

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodově-
decká fakulta**

**Analýza metabolitů v přírodních povrchových vo-
dách**

Diplomová práce

Klára Pilsová

Školitel: RNDr. Petr Šimek, CSc.
Konzultant: Ing. Martin Moos, PhD.

České Budějovice 2018

Pilsová, K. (2018): Analýza metabolitů v přírodních povrchových vodách [Metabolite Analysis in Natural Surface Waters. Mgr Thesis, in Czech] – 52 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Přírodní vody obsahují v různé míře rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic matter, DOC), jehož součástí jsou mimo jiné metabolity, organické látky tvořící základ buňčné látkové přeměny. Patří mezi ně zejména aminokyseliny, cukry a organické kyseliny a ve vodách se vyskytují obvykle ve velmi nízkých koncentracích. Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodu pro přímé stanovení vybraných metabolitů v přírodních povrchových vodách pomocí techniky kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). V dalším kroku byla pro vybrané analyty provedena validace metody a stanovena jejich koncentrace ve vzorcích regionálních povrchových říčních vod. Aminokyseliny fenylalanin a lysin představují hlavní detekované metabolity s výskytem v koncentračním rozsahu 0,5 až 25 ng.ml⁻¹.

Annotation:

Natural waters contain dissolved organic carbon (DOC) in various extent. It is composed of metabolites, organic compounds involved in cellular metabolism. Amino acids, sugars and organic acid are the main representatives that occur at very low concentrations in these waters. The main goal of the thesis was to develop a method for direct determination of selected metabolites in natural fresh surface waters by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). For the selected metabolites, the method was validated. In the next step their concentration was determined in water samples obtained from the regional surface waters. Amino acids phenylalanine and lysine represent major detected metabolites that were observed in the concentration range between 0.5 and 25 ng.ml⁻¹.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce.

Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Šimkovi, CSc. a Ing. Martinu Moosovi, Ph.D. za odborné vedení při vypracování diplomové práce. Dále pak celému kolektivu v laboratoři Analytické biochemie a metabolomiky při Biologickém centru AV ČR, v. v. i. za pomoc a rady při praktickém provádění analýz. Také bych chtěla poděkovat Hydrobiologickému ústavu Biologického centra AV ČR, v. v. i. a doc. Ing. Petru Porcalovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků přírodních povrchových vod. Dále profesorům na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za uvedení do problematiky chemie životního prostředí a také své rodině za podporu během studia. V neposlední řadě bych chtěla touto cestou vyjádřit díky svému příteli Pavlu Steffalovi za podporu a neustálou inspiraci během mého studia a při vypracování této diplomové práce.

Tato práce byla vypracována s finanční podporou projektu Grantové agentury ČR, projekt č. **17-22276S.**

Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST	1
1.1	Přírodní povrchové vody	1
1.2	Analytické metody používané pro stanovení složení přírodních vod.....	2
1.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	4
1.4	Hmotnostní spektrometrie.....	7
1.5	QqQ – Trojitý kvadrupól a jeho využití ve stopové analýze	11
1.5.1	Kvadrupólový hmotnostní analyzátor	11
1.5.2	Využití trojitého kvadrupólu	12
1.5.3	Stopové analýzy metabolitů technikou LC-QqQ-MS	14
1.5.4	Trojitý kvadrupól Agilent QqQ 6495B.....	15
1.6	Validace analytických metod.....	17
2	CÍLE PRÁCE	22
3	PRAKTICKÁ ČÁST	23
3.1	Lokalita a odběr vzorků	23
3.2	Metodika	24
3.2.1	Instrumentace a používaný software	24
3.2.2	Ladění MRM přechodů.....	25
3.2.3	Nastavení chromatografického systému a hmotnostního spektrometru	27
3.2.4	Validace metody.....	30
3.2.5	Příprava kalibračních roztoků a referenčních materiálů	31
3.2.6	Příprava reálných vzorků vod pro měření.....	32
4	VÝSLEDKY	33
4.1	Kalibrace	33
4.2	Reálné vzorky.....	39
5	DISKUSE	42
6	ZÁVĚR.....	44
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
8	SEZNAM POUŽITÝCH NOREM	50
9	PŘÍLOHY	51

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Přírodní povrchové vody

Přírodní sladké povrchové vody představují bohatý rezervoár rozpuštěných anorganických a organických látek. V různých koncentracích je v nich rozpuštěno mnoho různých látek anorganických (více než 10 mg.l^{-1} u makrokomponent, méně než 1 mg.l^{-1} u mikrokomponent). Mimo hlavní kationty (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), anionty (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-) a hydratovaný oxid křemičitý lze ve vodě najít prakticky všechny prvky z periodické soustavy. Významnou roli v oxidačně-redukčních vlastnostech vody hrají různé iontové formy kovů, zejména hliníku, železa nebo manganu. Významnou složkou povrchových vod je rozpuštěný organický uhlík (DOC) převážně ve formě nejrůznějších organických sloučenin nezbytných pro život vodních organismů. Povrch vodních ekosystémů je obklopen atmosférou, proto jsou jejich nedílnou součástí plyny z atmosféry (N_2 , O_2 , CO_2). Rozpustnost těchto plynů je dána Henryho konstantou a složením vody. V případě reagujících plynů (CO_2), je obsah ovlivněn i hydratační konstantou.

Organické látky významně ovlivňují fyzikálně-chemické, biologické i hygienické vlastnosti vody a jsou přírodního i antropogenního původu. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v závislosti na zastoupení prvků od jednotek po miliony daltonů (například huminové látky) (Vanloon, Duffy, 2011).

Podrobně sledovanou skupinou látek vznikajících lidskou činností představují dnes všudypřítomné polutanty, jejichž výskyt je podrobně sledován. Patří mezi ně zejména chlorované látky, polycyklické aromatické uhlovodíky nebo pesticidy, které mají často toxické, karcinogenní či mutagenní účinky.

Hlavní složku povrchových vod však reprezentují huminové látky, mimořádně složité směsi látek s nedefinovaným složením a s celou škálou funkčních skupin (například karboxylová, hydroxylová). Charakteristickou vlastností huminových látek je také jejich aromaticita, která se podílí na jejich absorpenci ve viditelné části elektromagnetického spektra. Jejich rozpustná frakce zahrnuje huminové a fulvonové kyseliny. Předpokládá se, že huminové látky vznikají kombinací degradačních a syntetických biochemických pochodů mikroorganismů v půdě (allochtonní původ), nebo ve vlastním vodním tělese (autochtonní původ), přičemž jedním z hlavních prekurzorů je lignin (Brezonik, Arnold, 2011).

Neméně významnou součástí rozpuštěného organického uhlíku v přírodních vodách jsou nízkomolekulární organické látky, zejména produkty buněčného metabolismu. Hlavní zástupce představují aminokyseliny, monosacharidy a disacharidy, nízkomolekulární organické kyseliny a mnohé další (např. glutathion, pyruvát). Koncentrace těchto metabolitů je v přírodních vodách obvykle velmi nízká, pohybuje se obvykle v řádu nmol.l^{-1} (Panagiotopoulos, Sempéré, 2005). Tyto metabolity jsou do vod vylučovány a znovu přijímány buněčnými vodními organismy. O výskytu, cirkulaci a osudu metabolitů v přírodních vodách je však dosud velmi málo poznatků, protože stanovení těchto velmi polárních látek bylo dosud velice pracné a zdlouhavé.

1.2 Analytické metody používané pro stanovení složení přírodních vod

Při určování složení vod se provádí často nejprve skupinová stanovení, mezi něž patří například měření neutralizační kapacity vody, komplexační kapacity, tvrdosti vody a další. Důležitý je též obsah kovů a polokovů, které se ve vodě vyskytují v rozpuštěné formě jako ionty, nebo častěji existují ve formě komplexů s anorganickými i organickými ligandy. Kovy mohou být také sorbovány v sedimentu, odkud se za určitých podmínek rozpouští zpět do vodního prostředí v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech vody. Většina kovů ve vodě podléhá hydrolyze, při níž vznikají málo rozpustné hydratované oxidy.

Koncentraci kovů i nekovových prvků ve vodě lze stanovit pomocí různých analytických metod. Ke stanovení obsahu vápníku nebo hořčíku se často využívá atomová absorpční spektrometrie. Díky tvorbě barevných komplexů lze některé kovy stanovit spektrofotometry. Při rutinních analýzách nízkých koncentrací některých prvků lze s výhodou využít hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem. Ke stanovení síranů a siřičitanů lze využít klasických oxidačně-redukčních, acidobazických a srážecích titračních metod (Pitter, 2009).

Jednotlivé prvky se ve vodě obvykle nevyskytují v jedné formě. Z toho důvodu se uvádí takzvaná celková koncentrace daného prvku, která zahrnuje organické i anorganické formy v ionizované i neionizované podobě. Často se rozlišuje rozpuštěná a nerozpuštěná frakce, přičemž hranice je dána arbitrárně, obvykle však filtrem o velikosti $0,4 \mu\text{m}$ (Brezonik Arnold, 2011; Vanloon, Duffy, 2011).

Celkový obsah organických látek ve vodě lze vyjádřit jako chemickou spotřebu kyslíku dichromanem (CHSK-Cr) případně manganistanem draselným (CHSK-Mn). Tato hod-

nota udává obsah látek, oxidovatelných daným chemickým oxidantem. Dále se využívá stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BSK). Pomocí BSK lze stanovit obsah látek, které ve vodě přispívají ke spotřebě rozpuštěného kyslíku, mimo organických látek jsou to například redukované formy kovů. K odhadnutí obsahu organických látek lze také využít jejich termické převedení na CO₂, jehož koncentrace je stanovena infračervenou spektroskopií (Vanloon, Duffy, 2011). Udává se tak množství celkového (TOC) a rozpuštěného (DOC) organického uhlíku.

Fyzikálně-chemické vlastnosti některých skupin organických látek lze využít k jejich charakterizaci. Například absorpance elektromagnetického záření při vlnové délce 254 nm koreluje s obsahem aromatických látek. Také je možné využít chromatografických metod s infračerveným detektorem pro stanovení nepolárních extrahovatelných látek. Z hygienického hlediska je významné sledovat obsah halogenovaných uhlovodíků, fenolů, polyfenolů a dalších nebezpečných/potenciálně nebezpečných látek. Pro jejich sledování se dnes preferuje kapalinová a plynová chromatografie ve spojení s různými detektory (spektrofotometrický detektor – polycyklické aromatické uhlovodíky, hmotnostní detektor – triazinové pesticidy, detektor elektronového záchytu – polychlorované bifenyly). U vybrané skupiny látek se obvykle při stanovování postupuje podle příslušných norem. Například podle normy ČSN ISO 28540 (757556) se postupuje při měření koncentrace 16 polycyklických aromatických uhlovodíků ve vodě pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostně spektrometrickou detekcí (Pitter, 2009; Horáková, 2000).

Stanovení přesné koncentrace nízkomolekulárních organických látek ve vodách je bez předchozí prekoncentrace, či derivatizace značně komplikované. Pouze několik málo analytických metod umožňuje jejich kvantifikace v řádu nmol.l⁻¹, jsou to například aniontová chromatografie s amperometrickou detekcí (Mopper a kol., 1992) nebo iontoměničová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (Horňák, Penthaler, 2014). Při vývoji nových metod pro stanovení obsahu různých organických látek v přírodních vodách je vhodné využít zejména kapalinovou chromatografii kombinovanou s hmotnostním spektrometrem (LC/MS) (Bacerra-Castro, 2013; Bajad a kol., 2006).

Studiem metabolitů produkovaných organismy do vodního prostředí se zabývá nová oblast výzkumu metabolomu vody, tedy kompletního souboru zastoupených metabolitů, které otevírá cestu k novým poznatkům o probíhajících biologických a chemických dějích v přírodních vodách. Pro studium „metabolomu vody“ je vhodná kombinace kapalinové chromatografie s HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) separací a tandemové hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem jako hmotnostním analyzátořem (Bajad a kol., 2006).

1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografie je analytická technika využívaná k separaci, identifikaci a kvantifikaci složek směsí na základě různé distribuce analytů mezi mobilní (MF) a stacionární (SF) fází. Mobilní fází v kapalinové chromatografii je kapalina, stacionární fází je buď tuhá látka nebo kapalina umístěná na tuhém nosiči. Separace látek probíhá v chromatografické koloně. V dnešní době se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography; LC – Liquid Chromatography), kdy je mobilní fáze do systému přiváděna pomocí vysokotlakého čerpadla.

Při dělení látek dochází k opakovanému ustanovování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází na základě distribučního koeficientu (1). Separace složek je ovlivněna fyzikálně chemickými vlastnostmi mobilní i stacionární fáze. Při dělení látek podobných vlastností je složení mobilní fáze v průběhu analýzy konstantní (izokratická eluce), v opačném případě je nutné používat mobilní fází o zvyšující se eluční síle (gradientová eluce), aby se zkrátila doba analýzy.

$$k = \frac{n_{SF}}{n_{MF}} \quad (1)$$

k – kapacitní poměr [1]

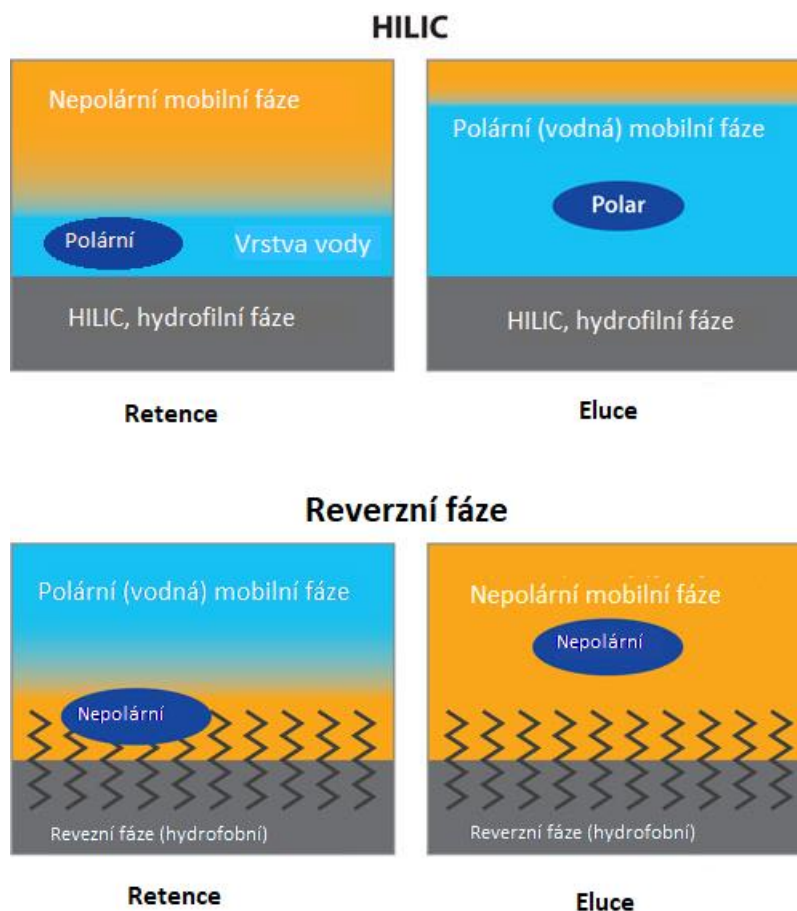
n_{SF} - látkové množství sloučeniny ve stacionární fází [mol]

n_{MF} - látkové množství sloučeniny v mobilní fází [mol]

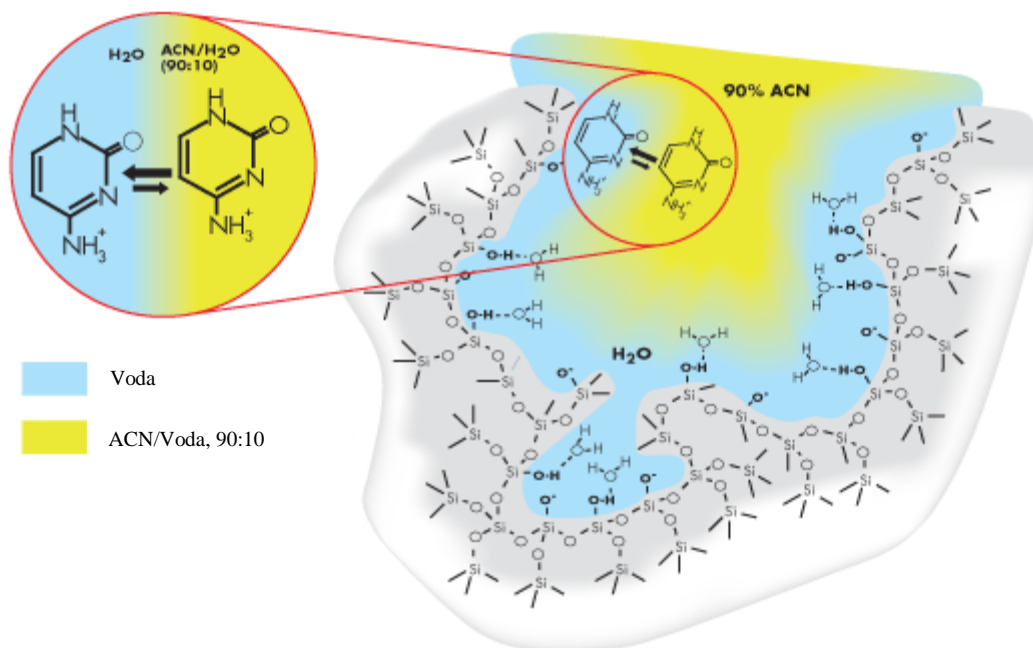
Dle polarity stacionární fáze se kapalinová chromatografie dělí na chromatografii s normální fází a chromatografii s reverzní fází. Při používání normální fáze je stacionární fáze (SF) polárnější než fáze mobilní (MF) (např. SF-silikagel a MF-heptan, pentan, chloroform). Naopak reverzní fáze využívá méně polárních stacionárních fází ve srovnání s fázemi mobilními. Nejčastěji je to C18 (oktadecylový uhlíkový řetězec) vázaný na silikagel jako SF a polární rozpouštědlo: voda, acetonitril či methanol, jako MF.

