic

e-mail: smolkova@iach.cz

Derivatization of oligosaccharides and glycans released from glycoproteins represents a crucial step of their analysis by capillary electrophoresis (CE), liquid chromatography (LC) and mass spectrometry (MS)^{1,2}. Since saccharides usually do not contain any chromophore or fluorophore in the structure, the labeling is required for detection by optical methods such as UV/Vis or fluorescence. The ionizable labeling tags also positively effect ionization efficiency in MS analysis. The 2-aminobenzamide (2-AB) represents a most commonly used label for LC analysis, however, a major drawback of 2-AB is poor ionization efficiency when analyzing oligosaccharide and glycan structures by ESI–MS. Furthermore, the labeling of saccharides by 2-AB is based on reductive amination chemistry, characterized by a low reaction yield and requiring a reducing agent present in the reaction mixture. The second most common type of labeling is based on hydrazone formation chemistry, which is simpler, does not require reducing agents and is performed under mild reaction conditions².

In this work, we present the synthesis of a new fluorescent label suitable for oligosaccharides and glycan analysis by LC with fluorescence and MS detection (LC/FLD-MS). The novel hydrazide derivative of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) has been synthesized from 2,4-dimethylpyrrole, methyl 4-chloro-4-oxobutanoate and boron trifluoride etherate followed by hydrazinolysis. The novel synthesized label was characterized by several analytical methods including UV/Vis and fluorescence spectroscopy, and MS. Derivatization of oligosaccharides and *N*-linked glycans by novel fluorescent label was performed via hydrazone formation chemistry under mild conditions followed by LC/FLD-MS analysis.

¹ Hajba L., Csanky E., Guttman A., Anal. Chim. Acta 943, 8 (2016).

² Smolkova D., Cmelik R., Lavicka J., Trends Anal. Chem. 163 (2023).

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic [22-00236S], Masaryk University [MUNI/A/1232/2021], and the institutional research plan [RVO: 68081715].

VYSOCE CITLIVÉ A ROBUSTNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRICKÉ METODY PRO RYCHLÉ ANALÝZY STOPOVÝCH VOC VE VZDUCHU

KRISTÝNA SOVOVÁ¹, PATRIK ŠPANĚL¹, JURAJ JAŠÍK¹, KSENIYA DRYAHINA¹

¹Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., Dolejškova 2155/3, 182 23 Praha 8, Česká republika

e-mail: kristyna.sovova@jh-inst.cas.cz

Cílem projektu je vytvořit inovativní a vysoce citlivé hmotnostní spektrometrické metody pro rychlou analýzu stopových těkavých organických sloučenin (VOC) ve vzduchu a dechu na základě podrobného pochopení iontové chemie v plynných médiích. Hlavním zaměřením výzkumu je absolutní kvantifikace stopového množství VOC v reálném čase bez nutnosti separace nebo extrakce, což představuje stále velkou výzvu. Dosavadní techniky, které se nejvíce blíží splnění těchto požadavků, jsou SIFT-MS, PTR-MS a SIFT-MS. Další relevantní technikou je SESI-MS, která se vyznačuje vysokou citlivostí. Přehled dosavadních dílčích výsledků bude představen formou posterového sdělení.

Poděkování Akademická prémie, Akademie věd České republiky.

MASS SPECTROMETRY METHODS AND INSTRUMENTATION FOR THE SPACE DUST GENERATION

A. SPESYVYI,¹ J. ŽABKA,¹ M. POLÁŠEK,¹ A. CHARVAT,² J. SCHMIDT,³ F. POSTBERG,³ B. ABEL²

¹ J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the CAS, Dolejškova 2155/3, 18223 Prague 8, Czech Republic

² Institute of Chemical Technology, and Wilhelm-Ostwald-Institute of Physical and Theoretical Chemistry, Linnestrasse 3, D-04103 Leipzig, Germany, and Leibniz Institute of Surface Engineering, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany

³ Institute of Geological Sciences, Freie Universität Berlin, Malteserstraße 74-100, D-12249 Berlin, Germany

