

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro analýzu vybrané skupiny neurotransmiterů

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Bc. Moldrzyková Karolína

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Bc. Moldrzyková Karolína

**Školitel:** prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro analýzu vybrané skupiny neurotransmiterů

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro separaci a identifikaci skupiny 10 vybraných neurotransmiterů za pomoci ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS).

V prvním kroku byla provedena základní MS analýza za účelem získání experimentálních  $m/z$  hmotnostním spektrometrem, mimo jiné byl sledován retenční čas standardů. Ověřen byl mimo jiné vznik  $[M+H]^+$ , resp.  $[M-H]^-$ . Ze skenů produktových iontů byly vybrány nejintenzivnější fragmenty jednotlivých analytů, které byly následně použity při SRM. Byla provedena optimalizace kolizní energie a optimalizace nastavení iontového zdroje. Toto základní měření probíhalo na koloně ACQUITY UPLC BEH C18. V rámci hledání vhodné stacionární fáze byly testovány tři kolony v systémech s RP (ACQUITY UPLC BEH C18, Kinetex F5, ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18) a šest HILIC kolon (Atlantis Premier BEH Z-HILIC, Luna NH2, ACQUITY UPLC BEH Amide, Synchronis HILIC, ACQUITY UPLC BEH HILIC, CORTECS UPLC HILIC). Jako vodná složka mobilní fáze byly testovány kyselina mravenčí ve vodě, octan amonný (pH 4, 6 a 9), mravenčan amonný pH 3, a jako složka organická byl testován acetonitril a okyselený acetonitril.

Byla provedena studie krátkodobé stability po dobu 24 hodin. Byla sledována změna plochy píků v čase ve 3 různých rozpouštědlech, a to ve vodě, 0,1 % kyselině mravenčí a 0,1 % kyselině octové. Vybrané analyty byly stabilní v obou kyselinách. Pro metodu na reverzních fázích byla jako vhodnější vybrána 0,1 % kyselina mravenčí, jelikož byla použita také k okyselení mobilní fáze.

**Klíčová slova:** 2-AG, 3-MT, 5-HIAA, 5-HT, AEA, DA, DOPAC, GABA, GLUT, HILIC, HVA, neurotransmitery, RP, stabilita, UHPLC-MS/MS

# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry Candidate: Bc. Moldrzyková Karolína

Supervisor: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Title of the diploma thesis:** The Development of a UHPLC-MS/MS method for the analysis of a selected group of neurotransmitters

The aim of this thesis was to develop and optimize a method for the separation and identification of a group of 10 selected neurotransmitters using ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection (UHPLC-MS/MS).

In the first step, a MS scan was performed to gain  $m/z$  of precursor ions, the retention time of standards was monitored. The formation of  $[M+H]^+$  and  $[M-H]^-$  ions was also verified. The most intense fragments of the individual analytes, identified from product ion scans, were selected for SRM. Optimization of the collision energy and the ion source setting was conducted. This initial measurement was carried out on an ACQUITY UPLC BEH C18 column. In stationary phase screening were tested, three reversed-phase columns (ACQUITY UPLC BEH C18, Kinetex F5, ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18) and six HILIC columns (Atlantis Premier BEH Z-HILIC, Luna NH2, ACQUITY UPLC BEH Amide, Synchronis HILIC, ACQUITY UPLC BEH HILIC, CORTECS UPLC HILIC). Formic acid in water, ammonium acetate (pH 4, 6, and 9), ammonium formate (pH 3) were tested, as the aqueous component of the mobile phase while acetonitrile and acidified acetonitrile were tested as the organic components.

A short-term stability study was conducted over 24 hours. The change in peak areas over time were monitored in three different solvents: water, 0,1 % formic acid, and 0,1 % acetic acid. The analytes were stable in both acids. Finally, 0,1 % formic acid was selected as the most suitable solvent for standards in the analysis on reversed phases and hydrophilic interaction liquid chromatography, as it was also used for acidifying the mobile phase.

**Keywords:** neurotransmitters, UHPLC-MS/MS, RP, HILIC, stability, DA, 5-HT, HVA, 5-HIAA, DOPAC, 3-MT, GABA, GLUT, AEA, 2-AG

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne: 1. 9. 2024

Bc. Karolína Moldrzyková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost, rady a zkušenosti předané při zpracování této práce.

# OBSAH

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
Seznam zkratk a symbolů.....	3
1. Úvod.....	5
2. Cíl a popis zadání práce .....	7
3. Teoretická část.....	9
3.1    Kapalinová chromatografie.....	9
3.1.1    Systémy s reverzními fázemi.....	10
3.1.2    Hydrofilní interakční chromatografie .....	13
3.2    Hmotnostní spektrometrie .....	14
3.2.1    Ionizační techniky .....	15
3.2.2    Hmotnostní analyzátory .....	15
3.3    Neurotransmitery .....	16
3.3.1    Klasické neurotransmitery .....	18
3.3.2    Endokanabinoidy .....	23
3.3.3    Fyzikálně chemické vlastnosti analytů.....	24
3.3.4    Metody stanovení vybraných neurotransmiterů .....	26
4. Experimentální část .....	33
4.1    Použité přístroje a pomůcky .....	33
4.2    Použité chemikálie .....	34
4.2.1    Použitá rozpouštědla a aditiva.....	34
4.2.2    Použité standardy .....	34
4.3    Příprava roztoků.....	35
4.3.1    Zásobní roztoky standardních látek.....	35
4.3.2    Pracovní roztoky .....	35
4.3.3    Mobilní fáze .....	35
4.3.4    Pomocné kapaliny .....	36
4.4    Vývoj RP-UHPLC-MS/MS metody .....	36
4.4.1    Parametry výchozí metody v systémech s reverzními fázemi .....	36
4.4.2    Optimalizace MS/MS metody.....	37
4.4.3    Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze.....	38

4.4.4	Kalibrační křivka .....	38
4.4.5	Opakovatelnost metody .....	38
4.4.6	Výchozí nastavení metody hydrofilní interakční chromatografie .....	39
4.4.7	Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze v HILIC.....	40
4.4.8	Kalibrační křivka .....	41
4.4.9	Opakovatelnost metody .....	41
4.5	Studie krátkodobé stability vybraných neurotransmiterů .....	41
5.	Výsledky a diskuze .....	43
5.1	Vývoj RP-UHPLC-MS/MS metody .....	43
5.1.1	Optimalizace nastavení SRM .....	43
5.1.2	Výsledky volby stacionární fáze .....	53
5.1.3	Měření kalibrační závislosti.....	62
5.1.4	Měření opakovatelnosti metody .....	63
5.1.5	Souhrn optimalizovaných podmínek pro metodu na reverzních fázích.....	64
5.2	Vývoj HILIC-UHPLC-MS/MS metody .....	65
5.2.1	Výsledky volby stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze .....	65
5.2.2	Měření kalibrační závislosti.....	74
5.2.3	Měření opakovatelnosti metody .....	75
5.2.4	Souhrn výsledných podmínek pro metodu HILIC-UHPLC-MS/MS.....	76
5.3	Porovnání RP a HILIC UHPLC metody .....	77
5.4	Studie krátkodobé stability vybraných neurotransmiterů .....	78
Závěr	.....	82
Seznam použité literatury	.....	84

## Seznam zkratek a symbolů

2-AG	2-arachidonoylglycerol
2-HT	serotonin
3-MT	3-methoxytyramin
5-HIAA	kyselina 5-hydroxyindol-3-octová
AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
AEA	anandamid
ALS	amyotrofická laterální skleróza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
BEH	ethylenem zesítený hybrid
CL	chemiluminiscenční detektor
CNS	centrální nervový systém
COMT	katechol – o – metyltransferáza
CSH	povrchově nabitě hybridy
DA	dopamin
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
DOPAC	kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová
dSPE	disperzní extrakce na tuhou fázi
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrospřejem
FA	kyselina mravenčí
FD	fluorescenční detektor
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GAD	glutamát dekarboxyláza
GI	glutamát inhibující
GLS	glutamináza
GS	glutamát stimulující
HEB	hematoencefalická bariéra



HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPS	vysoce účinné povrchy (MaxPeak High-Performance Surfaces)
HVA	kyselina homovanilová
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
MAO	monoaminoxidáza
MeOH	metanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NDA	naftalen-2,3-dicarboxaldehyd
NMDA	N-metyl – D – aspartátové receptory
OSA	1-oktansulfonová kyselina
PAM	polyakrylamid
PP	proteinová precipitace
PS-DVB	polystyren-divinylbenzen
PTFE	polytetrafluoretylen
PVA	polyvinylalkohol
RP	chromatografie s reverzními fázemi
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
SRM	monitorování vybrané reakce
TFA	trifluoroctová kyselina
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

# 1. Úvod

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS) je dnes jednou z nejpoužívanějších a nejpokročilejších separačních technik.

Hmotnostní detekce (MS) umožňuje kvantitativní a kvalitativní analýzu dokonce stopových množství analytů. V kombinaci s kapalinovou chromatografií (LC) lze efektivně analyzovat izobary a izomery, které by měla samotná MS problém rozlišit. Výhodou spojení je také rychlost a schopnost separovat jednotlivé analyty, což je zvláště důležité při studiu složitých biologických vzorků. Jako mód první volby se nejčastěji využívá chromatografie s reverzními fázemi (RP). V případě analýzy polárních a malých molekul může nastat problém v jejich nedostatečné retenci. V takovém případě je třeba zvolit podmínky, které umožní lepší zadržení a separaci těchto analytů. Pro tyto případy se používá hydrofilní interakční chromatografie (HILIC).

Tato diplomová práce se zaměřuje na vývoj a optimalizaci UHPLC-MS/MS metody pro analýzu deseti vybraných neurotransmiterů a jejich metabolitů, které hrají klíčovou roli v lidském nervovém systému. V žádné z dohledaných studií nebylo těchto deset neurotransmiterů stanovováno současně.

Neurotransmitery, jako jsou kyselina gama-aminomáselná (GABA), glutamát (GLUT), dopamin (DA), serotonin (5-HT) a jejich metabolity, jsou chemické mediátory, které umožňují přenos signálů mezi neurony. Ovlivňují celou škálu fyziologických funkcí, včetně motorické kontroly, kognitivních funkcí, emocí a regulace nálady. Změny v jejich koncentracích jsou často spojovány s různými neurologickými a psychickými poruchami, jako jsou Parkinsonova choroba, deprese, úzkost a schizofrenie.

Vývoj metody vybrané skupiny neurotransmiterů pomocí UHPLC-MS/MS čelí několika hlavním výzvám, které je třeba překonat. Jeden z hlavních problémů jsou různé fyzikálně-chemické vlastnosti analytů, jako je polarita, pKa a molekulová hmotnost, což komplikuje výběr vhodných podmínek pro jejich separaci a detekci. Anandamid (AEA) a 2 - arachidonoylglycerol (2-AG) jsou větší, nepolární molekuly, zatímco kyselina

gama-aminomáselná (GABA) a glutamát (GLUT) jsou naopak malé a polární. Další z problémů je stabilita analytů, především dopaminu (DA) a serotoninu (5-HT), proto je nutné pečlivě volit vhodná rozpouštědla standardů a podmínky uchování. Tyto výzvy vyžadují pečlivý a systematický přístup, aby výsledkem práce byla spolehlivá a robustní analytická metoda.

## 2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS) pro skupinu vybraných neurotransmiterů a jejich metabolitů. Konkrétně se jedná o analyty kyseliny gama-aminomáselnou (GABA), glutamát (GLUT), dopamin (DA), serotonin (5-HT) a jejich metabolitů, kyseliny homovanilovou (HVA), 3-methoxytyramin (3-MT), kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou (DOPAC), kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovou (5-HIAA), anandamid (AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG).

Prvním cílem bylo získání informací o fyzikálně chemických vlastnostech jednotlivých analytů. Konkrétně se jednalo o pKa, LogP, o jejich molekulovou hmotnost, stabilitu a strukturu. Současně byla provedena literární rešerše zaměřená na publikované metody stanovení těchto analytů.