Dalším typem kapalinové chromatografie je, hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) (Alpert, 1990), která je zajímavá tím, že je vhodná pro dělení látek polárnějšího charakteru (cukry, organické kyseliny, aminokyseliny, atd.). HILIC chromatografie kombinuje hlavní přednosti chromatografie na reverzní fází (použití polárních rozpouštědel jako mobilní fáze, obvykle s přísadkou pufru) s výhodami chromatografie na normální fází (lepší separace polárních látek použitím stacionárních fází například diolových, silikagelových či zwitterionových (obrázek č. 1). Mechanismus separace na HILIC koloně není doposud ještě

detailně objasněn, pravděpodobně se ale jedná o vytvoření rovnováhy mezi hydrofobní částí mobilní fáze a hydrofilní vrstvou vody, která je navázána na povrchu polární stacionární fáze (Nováková, Douša, 2013) (obrázek č. 2). V kontrastu s reverzní fází dochází k eluci nejprve látek hydrofobních a se zvyšujícím se gradientem polární mobilní fáze (obvykle vody) se elují látky hydrofilnější (Cubbon a kol., 2007). Další výhodou je vysoký obsah organických činidel podporující ionizaci v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru (elektrosprej) (Buszewski, Noga, 2012).



Obrázek č. 1: Porovnání hydrofilní interakční chromatografie a chromatografie na reverzní fázi. [Upraveno dle: http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/General-Interest/general_GNAR2716-UNV, dostupné online 17. 9. 2018.]



Obrázek č. 2: Princip HILIC metody. [Upraveno dle: <http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/hilic.html>, dostupné online 17. 9. 2018.]

Při vývoji nové analytické metody se optimalizují některé parametry separace tak, aby bylo dosaženo ideálního rozlišení a symetrie pík v co nejkratším čase. Píky získané z chromatografické separace by měly být v ideálním případě selektivní (jeden pík by měl být tvořen jen jedním analytem), symetrické a úzké (šířka píku je ovlivněna účinností separace, která je dána počtem teoretických pater kolony n (2), rychlostí toku mobilní fáze a teplotou) (Nováková, Douša, 2013).

$$n = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (2)$$

n – počet teoretických pater chromatografické kolony [1]

t_R – retenční čas [min]

$w_{1/2}$ – šířka píku sloučeniny v polovině jeho výšky [min]

Rozlišení, nebo také míra relativní separace, $R_{1,2}$ dvou analytů udává rozdíl jejich retenčních časů dělený průměrnou hodnotou šířky pík (3). Míra rozlišení je ovlivněna účinností kolony a selektivitou SF vůči analytům. Rozlišení lze tedy ovlivnit zvýšením počtu teoretických pater kolony (teoretické patro kolony je teoretická výška kolony, na níž dojde k jednomu ustanovení rovnováhy mezi SF a MF) snížením rychlosti průtoku mobilní fáze, použitím delší

kolony nebo kolony s částicemi náplně s menším průměrem, nebo také změnou složení mobilní fáze či použitím jiné stacionární fáze. Za ideální hodnotu rozlišení se považuje $R_{1,2}=1,5-2$ (Nováková, Douša, 2013; Český lékopis, 1997).

$$R_{1,2} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2)/2} \quad (3)$$

O kvalitě provedené analýzy také vypovídá symetrie získaných píků. Ta je matematicky popsána faktorem asymetrie A_S (4) (kde $w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a d vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky). Jeho hodnota by se měla ideálně pohybovat v rozmezí 0,8-1,5 a tvar píku by měl připomínat Gaussovu křivku (Nováková, Douša, 2013; Český lékopis, 1997).

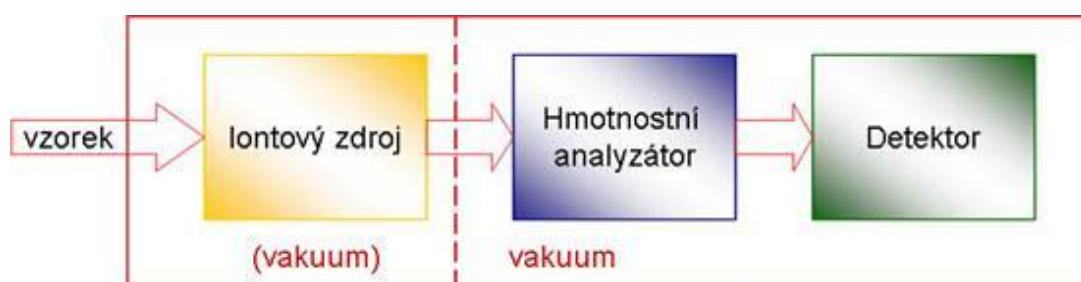
$$A_S = \frac{W_{0,05}}{2d} \quad (4)$$

Proces chromatografické separace je po rozdělení sloučenin vzorku na koloně zakončen detekcí separovaných látek. Pro svou univerzálnost a relativní jednoduchost byl dříve nejpožívanějším detektorem spektrofotometr s UV/VIS detekcí. Mezi další detektory využívaných pro detekci a kvantifikaci analyzovaných látek jejich různé fyzikálně-chemické vlastnosti patří například fluorescenční, vodivostní nebo elektrochemický detektor. V posledních několika desetiletích se však dává přednost detektoru hmotnostnímu (MS – hmotnostní spektrometr). I přes jeho relativně vysokou pořizovací i provozní cenu je detektorem nejuniverzálnějším. Mezi jeho další přednosti patří vysoká citlivost (nezbytná při stopových analýzách) a lineární odezva přes několik koncentračních řádů (2 až 5 řádů). V případě hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením také možnost určení sumárního vzorce neznámé sloučeniny. Kombinace technik LC a MS je zvláště výhodná při analýze komplexních směsí, protože hmotnostní detektor je schopen identifikovat a potvrdit analyt nejen na základě odezvy při určitém retenčním čase, ale i na základě hmotnosti analytu (Hoffmann, Stroobant, 2007; Bajad, 2006).

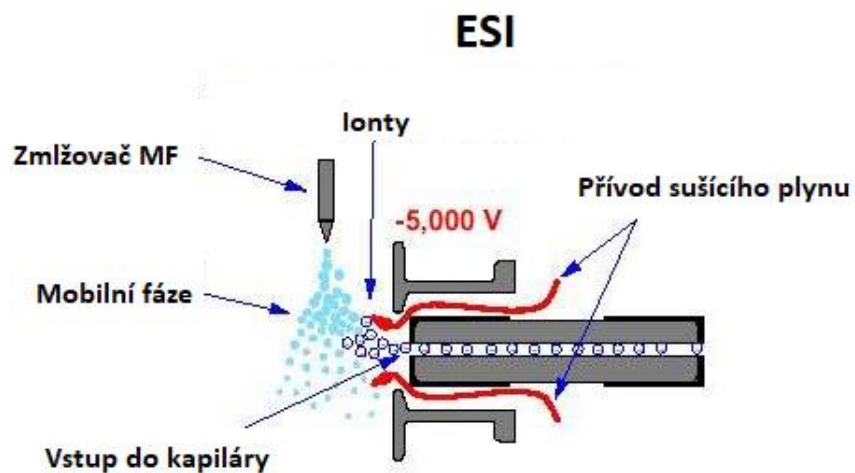
1.4 Hmotnostní spektrometrie

Jak již bylo řečeno výše, kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí se během posledních desetiletí stala metodou primární volby ve většině analytických laboratoří. Nezastupitelnou roli hraje také v metabolomice (Yan, 2015), proteomice (Aebersold, Mann, 2003), organické syntéze (Biemann, 1962) a genomice (Mohammed et al., 2016). Díky své univerzálnosti je MS tedy vhodný pro detekci téměř jakékoliv ionizovatelné látky jak při cílených (stanovení pouze vybraných látek), tak i necílených (screening všech stanovitelných sloučenin) analýzách.

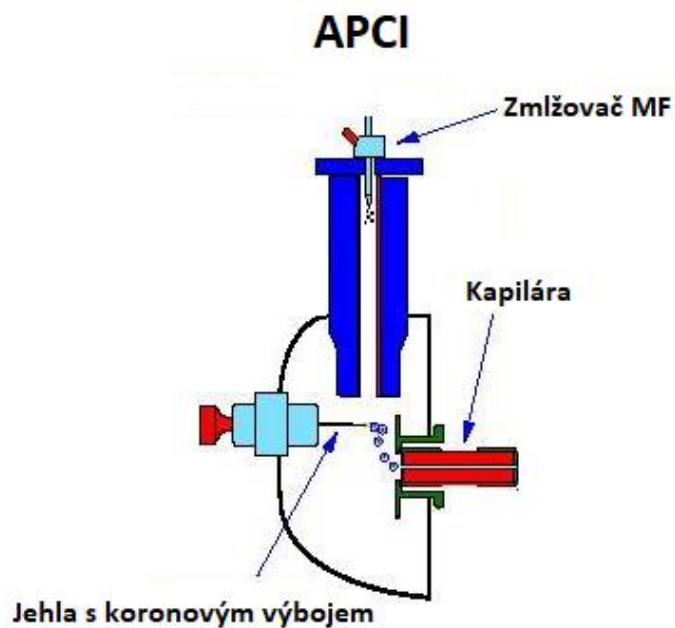
Hmotnostní spektrometr (obrázek č. 3) se skládá z iontového zdroje, jednoho případně více hmotnostních analyzátorů a detektoru. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly na nabitě částice. Nejčastější iontové zdroje používané ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou elektrosprej (ESI - electrospray ionization, obrázek č. 4) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI - atmospheric pressure chemical ionization, obrázek č. 5). Jsou to takzvané měkké ionizační techniky, kdy nedochází k rozsáhlejší fragmentaci v průběhu ionizace a vznikají převážně ionty $[M+H]^+$, nebo $[M-H]^-$, tedy protonovaná či deprotonovaná výchozí molekula. Polarita a tvorba konkrétních iontů je pak dána potenciálem vloženým na kapiláru případně ionizační jehlu iontového zdroje. U elektrospreje je vloženo vysoké napětí na kapiláru, kterou je přiváděn rozpuštěný analyt, následně dochází ke zmlžení a povrchovému nabití kapiček mobilní fáze. V důsledku vysoké teploty v prostředí iontového zdroje dochází k odpařování MF, které vede ke koncentraci povrchového náboje. Při překročení kritické hodnoty povrchového napětí dojde k tzv. coulombické explozi kapky. Tento proces se několikrát opakuje, až postupně vznikají z molekul analytů jednotlivé ionty. V případě chemické ionizace za atmosférického tlaku je přiváděný vzorek zmlžen v prostoru iontového zdroje. Koronovým výbojem jsou nejprve ionizovány molekuly mobilní fáze, které následně předávají svůj náboj molekulám analytů. Volba ionizační techniky se řídí podle fyzikálně chemických vlastností analytu a složení mobilní fáze. ESI ionizace se používá při analýze středně polárních až iontových sloučenin, není vhodná pro bezvodé MF. Pro analýzu málo až středně polárních sloučenin je vhodnější zvolit APCI (Holčapek, Jandera, 1998).



Obrázek č. 3: Schematické znázornění hmotnostního spektrometru. [Dostupné online: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/JVATE.htm>, dne 29. 11. 2018]



Obrázek č. 4: Schematické znázornění ionizace elektrosprejem. [Upraveno dle: <http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/hplc-ms.html>, dostupné online 29. 11. 2018]



Obrázek č. 5: Schematické znázornění chemické ionizace za atmosférického tlaku. [Upraveno dle: <http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/hplc-ms.html>, dostupné online 29. 11. 2018]

Ionizované molekuly pokračují dále do vlastního analyzátoru, který je jádrem celého hmotnostního spektrometru. Principem analyzátoru je rozdělení iontů dle jejich m/z za vysokého vakua.

Výběr hmotnostního analyzátoru je dán požadavky kladenými na měření zkoumaných organických látek. V případě, že je požadováno vysoké rozlišení, tedy schopnost rozlišit dva analyty o podobné m/z , je možné zvolit orbitrap či TOF (případně ICR). Tyto analyzátory poskytují informaci o přesné hmotě hledané sloučeniny (až do čtvrtého desetinného místa) a lze tak určit sumární vzorec (Pleil, Isaac, 2016). Nevýhodou orbitrapu a ICR je nízká skenovací rychlost (rychlost akvizice hmotnostního spektra). Mezi analyzátory s vysokou skenovací rychlostí patří iontové pasti a kvadrupóly. Ty řadíme mezi nízkorozlišovací hmotnostní spektrometry, u nichž je přesnost určení hmoty v řádu jednotek Da. Hmotnostní analyzátory lze také kombinovat (tzv. hybridní přístroje) a využívat předností tandemové hmotnostní spektrometrie. Ta umožňuje rozsáhlejší fragmentaci iontů po nárazu molekul kolizního plynu (obvykle N_2 , He, H_2) a umožňuje přesnou identifikaci a charakterizaci ve srovnání s jednoduchou tradiční analýzou. Taková metoda je výhodná právě v analýze složitých matric a komplexních vzorků (Gros a kol., 2006).

Ionty separované v hmotnostním analyzátoru jsou nakonec přivedeny na detektor. Tím může být nejběžnější elektronový násobič, fotonásobič či Faradayova klec. Detektor dopadu iontů generuje signál a získává se informace o relativní intenzitě iontů, která roste s koncentrací analytu (Hoffmann, Stroobant, 2007; Gross, 2004).