Nanometer to micrometer size ice particles as constitute of cosmic dust can originate from comets, plumes on icy satellites, hypervelocity meteoroid impacts on different icy surfaces. Mass spectrometric measurements of the molecular composition of such ice grains from Enceladus with the Cosmic Dust Analyzer on the Cassini spacecraft revealed the presence of organic molecules with masses over 200 amu. For future missions thus it is essential to have laboratory source of hypervelocity ice particles, which facilitates testing of new generation of the space high resolution mass spectrometric detectors. This requirement can be divided into two conceptual parts: the ice particle generation and the ice particle acceleration. We have developed instrument SELINA (Selected Ice Nanoparticle Accelerator) which resolves the ice particle generation part of the task. On the basis of our mass spectrometry experience we have applied and combined existing techniques to produce well defined beam of size selected icy nanoparticles on the output of the apparatus.

The highly charged water droplets are generated via electrospray ionization source with subsequent transfer from atmosphere pressure into the vacuum accompanied by the evaporative cooling and transition of water droplets from liquid phase to ice. The combination of two frequency controlled quadrupoles with differential pumping allows to produce charged particle beams of specified narrow size distributions within a range of 50-1000 nm diameter with 0.1-1 Hz repetition rates. The individual particle charge and velocity is measured by the non-destructive single pass charge detector. Special efforts were made to design SELINA as a compact transportable apparatus. As a result, all parts of instrument can be fitted on the two 19" cart (except for mechanical pumps) including control electronics. This allows to combine SELINA particle source with different stationary accelerators.

DETEKCE JEDNOTLIVÝCH ZNAČEK V IMUNOSTANOVENÍ POMOCÍ LA ICP MS

SVOJANOVSKÝ V., STIBOREK M.¹, KRÁSENSKÝ P.¹, KROUPA J.², HOUŠKA P.², KANICKÝ V.¹,
MAŠLAŇOVÁ I.³, FARKA Z.⁴, MACHÁČOVÁ E.⁴, MÁČALA J.⁴, PREISLER J.¹,

¹ Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

² Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Česká republika

³ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

⁴ Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

e-mail: 473881@mail.muni.cz

Laserová desorpce za účasti substrátu (SALD) spojená s hmotnostní spektrometrií ICP MS je vhodnou technikou zavádění intaktních nanočástic nanesených na plastových površích.^{1,2,3}

Imunochemické eseje jsou univerzální imunoanalytickou metodou pro kvantitativní stanovení řady biologicky významných molekul, na které je možná vazba vhodné protilátky. Tyto eseje využívají zpravidla enzymatické amplifikace především v sendvičovém provedení imobilizovaném na vhodném povrchu. Využití nanočástic jako značek a ICP MS jako velmi citlivého detektoru je možnou alternativou stávajících detekčních schémat.

Cílem práce bylo vyvinout metodu modelového imunostanovení v sendvičovém formátu s detekční značkou v podobě zlaté nanočástice. Dále bylo nutno nalézt vhodné podmínky mapování pomocí laserové ablace, které by byly slučitelné s desorpcí intaktních nanočástic s jejich následnou detekcí jakožto jednotlivých značek

1 Peš, Ondřej, et al. "Off-line coupling of capillary electrophoresis to substrate-assisted laser desorption inductively coupled plasma mass spectrometry." *Analytical chemistry* 80.22 (2008): 8725-8732.

2. Benešová, Iva, et al. "Direct analysis of gold nanoparticles from dried droplets using substrate-assisted laser desorption single particle-ICPMS." *Analytical chemistry* 88.5 (2016): 2576-2582.

3. Stiborek, Marek, et al. "Infrared Laser Desorption of Intact Nanoparticles for Digital Tissue Imaging." *Analytical Chemistry* (2022).

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury ČR (NU22-05-00042) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MUNI/A/1192/2020).