V rámci měření byly nejprve získány hmotnostní spektra jednotlivých analytů. Poté byla provedena optimalizace SRM přechodů a podmínek iontového zdroje. Následovala volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze (MF) pro jednotlivé chromatografické módy. Testovány byly čtyři kolony pro RP (ACQUITY UPLC BEH C18, Kinetex F5, ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18, ACQUITY UPLC CSH C18). Výchozí MF v systému s reverzními fázemi byla 0,1 % kyselina mravenčí (FA) jako vodná složka a jako organická složka acetonitril (ACN). V módu HILIC bylo testováno celkem šest chromatografických kolon (Synchronis HILIC, Atlantis Premier BEH Z HILIC, UPLC BEH HILIC, Luna HILIC, CORTECS UPLC HILIC, ACQUITY UPLC BEH Amide). Výchozí vodná složka MF byl 10 mM octan amonný (AmAc) o pH 6 a jako organická složka ACN. Další testovaná vodná složka MF v módu HILIC byla testována 10 mM AmAc o pH 4. U kolon, které to svým rozsahem umožňovaly, byl testován také 10 mM AmAc o pH 9. Na dvou vybraných kolonách, které poskytovaly nejlepší chromatogramy bylo podrobněji optimalizované složení MF. U těchto kolon byly testovány mobilní fáze 10 mM mravenčan amonný (AmF) o pH 3 a 0,1% a 0,5% FA jako vodná složka. Testována byla také okyselená organická složka mobilní fáze, konkrétně 0,1% a 0,5% FA v ACN. Na

koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC byla testována také 0,1% a 0,5% kyselina octová (AA) jako vodná složka mobilní fáze a 0,1% a 0,5% AA v ACN jako organická složka MF.

Další z cílů je porovnat oba chromatografické módy, a to pomocí LLOQ, kalibračních křivek, separace a retence změřených za optimalizovaných podmínek pro obě metody.

Další z cílů bylo testování stability po dobu 24 hodin, která se zaměřila na analyty DA, 5-HT a 5-HIAA. Krátkodobá stabilita byla měřena za optimalizovaných podmínek v systému reverzních fází za použití detektoru s diodovým polem (DAD). Stabilita byla testována ve třech rozpouštědlech; voda, 0,1 FA a 0,1 % AA. Během měření byla sledována změna plochy píku v závislosti na čase.

Výsledná chromatografická metoda s hmotnostní detekcí bude sloužit jako podklad pro další diplomovou práci na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Výsledky získané během této a navazující diplomové práce budou prakticky využity na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy ve výzkumu zaměřeném primárně na dopaminergní systém a jeho modulaci psychoaktivními látkami.

## 3. Teoretická část

### 3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je velmi univerzální a rozšířená separační metoda, která je založená na principu rozdělování látek mezi stacionární (obvykle pevnou) a mobilní (kapalnou) fází, což umožňuje efektivní separaci složek směsí. Během chromatografické analýzy dochází k ustavování dynamické rovnováhy distribuce analytů mezi tyto fáze, což je klíčový proces určující jejich retenční chování. Tento fenomén vychází z rozdílné interakce jednotlivých složek vzorku s oběma fázemi, což vede k jejich zadržování a následné separaci [1; 2].

Typ a vlastnosti stacionární fáze zásadně ovlivňují separaci. Nejčastěji využívané stacionární fáze jsou na bázi modifikovaného silikagelu. Díky své vysokému specifickému povrchu a chemické stabilitě, poskytuje silikagel ideální základ pro modifikaci různými funkčními skupinami, jako jsou C18 (oktadecyl), C8 (oktyl) nebo F5 (pentafluorofenyl). Tyto modifikace mění selektivitu separačního procesu, jelikož mění interakce mezi analyty a stacionární fází. Kromě chemických vlastností stacionární fáze jsou důležité také fyzikální vlastnosti, jako je velikost částic a velikost pórů, které ovlivňují rychlost difuze, a tím i účinnost separace. Volba stacionární fáze je kritickým krokem při optimalizaci chromatografické metody, protože přímo určuje nejen míru separace, ale také rychlost a robustnost analýzy [3; 4].

Historie kapalinové chromatografie sahá do první poloviny 20. století, kdy se jednoduchá kolonová chromatografie postupně vyvíjela do pokročilejších forem, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která byla představena roku 2004 společností Waters pod obchodní značkou Ultra Performance LC (UPLC). Tyto pokročilé metody jsou dnes považovány za standard. Umožňují rychlejší, přesnější a efektivnější analýzu složitých směsí, což je nezbytné pro pokrok a rozvoj jak ve vědeckém bádání, tak v průmyslových aplikacích [1; 5; 6].

UHPLC má ve srovnání s HPLC vyšší separační účinnost, vyšší rozlišení, rychlejší provedení analýz a nižší spotřebu rozpouštědel, což je výhoda, jelikož to znamená nižší finanční náklady spojené s analýzou a menší zátěž pro životní prostředí. Tohoto zlepšení je dosaženo použitím kolon naplněných částicemi charakteristicky menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Menší částice zvyšují odpor v koloně, což vede k nutnosti použití vyšších provozních tlaků v systému, které se pohybují okolo 1000 bar a více [1].

### **3.1.1 Systémy s reverzními fázemi**

V systémech s reverzními fázemi (RP) je charakteristické použití mobilní fáze, jejíž povaha je polárnější než povaha fáze stacionární. Pro účinnou separaci je důležité zajistit, aby analyty byly v neionizované formě, čehož se dosahuje volbou vhodného pH mobilní fáze. Pokud má analyt kyselý charakter, je zvolena mobilní fáze o kyselém pH. Naopak, pokud má analyt zásaditý charakter, mobilní fáze je upravena na zásadité pH [1; 7].

Stacionární fáze v systémech s reverzními fázemi (RP) jsou často založeny na modifikovaném silikagelu. Silikagel umožňuje širokou škálu chemických modifikací pomocí funkčních skupin, jako jsou například oktadecyl (C18), oktyl (C8), pentafluorofenyl (F5), kyanopropyl (CN), aminopropyl (NH<sub>2</sub>) a mnoho dalších. Tyto modifikace ovlivňují retenci analytů prostřednictvím interakcí s nepolárními řetězci na povrchu silikagelu. Silikagelové stacionární fáze jsou omezeny pH rozsahem 2-7 (8). Při vyšších hodnotách pH dochází k rozpuštění silikagelu a při nižších hodnotách pH ke kyselé katalyzované hydrolyze siloxanových vazeb. Důležitým faktorem je počet volných silanolových skupin, které mohou negativně ovlivňovat tvar a symetrii píků, zejména u bazických látek. Tento nežádoucí efekt lze minimalizovat zaslepením volných silanolových skupin tzv. endcappingem. Při tomto procesu se na volné silanolové skupiny naváže organosilan, což snižuje jejich schopnost reagovat s analyty tím, že zabrání vytváření nežádoucích vazeb mezi bazickými analyty a silanolovými skupinami na povrchu stacionární fáze [1; 7].

Vedle silikagelových stacionárních fází se v chromatografii využívají také organické polymerní stacionární fáze, které většinou poskytují chemickou odolnost v celém rozsahu pH a při vysokých teplotách. Polymerní stacionární fáze jsou však omezeny maximálním pracovním tlakem obvykle 200 barů. Použití příliš vysokého tlaku při analýze může způsobit deformaci částic. Organické polymerní stacionární fáze jsou kompatibilní s běžnými organickými rozpouštědly používanými v systému s reverzními fázemi, přesto je jejich využití omezeno tendencí bobtnat nebo se srážet v závislosti na typu použitého rozpouštědla, což může ovlivnit účinnost separace. Mezi nejčastěji používané materiály v systémech s reverzními fázemi patří polyakrylamid (PAM), polyvinylalkohol (PVA) a kopolymer polystyren-divinylbenzen (PS-DVB) [1; 7].

Hybridní stacionární fáze představuje typ chromatografického materiálu, který kombinuje vlastnosti anorganického polymeru (silikagel, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý) s organickým polymerem. Tento hybridní materiál je navržen tak, aby poskytoval vyšší stabilitu v širším rozmezí pH (obvykle 1-12) a lepší odolnost a mechanickou stabilitu oproti silikagelové stacionární fázi. Tato fáze je často modifikována skupinami, jako jsou C18, C8, pentafluorofenyl, nebo polárními skupinami, jako jsou kyanopropyl, aminopropyl a dioly. Tím se upravuje jejich selektivita pro separaci různorodých analytů v systémech s reverzními fázemi [1; 7].

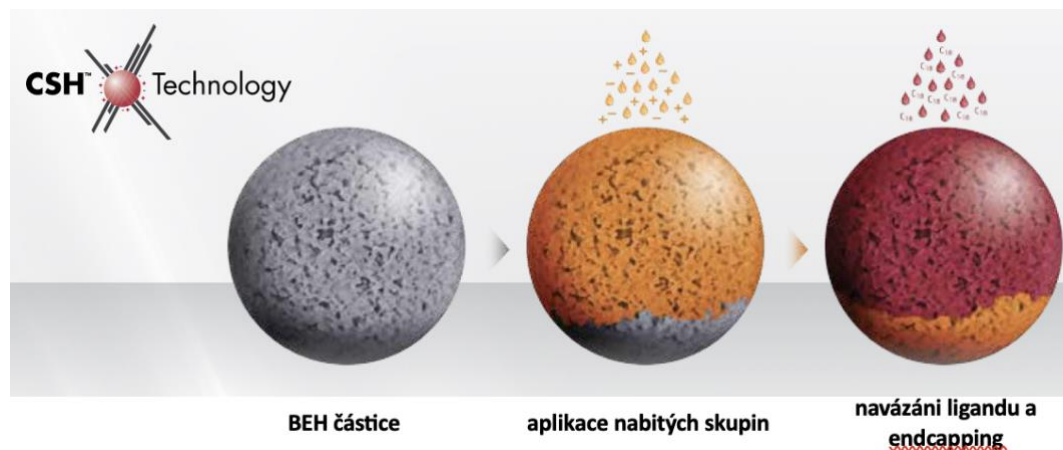
V roce 2004 představila společnost Waters hybridní materiál druhé generace, známý pod obchodním názvem BEH (Ethylene bridged hybrid). Jedná se o etylenem zesíťovaný silikagel. Výhodou tohoto materiálu v porovnání se silikagelem je vyšší chemická odolnost a mechanická stabilita. Podle údajů společnosti Waters je tento materiál schopen odolat provozním tlakům až 1500 barů. Například kolona Acquity UPLC BEH C18, která využívá tento hybridní materiál, poskytuje stabilitu v pH rozmezí 1–12 a je schopna pracovat při teplotách až do 80 °C [1; 8].

Dalším pokrokem při vývoji chromatografických materiálů společnosti Waters je hybridní sorbent CSH (charged surface hybrid) znázorněn na obr. 1. Tento materiál vychází z BEH částice, což zajišťuje vysokou chemickou stabilitu a mechanickou odolnost. Povrch částice je modifikován nábojem, který zlepšuje tvar píků, zejména pro bazické



sloučeniny při nízkém pH. Materiál je klasifikován jako vícemodální stacionární fáze, jelikož kombinuje více separačních mechanismů [1; 8].

Kolony s reverzními fázemi použité v této práci jsou shrnuty v tab. 1.