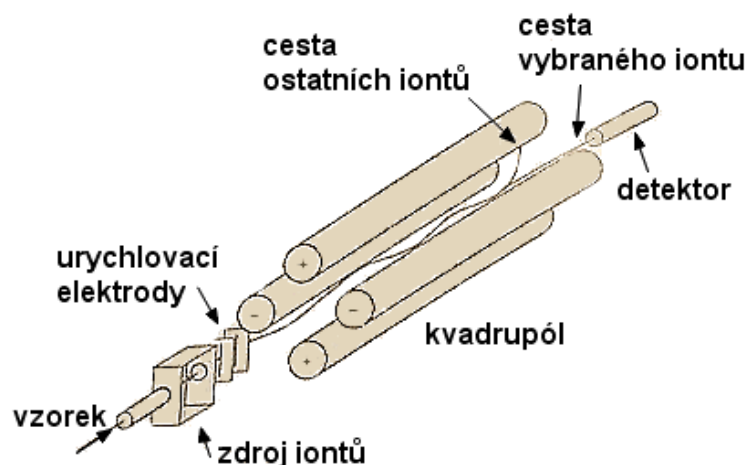
Základní informaci o celkovém průběhu chromatografické separace v závislosti na signálu detekovaných iontů poskytuje tzv. celkový iontový proud (TIC – total ion current). Pro zvýšení citlivosti detekce vybraného iontu při cílené analýze lze provést selektivní záznam vybraného iontu (SIM – single ion monitoring). Při tandemové hmotnostní spektrometrii mohou být předmětem zájmu produkty vznikající z dané molekuly po srážce s kolizním plynem (sken produktových iontů). Pokud nás zajímají všechny prekurzory, ze kterých vzniká určitý fragmentový ion, provádí se sken prekurzorových iontů. Také mohou být monitorovány ionty, ze kterých je při vzniku produktového iontu odštěpena část o určité hmotnosti (sken neutrálních ztrát). Za účelem získání vysoké citlivosti a selektivity tandemových analyzátorů se provádí záznam jedné/více reakcí (SRM/MRM – single reaction monitoring/ multiple reaction monitoring), kdy se sleduje specifická fragmentační reakce vybraného iontu (Hoffmann, Stroobant, 2007; Nováková, Douša, 2013).

1.5 QqQ – Trojitý kvadrupól a jeho využití ve stopové analýze

1.5.1 Kvadrupólový hmotnostní analyzátor

Jednoduchý kvadrupól je i přes poměrně nízké rozlišení (jednotky Da), hojně využívaným hmotnostním analyzátozem, především díky jeho jednoduchosti a cenové dostupnosti. Ve srovnání s dalšími druhy analyzátorů je kvadrupól oblíbený, protože umožňuje rychlé skenování. I přes to, že poskytuje omezené množství informací, je ve spojení s kapalinovou chromatografií často dostačující pro kvantitativní a kvalitativní analýzy (Katta a kol., 1991).

Jednoduchý kvadrupól (obrázek č. 6) tvoří čtyři tyčové paralelně uspořádané elektrody, na které je vkládáno kladné a záporné stejnosměrné napětí. Mezi tyčemi kvadrupólu vzniká oscilující elektrické pole, které selektivně stabilizuje určité ionty v závislosti na jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Změnou hodnot napětí lze selektivně skenovat ionty s různým m/z . V jednom okamžiku je kvadrupólový analyzátor schopen detekovat pouze ion s určitou hodnotou m/z . Kvadrupól tedy funguje jako hmotnostní filtr (Hoffmann, Stroobant, 2007).

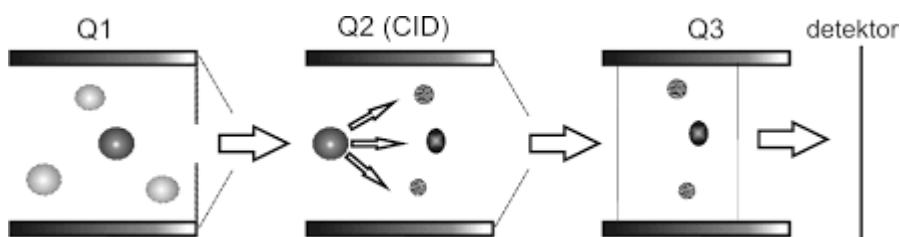


Obrázek č. 6: Schéma jednoduchého kvadrupólu. [Dostupné online: <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/detekтивni-chemie/2> dne 17. 9. 2018.]

I přes vysokou skenovací rychlost se jednoduchý kvadrupól v případě stopových a ultrastopových analýz komplexních vzorků v podstatě nepoužívá, a to z důvodu nízké citlivosti a selektivity (Lu a kol., 2008). Tento nedostatek lze při metabolomických analýzách odstranit

například použitím trojitého kvadrupólu (QqQ). QqQ má výrazně nižší meze detekce i stanovitelnosti a to až o několik řádů, také se zvýší selektivita analýzy stanovovaných látek (Kärman a kol., 2005; Lu a kol., 2008). Trojitý kvadrupól je tedy nedocenitelným pomocníkem pro svou schopnost stanovit i stopová množství hledaných látek v komplexních maticích - například přírodních vodách a také biologických vzorcích (Patti a kol., 2012; Domanski a kol., 2010).

Trojitý kvadrupól (obrázek č. 7) je tvořen systémem tří kvadrupólů zapojených sériově za sebou. První kvadrupól slouží jako hmotnostní filtr, který skenuje v předem určeném rozsahu m/z celkový iontový proud pro předem určené ionty a provádí jejich selekci. Tyto ionty dále vstupují do druhého kvadrupólu, který slouží jako kolizní cela. V něm obsažený kolizní plyn (obvykle molekuly N_2) naráží se specifickou kolizní energií do vybraných prekurzorových iontů. Ty následně fragmentují na určité charakteristické produktové ionty. Produktové ionty jsou analyzovány ve třetím kvadrupólu (Hoffmann, Stroobant, 2007; Gross, 2004).



Obrázek č. 7: Schéma trojitého kvadrupólu. [Dostupné online: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_846-850.pdf dne 17. 9. 2018.]

Při cílené analýze je známá hledaná molekula, a tedy i m/z takzvaného prekurzorového iontu. V MRM módu lze tedy určit přesně, jaké ionty mají být v prvním kvadrupólu selektovány. Při optimalizaci metody pro jednotlivé molekuly se hledají produktové ionty, na které se prekurzor rozpadá a jaká je nejideálnější kolizní energie pro vznik daného fragmentu (měřítkem je selektivita přechodu a plocha výsledného píku). I ve složitých maticích lze tak určit, zda získaný pík v určitém retenčním čase je opravdu hledanou látkou, jestli nedochází ke koluci a jaké je množství látky ve vzorku (Bajad a kol., 2006).

1.5.2 Využití trojitého kvadrupólu

Přírodní vody jsou směsí mnoha různých organických i anorganických látek, přičemž jejich celková koncentrace je obvykle velmi nízká. Pro analytické a environmentální chemiky

je stále výzvou určení přesného obsahu vybraných látek. V ideálním případě by příprava vzorku měla být velmi jednoduchá, nejlépe bez úprav či zakoncentrování, které jsou nutné pro kolorimetrické a chromatografické metody bez hmotnostního spektrometru (Dubois a kol., 1956; Meyer a kol., 2001). Z toho důvodu se při analýzách vod a dalších biologických systémů za účelem stopové a ultrastopové detekce metabolitů dnes často využívá tandemová hmotnostní spektrometrie. Ta může být reprezentovaná právě trojitým kvadrupólem, a to především díky její citlivosti, selektivitě a reprodukovatelnosti (Lu a kol., 2008). Při správném nastavení chromatografického systému lze rozlišit i izomery jednotlivých látek, například glukózu a fruktózu (Obata, Fernie, 2012; Horňák, Pernthaler, 2014). Trojitý kvadrupól je dále schopen rozlišit jednotlivé izotopy látek, čehož se využívá při kvantitativním stanovení obsahu jednotlivých analytů (Loos a kol., 2009).

Výhodou trojitého kvadrupólu jsou vysoké skenovací rychlosti, možnost rychlého přepnutí polarit, vysoká citlivost při cílené analýze, spolehlivá kvantifikace látek a lineární rozsah přes několik koncentračních řádů (Lu a kol., 2007; Li a kol., 2008). Ve srovnání například s Q-TOF (kvadrupól v kombinaci s analyzátozem doby letu) je robustnější vůči malým změnám parametrů metody (Ferrario a kol., 2016). Toto vše se podílí na možnosti spolehlivého screeningu až několika set metabolitů v rámci jedné analýzy určitého vzorku (Li a kol., 2017).

Existuje několik postupů, jak spolehlivě kvantifikovat stanovované látky. Při výběru metody se vychází z charakteru analyzovaného vzorku a dostupnosti standardních látek používaných pro kvantifikaci. Mezi nejvyužívanější patří metoda kalibrační křivky a metoda vnitřního standardu.

V případě neznečištěných přírodních vod přichází v úvahu metoda vnějšího standardu neboli metoda kalibrační křivky. Vychází se ze skutečnosti, že v určitém rozsahu koncentrací, je odezva spektrometru přímo úměrná koncentraci analytu. Ze standardů vybraných analytů se připraví řada kalibračních vzorků o různé koncentraci, přičemž rozsah kalibračních roztoků by měl korelovat s rozsahem koncentrací, které je hmotnostní spektrometr schopen detekovat s lineární odezvou. Nejnižší kalibrační bod se obvykle volí blízko limitu stanovitelnosti analytu (LOQ – limit of quantification). Pro validaci metody je většinou nutné připravit minimálně pětibodovou kalibraci. Metoda kalibrační křivky je použitelná pouze v případě, kdy lze zanedbat vliv matrice vzorku (Nováková, Douša, 2013).

Jinou možností je využití metody vnitřního standardu, a to především u vzorků s komplexní maticí, která může ovlivňovat odezvu detektoru na přítomnost daného analytu. Podstatou metody vnitřního standardu je, že se do kalibračních roztoků i do vzorku samotného přidá známé množství vnitřního standardu, kterým je obvykle izotopově značený standard,

nebo sloučenina, která se ve vzorku nevyskytuje. Vnitřní standard musí mít stejné nebo podobné chemické vlastnosti jako stanovovaná látka. Z poměru odezvy vnitřního standardu a analytu je pak možné určit obsah analytu ve vzorku. Výhodou přidavku vnitřního standardu je minimalizace vlivu změn pracovních podmínek, protože vnitřní standard i analyt jsou ovlivněny stejnou měrou (Nováková, Douša, 2013).

1.5.3 Stopové analýzy metabolitů technikou LC-QqQ-MS

Prvním krokem metabolomických analýz při tandemové hmotnostní spektrometrii je detekce a výběr nejvhodnějších dceřiných iontů vznikajících v kolizní cele. Dále se optimalizuje kolizní energie nutná pro fragmentaci prekurzorového iontu. Po vhodném naladění parametrů spektrometru následuje vývoj chromatografické metody, kdy hlavním cílem je nalezení ideálních chromatografických podmínek, které umožní detekci a kvantifikaci co nejvíce hledaných analytů (Bajad, 2006).

I přes to, že kvadrupóly umožňují rychlé skenování (skenovací rychlost, neboli minimální čas k získání dostatečného signálu, může být u kvalitních přístrojů pouhé 2 ms), je při analýze příliš mnoha sloučenin rizikem, že v případě skenování všech MRM přechodů by nebyl vzorek v danou chvíli dostatečně proskenován. Pro zvýšení citlivosti trojitého kvadrupólu se tedy při analýze velkého množství látek při jedné chromatografické separaci MRM přechody pro určitý typ látek provádí pouze v oblasti retenčního času dané sloučeniny. V danou chvíli tedy QqQ analyzuje pouze vybrané přechody, čímž se zvyšuje citlivost přístroje i spolehlivost získaných dat (Bajad, 2006; Li, 2017).

Jistou nevýhodou analýz v SRM/MRM módu je skutečnost, že takové přechody mnoha metabolitů nejsou známy. Při hledání těchto přechodů se často vychází z literatury nebo z databází metabolitů, kde jsou nejčastější fragmentové ionty a jejich kolizní energie uváděny (Chen a kol., 2013). Pro mnohé metabolity jsou také přímo dostupné knihovny MS/MS spekter, ze které je možno vycházet při identifikaci sloučeniny (MacLean a kol., 2010).

Jednou z databází je METLIN Metabolomics Database, kde jsou dostupné nejen užitečné informace o různých metabolitech (sumární vzorec, molekulová hmotnost, struktura), ale také data z tandemové hmotnostní spektrometrie. Další databáze poskytující detailní informace o hmotnostních spektrech metabolitů je MassBank of North America (MoNA). Obecné chemické informace o malých molekulách lze získat v databázi PubChem. Při studiu metabolitů vyskytujících se v lidském těle je možné hledat v databázi Human Metabolome Database (HMDB), kde jsou o dané látce dostupná chemická, klinická a molekulárně biologická data. Díky provázání serverů není obvykle nutné procházet všechny. Pokud je informace veřejně

dostupná, bývá nalezení potřebných dat jen otázkou času.

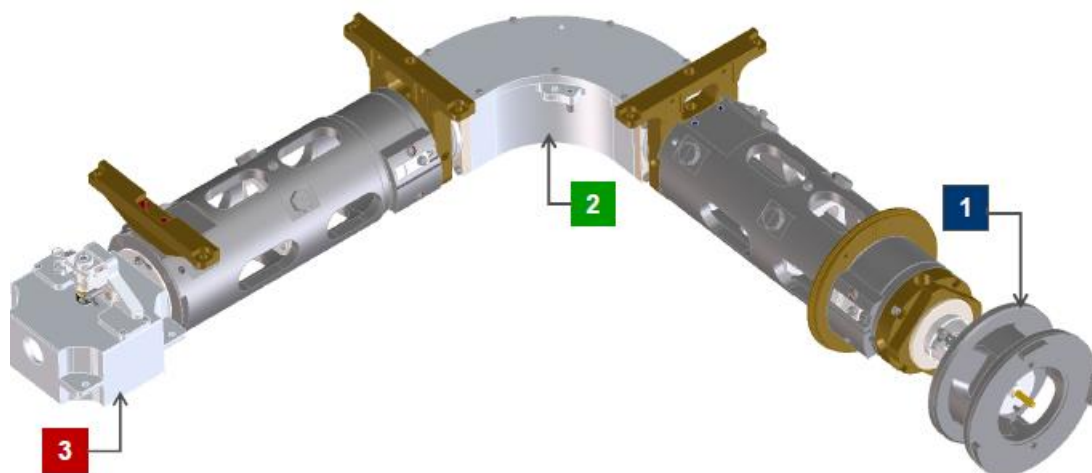
I přes možnost získání spekter a nejčastěji používaných přechodů při analýzách, slouží tyto informace často spíše jako inspirace pro vlastní optimalizaci přechodů. Důvodem pro nutnost optimalizace analýzy je skutečnost, že každý hmotností spektrometr má určité konstrukční odlišnosti, na variabilitě přechodů se dále podílí nastavení vlastního iontového zdroje, složení mobilní fáze nebo matrice vzorku. I v případě shodného fragmentového iontu je obvykle nutné minimálně optimalizovat energii kolizního plynu.

Dalším omezením trojitého kvadrupólu je jeho poměrně nízká rozlišovací schopnost. Identifikace látky je závislá na daném charakteristickém fragmentačním vzoru a nelze se tak spolehnout na přesnou hmotnost molekuly. Následkem může být koeluce isobarických látek (látky se stejnou nominální hmotností, ale jinou přesnou hmotností) a nelze je tak za daných chromatografických podmínek stanovovat odděleně (Li a kol., 2017).

Trojité kvadrupól je i přes jistá analytická omezení, jako je například nízké rozlišení, plně dostačující pro stanovování velkého množství metabolitů v komplexních matricích i při nízké koncentraci díky jeho citlivosti a vysokým skenovacím rychlostem. Zvláště ve spojení s HILIC kolonou může být využit pro separaci, detekci a kvantifikaci látek polárnějšího charakteru (Li a kol., 2017).

1.5.4 Trojitý kvadrupól Agilent QqQ 6495B

Jedním z nejmodernějších a nejlépe vybavených přístrojů pro stopové analýzy je trojitý kvadrupól od firmy Agilent se sériovým označením QqQ 6495B (schéma hmotnostního analyzátoru na obrázku č. 8). Vyznačuje se nízkou mezí kvantifikace, dobrou přesností a správností získaných dat, a to i při nízkých koncentracích (pikogramová množství látek v nástříku). Je možné využít velké skenovací rychlosti 500 MRM přechodů za vteřinu a široký lineární dynamický rozsah. Tento hmotnostní spektrometr je také velmi robustní vůči komplexním matricím. Rychlé přepínání polarity kapiláry umožňuje v jedné analýze stanovovat látky s odlišným fyzikálně chemickým charakterem. Tento hmotnostní spektrometr je ovládán softwarem MassHunter (Agilent, 2018).