ANALÝZA FYTOKANABINOIDŮ V KOSMETICKÝCH KRÉMECH S VYUŽITÍM METODY UHPLC-MS/MS

MAGDALÉNA VÁGNEROVÁ^{1,2}, ALŽBĚTA NEMEŠKALOVÁ¹, DAVID SÝKORA¹,
MARTIN KUCHAR²

¹ Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

² Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

e-mail: magdalena.vagnerova@vscht.cz

Kosmetika s obsahem konopí představuje v současnosti významnou část legálního trhu s konopnými produkty. Předběžné studie ukázaly potenciální terapeutické účinky kanabinoidů při aplikaci na kůži, což vedlo k nárůstu popularity konopných krémů, které jsou často propagovány pro své analgetické, protizánětlivé nebo hydratační vlastnosti. To vyvolalo větší potřebu analytických metod používaných pro kontrolu kvality těchto výrobků a regulaci zakázaných kanabinoidů. Přestože byly již dříve představeny ověřené analytické metody pro hydrofobní kosmetiku, analýza dvoufázových systémů (krémy typu olej ve vodě a jejich protějšky krémy typu voda v oleji) se ukázala jako náročná kvůli značné variabilitě chemického složení různých krémových matic.

Hlavním cílem této studie je vyvinout a validovat komplexní metodu extrakce krémů, která by byla kompatibilní s kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem, a která by byla použitelná na širokou škálu krémů.

Naše studie ukázala, že je nutná samostatná metoda extrakce pro oba hlavní typy krémů. Zatímco krémy typu voda v oleji lze jednoduše zředit a analyzovat, pozorovali jsme, že emulgátory používané v krémech typu olej ve vodě způsobují významné maticové efekty, které ovlivňují kvantitativní analýzu při použití hmotnostního spektrometru. Pro redukci těchto efektů byla optimalizována metoda extrakce na tuhou fázi, což vedlo k purifikovaným extraktům a vyšší přesnosti a preciznosti analýzy. Obě metody extrakce byly validovány a následně použity k určení hladin hlavních kanabinoidů v kosmetických krémech zakoupených na českém trhu.

REVERSED-PHASE UHPLC/MS APPROACH FOR THE ANALYSIS OF LIPIDS IN HUMAN PLASMA FROM PANCREATIC CANCER PATIENTS AND LONG SURVIVORS

ZUZANA VAŇKOVÁ¹, ONDŘEJ PETERKA¹, JAKUB IDKOWIAK¹, ROBERT JIRÁSKO¹, BEATRICE MOHELNÍKOVÁ DUCHOŇOVÁ², MARTIN LOVEČEK², BOHUSLAV MELICHAR², MICHAL HOLČAPEK¹

¹University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

²University Hospital Olomouc, I.P. Pavlova 185/6, 779 00 Olomouc, Czech Republic

e-mail: zuzana.vankova@upce.cz

Lipids are diverse endogenous biomolecules that play an important role in human metabolism. Their dysregulation is related to many serious diseases, e.g., various types of cancer. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most common causes of cancer-related deaths worldwide, with an average 5-year survival rate of less than 10%. Comprehensive lipid profiling currently appears to be a possible way of early detection of this type of cancer. Mass spectrometry is the primary technique for lipidomic analysis, and the connection to separation methods enables the identification and quantification of a large number of lipids from various lipid categories.

The main objective of this study was to apply our robust and high-throughput quantitative reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography (RP-UHPLC) method to the lipidomic profiling of PDAC patients¹. The main advantage of separation in RP mode is the possibility of distinguishing isobaric molecules due to the predictable retention behavior of logical lipid series. This approach allows the quantitation of more lipid species than in case of other lipid class separation methods. The UHPLC is coupled to a low-resolution mass spectrometer, where the characteristic transitions of each lipid species were measured by multiple reaction monitoring (MRM) scanning.

This fully validated method enables the quantitation of more than 450 lipid species in PDAC samples, healthy volunteers, and long-term survivors of PDAC (more than 5-year survival without recurrence). The unsupervised PCA without sample classification and supervised OPLS-DA with known sample classification were performed to visualize dysregulated lipids in PDAC samples. The most downregulated lipid classes include sphingolipids with very long fatty acyl chains (e.g., SM 41:1;O2 and Cer 41:1;O2), which is in agreement with previously published data². These results provide clear evidence that long-term survivors retain characteristics of the cancer group, which indicates that the changes in sphingolipid metabolism are permanent even after recovery from PDAC.