Obrázek 1: Výroba hybridních CSH částic společnosti Waters [8]

Tabulka 1: Souhrn vlastností RP kolon použitých v této práci [9; 10]

kolona	ACQUITY UPLC BEH C18		Kinetex F5
velikost pórů	130 Å		100 Å
měrný povrch	185 m <sup>2</sup> /g		200 m <sup>2</sup> /g
rozsah pH	1,0 - 12,0		1,5 - 8,5
teplotní stabilita	nízké pH	80 °C	60 °C
	vysoké pH	60 °C	40 °C
pokrytí uhlíkem	18 %		9 %
ligand	C 18		pentafluorfenylpropyl
vazba ligandu	trifunkční		monofunkční
endcapping	chráněno patentem		neuveдено
maximální tlak	18000 psi (1240 Bar)		20000 psi (1378 bar)
výrobce	Waters (USA)		Phemonenex (USA)
kolona	ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18		ACQUITY UPLC CSH C18
velikost pórů	130 Å		130 Å
měrný povrch	185 m <sup>2</sup> /g		185 m <sup>2</sup> /g
rozsah pH	2,0 – 11,0		1–11
teplotní stabilita	nízké pH	50 °C	80 °C
	vysoké pH	45 °C	45 °C
pokrytí uhlíkem	17 %		15 %
ligand	polární skupina s navázaným C18		polární skupina s navázaným C18
vazba ligandu	monofunkční		trifunkční
endcapping	trimethylsilan		chráněno patentem
maximální tlak	18000 psi (1240 Bar)		18000 psi (1240 Bar)
výrobce	Waters (USA)		Waters (USA)

### 3.1.2 Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je vhodná alternativa, pokud systém s reverzními fázemi nedosahuje dostatečné retence. Je vhodná pro separaci malých, polárních a ionizovaných sloučenin, které v systémech s reverzními fázemi vykazují minimální retenci [1; 7].

HILIC využívá mechanismus rozdělování analytů mezi silně hydrofilní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu polární stacionární fáze a vodně-organickou složkou mobilní fáze. Mobilní fáze je převážně hydrofobní a obsahuje vysoký podíl organického rozpouštědla, typicky acetonitrilu. Organická složka obvykle tvoří 70–95 % mobilní fáze, zatímco vodná složka je zastoupena minimálně 3 % [1; 7].

V této práci bylo testováno celkem šest HILIC kolon uvedených v tab 2. Jako zástupce nemodifikované silikagelové stacionární fáze byla testována kolona CORTECS UPLC HILIC od společnosti Waters, využívající částice s pevným jádrem a kolona Luna HILIC od společnosti Phenomenex využívá silikagelových částic s hladkým povrchem, což přispívá k jejich jednotnějšímu tvaru. Synchronis HILIC od společnosti Termo fisher scientific je silikagel modifikovaný zwitteriontovým ligandem sulfoalkylbetainem. Nemodifikovanou hybridní stacionární fázi BEH zastupovala kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC od společnosti Waters. Kolona z hybridního materiálu BEH s navázaným zwitteriontovým ligandem sulfoalkylbetainem byla Atlantis Premier BEH Z HILIC od společnosti Waters. Kolona Atlantis Premier BEH Z HILIC využívá mimo jiné patentovanou technologii MaxPeak High-Performance Surfaces (HPS), která minimalizuje nežádoucí interakce mezi analyty a povrchem kolony. Tato technologie zlepšuje tvar píků a citlivost analýzy tím, že eliminuje povrchové interakce, které by mohly vést k deformaci píků. Další testovanou kolonou od společnosti Waters byla ACQUITY UPLC BEH Amide, jedná se o hybridní materiál BEH s navázanou karbamoylovou skupinou [11; 12; 13; 14].

**Tabulka 2: Souhrn vlastností HILIC kolon použitých v této práci [10; 11; 12; 13]**

kolona		Synchronis HILIC	Atlantis Premier BEH Z HILIC	UPLC BEH HILIC
velikost pórů		100 Å	95 Å	130 Å
měrný povrch		320 m <sup>2</sup> /g	270 m <sup>2</sup> /g	185 m <sup>2</sup> /g
rozsah pH		2–8	2–10	1-9
teplotní stabilita	nízké pH	60 °C	60 °C	60 °C
	vysoké pH	40 °C	60 °C	45 °C
pokrytí uhlíkem		5 %	17 %	---
ligand		sulfoalkylbetain	sulfoalkylbetain	---
vazba ligandu		monofunkční	monofunkční	---
endcapping		---	---	---
maximální tlak		18 130 psi (1250 Bar)	18000 psi (1240 Bar)	18000 psi (1240 Bar)
výrobce		Termo fisher scientific (USA)	Waters (USA)	Waters (USA)
kolona		Luna HILIC	CORTECS UPLC HILIC	ACQUITY UPLC BEH Amide
velikost pórů		100 Å	90 Å	130 Å
měrný povrch		400 m <sup>2</sup> /g	100 m <sup>2</sup> /g	185 m <sup>2</sup> /g
rozsah pH		1,5 – 11	1-5	2-11
teplotní stabilita	nízké pH	60 °C	45 °C	90 °C
	vysoké pH	40 °C	45 °C	90 °C
pokrytí uhlíkem		9,5 %	---	12 %
ligand		aminopropyl	---	karbamoyl
vazba ligandu		monofunkční	---	trifunkční
endcapping		---	---	---
maximální tlak		6000 psi (414 Bar)	18000 psi (1240 Bar)	18000 psi (1240 Bar)
výrobce		Phemonenex (USA)	Waters (USA)	Waters (USA)

### 3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá analytická metoda. Poskytuje detailní informace o molekulové hmotnosti, přítomnosti a poměrech izotopů prvků v dané látce a umožňuje kvantitativní analýzu látek. Analyzované molekuly jsou převedeny na ionty v plynné fázi a následně separovány na základě jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) [15; 1].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí. Iontový zdroj, který zajišťuje převedení látky do plynné fáze a ionizaci analytu. Následuje hmotnostní analyzátor, ve kterém dochází k rozdělování iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje a následně detektor, který zaznamenává dopad iontů prošlých analyzátozem. Další

součástí přístroje jsou počítač, jako ovládací a vyhodnocovací zařízení, vakuový systém a iontová optika, která urychluje, fokusuje a usměrňuje ionty do analyzátoru. Iontová optika slouží také k oddělení nežádoucích neutrálních částic [1].

### **3.2.1 Ionizační techniky**

V iontových zdrojích jsou analyzované látky před vlastní analýzou v hmotnostním spektrometru ionizovány. K dispozici je celá řada ionizačních technik, kdy volba závisí na fyzikálně chemických vlastnostech analytu [1; 15].

Ionizační techniky lze rozdělit na měkké a tvrdé. Měkké ionizační techniky se od tvrdých liší tím, že způsobují menší, či žádnou fragmentaci. Ionizace probíhá jak v plynné, tak v kapalně fázi, v závislosti na použité ionizační technice. Nejčastěji se využívají techniky ionizace za atmosférického tlaku, známé jako API techniky. Patří sem například ionizace elektrosprejem (ESI), která je použita v této práci, nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Mezi tvrdé ionizační techniky, které se nejčastěji používají ve spojení s plynovou chromatografií, patří elektronová ionizace (EI). Tato technika způsobuje značnou fragmentaci, její výhodou je však existence knihoven spekter, což usnadňuje interpretaci výsledků [1; 15].

K ionizaci elektrosprejem dochází vložím napětí na kapiláru, které vytvoří na povrchu eluátu náboj. Na konci kapiláry je eluát pomocí zamlžujícího plynu rozptýlen za vzniku kapiček, na jejichž povrchu je velké množství náboje. Postupným odpařováním rozpouštědla dochází ke coulombické explozi do takové míry, že jsou získány nabitě ionty, které jsou fokusovány iontovou optikou do analyzátoru [15].

Elektrosprej dokáže produkovat také vícenásobně nabitě ionty, což umožňuje analýzu látek s vysokou molekulovou hmotností například v proteomice. Tento typ ionizace je nejčastěji využívaný typ ionizace ve spojení s kapalinovou chromatografií [15].

### **3.2.2 Hmotnostní analyzátory**

Hmotnostní analyzátory umožňují rozdělení iontů na základě jejich  $m/z$  a zároveň je urychlují a usměrňují na detektor. Existuje několik typů hmotnostních analyzátorů,

kteře se lišĩ principem, separace iontů podle jejich  $m/z$ . V této práci je použit trojitý kvadrupól [1].

Trojitý kvadrupól je tandemové uspořádní tří kvadrupólů za sebou. První kvadrupól selektivně filtruje ionty o specifickém poměru  $m/z$ , které jsou následně fragmentovány ve druhém kvadrupólu, sloužícím jako kolizní cela, což umožňuje měření fragmentačních spekter. Fragmentace je způsobena interakcí iontů s inertním kolizním plynem v kolizní cele, což vede k rozbití prekurzorových iontů na fragmenty, které jsou následně analyzovány ve třetím kvadrupólu. Tato konfigurace umožňuje selektivní analýzu složitých směsí, protože každý kvadrupól může být nezávisle nastaven na filtraci specifických  $m/z$  poměrů, což zvyšuje schopnost identifikovat a kvantifikovat analyty v přítomnosti interferujících látek [15].

### 3.3 Neurotransmitery

Neurotransmitter je chemický mediátor, který je uvolňován do synaptické štěrby jedním neuronem, který ovlivňuje postsynaptickou buňku, což může být další neuron nebo efektorový orgán, jako je svalová buňka nebo žláza. Neurotransmitter se váže na specifické receptory na postsynaptické membráně, čímž vyvolává excitační nebo inhibiční odpověď v této buňce. Většina neurotransmiterů nedokáže překonat hematoencefalickou bariéru (HEB), která chrání centrální nervovou soustavu (CNS) před potenciálně škodlivými látkami. Přes HEB mohou postupovat pouze malé a nepolární molekuly, nebo prekurzory neurotransmiterů. Z prekurzorů jsou následně syntetizovány neurotransmitery přímo v neuronech, často v synaptickém zakončení. HEB hraje klíčovou roli při udržování stabilního mikroprostředí pro neuronální signalizaci, což je nezbytné pro správné fungování CNS. Poškození HEB může vést k narušení této homeostázy, což je spojeno s neurodegenerativními onemocněními, jako je Alzheimerova choroba, a se zánětlivými procesy v mozku. Integrita HEB je proto zásadní pro udržení celkového zdraví mozku [16; 17; 18].

Každý neuron syntetizuje a uvolňuje pouze ty neurotransmitery, které používá pro přenos signálů přes synapsi k jiné buňce. Neuronové dráhy jsou často identifikovány

podle jejich neurotransmiterů, například dopaminergní dráha syntetizuje a uvolňuje neurotransmiter dopamin. Cílem neurotransmiterů mohou být mimo neurony, také jiné typy buněk, například svalové nebo žlázné [16; 17].

Neurotransmitery jsou strukturně velmi různorodá skupina látek, která se dá rozdělit na podle několika kritérií. Zde je uvedeno rozdělení na základě chemického složení [19]:

- **klasické neurotransmitery:**

- aminokyseliny: glutamát, kyselina gama-aminomáselná, glycin;
- biogenní aminy:
  - katecholaminy (dopamin, noradrenalin, adrenalin);
  - indolaminy: serotonin;
- histamin;
- acetylcholin;

- **neuropeptidy:**

- substance P;
- endorfiny a enkefaliny (opioidní peptidy);
- vasopresin;
- oxytocin;
- neuropeptid Y;
- somatostatin;

- **endokanabinoidy:**

- endokanabinoidy: anandamid, 2-arachidonoylglycerol;

- **plynné molekuly:**

- oxid dusnatý (NO);
- oxid uhelnatý (CO);

- **puriny:**
  - adenosin;
  - ATP (adenosintrifosfát).

Tato práce se zabývá neurotransmitery, které spadají do skupiny klasické neurotransmitery a endokannabinoidy.

### **3.3.1 Klasické neurotransmitery**

Klasické neurotransmitery jsou skupinou malých molekul, jejichž mechanismy účinku byly v neurovědě prostudovány mezi prvními. Tyto neurotransmitery rychle a přesně ovládají neuronální komunikaci prostřednictvím interakce s iontovými kanály nebo receptory spojenými s G-proteiny, což je zásadní pro funkce jako motorická kontrola, vnímání, učení a paměť. Mezi klasické neurotransmitery patří acetylcholin, glutamát, GABA, glycin a biogenní aminy, jako dopamin, serotonin a noradrenalin. Tyto molekuly položily základ pro pochopení synaptického přenosu a nadále slouží jako klíčové referenční body pro výzkum složitějších neurochemických procesů [19]. Glutamát (GLUT) a kyselina gama-aminomáselná (GABA) jsou klíčové neurotransmitery, které zásadně ovlivňují funkce centrálního nervového systému (CNS). V mozku je GABA hlavní inhibiční neurotransmitter, zatímco GLUT je hlavní excitační neurotransmitter. Spolupracují na regulaci neuronální aktivity a řadě neurologických funkcí. Narušení rovnováhy mezi nimi může vést k neurologickým poruchám. GABA i GLUT se v těle vyskytují velmi hojně a zapojují se do mnoha fyziologických procesů, proto bylo velmi obtížné je identifikovat jako neurotransmitery [16]. GLUT je esenciální aminokyselina a nejhojnější neurotransmitter. Mimo jiné je mediátorem plasticity nervového systému (zániku starých, nevyužitých synapsí, posílení jiných synapsí nebo vzniku úplně nových), včetně buněčné eliminace. Předpokládá se, že právě synaptická plasticita hraje zásadní roli v uchovávání vzpomínek a procesu učení [16; 20].