Obrázek č. 8: Schéma iontové optiky, tří sériově řazených kvadrupólů a detektoru uvnitř hmotnostního spektrometru Agilent QQQ 6495B. 1-iontová optika, 2-hexapólová kolizní cela, 3-detektor s vysokoenergetickou konverzní dynodou. [Dostupné online: https://www.agilent.com/cs/library/flyers/public/News_and_innovations_from_Agilent_LCMS_group-Martin_Haex.pdf, dne 5. 12. 2018].

Nízké meze detekce a vysokou citlivost umožňuje (mimo jiné) speciální technologie nazvaná Agilent Jet Stream, což je takzvané termální gradientové zaostřování. Tato technologie zvyšuje účinnost ionizace elektrospreje zejména zlepšením fokusace iontů a rychlejším odstraněním molekul rozpouštědla. Toho je dosaženo přiváděným proudem dusíku, který je zahřátý na vysokou teplotu (obvykle kolem 300 °C). Rychlé odstranění mobilní fáze a zakoncentrování iontů před vstupem do vlastního hmotnostního analyzátoru také snižuje množství šumu a pozitivně působí na tvar píků (Agilent, 2018).

Trojité kvadrupól 6495B od firmy Agilent disponuje možností takzvané Dynamic MRM, neboli dynamického přizpůsobení měření MRM přechodů v průběhu analýzy. Tato technika spočívá v tom, že měření MRM přechodů konkrétních látek je rozděleno do časových segmentů podle retenčních časů vybraných analytů. Dané množství prováděných MRM přechodů v určitém konkrétním časovém okamžiku je tedy mnohem menší ve srovnání s celkovým množstvím měřeným za celkovou dobu analýzy, což výrazně zvyšuje dobu, po kterou mohou být měřeny danými přechody jednotlivé látky. Dynamické měření MRM přechodů se tedy podílí na spolehlivosti kvalitativní i kvantitativní analýzy při velkém množství (až 4000) přechodů v jedné analýze (Agilent, 2017).

1.6 Validace analytických metod

Data získaná pomocí analytických metod jsou vždy zatížena určitou chybou. Analytické váhy, volumetrické nádoby, pipety i analytické přístroje jako hmotnostní spektrometry a chromatografické systémy jsou zdrojem chyb, stejně tak i vlastní práce analytika (navazování, pipetování, manipulace se vzorky). Získané koncentrace tedy neodpovídají přesně skutečnému obsahu analytu ve vzorku, ale pohybují se v určitém rozsahu hodnot. Před zavedením nové metody do praxe je tedy nutné nejprve popsat, jaký je rozptyl získaných dat a v jakém rozsahu koncentrací jsou získaná data dostatečně spolehlivá pro požadavky analýzy. Pro validaci určité analytické metody v praxi zpravidla postupuje podle norem vydaných autoritami, jako jsou například Český normalizační institut, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Mezi zahraniční autority patří Food and Drug Administration nebo International Organization for Standardization.

Z důvodu složitého a nepřehledného názvosloví a pojmenovávání validačních parametrů v českém jazyce se v této diplomové práci vychází z názvosloví uvedeného v Předběžné české technické normě ČSN P CEN/TS 16800 [1], kde jsou uvedeny názvy jednotlivých validačních parametrů v českém i anglickém jazyce a termíny jsou podrobně vysvětleny.

Při validování metody je nutné při odhadu vychýlení od skutečné hodnoty pracovat s materiálem, který má přesně definovaný obsah daného analytu v matrici, která odpovídá stanovovaným vzorkům. V případě komerční dostupnosti je ideální pracovat s takzvaným certifikovaným referenčním materiálem (CRM), jenž tyto požadavky splňuje. Alternativou může být příprava takzvaného interního referenčního materiálu (IRM), který je definován jako homogenní dávka materiálu vzorku s přidavkem analytu, přičemž matrice má být co nejpodobnější typu matrice, se kterou se pracuje při vývoji metody. [1]

Parametry analytických metod

Vychýlení, strannost (bias) [1]

Definována jako rozdíl mezi referenční hodnotou a střední hodnotou výsledku měření.

Při výpočtu vychýlení je nutné mít k dispozici CRM nebo IRM, ke kterému je možné výsledek měření vztáhnout. Velikost vychýlení se stanovuje jako celková výtěžnost A , které je průměrem výsledků jednotlivých výtěžností A_i (5).

$$A_i = \frac{x_{c+\Delta c,j} - x_{c,j}}{\Delta c} \quad (5)$$

$x_{c+\Delta c,j}$ – naměřená hodnota měřené veličiny ve vzorku s přidavkem analytu

$x_{c,j}$ – naměřená hodnota měřené veličiny ve vzorku bez přidavku analytu

Δc – přidané množství měřené veličiny

Přesnost (accuracy) [1, 2]

Těsnost shody mezi výsledkem zkoušky a přijatou referenční hodnotou.

Přesnost se počítá jako výtěžnost z CRM nebo IRM. Měří se devět vzorků na minimálně třech úrovních koncentrace (například 3 opakování na 3 koncentračních úrovních, první úroveň bývá LOQ-limit kvantifikace, druhou hodnota v polovině a třetí v 75 % rozsahu kalibrace).

Preciznost (precision) [1, 2]

Těsnost shody mezi nezávislými výsledky zkoušek za definovaných podmínek.

Preciznost se odhaduje z opakované analýzy vzorků na různých koncentračních úrovních (používá se stejný vzorek jako pro odhad vychýlení).

Preciznost za podmínek opakovatelnosti (výsledky zkoušek se získají toutéž metodou na tomtéž přístroji, jedním operátorem se stejným vybavením v krátkém časovém úseku) se určuje dle (5) a (6) jako relativní směrodatná odchylka výsledků z jednotlivých opakování.

Preciznost za podmínek opakovatelnosti by měla být zjištěna pomocí devíti opakovaných měření (3 koncentrační úrovně, na každé 3 replikáty), nebo minimálně šest opakování při stoprocentní testované koncentraci.

$$SD = \sqrt{\frac{1}{(p-1)} \sum_{j=1}^p (x_j - \bar{x})^2} \quad (5)$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (6)$$

SD – výběrová směrodatná odchylka z výsledků jednotlivých opakování x_j při měření referenčního materiálu [jednotky koncentrace]

\bar{x} – aritmetický průměr jednotlivých opakování x_j [jednotky koncentrace]

p – počet opakování

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Kalibrace [1, 2, 3]

Kalibrace je proces, ve kterém je zjištěn vztah mezi velikostí odezvy přístroje na obsah analytu ve vzorku.

Při výpočtu kalibrační funkce je nutné připravit sadu roztoků s koncentracemi ekvidistantně rozmístěnými v celém požadovaném rozsahu koncentrací (minimum je pět úrovní). V případě požadavku linearity kalibrační funkce je nutné určit, zda je funkce lineární v požadovaném rozsahu koncentrací. Linearita a pracovní rozsah se určují matematicky s použitím počítačových programů.

Nejčastěji se linearita kalibrační funkce hodnotí pomocí koeficientu determinace R^2 . Tato hodnota popisuje rozptyl naměřených hodnot od predikované lineární regresní funkce.

Výsledná funkce získaná výpočtem regrese metodou nejmenších čtverců je pouze odhadem skutečné funkce. Odhad nejistoty vyjadřuje číselně reziduální směrodatná odchylka s_y (7), je mírou rozptýlení naměřených hodnot kolem kalibrační přímky. Při výpočtu se dosazují koeficienty a a b z dané kalibrační funkce vyjádřené ve tvaru: $y=a \cdot x+b$.

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + ax_i)]^2}{p-2}} \quad (7)$$

s_y - reziduální směrodatná odchylka kalibrační funkce [jednotky koncentrace]

Pro každou hodnotu x tedy existuje konfidenční interval pokrývající skutečnou hodnotu y . Tento konfidenční interval v celém rozsahu kalibrační funkce lze graficky znázornit jako dva hyperbolické oblouky ohraničující z obou stran vlastní kalibrační křivku (v krajních bodech je rozsah nejistoty největší). Konfidenční intervaly lze získat ze vztahu uvedeném v (8). Konfidenční interval pokrývá skutečnou analytickou hodnotu v rozmezí daném statistickou jistotou určenou Studentovým rozdělením.

$$\hat{x}_{1,2} = \frac{\hat{y}-a}{b} \pm \left(\frac{s_y \cdot t}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{\hat{p}} + \frac{(\hat{y}-\bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2}} \right) \quad (8)$$

\hat{y} – průměr naměřených informačních hodnot vyplývajících z p opakování

\hat{x} – koncentrace stanovovaného ukazatele ve vzorku vypočtená z hodnoty průměru naměřených informačních hodnot \hat{y}

Za nejnižší bod kalibrační křivky je obvykle zvolen bod meze stanovitelnosti (LOQ), což je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze danou metodou kvantifikovat s přijatelnou přesností a správností. Mez stanovitelnosti lze orientačně vypočítat jako trojnásobek meze detekce

(LOD). Přístupů k výpočtu meze detekce je několik, obvykle ji lze odhadnout jako trojnásobek výšky šumu základní linie. Ovšem v případě hmotnostních spektrometrů bývá šum velmi malý. Proto je někdy vhodnější použít postup popsáný v knize *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (Miller a Miller, 2005), kde je LOD vypočítán jako trojnásobek výběrové směrodatné odchylky s_y , protože tato hodnota lépe odpovídá normálnímu rozdělení hodnot při měřeních prováděných pomocí LC-MS.

Selektivita [1]

Selektivita metody je schopnost rozlišit sledovanou měřenou látku od dalších složek v matici vzorku za daných podmínek.

Selektivita je spíše charakterizována kvalitativně než kvantitativně. Měřeními se porovnají výsledky vzorků s přídavkem a bez přídavku analytu, s přídavkem a bez přídavku potenciálně rušivých látek z matrice.

Robustnost [1]

Robustnost je mírou schopnosti metody odolávat malým, ale záměrným změnám experimentálních podmínek a poskytnout představu o spolehlivosti metody při běžném používání.

Robustnost je vícesložkovou veličinou a zahrnuje robustnost vůči změně vzorku v jedné laboratoři, robustnost vůči malému kolísání provozních podmínek a podmínek prostředí (teplota, tlak, chemikálie, odlišné nastavení přístrojů...). Tyto požadavky jsou kladeny zvláště na metody, které mají být používány rutinně z důvodu zajištění spolehlivosti analytického stanovení.

Nejistota měření [1]

Nejistota měření charakterizuje rozptýlení získaných naměřených hodnot a představuje chybu měření. Je nezbytná k tomu, aby mohla být nezávislá měření porovnávána. Lze také stanovit požadavky na maximální hodnotu nejistoty metody.

Určování nejistoty měření se provádí odhadem systematických i náhodných chyb opakovaným měřením vhodných certifikovaných referenčních materiálů, případně interních referenčních materiálů. Celková nejistota zahrnuje výpočet preciznosti (precision) za podmínek reprodukovatelnosti (výpočet variačního koeficientu) a výpočet přesnosti (accuracy) (výpočet výtěžnosti, pracuje se s maticí obohacenou stanoveným analytem).

Vzorek je obvykle analyzován ve třech opakováních. Výsledek analýzy vzorku se obvykle udává ve formě: střední hodnota \pm nejistota. Přičemž jako odhad hodnoty nejistoty může být použit například dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky jednotlivých výsledků měření vzorku.

Na základě výše uvedených kroků se určí, zda a v jakém koncentračním rozsahu je metoda použitelná s požadovanou selektivitou, precizností, přesností a nejistotou měření.

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši na téma analytika metabolitů v povrchových sladkovodních vodách včetně validace celého procesu, se zaměřením na využití hmotnostní spektrometrie pro stopovou analýzu metabolitů s využitím trojitého kvadrupólu
- Vypracovat vhodnou LC-QqQ-MS metodu pro přímé stopové stanovení nízkomolekulárních organických látek v přírodních sladkých povrchových vodách bez předchozí předkoncentrace analytů ve vzorku
- Provést validaci vypracované LC-QqQ-MS metody pro přímé stanovení vybraných metabolitů v povrchových vodách.
- Ověřit vypracovanou metodu LC-QqQ-MS na analýze metabolitů v reálných vzorcích povrchových vod.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Lokalita a odběr vzorků

Vzorky vody byly odebrány v listopadu 2018 podle standardního protokolu používaného Hydrobiologickým ústavem při Biologickém centru AV ČR, v. v. i. (dále jen Hydrobiologický ústav) pro odběr povrchových sladkých přírodních vod. Voda byla přímo na místě odběru přefiltrována nylonovým sítkem s průměrem ok 40 μm z důvodu odstranění případných nečistot (listí, jehličí, zvířený sediment a podobně). Do laboratoře byly vzorky převezeny v chladicích taškách a po zfiltrování přes skleněný filtr o porozitě 0,4 μm (Macherey Nagel GF-5, Německo) byly skladovány při 4 °C v chladicím boxu. Chemické parametry poskytnuté Hydrobiologickým ústavem (pH, vodivost, koncentrace rozpuštěného uhlíku a koncentrace nejčastějších iontů) jsou uvedeny v příloze v tabulce I.

První sada vzorků podrobených analýze byla voda, která je upravována na vodu pitnou. První vzorek byl odebrán z výtoku vodní nádrže Římov, která leží na řece Malší a slouží jako zdroj pitné vody pro České Budějovice. Dále byla analyzována surová voda přitékající do úpravny vody Plav z Římovské vodní nádrže. Oba vzorky přírodní vody byly porovnány s pitnou vodou (také z úpravny vody Plav).

Dále byly porovnány obsahy analytů ve výtocích dvou šumavských jezer – Čertova a Plešného. Obě dvě jezera leží na české straně Šumavy. Čertovo jezero má maximální hloubku 36,5 m a má větší objem než jezero Plešné, jehož maximální hloubka je 18,3 m. Šumavská jezera jsou charakteristická tím, že jejich podloží je chudé na vápenaté ionty, tudíž jsou náchylná k okyselení. Ve srovnání s Čertovým jezerem je jezero Plešné méně ovlivněno antropogenním znečištěním kyselými dešti a také jsou vody do něj přitékající bohatší na fosfor. Z toho důvodu je primární produkce v jezeře vyšší.

Poslední dva vzorky vody byly odebrány ze dvou vodních ploch v Novohradských horách. Prvním odběrovým místem byl lesní potok u vesnice Pohoří na Šumavě. Druhý vzorek vody byl odebrán z Jiřické nádrže (Pohořského rybníka), která byla vybudována v 18. století k usnadnění splavování dřeva.

Pro zohlednění vlivu ročního období na obsah analytů v přírodních sladkých povrchových vodách byl orientačně zanalyzován stejnou metodou i vzorek vody z přítoku do Římovské přehrady, který byl odebrán v srpnu 2016 stejným postupem jako vzorky uvedené výše. Vzorek byl uchováván v mrazicím boxu.

3.2 Metodika

3.2.1 Instrumentace a používaný software

Při přípravě roztoků a měření vzorků bylo používáno následující laboratorní vybavení:

- LC/MS: 6495B Trojitý kvadrupól (Agilent, Santa Clara, Kalifornie, USA)
- Přístroj na přípravu ultračisté vody: Direct-Q[®] 3 UV Water Purification System (Merck, Darmstadt, Německo)
- pH metr (Mettler Toledo, Praha, Česká republika)
- Automatické pipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Mikrostříkačky (Hamilton, Labicom, Olomouc, Česká republika)
- Další běžné laboratorní vybavení: analytické váhy, laboratorní sklo...