¹ Vaňková Z., Peterka O., Chocholoušková M., Wolrab D., Jirásko R., Holčápek M.: Anal. Bioanal. Chem. 44, 1 (2022)

² D. Wolrab a 27 spoluaautorů: Nat. Commun. 13,124 (2022).

This work was supported by the Czech Science Foundation (GAČR) project No. 21-20238S.

ANALÝZA TERAPEUTICKÝCH OLIGONUKLEOTIDŮ V HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII

ZUZANA VOSÁHLOVÁ¹, SYLWIA STUDZIŃSKA², MARTIN GILAR³, KVĚTA KALÍKOVÁ¹

¹Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 8, 12800 Praha, Česká republika

²Department of environmental chemistry and bioanalysis, Faculty of chemistry, Nicolaus Copernicus University, Gagarin Street 7, 87100 Torun, Polsko

³Waters Corporation, Maple Street 34, 01757 Milford, USA

e-mail: kadleczu@natur.cuni.cz

Význam a využití terapeutických oligonukleotidů v genové a antisense terapii v posledních letech významně roste¹. „Přirozené“ oligonukleotidy jsou citlivé k buněčným nukleázám. Synteticky připravované terapeutické oligonukleotidy se chemicky modifikují za účelem zvýšení rezistence vůči těmto enzymům, což vede ke zvýšení jejich *in vivo* stability, a tedy i účinnosti². Jedním z nejčastějších typů modifikace je tzv. thiofosfátová substituce, kde je jeden (nebo více) atomů kyslíku, který se nepodílí na fosfodiesterové vazbě, nahrazen sírou. Tato modifikace vede ke vzniku chirálního centra na atomu fosforu a tvorbě 2ⁿ diastereomerů, kde *n* je počet thiofosfátových substitucí (PS). Diastereomery vykazují různé fyzikálně-chemické vlastnosti a mohou tedy být separovány v klasickém reverzním módu kapalinové chromatografie. Při vyšším počtu thiofosfátových substitucí je ale počet potenciálně separovatelných diastereomerů tak velký, že je není možné separovat na základní linii dostupnými chromatografickými technikami. Výsledkem jsou široké píky s částečně separovanými diastereomery, které nelze spolehlivě vyhodnotit. V současné době se k chromatografické analýze terapeutických oligonukleotidů využívá zejména dvou přístupů: i) potlačení separace diastereomerů použitím iontově-párových činidel v kombinaci s reverzní stacionární fází; ii) využití hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC), která neposkytuje separaci diastereomerů³. Druhý ze zmiňovaných přístupů je výhodný zejména díky bezproblémové kompatibilitě s MS detekcí.

Pro analýzu komplexních vzorků, například vzorků plazmy, kde je využití hmotnostní detekce nezbytností, může být HILIC vhodnou volbou. Proto byl v této práci nejprve testován vliv různých chromatografických podmínek (např. pH vodné složky mobilní fáze, typ pufru, koncentrace pufru, separační teplota) na retenci a separaci modelových thiofosfátových oligonukleotidů na amidové stacionární fázi. Byla vybrána sada oligonukleotidů obsahující plně modifikovaný 21 mer (terapeutický oligonukleotid první generace) a jeho typické nečistoty (20 mer, 19 mer a 18 mer, vždy zkrácený na 5' konci). Sada byla doplněna o krátké oligonukleotidy (2-6 mer) s různým počtem thiofosfátových substitucí. Byl sledován vliv výše uvedených chromatografických parametrů především na rozlišení různě dlouhých oligonukleotidů a oligonukleotidů s různým počtem thiofosfátových modifikací. Získané poznatky byly aplikovány na analýzu nepurifikovaného 18 mer oligonukleotidu, který je analogem k přípravku Spinraza využívanému k léčbě spinální svalové atrofie. Cílem bylo separovat nečistoty od hlavního píku a identifikovat je pomocí MS. Na závěr byl analyzován vzorek plazmy pacientů léčených Spinrazou.