GLUT působí primárně v glutamatergním systému. Nejrozšířenějším typem receptorů pro tento neurotransmitter jsou N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory. Tyto receptory jsou hojně exprimovány v celém nervovém systému a hrají velmi důležitou roli v jeho fungování. Jsou klíčové pro fyziologický vývoj nervových tkání, plasticitu synaptických spojení a kognitivních funkcí, jako jsou učení a paměť. Přílišná stimulace těchto receptorů však může vést k excitotoxickým újmám, což může zapříčinit závažné neurologické problémy. Mezi ně patří amyotrofická laterální skleróza (ALS), která je spojena právě s vyššími hladinami glutamátu, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, cévní mozkové příhody a jiné neurodegenerativní stavy [20; 21].

Narušení glutamatergního systému je společným rysem pro hypoxicko-ischemické poškození, traumatické poranění mozku, neurodegenerativní onemocnění i neuropsychiatrické choroby. Proto je glutamatergní systém a potažmo NMDA receptory atraktivním cílem současného neurofarmakologického výzkumu [16; 20].

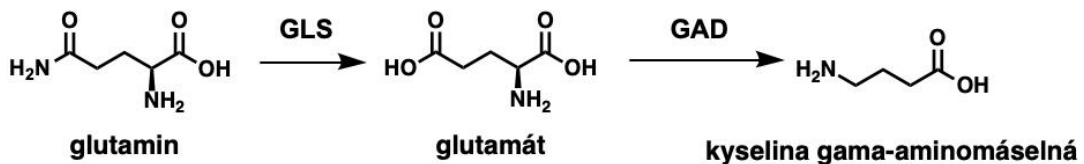
GABA jako inhibiční neurotransmitter pomáhá uklidnit mozek a podporuje relaxaci, čímž reguluje náladu a napomáhá spánku. Stejně jako GLUT hraje roli v učení a paměti. Vzhledem k tomu, že role GABA jsou opačné než role GLUT, příznaky spojené s nedostatkem GABA se překrývají s příznaky nadměrné hladiny GLUT. Takové příznaky jsou například globální excitabilita mozku a náchylnost k neurotoxickému poškození. Nedostatek GABA může vést k úzkosti, epilepsii, insomnii a depresi [16].

Jsou známy tři typy GABAergních receptorů GABAA-C. GABAA a GABAC mají podobnou funkci. Jedná se o ionotropní receptory, které ovlivňují permeabilitu  $\text{Cl}^-$  kanálů. GABAC však oproti GABAA tyto kanály otevírá pomaleji a jejich účinek je daleko delší. GABAB receptory jsou metabotropní a jsou spřaženy s G-proteinem. Aktivace tohoto receptoru mimo jiné způsobí zvýšení propustnosti pro  $\text{K}^+$  a snížení aktivity  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů. Výsledný efekt je snížení množství vyplaveného neurotransmiteru cílovým neuronem [16].

GLUT a GABA spolu úzce souvisejí. GABA je syntetizována z GLUT. Děje se tak díky enzymu glutamátdekarboxylázy (GAD). V CNS je GABA recyklována v rámci řady reakcí, které efektivně šetří a obnovují jak GLUT, tak GABA.



GLUT je v neuronech syntetizován primárně z glutaminu pomocí enzymu glutaminázy (GLS), který vzniká v astrocytech a je transportován do neuronů. Právě tato spolupráce neuronů a astrocytů je důležitá pro syntézu GLUT a současně i GABA. syntéza GLUT a GABA je znázorněna na obr. 2 [16; 20].



**Obrázek 2: Syntéza GLUT a GABA**

Recyklace GLUT probíhá tak, že po jeho uvolnění do synaptické štěrby je většina GLUT zpětně vychytávána astrocyty pomocí glutamátových transportérů. V astrocytech je pak přeměněn zpět na glutamin za spotřeby ATP, amoniaku a působení enzymu glutaminsyntetázy. Takto vzniklý glutamin je následně opět transportován do neuronů, kde může být znovu využit k produkci glutamátu a jeho uvolnění do synaptické štěrby [16; 20].

Dopamin (DA) a serotonin (5-HT) jsou monoaminové neurotransmitery. Serotonergní systém se účastní regulace mnoha fyziologických funkcí, jako jsou spánkové cykly a bdění, tělesná teplota, krevní tlak, vnímání bolesti, hormonální funkce hypotalamu a psychologické funkce, jako je například deprese a úzkost. Dopaminergní systém je pravděpodobně nejznámější pro svou roli v psychických poruchách a drogové závislosti. V CNS hraje významnou úlohu při řízení motorických funkcí, iniciaci různých vzorců chování a při modulaci aktivity viscerálních funkcí [16; 22].

5-HT často cílí na stejné oblasti jako noradrenalin, se kterým funkčně spolupracuje. Dosud bylo popsáno sedm typů serotoninových receptorů označovaných 5-HT1 až 5-HT7R, které se liší účinky. Některé jsou excitační a jiné inhibiční. Výsledný účinek serotoninu proto závisí na místě a typu receptoru, které cílová struktura exprimuje [16; 22].

Ascendentní serotoninergní systém, který směřuje své nervové signály do mozkové kůry, limbického systému (amygdala a hypokampus), bazálních ganglií, hypothalamu a některých oblastí thalamu, má roli v řízení emocí, hypothalamických funkcí spojených s viscerálními procesy a ve spánkovém cyklu. Dále ovlivňuje způsob, jakým mozek zpracovává sensorické signály, například v kontextu s vizuálním vnímáním. Descendentní serotoninergní systém naopak směřuje nervové signály do kaudálnějších oblastí CNS, kam patří mozeček, mícha a mozkový kmen. Descendentní nervový systém hraje roli ve vnímání bolesti skrze interakce se zadním míšním rohem, kde zvýšená aktivita tohoto systému podporuje účinky anestetik a je nezbytná pro efekt opiátů. Dále moduluje excitabilitu neuronů v autonomním nervovém systému a podporuje aktivitu motorických neuronů ve ventrální míšní oblasti [16].

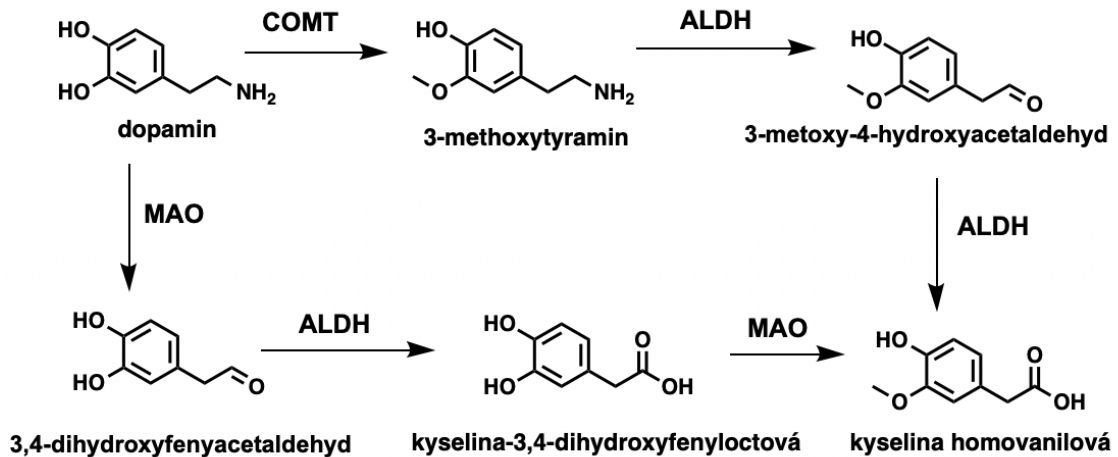
Serotoninergní systém je spojen s mnoha behaviorálními poruchami, včetně depresí, úzkostných poruch, bipolární poruchy a antisociální poruchy osobnosti [22].

DA je odvozem od L-tyrosinu. V CNS ovlivňuje řízení motorických funkcí, iniciaci různých vzorců chování a při modulaci aktivity viscerálních funkcí. Je zásadní i v procesech souvisejících s pocitem potěšení, odměnou a vznikem závislostí. Nerovnováha dopaminu, ať už jeho nadbytek či nedostatek, může vést k vážným zdravotním komplikacím. Jeho role je také spojována s Parkinsonovou chorobou a schizofrenií [22; 16; 23].

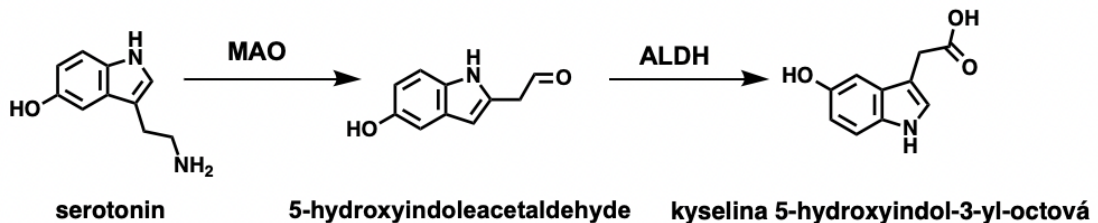
Aktuálně je známo pět typů dopaminových receptorů označovaných D1 až D5. Tyto receptory jsou spojeny s G-proteiny ovlivňující funkci adenylátcyklázy. Klasifikují se do dvou hlavních kategorií, na základě jejich vlivu na adenylátcyklázu. D1 a D5 spadají do skupiny GS, která adenylátcyklázu stimuluje, zatímco receptory D2, D3, D4 patří do skupiny GI, která ji naopak inhibuje. Distribuce těchto receptorů se liší napříč různými částmi CNS. Například v motorických oblastech mozkové kůry převažují D2 receptory, zatímco v limbickém systému dominují receptory D3 a D4. Adrenalin a noradrenalin působí pro většinu těchto receptorů jako parciální agonisté [16].

Hladiny obou těchto neurotransmiterů jsou regulovány zpětným vychytáváním a metabolismem. Jak DA, tak 5-HT jsou metabolizovány monoaminoxidázou (MAO)

na metabolity fáze I, kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou (DOPAC) a kyselinu 5-hydroxyindoloctovou (5-HIAA). DOPAC je dále metabolizován na kyselinu homovanilovou (HVA) katechol-O-methyltrasferázou (COMT). Metabolismus DA a 5-HT je znázorněn na obr. 3 a 4 [23].



Obrázek 3: Metabolismus dopaminu



Obrázek 4: Metabolismus serotoninu

Vzhledem k tomu, že hladiny DA a 5-HT jsou velmi proměnlivé, v praxi se pro hodnocení stavu těchto neurotransmitterových systémů často využívá stanovení jejich metabolitů. Tyto metabolity lze stanovit nejen v krvi, ale například kyselina homovanilová je také vylučována do moči [17; 24].

Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (DOPAC) a 3-methoxytyramin (3-MT) jsou meziprodukty metabolismu DA, zatímco kyselina homovanilová (HVA) představuje jeho hlavní koncový produkt. Kyselina 5-hydroxyindoloctová (5-HIAA) je hlavním koncovým produktem metabolismu serotoninu (5-HT). Tyto metabolity jsou vylučovány převážně močí a slouží jako důležité biomarkery neuronální aktivity a funkce DA a 5-HT. Jsou využívány k diagnostice a monitorování poruch spojených s těmito neurotransmitery [24; 25].