Pro měření vzorků a vyhodnocování dat byly používány následující programy:

- MS Excel
- MassHunter Data Acquisition, verze B.09.00
- MassHunter Qualitative Analysis, verze B.07.00
- MassHunter Optimizer, verze B.09.00 (dále jen Optimizer)
- MassHunter Quantitative Analysis, verze B.09.00
- MassHunter Source and iFunnel Optimizer, verze B.09.00 (dále jen Source Optimizer)

3.2.2 Ladění MRM přechodů

V této práci jsou pro molekulovou hmotnost používány jednotky Dalton (Da), které jsou obvyklé pro vyjádření hmotnosti při práci s MS daty (Busch, 2001). Pro vyjádření v SI jednotkách lze použít jednoduchý přepočít, kdy pro $[H]^+$, $m/z = 1$ Da.

Komplexní validace podle příslušných norem pro analýzu vod nebyla dělána pro všechny analyty stanovitelné pomocí HILIC metody na trojitém kvadrupólu. Metoda byla zvalidována pouze pro osm vybraných metabolitů, které byly detekovány ve vzorcích vod při zkušební analýze. Metabolity a k nim vybrané vnitřní standardy jsou uvedeny v tabulce č. 1. Volba značených vnitřních standardů v případě nedostupnosti IS odpovídajícího danému metabolitu byla provedena tak, aby jeho fyzikálně chemické vlastnosti byly co nejvíce podobné danému analytu a aby dobře ionizoval v MS. Vybrané metabolity s retenčními časy a MRM přechody jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 1: Seznam metabolitů a vnitřních standardů používaných při validaci.

Analyt	Vnitřní standard
prolin	prolin $^{13}C_5$
leucin	alanin $^{13}C_3$
isoleucin	alanin $^{13}C_3$
valin	alanin $^{13}C_3$
fenylalanin	fenylalanin $^{13}C_6$
lysin	lysin $^{13}C_6$
k. maleinová	k. α -ketoglutarová $^{13}C_4$
k. jablečná	k. α -ketoglutarová $^{13}C_4$

Tabulka č. 2: Seznam metabolitů a vnitřních standardů použitých při validaci metody s jejich sumárními vzorci, molární hmotností, orientačním retenčním časem a použitými MRM přechody.

Analyt	Sumární vzorec	Molární hmotnost	Orientační retenční čas	Prekurzor [M+H] ⁺	Produkt	Kolizní energie	Prekurzor [M-H] ⁻	Produkt	Kolizní energie
		[g.mol ⁻¹]	[min]	[Da]	[Da]	[eV]	[Da]	[Da]	[eV]
Fenylalanin	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,19	6,0	166,1	77,0	48	164	72,2	12
					102,9	32		103,0	16
					120,0	12		147,0	12
Prolin	C ₅ H ₉ NO ₂	115,13	8,0	116,0	43,0	32			
					70,0	16			
Leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,18	6,7	132,2	86,0	8			
					44,0	32			
					43,0	24			
Isoleucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,18	6,7	132,2	86,0	8			
					44,0	32			
					43,0	24			
Valin	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,15	7,8	118,1	55,0	24			
					72,0	12			
Lysin	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,19	15,2	147,1	56,0	40			
					84,0	16			
					130,1	8			
Kyselina jablečná	C ₄ H ₆ O ₅	134,09	10,7				133,0	71,0	12
								73,1	16
								115,0	8
Kyselina maleinová	C ₄ H ₄ O ₄	116,07	7,8				115,0	71,0	8
Vnitřní standard									
Fenylalanin ¹³ C ₆	¹³ C ₆ C ₉ H ₁₁ NO ₂	171,19	6,0	172,2	81,1	48	170,1	109,0	16
					109,0	32		153,2	12
					126,1	12		72,1	16
Lysin ¹³ C ₆	¹³ C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	152,19	15,2	153,2	59,1	40			
					89,1	16			
Prolin ¹³ C ₅	¹³ C ₅ H ₉ NO ₂	120,13	8,0	121,1	74,1	20			
					46,2	32			
Alanine ¹³ C ₃	¹³ C ₃ H ₇ NO ₂	92,09	9,3	93,1	46,1	12			
K. α-ke-toglutarová ¹³ C ₄	¹³ C ₄ CO ₅ H ₆	150,11	10,1				149,1	60,1	8
								105,0	4

Pro stanovení jednotlivých analytů je nutné nalézt a vybrat vhodné MRM přechody. Postupovat lze několika způsoby. Jednou z možností je využití softwarového vybavení hmotnostního spektrometru od firmy Agilent, program Optimizer. Po nařazení roztoku standardu

padesátiprocentním acetonitrilem na vhodnou koncentraci (jako vhodná se osvědčila koncentrace 100 ng.ml⁻¹ u hůře ionizujících látek a 50 ng.ml⁻¹ u dobře ionizujících) je vzorek ve třech po sobě jdoucích analýzách nadávkován automatickým dávkovačem na kolonu.

V prvním kroku se provádí sken produktových iontů (ionty prekurzoru fragmentovány kolizními energiemi 0, 15, 30 a 45 eV). V druhé analýze jsou nejčtenější produktové ionty z první analýzy podrobeny fragmentacím při různých kolizních energiích (rozsah nastaven na 0-60 eV s rozestupem 4 eV). V posledním kroku se zpřesňuje (na první desetinné místo) m/z produktových iontů z předchozích analýz. Následuje výběr kolizní energie poskytující nejintenzivnější produktový ion a kontrola selektivity. V případě, že není možné touto cestou získat produktový ion, je nutné postupovat jinak.

Pro většinu komerčně dostupných látek je možné najít nejčastější produktové ionty ve veřejně přístupných databázích (např. MRM-Metlin). Když látka v těchto databázích není uvedena (derivatizované látky, značené vnitřní standardy, atd.), je nutno udělat sken produktových iontů jako samostatnou metodu a ve výsledném chromatogramu vybrat potenciální kandidáty. V obou případech následuje výběr optimální kolizní energie prováděný opět v programu Optimizer.

3.2.3 Nastavení chromatografického systému a hmotnostního spektrometru

Optimalizace LC podmínek separace metabolitů nebyla předmětem této práce. Pro analýzu metabolitů ve vodách byly využity metody vyvinuté v laboratoři Biochemie a metaboliky Biologického centra AV ČR, v. v. i. v Českých Budějovicích.

K LC-QqQ-MS analýzám byla použita kolona s reverzní fází C18 (ZORBAX Eclipse Plus C18, 50 x 3 mm, 1,8 μm) s krátkým tříminutovým gradientem (tabulka č. 3). Následným krokem bylo ověření retenčních časů na HILIC koloně (SeQuant ZIC-pHILIC, 150 x 4,6 mm, 5 μm). Stejná kolona byla použita při měření kalibračních i reálných vzorků.

Pro každou látku byly vybrány dva až tři MRM přechody. Kvantifikátor je obvykle MRM přechod s nejvyšší intenzitou. Ostatní přechody slouží jako kvalifikátory, používají se ke zvýšení jistoty identifikace dané sloučeniny.

Při stanovování skupiny látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi je vhodné zoptimalizovat nastavení iontového zdroje a podpořit tak ionizaci sledovaných látek. Program Source Optimizer od firmy Agilent umožňuje kroky optimalizace zautomatizovat. V sérii analýz jednoho nebo více standardů se mění postupně nastavení iontového zdroje. Po ukončení této série následuje výběr nejvhodnějších parametrů iontového zdroje analytikem.

Jako mobilní fáze byly použity 20 mmol.l⁻¹ (NH₄)₂CO₃ vodný pufr o pH 9,2 a acetonitril. Všechny používané chemikálie byly v čistotě vhodné pro analýzu na LC/MS systému.

Chromatografické podmínky a nastavení hmotnostního spektrometru jsou uvedeny v tabulkách číslo 3 až 8. Z důvodu nízké koncentrace analytů ve vodě bylo nastříkováno 20 µl vzorku (maximální objem nastříkovaný automatickým dávkovačem bez použití speciální nástřikové smyčky pro vyšší objemy).

Tabulka č. 3: Podmínky chromatografické separace při optimalizaci MRM přechodů.

Metoda LC: optimalizace přechodů	
chromatografická kolona	ZORBAX Eclipse PlusC 18, 50x3 mm, 1,8 µm
nástřik	5/10 µl
průtok	400 µl.min ⁻¹
délka analýzy	3 min
teplota při separaci	40 °C
maximální tlak	1000 bar
MF-A	20 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ , pH 9,2
MF-B	ACN

Tabulka č. 4: Gradient použitý při LC separaci pro optimalizaci MRM přechodů.

gradient MF		
čas	MF-A	MF-B
(min)	(%)	(%)
0	70	30
1	0	100
2,5	0	100
2,6	70	30

Tabulka č. 5: Podmínky chromatografické separace při hydrofilní iontové chromatografii.

Metoda LC: HILIC	
chromatografická kolona	SeQuant ZIC-pHILIC, 150x4,6 mm, 5 µm
nástřik	20 µl
průtok	450 µl.min ⁻¹
délka analýzy	30 min
teplota při separaci	35 °C
maximální tlak	200 bar
MF-A	20 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ , pH 9,2
MF-B	ACN

Tabulka č. 6: Gradient použitý při hydrofilní iontové kapalinové chromatografické separaci.

gradient MF		
čas	MF-A	MF-B
(min)	(%)	(%)
0	20	80
20	80	20
20,1	95	5
23,3	95	5
23,4	20	80
30	20	80

Tabulka č. 7: Nastavení iontového zdroje a iontové optiky hmotnostního spektrometru při optimalizaci MRM přechodů.

Nastavení iontového zdroje a iontové optiky (výchozí nastavení)		
Teplota zmlžujícího plynu	150 °C	
Průtok zmlžujícího plynu	15 l.min ⁻¹	
Tlak nebulizátoru	30 psi	
SGT	380 °C	
SGF	12 l.min ⁻¹	
	Positiv	Negativ
Napětí na kapiláře	3500 V	3500 V
Napětí na trysce (Nozzle Voltage)	500 V	500 V
High Pressure RF	150 V	90 V
Low Pressure RF	60 V	60 V

SGT-sheath gas temperature, teplota plynu zaostřujícího analyty do úzkého kužele

SGF-sheath gas flow, průtok plynu zaostřujícího analyty do úzkého kužele

High Pressure a Low Pressure RF-radiofrekvenční napětí v cele s vysokým tlakem (7-14 torr)
a v cele s nízkým tlakem (1-3 torr)

Tabulka č. 8: Nastavení iontového zdroje a iontové optiky hmotnostního spektrometru při HILIC chromatografii.

Nastavení iontového zdroje a iontové optiky (HILIC)		
Teplota zmlžujícího plynu	290 °C	
Průtok zmlžujícího plynu	11 l.min ⁻¹	
Tlak nebulizátoru	25 psi	
SGT	380 °C	
SGF	12 l.min ⁻¹	
	Positiv	Negativ
Napětí na kapiláře	3500 V	3500 V
Napětí na trysce (Nozzle Voltage)	500 V	500 V
High Pressure RF	150 V	60 V
Low Pressure RF	60 V	60 V

SGT-sheath gas temperature, teplota plynu zaostřujícího analyty do úzkého kužele

SGF-sheath gas flow, průtok plynu zaostřujícího analyty do úzkého kužele

High Pressure a Low Pressure RF-radiofrekvenční napětí v cele s vysokým tlakem (7-14 torr)
a v cele s nízkým tlakem (1-3 torr)

3.2.4 Validace metody

Při validaci LC-QqQ-MS metody pro měření metabolitů ve sladkých přírodních vodách bylo postupováno podle následujících dokumentů:

- Předběžná česká technická norma z roku 2017 (ČSN P CEN/TS 16800) [1] popisuje celkový obecný postup pro validaci fyzikálně-chemických analytických metod.

- Norma Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) z roku 1996 [2] uvádí metodologii procesu validace analytických metod.

- Česká norma z roku 1994 (ČSN ISO 8466-1) [3] uvádí popis statistického hodnocení lineárních kalibračních funkcí.

- Mezinárodní norma z roku 2012 (ISO 11352) [4] upravuje hodnocení nejistoty měření.

- Kniha Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (Miller a Miller, 2005) obsahuje popis pro výpočet meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ)

V rámci této diplomové práce byly jako referenční materiály použity roztoky standardních látek s koncentracemi odpovídajícími kalibračním bodům na nejnižší úrovni ($0,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), v 50 % ($5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) a přibližně v 75 % ($20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) kalibračního rozsahu. Roztoky byly připraveny ve třech opakováních a použity k výpočtu preciznosti (vyjádřená jako procentuální hodnota relativní směrodatné odchylky v daném bodě) a přesnosti (vyjádřená jako aritmetický průměr procentuálních hodnot výtěžnosti v daném kalibračním bodě).

LOD byl stanoven arbitrárně jako trojnásobek výšky šumu základní linie. Nejnižší bod kalibrace s vyhovujícími hodnotami přesnosti a preciznosti byl považován za LOQ metody.

3.2.5 Příprava kalibračních roztoků a referenčních materiálů

Dalším krokem při vývoji metody byla příprava kalibračních roztoků a referenčních materiálů.

Pro jednotlivé analyty a vnitřní standardy byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50 % acetonitrilu. Z těchto roztoků byly připraveny směsné pracovní roztoky. Obsah jednotlivých analytů v pracovních roztocích byl $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, jako rozpouštědlo byl opět použit 50 % acetonitril. Koncentrace vnitřních standardů v kalibračních vzorcích byla $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pipetované objemy jsou uvedeny v tabulce číslo 9.

Z důvodu velmi nízké koncentrace rozpuštěných látek v přírodních sladkých povrchových vodách byla pro kalibraci použita destilovaná voda. Příprava referenčních materiálů tedy probíhala stejně jako příprava kalibračních roztoků. Pipetované objemy jsou uvedeny v tabulce číslo 9.

Tabulka č. 9: Objemy pracovního směsného roztoku metabolitů 100 ng.ml⁻¹, pracovního směsného roztoku metabolitů 5 ng.ml⁻¹, pracovního směsného roztoku vnitřních standardů 100 ng.ml⁻¹ a 50 % acetonitrilu použité při přípravě kalibračních roztoků a referenčních materiálů.

Označení	V (PR-100 ng.ml ⁻¹)	V (PR-5 ng.ml ⁻¹)	V (PR IS-100 ng.ml ⁻¹)	V (50% ACN)
	(ul)	(ul)	(ul)	(ul)
PR-5 ng/ml	25	x	x	475
0.1 ng/ml	x	10	50	440
0.5 ng/ml	x	50	50	400
1 ng/ml	5	x	50	445
2.5 ng/ml	12.5	x	50	437.5
5 ng/ml	25	x	50	425
10 ng/ml	50	x	50	400
15 ng/ml	75	x	50	375
20 ng/ml	100	x	50	350
25 ng/ml	125	x	50	325
RM 0.1 ng/ml-I	x	10	50	440
RM 0.1 ng/ml-II	x	10	50	440
RM 0.1ng/ml-III	x	10	50	440
RM 0.5 ng/ml-I	x	50	50	400
RM 0.5 ng/ml-II	x	50	50	400
RM 0.5 ng/ml-III	x	50	50	400
RM 5 ng/ml-I	25	x	50	425
RM 5 ng/ml-II	25	x	50	425
RM 5 ng/ml-III	25	x	50	425
RM 20 ng/ml-I	100	x	50	350
RM 20 ng/ml-II	100	x	50	350
RM 20 ng/ml-III	100	x	50	350

3.2.6 Příprava reálných vzorků vod pro měření

Aby byl nastříkovaný vzorek kompatibilní se systémem mobilních fází acetonitril/vodný pufr uhličitanu amonného, bylo nutné, aby polovinu nastříkovaného objemu tvořil acetonitril. Ke 250 μl vzorku vody bylo přidáno 200 μl acetonitrilu a 50 μl pracovního roztoku vnitřních standardů o koncentraci 100 ng.ml⁻¹. Všechny vzorky byly připraveny a měřeny v triplikátech.