¹ Andersson S., Antonsson M., Elebring M., Jansson-Löfmark R., Weidolf L.: Drug Discov. Today 23, 1733 (2018).

² Goyon A., Yehl P., Zhang K.: J. Pharm. Biomed. Anal. 182, 113105 (2020).

³ Lardeux H., Guillaume D., D'Atri V.: J. Chromatogr. A 1690, 463785 (2023).

NAPAŘOVÁNÍ STŘÍBRA PRO ZOBRAZOVÁNÍ DISTRIBUCE CHOLESTEROLU V ŽIVOČIŠNÝCH TKÁNÍCH S VYUŽITÍM LASEROVÉ DESORPCE/IONIZACE

VLADIMÍR VRKOSLAV¹, ŠTĚPÁN STRNAD¹, ANNA MENGŘ¹, ONDŘEJ FABIÁN^{2,3},

JIŘÍ RYBÁČEK¹, MILOŠ KUBÁNEK², VOJTĚCH MELENOVSKÝ²,

LENKA MALETÍNSKÁ¹, JOSEF CVAČKA¹

¹ Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Flemingovo nám. 2, 160 00, Praha, Česká republika

² Institut Klinické a Experimentální Medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21, Praha 4, Česká republika

³ Ústav patologie a molekulární medicíny 3. LF UK a FTN, Vídeňská 800, 140 59, Praha 4, Česká republika

e-mail: vrkoslav@uochb.cas.cz

Cholesterol je důležitou součástí buněk savců a narušení jeho homeostázy a biochemických procesů je projevem mnoha onemocnění. Lokalizace cholesterolu v živočišných tkáních je zásadní pro lepší pochopení těchto procesů. Jako účinná metoda pro lokalizaci cholesterolu byla popsána zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI) s využitím MALDI iontového zdroje a depozice stříbra¹. V prezentované práci jsme testovali a optimalizovali tepelné napařování stříbra jako alternativní techniku k depozici napařováním pro MALDI MSI cholesterolu. Struktura napařených vrstev byla studována s využitím skenovacího elektronového mikroskopu. Vrstva stříbra o tloušťce 6 nm poskytla optimální účinnost ionizace a dobré rozlišení hmotnostních spekter. Depozice ultratenkého nanofilmu stříbra umožnila nastavit laterální rozlišení MALDI MSI s krokem až 5 µm. Optimalizovanou metodu jsme použili k vizualizaci distribuce cholesterolu v mozcích myšího modelu APP/PS1, což je model, který se podobá patologii Alzheimerovy choroby. V mozku myší se mimo jiné vytváří senilní plak amyloidu β. Zjistili jsme, že cholesterol byl rovnoměrně distribuován v tkáni frontální kůry, bez známek akumulace v regionech senilního plaku. Dále jsme zkoumali přítomnost a distribuci cholesterolu v řezech lidské srdeční tkáně postižené transthyretinovou srdeční amyloidózou (ATTR). Identifikovali jsme přítomnost vyššího množství cholesterolu v oblastech s uloženým amyloidem, ale úplná kolokalizace pozorována nebyla.

¹ Dufresne M., Thomas A., Breault-Turcot J., Masson J.-F., Chaurand P.: Anal. Chem. 85, 3318 (2013).

Podpořeno projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Abstrakty přednášek v sekci Mládí vpřed a plakátových sdělení

24. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie

Vydala: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci

se sídlem: Ke Karlovu 2027/3, 120 00, Praha 2 – Nové Město

IČO: 00444634 DIČ: 00444634

Editoři: Josef Cvačka, Vladimír Vrkoslav, Martin Hubálek, Mikuláš Vlk

Fotografie na obálce © Martin Hubálek, 2023

Vydání první

ISBN: 978-80-88195-43-6