### **3.3.2 Endokanabinoidy**

Lipidové neurotransmitery, jako jsou anandamid (AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG), představují specifickou skupinu signálních molekul odvozených od kyseliny arachidonové, což je mastná kyselina nacházející se v buněčných membránách. Narozdíl od klasických neurotransmiterů, které jsou uvolňovány exocytózou z vezikul, se endokanabinoidy díky lipofilní povaze uvolňují pasivně, difúzí přes buněčnou membránu.

Strukturu anandamidu poprvé popsal v roce 1992 český analytický chemik Lumír Ondřej Hanus ve spolupráci s americkým farmakologem Williamem Anthony Devanem. Struktura 2 - arachidonoylglycerolu byla popsána o 3 roky později Izraelským chemikem Raphaelem Mechoulamem, který je dnes považován za „Otce výzkumu kanabinoidů“ [16; 26].

Anandamid (AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG) jsou látky odvozené od kyseliny arachidonové, které hrají klíčovou roli v tzv. endokanabinoidním systému. Ten se nachází v celém těle a ovlivňuje širokou škálu fyziologických funkcí. AEA a 2-AG působí na receptory CB1, které se primárně nacházejí v mozku a CB2, které jsou umístěny mimo mozek. V mozku ovlivňují motorickou kontrolu, kognici, emoce, motivaci a homeostázu. Mimo mozek ovlivňují autonomní nervový systém, imunitní systém, mikrocirkulaci, trávicí systém a reprodukční systém [16; 27; 28; 26].

Tyto endokanabinoidy neprodukuje tělo do zásoby. V případě potřeby je endokanabinoidní systém aktivován a až po této aktivaci dochází k syntéze AEA a

2-AG. Ty se poté uvolňují z buněk a ovlivňují komunikaci mezi neurony. Endokannabinoidní systém je stále předmětem intenzivního výzkumu [27; 26].

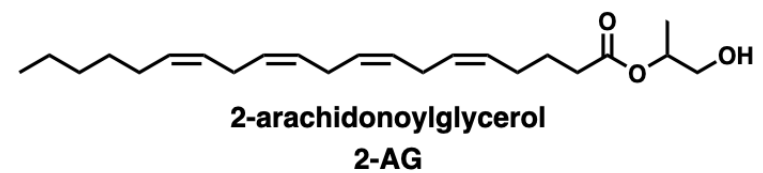
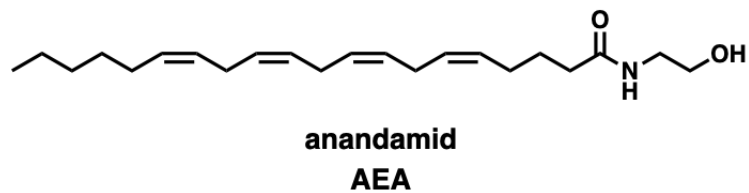
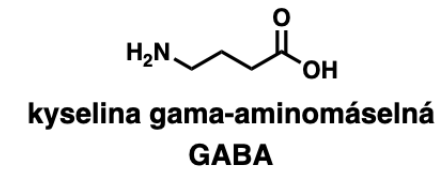
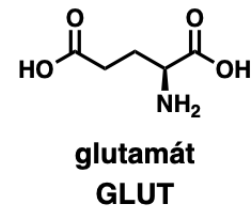
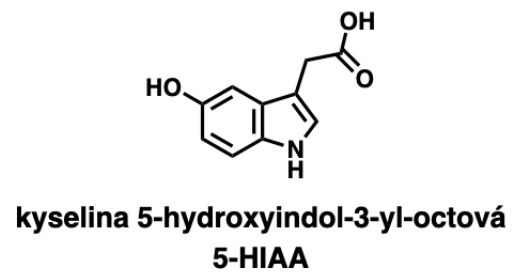
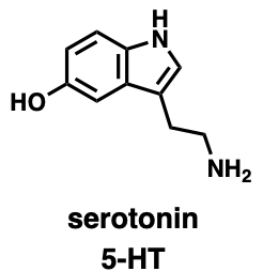
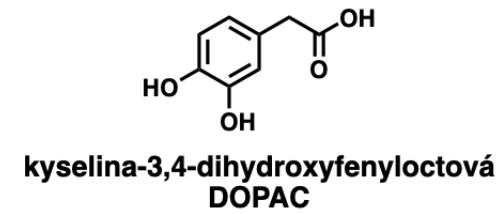
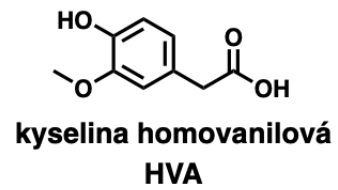
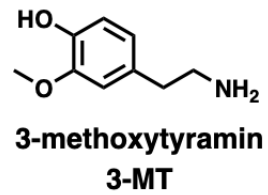
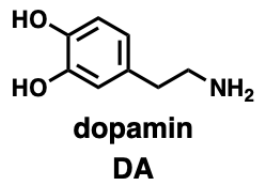
Existují další zástupci, například O-arachidonylethanolamin (OAE), O-oleoylethanolamin (OEA), nebo N-Arachidonoyldopamin (NADA). Tyto molekuly, i když nejsou tak dobře prozkoumané jako anandamid a 2-AG, rozšiřují skupinu lipidových neurotransmiterů a naznačují, že signalizace v nervové soustavě je komplexnější, než se původně předpokládalo [27; 26].

### 3.3.3 Fyzikálně chemické vlastnosti analytů

Fyzikálně chemické vlastnosti analytů jsou shrnuty v tab. 3. Většina analytů je polárních, avšak 2-AG a AEA jsou nepolární, což komplikuje vývoj metody pro jejich současné stanovení. Struktury jednotlivých analytů jsou zobrazeny na obr. 5.

**Tabulka 3: Fyzikálně chemické vlastnosti analytů [29]**

analyt	zkratka	správná molekulová hmotnost [Da]	MW [g/mol]	LogP	pKa nejvíce kyselých funkčních skupiny	pKa nejvíce bazických funkčních skupiny
dopamin	DA	156,0790	153,18	0,046	9,39	10,11
kyselina homovanilová	HVA	182,0579	182,17	0,650	4,39	-
3-methoxytyramin	3-MT	167,9046	167,21	0,640	9,57	-
kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová	DOPAC	168,0423	168,15	0,305	4,42	-
anandamid	AEA	347,2824	347,53	6,155	14,48	-0,69
2-arachidonoylglycerol	2-AG	378,2770	378,50	6,358	13,54	-
glutamát	GLUT	147,0532	146,14	-1,39	3,05	9,67
serotonin	5-HT	176,0950	176,21	0,545	10,9	9,52
kyselina 5-hydroxyindole-3-octová	5-HIAA	191,0582	191,18	0,529	4,54	-4,07
kyselina gama-aminomáselná	GABA	103,0633	103,12	-0,637	4,44	11,25



Obrázek 5: Struktury neurotransmiterů použitých v této práci [29]

### 3.3.4 Metody stanovení vybraných neurotransmiterů

Souhrn vybraných publikací zabývajících se stanovením vybraných neurotransmiterů je uveden v tab. 4. Pro separaci neurotransmiterů je nejčastěji využívána ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC) s tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS). Mezi další využívané detektory patří detektor elektronového záchytu (ECD), detektor s diodovým polem (DAD/PDA), fluorescenční detektor (FD) a chemiluminiscenční detektor (CL). MS/MS poskytuje vysokou citlivost a selektivitu. Umožňuje jednoznačnou identifikaci neurotransmiterů na základě jejich  $m/z$  a fragmentačních vzorců. Dokáže detekovat širokou škálu látek bez omezení na jejich vlastnosti, na rozdíl od jiných detektorů, jako je ECD (omezen na látky s vysokou afinitou k elektronům), DAD (omezen na látky s chromofory), FD (omezen na fluorescenční vlastnosti látky) a CL (omezen na chemiluminiscenční vlastnosti látky).

Nejčastěji volená stacionární fáze pro separaci neurotransmiterů byla C18. Vodnou složkou mobilní fáze (MF) byla nejčastěji 0,1% kyselina mravenčí (FA). Další použité vodné složky MF byly například 0,2% FA, kyselina octová (AA), 5 mM octan amonný (AmAc) o pH 3,5 a 4,5. Jako Organická složka MF byl nejčastěji používán acetonitril (ACN). Dále byly také používány například 0,1% FA v ACN, metanol (MeOH) a 0,1% FA v MeOH. Nejčastěji se doba analýzy pohybovala v rozmezí od 5 do 15 minut.

V žádné z nalezených studií nebyly současně stanovovány neurotransmitery zvoleny pro tuto práci. Nejčastěji byly analyzovány polární neurotransmitery, a to buď jednotlivě, nebo ve skupinách maximálně po šesti sloučeninách. Dále bylo zjištěno, že studií zaměřených na analýzu AEA a 2-AG je menší množství než pro ostatní analyty. Nebyla nalezena žádná studie, ve které by tyto lipofilní analyty byly stanovovány současně s některým z cílových polárních neurotransmiterů.

**Tabulka 4A: Přehled metod pro stanovení vybraných neurotransmiterů**

Analyt	Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LLOQ	Zdroj
5-HT	40 µL lyzátu buněčné linie	mikrocentrifugace	Synergi Polar-RP (2 x 150 mm; 4 µm)	A: 0,1% FA ve vodě B: 0,10 FA v MeOH	MS/MS	5 ng/mL	[30]
HVA 5-HIAA	3 mL moči	SPE	Symmetry C18 (4,6 x 75 mm; 3,5 µm)	A: 4 % AA B: MeOH	ECD	2,5 µmol/L	[31]
GABA	50 µL séra	PP	XBridge C18 column (2,1 x 150 mm; 3,5 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: 0,1 % FA v MeOH	MS/MS	2 nmol/L	[32]
GABA	500 mg fermentovaných sójových produktů	homogenizace, extrakce ultrazvukem, centrifugace	ZORBAX Extend-C 18 (2,1 x 100 mm; 3,5 µm)	A: 5 mM octan amonný (pH 3,50) B: ACN	DAD	0,3 ng/mL	[33]
DA HVA 5-HIAA DOPAC GABA 5-HT	100 mg mozkové tkáně	homogenizace, Centrifugace, filtrace	Welch AQ-C18 column (2,1 x 100 mm, 3 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: MeOH	MS/MS	DA – 0,05 HVA - 45 5-HIAA - 3 DOPAC - 5 GABA - 100 5-HT - 0,03 ng/mL	[34]
DA 5-HT	0,1 mg mozkové tkáně	homogenizace, Centrifugace	ZORBAX Eclipse Plus C-18 (2,1 x 50 mm; 1,8 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: 0,1 % FA v ACN	MS/MS	0,25 ng/mL	[35]
5-HT DA	150 µL séra	PP, centrifugace	Restek Ultra PFP Propyl (2,1 x 100 mm; 3 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: 0,1 % FA v MeOH	MS/MS	0,94 ng/mL	[36]
5-HIAA	50 µL moči	online SPE	Atlantis dC18 (3 x 100 mm; 3 µm)	A: 0,2 % FA ve vodě B: ACN	MS/MS	0,13 µmol/L	[37]
5-HIAA	10 ml séra	PP	Waters Acquity HSS T3 (2,1 x 100 mm; 1,8 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: MeOH + 0,3 % FA	MS/MS	-----	[38]
5-HIAA	25 µL moče	-----	ACQUITY UPLC HSS C18 (2,1 x 100 mm; 1,8 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: ACN	MS/MS	0,07 µmol/l	[39]
3-MT	500 µL moči	SPE	Shim-Pack VP-ODS (4,6 x 150 mm; 4,6 µm)	A: 70 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> B: MeOH	FD	LOD = 7,9 µg/L (LOQ neuvedeno)	[40]