4 VÝSLEDKY

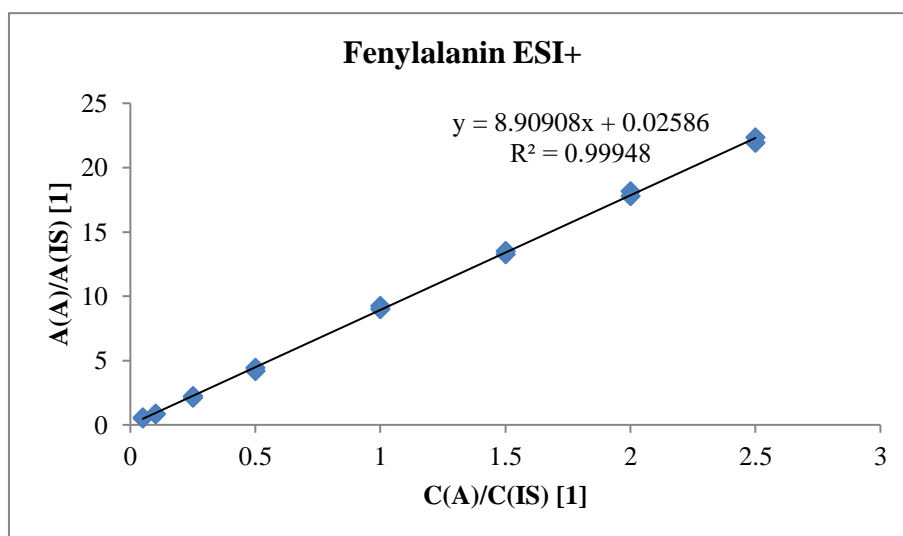
4.1 Kalibrace

Nejprve byly změřeny kalibrační vzorky v rozsahu 0,1-25 ng.ml⁻¹. Pro tento rozsah byly připraveny referenční materiály o koncentracích 0,1, 5 a 20 ng.ml⁻¹. Hodnoty výtěžnosti na koncentrační úrovni 0,1 ng.ml⁻¹ neodpovídaly předpokládaným očekávaným hodnotám uvedeným v publikaci Guidelines for Standard Method Performance Requirements [5]. Rozsah koncentrací byl tedy zmenšen na 0,5 – 25 ng/ml. Očekávaná hodnota přesnosti je do 21 % na úrovni desítek ng.ml⁻¹ a do 30 % na úrovni jednotek ng.ml⁻¹, očekávaný rozsah preciznosti 60-115 % na úrovni desítek a 40-120 % na úrovni jednotek ng.ml⁻¹

Výsledné kalibrační křivky s rovnicemi spojnic trendu a hodnotami R² pro vybrané analyty jsou uvedeny na grafech číslo 1-8.

Fenylalanin ESI+ (IS Fenylalanin ¹³C₆)

Kvantifikační MRM přechod: 166,1 Da > 120 Da, CE: 12 eV



Graf č. 1: Kalibrační funkce fenylalaninu (pozitivní ionizační mód).

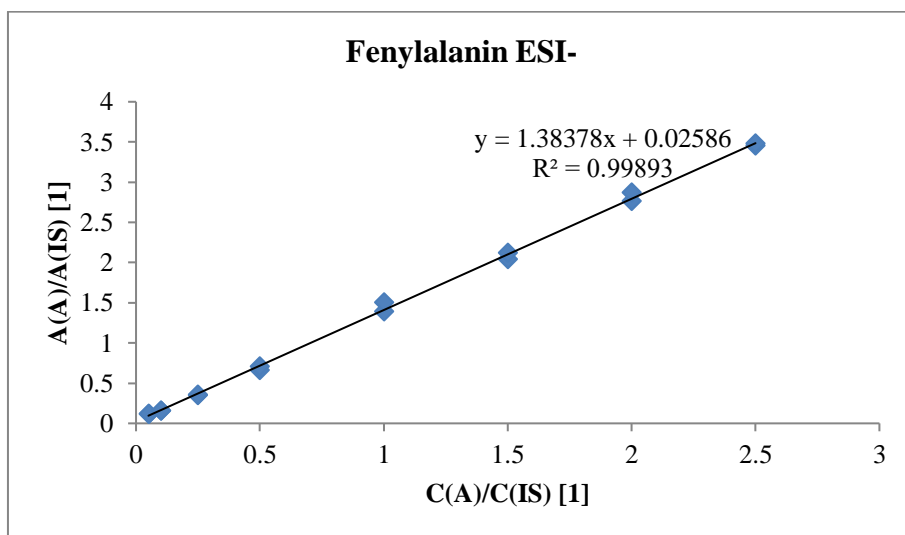
Rovnice lineární kalibrační funkce: $y = 8,90908x + 0,02586$

Hodnota R²: 0,9995

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: 0,50 ng.ml⁻¹

Fenylalanin ESI- (IS Fenylalanin ¹³C₆)

Kvantifikační MRM přechod: 164 Da > 147 Da, CE: 12 eV



Graf č. 2: Kalibrační funkce fenylalaninu (negativní ionizační mód.)

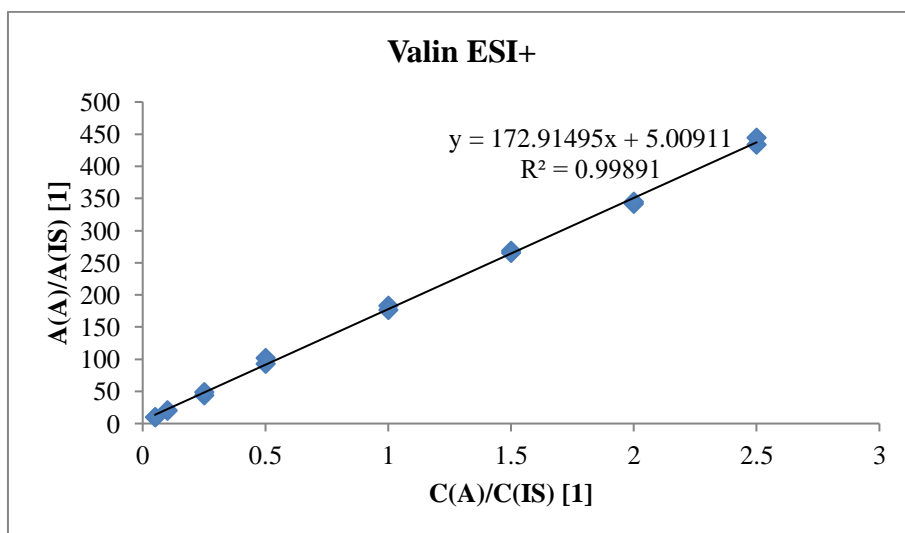
Rovnice lineární kalibrační funkce: $y = 1,38378x + 0,02586$

Hodnota R^2 : 0,9989

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: 0,70 ng.ml⁻¹

Valin ESI+ (IS Alanin ¹³C₃)

Kvantifikační MRM přechod: 118,1 Da > 72 Da, CE: 12 eV



Graf č. 3: Kalibrační funkce valinu (pozitivní ionizační mód.)

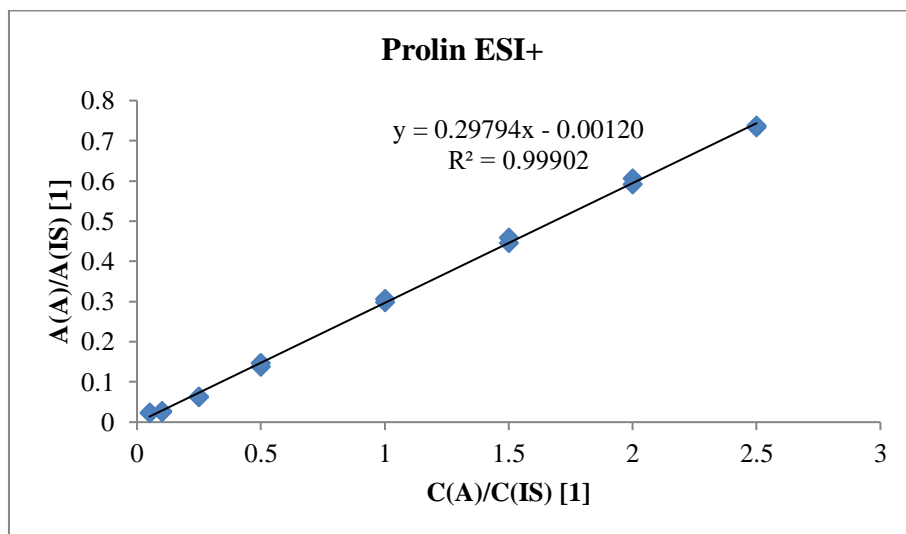
Rovnice lineární kalibrační funkce: $y=172,91495x + 5,00911$

Hodnota R^2 : 0,9989

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: $0,02 \text{ ng.ml}^{-1}$

Prolin ESI+ (IS Prolin $^{13}\text{C}_5$)

Kvantifikační MRM přechod: $116 \text{ Da} > 70 \text{ Da}$, CE: 16 eV



Graf č. 4: Kalibrační funkce prolinu (pozitivní ionizační mód).

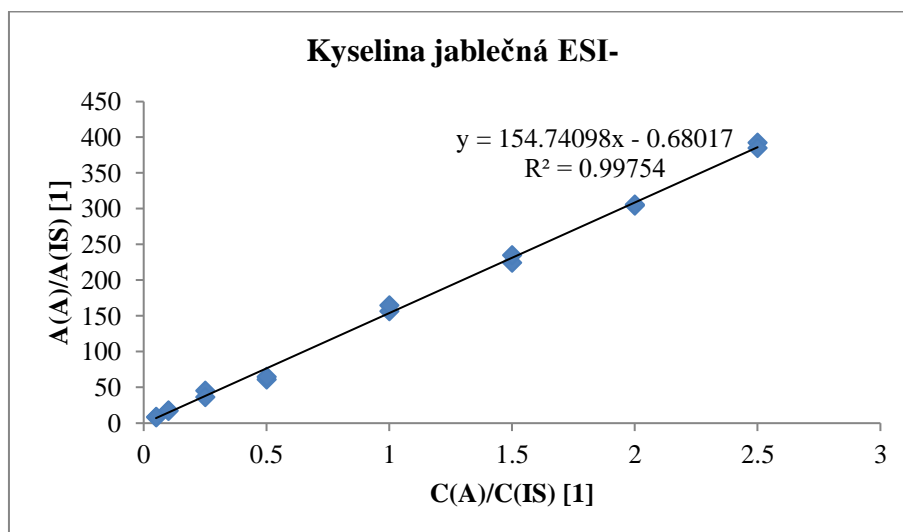
Rovnice lineární kalibrační funkce: $y=0,29794x - 0,00120$

Hodnota R^2 : 0,9990

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: $0,18 \text{ ng.ml}^{-1}$

Kyselina jablečná ESI- (IS kyselina α -ketoglutarová $^{13}\text{C}_4$)

Kvantifikační MRM přechod: 133 Da > 115 Da, CE: 8 eV



Graf č. 5: Kalibrační funkce kyseliny jablečné (negativní ionizační mód).

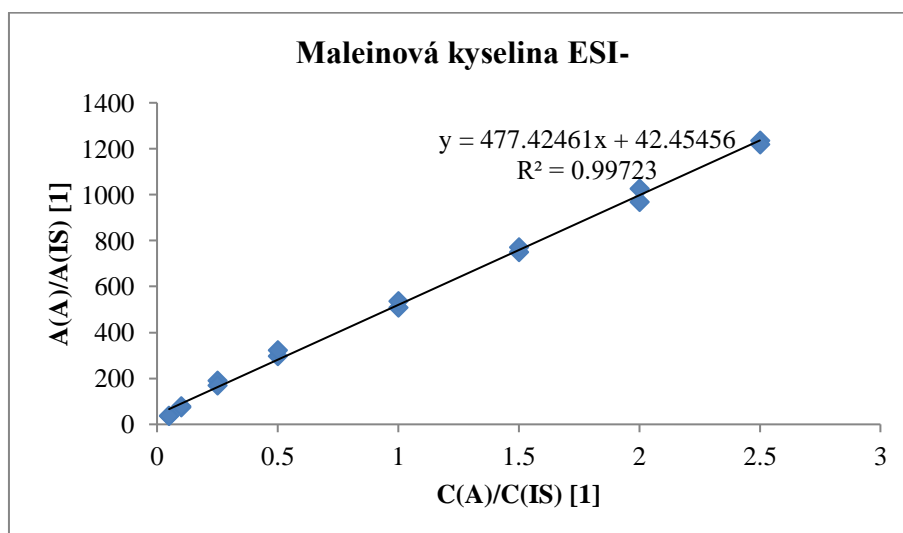
Rovnice lineární kalibrační funkce: $y = 154,74098x - 0,68017$

Hodnota R^2 : 0,9975

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: $0,07 \text{ ng.ml}^{-1}$

Kyselina maleinová ESI- (IS kyselina α -ketoglutarová $^{13}\text{C}_4$)

Kvantifikační MRM přechod: 115 Da > 71 Da, CE: 8 eV



Graf č. 6: Kalibrační funkce kyseliny maleinové (negativní ionizační mód).

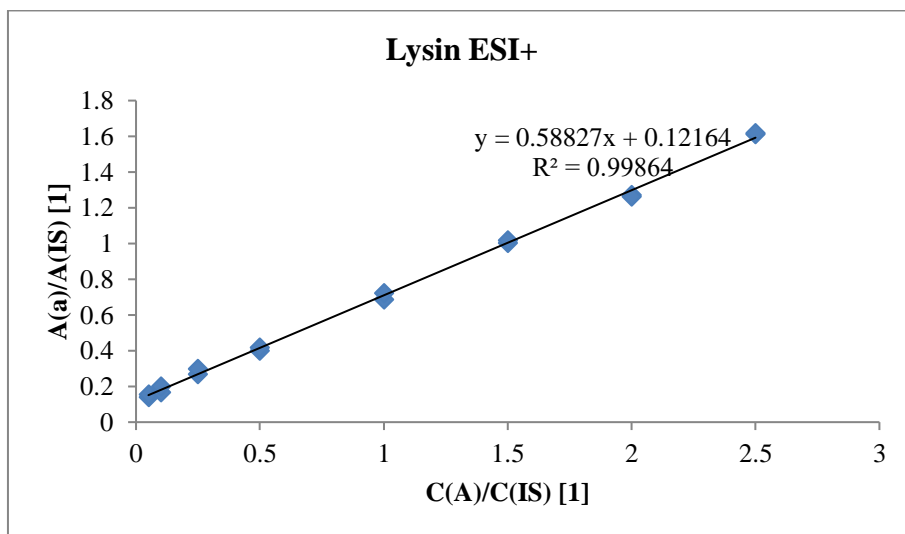
Rovnice lineární kalibrační funkce: $y=477,42461x + 42,45456$

Hodnota R^2 : 0,9972

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: $0,50 \text{ ng.ml}^{-1}$

Lysin ESI+ (IS Lysin $^{13}\text{C}_6$)

Kvantifikační MRM přechod: $147,1 \text{ Da} > 84 \text{ Da}$, CE: 16 eV



Graf č. 7: Kalibrační funkce lysinu (pozitivní ionizační mód).

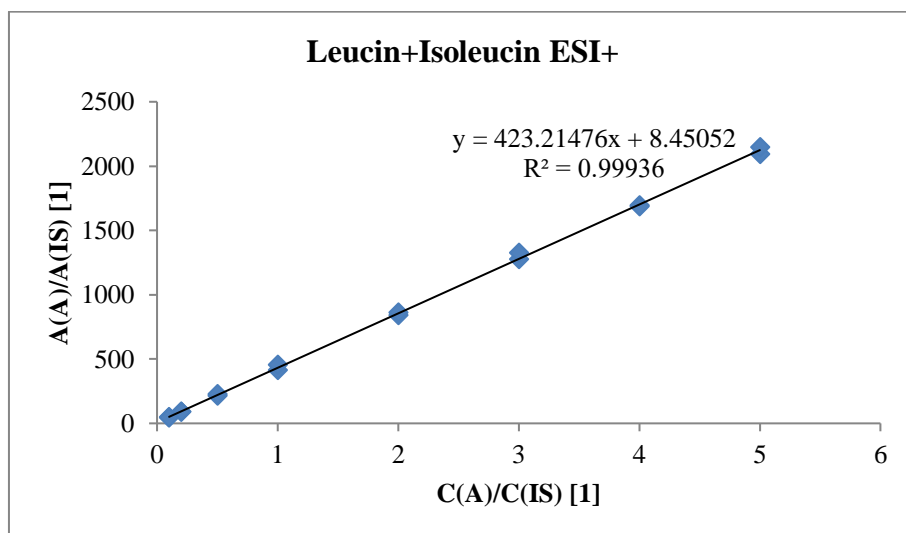
Rovnice lineární kalibrační funkce: $y=0,58827x + 0,12164$

Hodnota R^2 : 0,9986

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: $0,67 \text{ ng.ml}^{-1}$

Leucin a Isoleucin ESI+ (IS Alanin $^{13}\text{C}_3$)

Kvantifikační MRM přechod: 132,2 Da > 86 Da, CE: 8 eV



Graf č. 8: Kalibrační funkce leucinu a isoleucinu (pozitivní ionizační mód).