**Tabulka 4B: Přehled metod pro stanovení vybraných neurotransmiterů**

Analyt	Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LLOQ	Zdroj
DA DOPAC HVA 5-HT 5-HIAA	20 µL mozkového mikrodialyzátu	přidání antioxidantů	Thermo Scientific Gold PFP Hypersil, (2,1 × 150 mm; 1,9 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: 0,1 % FA v ACN	MS/MS	DA – 0,05 DOPAC - 10 HVA – 0,5 5-HT – 0,1 5-HIAA - 1 ng/mL	[41]
DA GLUT GABA 5-HT	50 µL mozkového homogenátu hippocampu	PP, centrifugace	Restek Ultra Aqueous C18 (2,1 x 100 mm; 3 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: ACN	MS/MS	DA – 32,64 GLUT – 6,80 GABA – 9,70 5-HT – 11,35 nmol/L	[42]
DA 5-HT DOPAC 5-HIAA GABA	1 mg mozkové tkáň	homogenizace, Centrifugace, Filtrace, dSPE	Shimadzu C18 (2,1 × 150 mm; 2 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: ACN	MS/MS	DA - 1 5-HT - 10 DOPAC - 50 5-HIAA – 50 GABA – 0,1 ng/mL	[43]
GABA	100 µL lidské plazmy, potkaní plazmy, homogenát sítnice a mozku	NDA derivatizace	Zorbax Eclipse AAA (4,6 x 150 mm; 3.5 µm)	A: 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve vodě (pH 6,5) B: MeOH	FD	51,5 ng/mL	[44]
GABA	20 µL likvoru	PP	Acquity UPLC HSS RP C18 (2.1 × 150 mm, 1.8 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: MeOH	MS/MS	500 ng/mL	[45]
GABA	9 µL mozkového mikrodialyzátu	o-phthalaldehyd (OPA)/sulfit derivatizace	Luna C18 column (1,0 x 150 mm; 3 µm)	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (pH 4,5) 10–18 % (v/v) MeOH	FD	1 nmol/L	[46]

**Tabulka 4C: Přehled metod pro stanovení vybraných neurotransmiterů**

Analyt	Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LLOQ	Zdroj
GLUT	60 µL oční sítnice kuřecích embryí	OPA derivatizace	Shimadzu C18 Shim-pack VP-ODS (4,6 x 250 mm; 5 µm)	A: 50 mM octan sodný, MeOH 5 %, 2-propanol (pH 5.67) B: 70 % MeOH	FD	100 ng/mL	[47]
DOPAC 5-HIAA DA HVA 5-HT	mozková tkáň myši	Centrifugace, filtrace, PP	Mikrokolona ALF-105 C18 (1,0 x 150 mm; 3 µm)	citrátovo-fosfátový pufr (8 mM KCl, 50 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM kyselina citrónová, 2,33 mM OSA, 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 3,25 s 50% NaOH) + 10% methanol	ECD	DOPAC 2,5 5-HIAA 1,9 DA 2,7 HVA 14 5-HT 4,5 pg/ml	[48]
DA	200 µL plazmy	PP, SPME	ACQUITY BEH Amide (2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: ACN	MS/MS	1,2 ng/mL	[49]
DA DOPAC 5-HT 5-HIAA HVA	20 mg mozkové tkáně sépie	PTFE	LiChroster® 100 RP- 18 (4 x 125 mm; 5 µm)	A: 100 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> , 1,8 mM OSA + 0,1 mM EDTA B: 10 % ACN	ECD	DA – 7 DOPAC – 3 5-HT - 7 5-HIAA – 3 HVA – 3 ng/mL	[50]
DA	200 µL homogenátu mozku potkana	LLE	ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: ACN	MS/MS	DA - 0,844 ng/mL	[51]
5-HT	1 mL roztoku CAAI-18 AA	ředění	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-Aq (2,1 x 100 mm; 2,7 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: ACN	PDA	120 ng/mL	[52]
5-HIAA	50 µL plazmy	PP	Primesep B, SIELC Inc. (3,2 x 50 mm; 5 µm)	A: 10 mM octan amonný + 0,1 % (v/v) FA ve vodě B: 2 mM octan amonný + 0,1 % (v/v) FA v MeOH	MS/MS	15 nmol/L	[55]

**Tabulka 4D: Přehled metod pro stanovení vybraných neurotransmiterů**

Analyt	Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LLOQ	Zdroj
DA 5-HT	200 µL homogenitu mozkové tkáně	PP	Shim-pack ODS (4,6 x 250 mm; 5 µm)	A: 0,2 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> B: MeOH	CL	LOD = DA – 1,9 5-HT - 2,3 ng/mL (LOQ neuveдено)	[53]
5-HT	100 µL plazmy	PP	XB-C18 (2,1 x 50 mm; 5 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě B: 0,1 % FA v ACN	MS/MS	LOD = 1 ng/mL (LOQ neuveдено)	[54]
5-HT, DA, 5-HIAA, DOPAC HVA	1,5 ml homogenátu mozkové tkáně potkana	centrifugace, LLE	Thermo C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm)	0,05 % FA v ACN (92: 8, v/v)	MS/MS	5-HT - 4 DA - 4 5-HIAA - 12 DOPAC - 12 HVA - 12 ng/mL	[56]
DA DOPAC	500 µL plazmy	centrifugace	HR-80 Column C18 (4,6 x 80 mm; 3 µm)	CAT-A-PHASE HPLC pufr; ESA (MeOH, fosfátový pufr, patentovaný roztok pro iontové párování) + ACN	ECD	DOPAC - 5 DA - 5 ng/mL	[57]
DA 5-HT	10 µL plazmy	PP	GRACE VisionHT C18 (2,1 x 100 mm; 3 µm)	A: 0,1 % FA ve vodě + 0,01 % TFA B: 0,1 % FA v ACN	MS/MS	5-HT – 0,25 DA – 0,5 nmol/L	[58]
GLUT GABA	10 µL mozkového mikrodialyzátu	bez úpravy	Nucleoshell HILIC, EC (2,0 x 100 mm; 2,7 µm)	A: 25 mM AmF ve vodě (pH 3,5) B: ACN	MS/MS	GABA – 0,63 GLUT – 1,25 ng/mL	[59]
DA 3-MT DOPAC HVA	10 µL mozkového mikrodialyzátu	lyofilizace	Gemini NX-C18 (150x2 mm; 5 µm, 110 Å)	A: AA ve vodě (pH 2) B: MeOH	MS/MS	-----	[61]

**Tabulka 4E: Přehled metod pro stanovení vybraných neurotransmiterů**

Analyt	Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LLOQ	Zdroj
DA 3-MT HVA DOPAC	80 µL mozkového mikrodialyzátu	lyofilizace	Gemini® NX-C18 (2,0 x 150 mm; 5 µm)	A: AA ve vodě (pH 2) B: MeOH	MS/MS	DA – 4,24 HVA – 4,94 3-MT – 4,44 DOPAC – 5,35 nmol/mL	[60]
5-HT 5-HIAA HVA DA DOPAC 3-MT	250 µL plazmy	DLLME	XBridge Amide™ BEH (3,0 x 100 mm; 3,5 µm)	A: 10 mM AmF ve vodě (pH 3) B: 10 mM AmF v ACN	MS/MS	5-HT – 10 5-HIAA – 10 HVA – 30 DA – 10 DOPAC - 30 3-MT - 10 ng/mL	[62]
3-MT	50 µL plné krve ve formě suché kapky	extrakce rozpouštědlem, deprivatizace	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 150 mm; 1,8 µm)	A: 0,1 % FA B: 0,1 % FA v ACN	MS/MS	20 pg/mL	[63]
AEA 2-AG	50 µL séra	LLE	Atlantis dC18 (3,9 x 150 mm; 3 µm)	A: voda B: ACN	MS/MS	AEA – 1,7 2-AG – 13,4 pg/mL	[64]
AEA 2-AG	Plazma (možství neuvedeno)	LLE	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 100 mm; 2,6 µm)	A: 0,2 % AA B: 0,1 % FA v ACN	MS/MS	AEA - 500 2-AG - 500 ng/mL	[65]
AEA 2-AG	20 µL mikrodialyzátu	microSPE	Dionex C18 microcolumn (180 µm x 15 cm, 3 µm)	A: 10 mM octan amonný B: MeOH	MS/MS	AEA – 30 2-AG – 300 fmol	[66]
2-AG AEA	500 µL plazmy	PP, SPE	Reprosil-PUR C18 (2 x 50 mm; 3 µm)	A: voda + 2 mM octan amonný + 0,1 % FA B: MeOH + 2 mM octan amonný	MS/MS	2-AG – 0,1 AEA – 3,2 ng/mL	[68]

**Tabulka 4F: Přehled metod pro stanovení vybraných neurotransmiterů**

Analyt	Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	LLOQ	Zdroj
AEA	150 µL lidské plazmy	LLE	Zorbax Eclipse XDB C18 (2,1 × 50 mm; 5 µm)	A: 10 mM Octan amonný ve vodě B: 10 mM octan amonný v 90/10: ACN/voda (v/v) C: 10 mM Octan amonný v 50/50: ACN/voda (v/v).	MS/MS	0,1 ng/mL	[67]
2-AG	100 µL plazmy morčat	LLE	Waters Symmetry C18 (2,1 × 150 mm; 5 µm)	A: voda B: MeOH	MS/MS	1 ng/mL	[69]
AEA	50 µL plazmy	PP	Phenomenex Gemini C6-Phenyl (2,1 × 50 mm; 5 µm)	A: 5 mM amonium formát ve vodě B: ACN	MS/MS	250 fg	[70]
2AG AEA	50 mg vlasů	Extrakce rozpouštědlem, SPE	Acquity BEH C18 column (2,1 × 100 mm; 1,7 µm)	A: 2.0 mM octan amonný (pH 4.5) B: ACN	MS/MS	2AG – 5,30 AEA – 0,40 ng/mL	[71]
AEA 2-AG	buněčné linie	lýza buněk, 2x extrakce do tris-HCL pufru	Multospher 120 C18 (2 x 250 mm; 5 µm)	A: 0,2 % FA ve vodě B: 0,2 % FA v ACN	MS/MS	AEA - 0,03 2-AG - 2 ng/mL	[72]

## 4. Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje a pomůcky

- chromatografický systém: ACQUITY UPLC I-Class PLUS system; Waters, Milford, USA:
  - pumpa: ACQUITY Binary solvent manager; Waters, Milford, USA;
  - dávkovač vzorku: ACQUITY Sample manager FL-1; Waters, Milford, USA;
  - kolonový termostat: ACQUITY Column manager; Waters, Milford, USA;
  - vyhodnocovací program: MassLynx V4.2; Waters, Milford, USA;
  - hmotnostní spektrometr: Xevo TQ-XS triple quadrupole; Waters, Milford, USA;
  
- chromatografický systém: ACQUITY UPLC; Waters, Milford, USA:
  - pumpa: ACQUITY Binary solvent manager; Waters, Milford, USA;
  - dávkovač vzorku: ACQUITY Sample manager; Waters, Milford, USA;
  - kolonový termostat: ACQUITY Column manager; Waters, Milford, USA;
  - detektor: PDA detektor; Waters, Milford, USA;
  - vyhodnocovací program: Empower; Waters, Milford, USA;
  
- analytické váhy: Sartorius ME5-OC; Sartorius, Göttingen, Německo;
- třepačka: Promax 1020; Fisher scientific, Pardubice, Česká republika;
- ultrazvuková lázeň: Sonorex Digitec; Bandelin Elextronic, Berlin, Německo;
- automatické pipety: Eppendorf Reference 2; Eppendorf, Říčany u Prahy, Česká republika;
- pH metr: Hanna, Fisher scientific, Pardubice, Česká republika.

Seznam všech použitých chromatografických kolon:

- ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m); Waters (Milford, USA);
- Kinetex F5 (2,1 x 100 mm; 2,6  $\mu$ m); Phenomenex (Torrance, USA);
- ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18 (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m); Waters (Milford, USA);
- ACQUITY UPLC CSH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m); Waters (Milford, USA);
- Atlantis Premier BEH Z HILIC (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m); Waters (Milford, USA);
- Luna NH2 (2,0 x 100 mm; 3,0  $\mu$ m); Phenomenex (Torrance, USA);
- ACQUITY UPLC BEH Amide (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m); Waters (Milford, USA);
- Synchronis HILIC (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m); Thermo scientific (Bend, USA);
- ACQUITY UPLC BEH HILIC (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m); Waters (Milford, USA);
- CORTECS UPLC HILIC (2,1 x 100 mm; 1,6  $\mu$ m); Waters (Milford, USA).

## 4.2 Použité chemikálie

### 4.2.1 Použitá rozpouštědla a aditiva

- voda LC-MS grade: VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Francie;
- kyselina mravenčí  $\geq 99$  %: VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Francie;
- kyselina octová 100 %: Merck, Praha, Česká republika;
- acetonitril LC-MS grade: Fisher Scientific, Loughborough, UK;
- amoniak 25 % LC-MS grade: Merck, Praha, Česká republika;
- metanol LC-MS grade: Fisher Scientific, Loughborough, UK.

### 4.2.2 Použité standardy

- 3-methoxytyramin (97,3 %); Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo;
- kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (99,5 %); Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo;
- kyselina gama-aminomáselná (99,6 %); Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo;
- kyselina 5-hydroxyindole-3-octová (99 %); Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo;
- kyselina homovanilová (98,03 %); MedChemExpress, Monmouth Junction, USA;
- 2-arachidonoylglycerol ( $\geq 99,0$  %); MedChemExpress, Monmouth Junction, USA;
- anandamid (98,47 %); Toronto research chemicals, Toronto, Kanada;

- serotonin (98 %); Toronto research chemicals, Toronto, Kanada;
- dopamin (98 %); Toronto research chemicals, Toronto, Kanada;
- Glutamát (100 %); US Pharmacopeia, Rockville, USA.

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Zásobní roztoky standardních látek

Zásobní roztoky standardů GABA, GLUT, DA, HVA, 5-HIAA, DOPAC, 3-MT, 5-HT byly připraveny rozpuštěním v 0,1% FA ve vodě. Zásobní roztok AEA byl připraven rozpuštěním standardu v ACN. Zásobní roztok 2-AG byl připraven naředěním roztoku standardu 2-AG v ACN. Koncentrace zásobních roztoků byla 1 mg/ml. Zásobní roztoky standardů byly uchovávány v lednici při teplotě 4-8 °C po dobu maximálně 7 dnů.

### 4.3.2 Pracovní roztoky

Pracovní roztoky pro metodu na reverzních fázích byly připravovány dle potřeby do 0,1% FA ve vodě, pro metodu v módu HILIC byly pracovní roztoky připravovány do čistého ACN.

### 4.3.3 Mobilní fáze

V systému RP byly jako vodné složky testovány 0,1% FA ve vodě a 0,1% NH<sub>4</sub>OH ve vodě jako vodná složka MF. Jako organická složka byl vždy použit ACN.

V systému HILIC byly testovány vodné složky MF 10mM octan amonný (AmAc) o pH 4 a 6 a 9. 10 mM mravenčan amonný (AmF) o pH 3, 0,1% a 0,5% FA ve vodě, 0,1% a 0,5% AA ve vodě. Jako organická složka MF byl testován ACN, 0,1% a 0,5% FA v ACN a 0,1% a 0,5% AA v ACN.

MF 0,1% FA a 0,1% AA byla připravena přidáním 0,5 mL koncentrované FA/AA do 500 mL odměrné baňky s vodou, která byla následovně doplněna po rysku. MF s 0,1% obsahem NH<sub>4</sub>OH byla připravována přidáním 2 mL 25% NH<sub>3</sub> do 500 mL odměrné baňky s vodou, která byla následovně doplněna po rysku. Stejným způsobem byla připravena také organická složka MF 0,1% FA a 0,1% AA v ACN, tedy přidáním 0,5 mL koncentrované FA/AA do 500 mL odměrné baňky s ACN, která byla následně doplněna po rysku.



Octan amonný o pH 4, nebo 6 byl připraven přidáním 285,14  $\mu\text{L}$  AA do 500 mL vody v kádince, následně byl přidáván amoniak až do dosažení pH 4 a 6.

Octan amonný o pH 9 byl připraven opačně, přidáním 285,14  $\mu\text{L}$  amoniaku do 500 mL vody a pH bylo upraveno kyselinou octovou na hodnotu pH 9.

Mravenčan amonný o pH 3 byl připraven přidáním 188,65  $\mu\text{L}$  FA do 500 mL vody v kádince, následně byl přidáván amoniak až do dosažení pH 3.

#### 4.3.4 Pomocné kapaliny

Jako wash byl použit 100 % ACN. Jako purge byl použit 10 % ACN, připraven pomocí odměrného válce tak, že bylo smícháno 900 ml vody a 100 ml ACN. Oplachová kapalina pro těsnění pístů čerpadla byl 10 % MeOH. Připravena byla stejným způsobem jako slabá oplachová kapalina, avšak místo ACN byl použit MeOH.

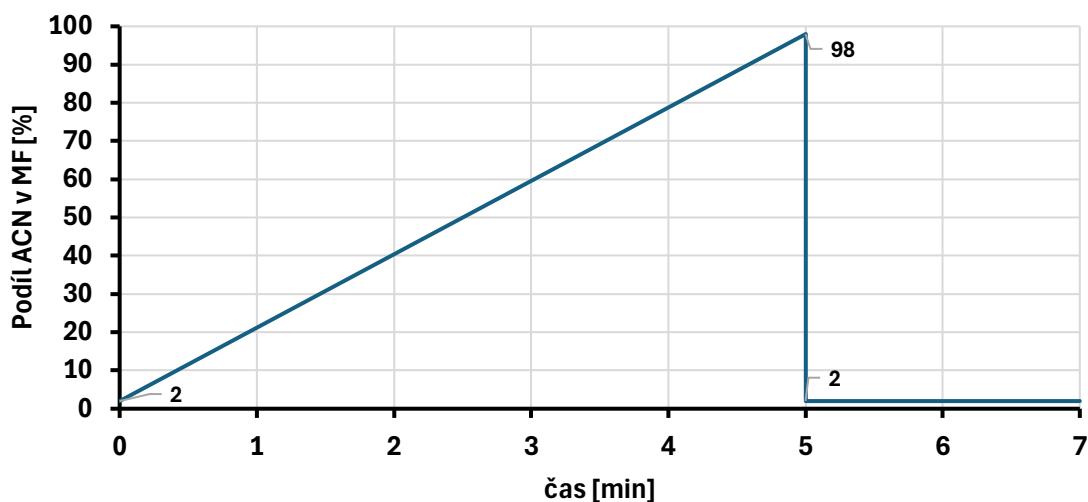
### 4.4 Vývoj RP-UHPLC-MS/MS metody

#### 4.4.1 Parametry výchozí metody v systémech s reverzemi fázemi

Výchozí podmínky analýzy jsou uvedeny v tab. 5.

**Tabulka 5: Výchozí podmínky pro vývoj metody na reverzních fázích**

Parametr		Nastavení parametru
kolona		ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 $\mu\text{m}$ )
mobilní fáze	složka A	0,1% FA
	složka B	ACN
průtoková rychlost		0,5 mL/min
doba analýzy		7 min
nastříkovaný objem vzorku		2 $\mu\text{L}$
teplota kolony		40 °C
teplota dávkovače vzorku		10 °C
purge		10 % ACN
wash		ACN
rozpuštědlo standardu		voda
Nastříkovaný objem vzorku		2 $\mu\text{L}$
typ eluce		gradientová, viz obrázek 6



Obrázek 6: Nastavení gradientové eluce v systému reverzních fází

#### 4.4.2 Optimalizace MS/MS metody

Optimalizace byla prováděna s využitím pracovních roztoků o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  g/mL. Měření bylo provedeno v pozitivním i negativním módu ESI. Byla zjištěna experimentální  $m/z$  prekurzorových iontů analytů.

Následně byl proveden sken produktových iontů, kdy byla hodnocena intenzita jednotlivých fragmentů analytů při hodnotách 10 eV, 20 eV a 30 eV.

Pro optimalizaci kolizní energie byly použity nejintenzivnější fragmenty, které byly vybrány z měření skenů produktových iontů v pozitivním a negativním módu. Optimalizace kolizní energie byla provedena v rozmezí od 5 eV do 35 eV v intervalech po 5 eV.

V tab 8 jsou uvedeny parametry s příslušným testovaným rozmezím pro optimalizaci nastavení iontového zdroje. Byly použity pracovní roztoky standardů o koncentraci  $1 \times 10^{-7}$  g/mL.

**Tabulka 8: Přehled parametrů optimalizace nastavení iontového zdroje a testovaný rozsah hodnot**

parametr	optimalizované rozmezí	
	pozitivní mód	negativní mód
napětí na kapiláře	0,5 – 3,5 kV	1-2,5 kV
napětí na vstupním kuželu	5–55 V	5–55 V
průtok plynu na vstupním kuželu	150–400 L/h	150–400 L/h
průtok desolvatačního plynu	500–1200 L/h	500–1200 L/h
desolvatační teplota	250–600 °C	250–600 °C

#### 4.4.3 Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze

Byly měřeny SRM jednotlivých neurotransmiterů za účelem získání retenčních časů. Měřeny byly pracovní roztoky standardů o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  mg/mL.

V rámci volby stacionární fáze v systému reverzních fází byly testovány čtyři kolony:

- ACQUITY BEH C18;
- ACQUITY UPLC CSH C18;
- Kinetex F5;
- ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18.

Jako výchozí vodná složka MF byla použita 0,1 % FA a jako organická složka MF ACN.

Na koloně ACQUITY UPLC CSH C18 byly testovány dvě MF, a to 0,1 % FA a 0,1 % NH<sub>4</sub>OH jako vodná složka MF a ACN jako organická složka MF.

#### 4.4.4 Kalibrační křivka

Analyzovány byly pracovní roztoky směsí neurotransmiterů s koncentracemi 0,1 až 500 ng/mL. Rostoky byly měřeny v triplikátu. Výsledky měření kalibračních křivek umožnilo stanovit dolní limit kvantifikace (LLOQ). Vzorky vybraných koncentrací poté sloužily k měření opakovatelnosti metody. Mezi analýzou roztoků o různých koncentracích byly vloženy dva blanky, aby se zabránilo případným přenosům mezi nástřiky.

#### 4.4.5 Opakovatelnost metody

Pro měření opakovatelnosti metody byly zvoleny roztoky o koncentraci 0,1; 1; 10 a 100 ng/mL. Tyto hladiny byly změřeny desetkrát. Z naměřených hodnot retenčních časů (RT),

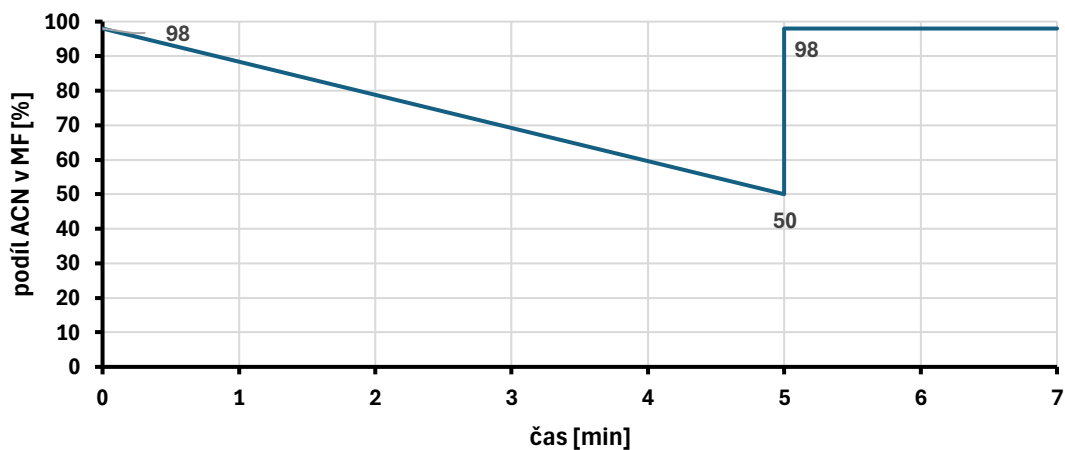
plochy píků, a asymetrie píků byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD). Vývoj HILIC-UHPLC-MS/MS metody

#### 4.4.6 Výchozí nastavení metody hydrofilní interakční chromatografie

Výchozí podmínky HILIC metody jsou uvedeny v tab. 9.