Rovnice lineární kalibrační funkce: $y=423,21476x + 8,45052$

Hodnota R^2 : 0,9994

LOD spočítaný z trojnásobku výšky šumu: 0,03 ng.ml $^{-1}$

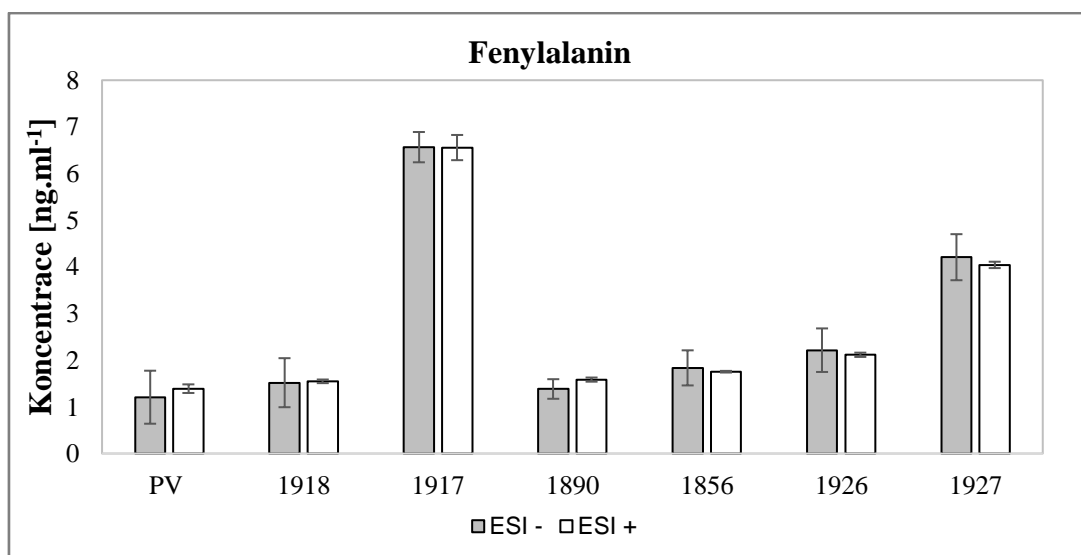
Hodnoty preciznosti (precision) a přesnosti (accuracy) na úrovních 0,5 ng.ml $^{-1}$, 5 ng.ml $^{-1}$ a 20 ng.ml $^{-1}$ z celkového kalibračního rozsahu 0,5-25 ng.ml $^{-1}$ pro referenční vzorky měřené ve třech opakováních jsou uvedeny v tabulce číslo 10.

Tabulka č. 10: Hodnoty preciznosti (precision) a přesnosti (accuracy) pro vybrané analyty na úrovni 0,5, 5 a 20 ng.ml⁻¹. Referenční roztoky připraveny ve třech opakováních. Hodnota preciznosti získaná jako procentuální vyjádření relativní směrodatné odchylky. Hodnota přesnosti vyjádřená jako aritmetický průměr výtěžností jednotlivých opakování.

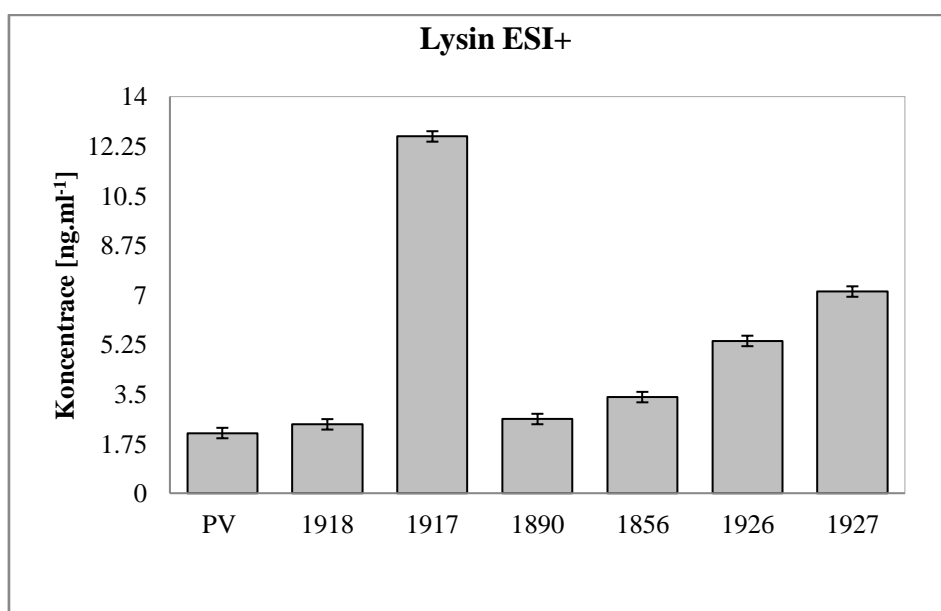
kalibrační úroveň	0,5 ng.ml ⁻¹		5 ng.ml ⁻¹		20 ng.ml ⁻¹	
Analyt	Preciznost (precision)	Přesnost (accuracy)	Preciznost (precision)	Přesnost (accuracy)	Preciznost (precision)	Přesnost (accuracy)
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Fenylalanin ESI+	4	103	4	102	1	102
Fenylalanin ESI-	19	99	3	100	6	97
Valin ESI+	9	94	2	111	1	98
Prolin ESI +	20	117	9	100	1	100
K. jablečná ESI-	4	98	11	95	1	100
K. maleinová ESI-	-0.51	-230	1	116	1	100
Lysin ESI +	8	104	9	112	3	100
Leucin + Iso-leucin ESI+	9	93	2	101	2	97

4.2 Reálné vzorky

Ve vzorcích vod odebraných v listopadu 2018 v rozsahu kalibračních vzorků 0,5 až 25 ng.ml⁻¹ byly detekovány pouze aminokyseliny fenylalanin a lysin. Sloupcové grafy zobrazující obsah těchto analytů ve vzorcích vod jsou uvedeny v grafech číslo 9 a 10. Koncentrace ostatních analytů byla nižší než nejnižší bod kalibrace. Za LOQ metody lze považovat, kalibrační bod 0,5 ng.ml⁻¹, což byl nejnižší bod, který měl ve zvoleném kalibračním rozsahu vyhovující hodnoty přesnosti a preciznosti (s výjimkou kyseliny maleinové). Hodnoty poměru plochy píku analytu a vnitřního standardu (RR - relative response), pro srovnání hodnoty RR nejnižšího kalibračního bodu a číselné hodnoty pro koncentrace fenylalaninu a lysinu ve vzorcích jsou uvedeny v příloze (tabulka II).



Graf č. 9: Obsah fenylalaninu (měřeno v negativním i v pozitivním ionizačním modu) ve vzorcích vod, koncentrace uváděna v ng.ml^{-1} , nejistota zobrazena jako dvojnásobek relativní směrodatné odchylky. PV – pitná voda. 1918 – surová voda, Plav, 1917 – Římovská přehrada, výtok, 1890 – Čertovo jezero, výtok, 1856 – Plešné jezero, výtok, 1926 – lesní potok, Pohoří na Šumavě, 1927 – Jiřická nádrž, Pohoří na Šumavě.



Graf č. 10: Obsah lysinu (měřeno v pozitivním ionizačním modu) ve vzorcích vod, koncentrace uváděna v ng.ml^{-1} , nejistota zobrazena jako dvojnásobek relativní směrodatné odchylky. PV – pitná voda. 1918 – surová voda, Plav, 1917 – Římovská přehrada, výtok, 1890 – Čertovo jezero, výtok, 1856 – Plešné jezero, výtok, 1926 – lesní potok, Pohoří na Šumavě, 1927 – Jiřická nádrž, Pohoří na Šumavě.

Měření čerstvě odebraných vzorků probíhala na přelomu podzimu a zimy, aby byl zohledněn i možný vliv ročních období, byl stejnou metodou změřen i vzorek vody ze srpna 2016. Ten byl odebrán stejnou metodou uvedenou výše z přítoku do Římovské přehrady, protože však nebyl k dispozici vzorek odebraný z přítoku v listopadu, není možné data porovnávat přímo. V tomto vzorku byly v koncentračním rozsahu kalibračních vzorků detekovány mimo fenylalaninu a lysinu i kyselina maleinová a jablečná. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce číslo 11. Získané hodnoty jsou však pouze orientační, protože tato voda byla použita při prvotních zkušebních analýzách a opakovaně zmražována, získané hodnoty tedy nejsou z analytického hlediska rovnocenné hodnotám získaným pro čerstvé vzorky vod.

Tabulka č. 11: Obsah fenylalaninu (měřený v pozitivním i v negativním ionizačním módu), lysinu, kyseliny jablečné a kyseliny maleinové ve vzorku vody z přítoku do Římovské nádrže ze srpna 2016. Výsledky uvedeny v $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ s nejistotou vyjádřenou jako dvojnásobek relativní směrodatné odchylky.

Vzorek	Fenylalanin (+)	Fenylalanin (-)	Lysin	K. jablečná	K. maleinová
	c	c	c	c	c
	($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Římov - přítok	$2,79 \pm 0,14$	$2,98 \pm 0,64$	$8,81 \pm 0,29$	$2,20 \pm 0,28$	$1,816 \pm 0,054$

5 DISKUSE

Přímé LC-QqQ-MS měření ve vodách prokázalo, že se metabolity vyskytují v regionálních povrchových vodách ve velmi nízkých koncentracích, většinou pod 1 ng.ml^{-1} . Velice žádoucí přímé stanovení bez předchozího zakoncentrování je tak velmi obtížné.

Velkou výhodnou trojitých kvadrupólů jako hmotnostních analyzátorů, ve srovnání například s hmotnostními spektrometry s vysokým rozlišením (HRMS), je vysoká citlivost (pikogramová množství v nástřiku) a opakovatelnost. Dalším důvodem pro výběr trojitého kvadrupólu pro metabolomické analýzy jsou velké skenovací rychlosti, které umožňují měření velkého množství látek v nízkých koncentracích v jedné analýze za možnosti současného měření v pozitivním i v negativním ESI modu. I přes jistou nevýhodu ztráty komplexní informace o přesné hmotě všech látek detekovaných v základním celkovém skenu HRMS analyzátorů, jsou trojité kvadrupóly díky MRM přechodům velmi výhodné pro cílené metabolomické analýzy.

Výše uvedená data dokazují, že za uvedených chromatografických a MS podmínek bylo možno stanovit společně látky různých fyzikálně-chemických vlastností v negativním i v pozitivním ESI modu v koncentračním rozsahu $0,5 - 25 \text{ ng.ml}^{-1}$ s hodnotami preciznosti a přesnosti vyhovujícím požadavkům kladeným na analytické metody.

Obecně analyty měřené v negativním ionizačním modu poskytovaly odezvy selektivnější, ale nižší. Aminokyselina fenylalanin byla měřena v pozitivním i negativním ionizačním ESI modu. Získaná data pro jednotlivé vzorky si sice odpovídají, ale směrodatná odchylka pro data měřená v negativním ionizačním modu je vyšší. Z toho důvodu je v případě možnosti volby vhodnější zvolit MRM přechod v pozitivním ionizačním modu.

Jedním z hlavních cílů této diplomové práce bylo aplikovat metodu na vzorky přírodních sladkých povrchových vod bez předchozího zakoncentrování metabolitů. Ve vzorcích vod ve vybraném koncentračním rozsahu kalibračních vzorků byl přítomen fenylalanin a lysin. Koncentrace ostatních analytů byla nižší než nejnižší bod kalibrace, i přesto ale z hodnot poměru plochy píku analytu a vnitřního standardu bylo možné odvodit alespoň orientačně obsah daného analytu ve vzorku a tím i biochemické pochody probíhající v daném vodním systému. Pro získání informace o procesech ve vodním zdroji je tato hodnota často cenná a absolutní čísla nejsou vždy nezbytná.

Pokud bychom fenylalanin a lysin považovali za vhodné reprezentanty celkového obsahu nízkomolekulárních organických látek, tak získané hodnoty obou kvantifikovatelných analytů odpovídají charakteristikám daného vodního zdroje. Surová voda a z ní získávaná voda pitná byly ve srovnání s dalšími vzorky na organické látky nejchudší. Šumavská jezera sice obsahují velké množství rozpuštěného uhlíku, ale ten se vyskytuje hlavně ve formě huminových látek. Mimo antropogenní acidifikaci způsobenou kyselými dešti jsou tato jezera ovlivněna lidským působením, například zvyšováním koncentrace biogenních prvků splachem z polí nebo přitékajícími odpadními vodami, jen málo, proto je tam fenylalaninu a lysinu jen o trochu více než ve vodě pitné. Zároveň je viditelný i rozdíl mezi oběma jezery. Z důvodu vyššího obsahu fosforu v přítocích Plešného jezera, je zde obsah obou aminokyselin vyšší než v Čertovo jezeře. Novohradské hory jsou ve srovnání s Šumavou ovlivněny antropogenním znečištěním více. Pravděpodobně i nižší nadmořská výška se podílí na vyšší primární produkci a zvýšené koncentraci stanovovaných analytů v lesním potoce. Nejvyšší koncentrace obou kvantifikovatelných látek byly v uměle vytvořených nádržích – Jiřické, ale hlavně Římovské. Důvodem je pravděpodobně nejvyšší primární produkce, na které se podílí vyšší obsah dusíku a fosforu a celkově lepší podmínky pro život mikroorganismů.

Pravděpodobným důvodem pro nízké koncentrace stanovovaných analytů a nemožnost kvantifikovat je ve vzorcích reálných vod byla skutečnost, že vodní zdroje, ze kterých byly vzorky odebrány, nejsou příliš ovlivňovány antropogenním znečištěním. Dalším důvodem je i skutečnost, že vzorky byly odebírány v době, kdy primární produkce díky ročnímu období byla velmi nízká. Aminokyseliny a nízkomolekulární organické kyseliny slouží jako nejsnazší zdroj biogenních prvků a energie pro konzumenty prvního řádu. Proto v listopadu, kdy kvůli nízkým teplotám a krátké době slunečního svitu je aktivita primárních producentů nízká, je těchto organických látek ve vodě málo.

Další výzkum metabolitů v povrchových vodách bude vyžadovat rozšíření rozsahu kalibrace k nižším hodnotám, například za využití většího nástřiku vzorku pomocí nástřikové smyčky, případně jiného rozsahu kalibrace. Analyty poskytovaly prokazatelnou odezvu analytů v pozitivním ESI modu na hladině $0,1 \text{ ng.ml}^{-1}$. Tento kalibrační bod však nebylo možno vzhledem k nevyhovující přesnosti do kalibrační závislosti zahrnut. V další studii bude tedy nutno metodu měření dále zdokonalit.

6 ZÁVĚR

Záměrem této diplomové práce byly čtyři dílčí cíle.

Byla provedena rešerše literatury zaměřené na analýzu metabolitů v přírodních sladkých povrchových vodách, která ukázala, že metody přímé analýzy povrchových vod (analogicky, jako se provádí při analýze organických polutantů) jsou dosud jen velmi málo rozpracovány. Bylo popsáno využití trojitého kvadrupólu při cílených stopových analýzách.

Byla vypracována LC-QqQ-MS metoda pro přímé stopové stanovení nízkomolekulárních organických látek v přírodních sladkých povrchových vodách bez předchozí předkoncentrace analytů ve vzorku. Na trojitém kvadrupólu spojeném s HILIC chromatografickým systémem byla vyvinuta metoda, díky které je možno dokázat přítomnost metabolitů, pro které byly naladěny MRM přechody.

Byla provedena validace metody. Pro vybraných osm látek (fenylalanin, lysin, prolin, valin, leucin a izoleucin, kyselinu maleinovou, kyselinu jablečnou) byla připravena kalibrace s lineárním kalibračním rozsahem $0,5 - 25 \text{ ng.ml}^{-1}$ s přijatelnou přesností a precizností (s výjimkou kyseliny maleinové v nejnižším bodě kalibrace) v uvedeném rozsahu.

Vlastnosti vypracované LC-QqQ-MS metody byly ověřeny na analýze metabolitů v sedmi reálných vzorcích vod (pitná voda, surová voda z úpravny vody Plav, výtok z Římovské nádrže, výtok z jezera Plešnéha a Čertova, lesní potok u Pohoří na Šumavě, Jiřická nádrž). Aminokyseliny fenylalanin a lysin byly kvantifikovány ve všech analyzovaných vzorcích vody v rozsahu 0,5-25 ng/ml. Získané hodnoty odpovídají podmínkám, v nichž se příslušný ekosystém nacházel.

Výsledky dosažené v této práci ukazují, že lze provádět přímé stanovení metabolitů vypracovanou metodou LC-QqQ-MS bez předchozí prekoncentrace. Budou však nutné další opatření ke snížení limitu kvantifikace, zejména zvýšení objemu filtrované vody dávkované na kolonu.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AEBERSOLD, Ruedi a Matthias MANN. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* [online]. 2003, **422**(6928), 198-207 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1038/nature01511. ISSN 0028-0836.

AGILENT. Experience the Highest Level of Confidence. 5991-4541EN. USA: Agilent Technologies, 2018

AGILENT. Agilent 6495B Triple Quadrupole LC/MS with iFunnel Technology. Data sheet. 5991-4704EN. USA: Agilent Technologies, 2017

ALPERT, Andrew J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 1990, **499**, 177-196 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3. ISSN 00219673.

BAJAD, Sunil U., Wenyun LU, Elizabeth H. KIMBALL, Jie YUAN, Celeste PETERSON a Joshua D. RABINOWITZ. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1125**(1), 76-88 [cit. 2018-07-21]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.05.019. ISSN 00219673.

BECERRA-CASTRO, Cristina, Petra KIDD, Melanie KUFFNER, et al. Bacterially Induced Weathering of Ultramafic Rock and Its Implications for Phytoextraction. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2013, **79**(17), 5094-5103 [cit. 2018-07-21]. DOI: 10.1128/AEM.00402-13. ISSN 0099-2240.

BIEMANN, K. The Application of Mass Spectrometry in Organic Chemistry: Determination of the Structure of Natural Products. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. 1962, **1**(2), 98-111 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1002/anie.196200981. ISSN 0570-0833.

BREZONIK, Patrick L. a William A. ARNOLD. *Water chemistry: an introduction to the chemistry of natural and engineered aquatic systems*. New York: Oxford University Press, c2011.

ISBN 978-0-19-973072-8.

BUSCH, K. L.. Units in Mass Spectrometry, *Spectroscopy* 16(11), 28–31 (2001). ISSN 08876703

BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231-247 [cit. 2018-07-13]. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5. ISSN 1618-2642.

CHEN, Wei, Liang GONG, Zilong GUO, et al. A Novel Integrated Method for Large-Scale Detection, Identification, and Quantification of Widely Targeted Metabolites: Application in the Study of Rice Metabolomics. *Molecular Plant* [online]. 2013, **6**(6), 1769-1780 [cit. 2018-08-10]. DOI: 10.1093/mp/sst080. ISSN 16742052.

CUBBON, Simon, Timothy BRADBURY, Julie WILSON a Jane THOMAS-OATES. Hydrophilic Interaction Chromatography for Mass Spectrometric Metabonomic Studies of Urine. *Analytical Chemistry*[online]. 2007, **79**(23), 8911-8918 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1021/ac071008v. ISSN 0003-2700.

Český lékopis 1997. [2. vyd.]. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-7169-625-0.

DOMANSKI, Dominik, Leigh C. MURPHY a Christoph H. BORCHERS. Assay Development for the Determination of Phosphorylation Stoichiometry Using Multiple Reaction Monitoring Methods with and without Phosphatase Treatment: Application to Breast Cancer Signaling Pathways. *Analytical Chemistry* [online]. 2010, **82**(13), 5610-5620 [cit. 2018-07-21]. DOI: 10.1021/ac1005553. ISSN 0003-2700.

DUBOIS, Michel., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS a Fred. SMITH. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* [online]. 1956, **28**(3), 350-356 [cit. 2018-07-21]. DOI: 10.1021/ac60111a017. ISSN 0003-2700.

FERRARIO, Manuela, Alice CAMBIAGHI, Laura BRUNELLI, et al. Mortality prediction in

patients with severe septic shock: a pilot study using a target metabolomics approach. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), - [cit. 2018-08-10]. DOI: 10.1038/srep20391. ISSN 2045-2322.

GROS, Meritxell, Mira PETROVIĆ a Damiá BARCELÓ. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*. 2006, **70**(4), 678-690 [cit. 2018-07-29]. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.05.024. ISSN 00399140.

GROSS, Jürgen H. *Mass spectrometry: a textbook*. New York: Springer, c2004. ISBN 978-3-540-40739-3.

HOFFMANN, Edmond de. a Vincent. STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2007. ISBN isbn978-0-470-03310-4.

HOLČAPEK M., JANDERA P. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*. 1998, č. 92, s. 278 – 286. ISSN 0009-2770.

HORÁKOVÁ, Marta. *Analytika vody*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-7080-391-6.

HORŇÁK, Karel a Jakob PERNTHALER. A novel ion-exclusion chromatography–mass spectrometry method to measure concentrations and cycling rates of carbohydrates and amino sugars in freshwaters. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1365**, 115-123 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.09.007. ISSN 00219673.

KATTA, Viswanatham., Swapan K. CHOWDHURY a Brian T. CHAIT. Use of a single-quadrupole mass spectrometer for collision-induced dissociation studies of multiply charged peptide ions produced by electrospray ionization. *Analytical Chemistry* [online]. 1991, **63**(2), 174-178 [cit. 2018-07-31]. DOI: 10.1021/ac00002a016. ISSN 0003-2700.

KÄRRMAN, Anna, Bert VAN BAVEL, Ulf JÄRNBERG, Lennart HARDELL a Gunilla LINDSTRÖM. Development of a Solid-Phase Extraction-HPLC/Single Quadrupole MS

Method for Quantification of Perfluorochemicals in Whole Blood. *Analytical Chemistry* [online]. 2005, 77(3), 864-870 [cit. 2018-07-31]. DOI: 10.1021/ac049023c. ISSN 0003-2700.

LI, Kefeng, Jane C. NAVIAUX, A. Taylor BRIGHT, Lin WANG a Robert K. NAVIAUX. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. *Metabolomics* [online]. 2017, 13(10), - [cit. 2018-08-10]. DOI: 10.1007/s11306-017-1264-1. ISSN 1573-3882.

LOOS, Robert, Bernd Manfred GAWLIK, Kristin BOETTCHER, Giovanni LOCORO, Serafino CONTINI a Giovanni BIDOGLIO. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, 1216(7), 1126-1131 [cit. 2018-07-31]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.048. ISSN 00219673.

LU, Wenyun, BENNET, Bryson, RABINOWITZ, Joshua. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of chromatography. B. Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2008, 871. 236-42. 10.1016/j.jchromb.2008.04.031. ISSN 1570-0232.

MACLEAN, Brendan, Daniela M. TOMAZELA, Nicholas SHULMAN, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* [online]. 2010, 26(7), 966-968 [cit. 2018-08-14]. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq054. ISSN 1460-2059.

MEYER, Axel, Christine RABA a Klaus FISCHER. Ion-Pair RP-HPLC Determination of Sugars, Amino Sugars, and Uronic Acids after Derivatization with p -Aminobenzoic Acid. *Analytical Chemistry*[online]. 2001, 73(11), 2377-2382 [cit. 2018-07-21]. DOI: 10.1021/ac001402s. ISSN 0003-2700.

MILLER, J. N a J. C MILLER. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 5th ed. New York: Pearson/Prentice Hall, 2005. ISBN 0131291920.

MOHAMMED, Hisham, Christopher TAYLOR, Gordon D BROWN, Evaggelia K PAPA-CHRISTOU, Jason S CARROLL a Clive S D'SANTOS. Rapid immunoprecipitation mass

spectrometry of endogenous proteins (RIME) for analysis of chromatin complexes. *Nature Protocols* [online]. 2016, **11**(2), 316-326 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1038/nprot.2016.020. ISSN 1754-2189.

MOPPER, Kenneth, Christopher A. SCHULTZ, Lionel CHEVOLOT, Claire GERMAIN, Rene REVUELTA a Rodger DAWSON. Determination of sugars in unconcentrated seawater and other natural waters by liquid chromatography and pulsed amperometric detection. *Environmental Science & Technology* [online]. 1992, **26**(1), 133-138 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.1021/es00025a014. ISSN 0013-936X.

NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

OBATA, Toshihiro a Alisdair R. FERNIE. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2012, **69**(19), 3225-3243 [cit. 2018-07-21]. DOI: 10.1007/s00018-012-1091-5. ISSN 1420-682X.

PANAGIOTOPOULOS, Christos a Richard SEMPÉRÉ. Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnology and Oceanography: Methods* [online]. 2005, **3**(10), 419-454 [cit. 2018-07-10]. DOI: 10.4319/lom.2005.3.419. ISSN 15415856.

PATTI, Gary J., Oscar YANES a Gary SIUZDAK. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*[online]. 2012, **13**(4), 263-269 [cit. 2018-07-21]. DOI: 10.1038/nrm3314. ISSN 1471-0072.

PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.

PLEIL, Joachim D a Kristin K ISAACS. High-resolution mass spectrometry: basic principles for using exact mass and mass defect for discovery analysis of organic molecules in blood, breath, urine and environmental media. *Journal of Breath Research*. 2016, **10**(1), 012001. DOI: 10.1088/1752-7155/10/1/012001. ISSN 1752-7163.

VANLOON, Gary W a Stephen J DUFFY. *Environmental chemistry: a global perspective*.

3rd ed. New York: Oxford University Press, c2011. ISBN 978-0-19-922886-7.

VRBA, J., Kopáček, J., Fott, J. Šumavská ledovcová jezera na přelomu tisíciletí. *Živa*, 6/2002 (265–269)

YAN, Zhixiang a Ru YAN. Increase the accessibility and scale of targeted metabolomics: Construction of a human urinary metabolome-wide multiple reaction monitoring library using directly-coupled reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **894**, 65-75 [cit. 2018-11-29]. DOI: 10.1016/j.aca.2015.08.056. ISSN 00032670.

8 SEZNAM POUŽITÝCH NOREM

[1] ÚŘAD PRO TECHNICKOU NORMALIZACI, METROLOGII A STÁTNÍ ZKUŠEBNICTVÍ. Předběžná česká technická norma. *Směrnice pro validaci fyzikálně-chemických analytických metod*. 2017.

[2] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. *Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)*. [Dostupné online] 1996. [Citace: 16. 11. 2018.] <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/qualityguidelines.html>.

[3] ČESKÝ NORMALIZAČNÍ INSTITUT. Česká norma. *Jakost vod KALIBRACE A HODNOCENÍ ANALYTICKÝCH METOD A UTČENÍ JEJICH CHARAKTERISTIK Část 1: Statistické hodnocení lineární kalibrační funkce*. 1993.

[4] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. International Standard. *Water quality – Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*. 2012.

[5] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES. Official Methods of Analysis. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F*. [Online] 2016. [Citace: 16. 11. 2018] http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.

9 PŘÍLOHY

Tabulka I: Hodnoty pH, vodivosti, alkality, rozpuštěného organického uhlíku (DOC Shimadzu), rozpuštěného celkového dusíku (DN Shimadzu), koncentrace chloridových iontů, dusičnanového dusíku, síranových aniontů, fluoridových aniontů, sodných, draselných, vápenatých a hořečnatých kationtů stanovené pomocí iontové chromatografie. Parametry změřeny na Hydrobiologickém ústavu při Biologickém centru AV ČR, v. v. i. v Českých Budějovicích.

Vzorek	Popis	Datum odběru	pH	Vodivost	Alkalita	DOC	DN	Cl	NO ₃ -N	SO ₄	F	Na	K	Ca	Mg
				μS.cm ⁻¹	μeq.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹	mg.l ⁻¹
1856	PL-VY	12-XI-18	5.6 3	12.8	23	7.62	0.31	0.3	0.1	2.0	0.1	0.8	0.5	0.7	0.2
1890	CT-VY	14-XI-18	4.9	16.4	-9	2.98	0.47	0.5	0.3	2.4	0.0	0.6	0.3	0.3	0.3
1917	Římov - výtok	19-XI-18	7.1 8	135.4	650	6.78	1.11	8.2	0.6	12.7	0.1	7.9	2.5	13.1	2.7
1918	Plav-surová	19-XI-18	6.8	135.5	546	4.89	1.63	8.1	1.4	12.6	0.1	7.7	2.1	12.5	2.6
1926	lesní potok Pohoří	19-XI-18	6.5 5	48.1	176	8.53	0.39	0.0	0.1	9.1	0.1	4.2	0.4	4.2	0.6
1927	Jiřická nádrž	19-XI-18	6.7 6	47.5	227	9.62	0.38	0.0	0.0	6.3	0.1	3.6	0.7	4.1	0.7
PV	upravená voda	19-XI-18	8.2 2	247	1209	1.57	1.56	x	x	x	x	x	x	x	x

PL-VY - odtok z Plešného jezera

CT-VY - Odtok z Čertova jezera

Římov – výtok - odtok z vodárenské nádrže Římov (řeka Malše pod přehradou)

Plav-surová - surová voda z vodárenské nádrže Římov odebíraná úpravnou Plav

lesní potok Pohoří - lesní potok s vysokou koncentrací DOC, ale vyšším pH než šumavská jezera

Jiřická nádrž - nádrž v Novohradských horách, do které přitéká lesní potok

upravená voda - upravená pitná vody z úpravny vody Plav

Tabulka II.: Koncentrace fenylalaninu a lysinu ve vzorcích vod. Hodnoty RR (relative response – poměr plochy píku analytu a plochy píku vnitřního standard) pro sumu leucinu a isoleucinu, valinu, prolinu, kyseliny jablečné a kyseliny maleinové.

Vzorek	Phe (+)	Phe (-)	Lys	Leu + Ile	Val	Pro	K. jablečná	K. maleinová
	c	c	c	RR	RR	RR	RR	RR
	(ng.ml ⁻¹)	(ng.ml ⁻¹)	(ng.ml ⁻¹)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
pitná voda	1,390 ± 0,092	1,21 ± 0,57	2,12 ± 0,18	1,24	0,31	0,00193	1,80	1,06
Plav -surová (1918)	1,547 ± 0,039	1,52 ± 0,53	2,43 ± 0,17	1,56	0,39	0,00173	2,28	0,71
Římov -výtok (1917)	6,56 ± 0,27	6,57 ± 0,32	12,59 ± 0,15	6,94	2,01	0,00830	2,32	1,18
Čertovo jezero -výtok (1890)	1,584 ± 0,044	1,38 ± 0,21	2,62 ± 0,56	1,25	0,34	0,00159	2,56	0,83
Plešné jezero -výtok (1856)	1,753 ± 0,018	1,84 ± 0,38	3,39 ± 0,15	1,47	0,42	0,00214	3,15	1,04
lesní potok - Pohří na Šumavě (1926)	2,116 ± 0,046	2,21 ± 0,47	5,38 ± 0,53	1,87	0,51	0,00269	3,59	0,93
Jiřická nádrž (1927)	4,042 ± 0,068	4,21 ± 0,49	7,12 ± 0,48	4,04	1,20	0,00552	2,48	0,67
0,5 ng/ml (kal. Roztok)				46,38	10,40	0,02303	8,78	37,78