**Tabulka 9: Výchozí nastavení HILIC metody**

Parametr		Nastavení parametru
kolona		ACQUITY UPLC BEH HILIC (2,1 x 100 mm; 1,7 μm)
mobilní fáze	složka A	ACN
	složka B	0,1 % FA
průtoková rychlost		0,4 mL/min
doba analýzy		7 min
nastříkovaný objem vzorku		2 μL
teplota kolony		40 °C
teplota dávkovače vzorku		10 °C
purge		50 % ACN
wash		ACN
rozpuštědlo standardu		ACN
Nastříkovaný objem vzorku		2 μL
typ eluce		gradientová, viz obrázek 7



**Obrázek 7: Nastavení gradientové eluce v systému HILIC**

#### 4.4.7 Volba stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze v HILIC

Byl proveden screening šesti stacionárních fází. Jednalo se o kolony

- Synchronis HILIC;
- Atlantis Premier BEH Z HILIC;
- UPLC BEH HILIC;
- LUNA HILIC;
- CORTECS UPLC HILIC;
- ACQUITY UPLC BEH Amide.

U každé stacionární fáze byl proveden screening mobilní fáze dle tabulky 10.

**Tabulka 10: Přehled testovaných mobilních fází v systému HILIC**

kolona	mobilní fáze A	mobilní fáze B
Synchronis HILIC	10 mM octan amonný pH 4	ACN
	10 mM octan amonný pH 6	ACN
Atlantis Premier BEH Z HILIC	10 mM octan amonný pH 4	ACN
	10 mM octan amonný pH 6	ACN
	10 mM octan amonný pH 9	ACN
	10 mM mravenčan amonný pH 3	ACN
	0,1 % kyselina mravenčí	ACN
	0,1 % kyselina mravenčí	ACN + 0,1 % FA
	0,5 % kyselina mravenčí	ACN
	0,5 % kyselina mravenčí	ACN + 0,5 % FA
	0,1 % kyselina octová	ACN
	0,1 % kyselina octová	ACN + 0,1 % AA
	0,5 % kyselina octová	ACN
	0,5 % kyselina octová	ACN + 0,5 % AA
UPLC BEH HILIC	10 mM octan amonný pH 4	ACN
	10 mM octan amonný pH 6	ACN
	10 mM octan amonný pH 9	ACN
Luna HILIC	10 mM octan amonný pH 4	ACN
	10 mM octan amonný pH 6	ACN
CORTECS UPLC HILIC	10 mM octan amonný pH 4	ACN
	10 mM octan amonný pH 6	ACN
ACQUITY UPLC BEH Amide	10 mM octan amonný pH 4	ACN
	10 mM octan amonný pH 6	ACN
	10 mM octan amonný pH 9	ACN
	10 mM mravenčan amonný pH 3	ACN
	0,1 % kyselina mravenčí	ACN
	0,1 % kyselina mravenčí	ACN + 0,1 % FA

ACN – acetonitril, AA – kyselina octová, FA – kyselina mravenčí

#### 4.4.8 Kalibrační křivka

Analyzovány byly pracovní roztoky směsí neurotransmiterů s koncentracemi 0,1 až 500 ng/mL. Roztoky byly měřeny v triplikátu. Výsledky měření kalibračních křivek umožnilo stanovit dolní limit kvantifikace (LLOQ). Vzorky vybraných koncentrací poté sloužily k měření opakovatelnosti metody. Mezi analýzou roztoků o různých koncentracích byly vloženy dva blanky, aby se zabránilo případným přenosům mezi nástřiky.

#### 4.4.9 Opakovatelnost metody

Pro měření opakovatelnosti metody byly zvoleny roztoky o koncentraci 10; 25; 100 a 250 ng/mL. Tyto vzorky byly změřeny desetkrát. Z naměřených hodnot retenčních časů (RT), plochy píků, a asymetrie píků byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD).

### 4.5 Studie krátkodobé stability vybraných neurotransmiterů

Byla provedena studie krátkodobé stability zaměřená na analyty DA, 5-HT a 5-HIAA, protože se jedná o analyty citlivé na světlo, teplotu a pH. Provedení stabilitní studie bylo nezbytné k ověření stability po dobu 24 hod., což je klíčové pro dosažení validních a reprodukovatelných výsledků.

Stabilita byla měřena v systému RP po dobu 24 hod za podmínek uvedených v tab. 11. Pro detekci byl použit detektor s diodovým polem (PDA) nastavený na detekci 280 nm.

**Tabulka 11: Podmínky pro studii krátkodobé stability vybraných neurotransmiterů**

Parametr		Nastavení parametru
kolona		ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm)
mobilní fáze	složka A	0,1% FA
	složka B	ACN
průtoková rychlost		0,5 mL/min
doba analýzy		7 min
nastříkovaný objem vzorku		2 μL
teplota kolony		40 °C
teplota dávkovače vzorku		10 °C
purge		10 % ACN
wash		ACN
rozpuštědlo standardu		voda
Nastříkovaný objem vzorku		2 μL
typ eluce		gradientová, viz obrázek 6

Stabilita byla měřena po dobu 24 hodin. Byly testovány tři různá rozpouštědla a to voda, 0,1% FA a 0,1% AA. Pracovní roztoky byly připraveny bezprostředně před vlastní analýzou. V autosampleru byly temperovány přibližně 4 minuty na nastavenou teplotu. V hodinových intervalech byly duplicitně měřeny jednotlivé analyty. Vyhodnoceny byly plochy píků a jejich změna v čase.

Na základě získaných dat bylo zvoleno rozpouštědlo, ve kterém byly analyty stabilní co nejdelší dobu. Ve zvoleném rozpouštědle byla ověřena stabilita 3-MT, DOPAC a HVA. Analyty GABA a GLUT nebyly ověřovány, jelikož je vzhledem k jejich struktuře není možné pozorovat na detektoru s diodovým polem. Analyty 2-AG, AEA nebyly testovány z důvodu jejich vysoké ceny.

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1 Vývoj RP-UHPLC-MS/MS metody

#### 5.1.1 Optimalizace nastavení SRM

Optimalizace byla provedena v pozitivním i negativním módu. Výchozí podmínky chromatografické metody jsou uvedeny v kapitole 4.4.1.

Experimentální hodnoty  $[M+H]^+$  /  $[M-H]^-$  každého analytu byly získány pomocí MS skenů. HVA a DOPAC neionizovaly v pozitivním módu, což je dáno jejich kyselou povahou. Tyto látky mají tendenci chovat se jako donory  $H^+$  a tvořit deprotonované molekuly. 3-MT, 2-AG a 5-HT neionizovaly v negativním módu. 3-MT je amfoterní látka, která se může chovat jako kyselina nebo báze v závislosti na použité mobilní fázi. V tomto případě byla jako vodná složka mobilní fáze použita 0,1% FA, což vede k tomu, že se 3-MT chová jako báze a ionizuje v pozitivním módu. 2-AG má neutrální povahu, která v kyselém prostředí, kde je nadbytek  $H^+$ , přijímá protony a ionizuje v pozitivním módu. 5-HT má díky aminové skupině bazickou povahu a tendenci k protonaci. Experimentální molekulové hmotnosti protonovaných a deprotonovaných molekul získané z měření MS skenů v  $ESI^+$  a  $ESI^-$  jsou uvedeny v tab. 12. Znalost experimentální molekulové hmotnosti  $[M+H]^+$  a  $[M-H]^-$  umožňuje jednoznačnou identifikaci analytů ve vzorku.

**Tabulka 12: výsledky měření MS skenů**

analyt	správná molekulová hmotnost	teoretická $[M+H]^+$	experimentální $[M+H]^+$	teoretická $[M-H]^-$	experimentální $[M-H]^-$
DA	153,0790	154,0863	154,01	152,0717	151,98
HVA	182,0579	183,0652	N	181,0652	180,97
3-MT	167,0946	168,1019	168,04	166,0874	N
DOPAC	168,0423	169,0495	N	167,0350	166,92
AEA	347,2824	348,2897	348,21	346,2752	346,19
2-AG	378,2770	379,2843	379,21	377,2697	N
GABA	103,0633	104,0706	104,00	102,0561	102,01
GLUT	147,0532	148,0604	147,98	146,0459	145,95
5-HIAA	191,0582	192,0655	191,99	190,0510	189,97
5-HT	176,0950	177,1022	177,04	175,0877	N

*$[M+H]^+$  - protonovaná molekula analytu,  $[M-H]^-$  - deprotonovaná molekula analytu, N – neionizuje*

Následně byly získány fragmenty z měření MS/MS skenů. Byly vybrány 3 nejintenzivnější fragmenty od každého analytu. Tyto fragmenty jsou uvedeny v tab. 13 a byly použity

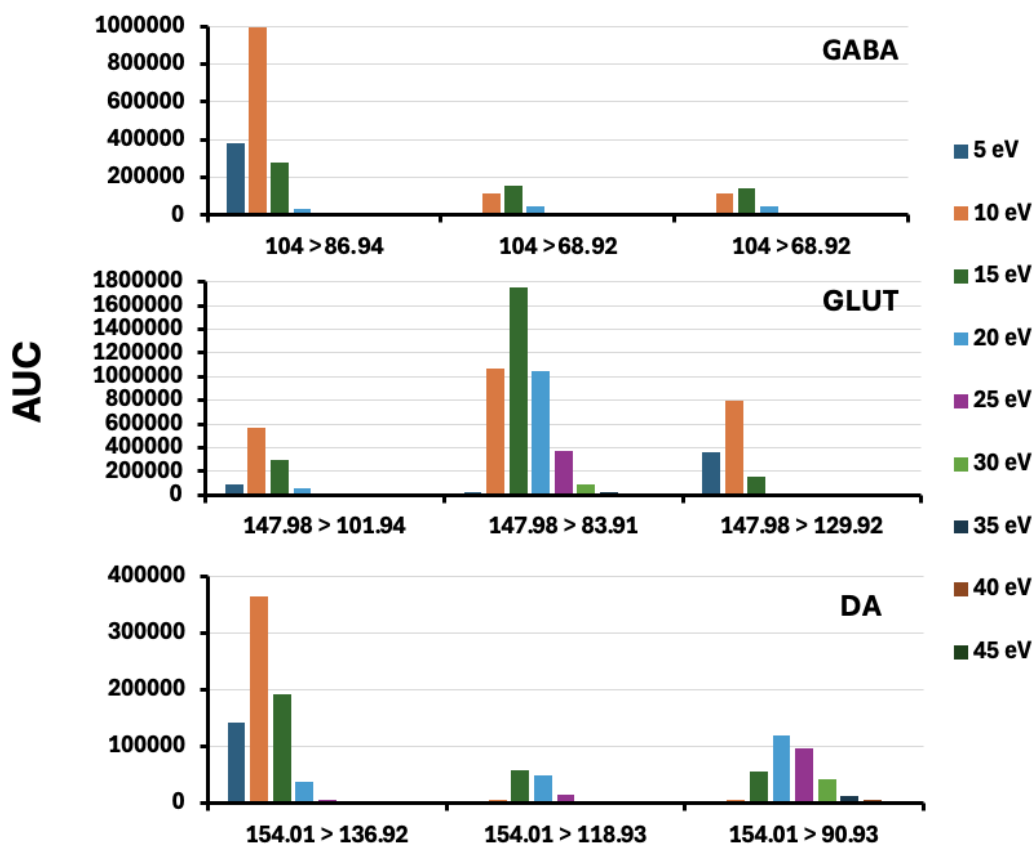


k optimalizaci kolizní energie. Cílem optimalizace kolizní energie bylo najít podmínky, při kterých budou analyty poskytovat nejvyšší odezvu detektoru. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 8 až 11. Nejintenzivnější fragment s příslušnou kolizní energií od každého analytu jak v pozitivním, tak negativním módu byl dále použit k optimalizaci nastavení iontového zdroje.

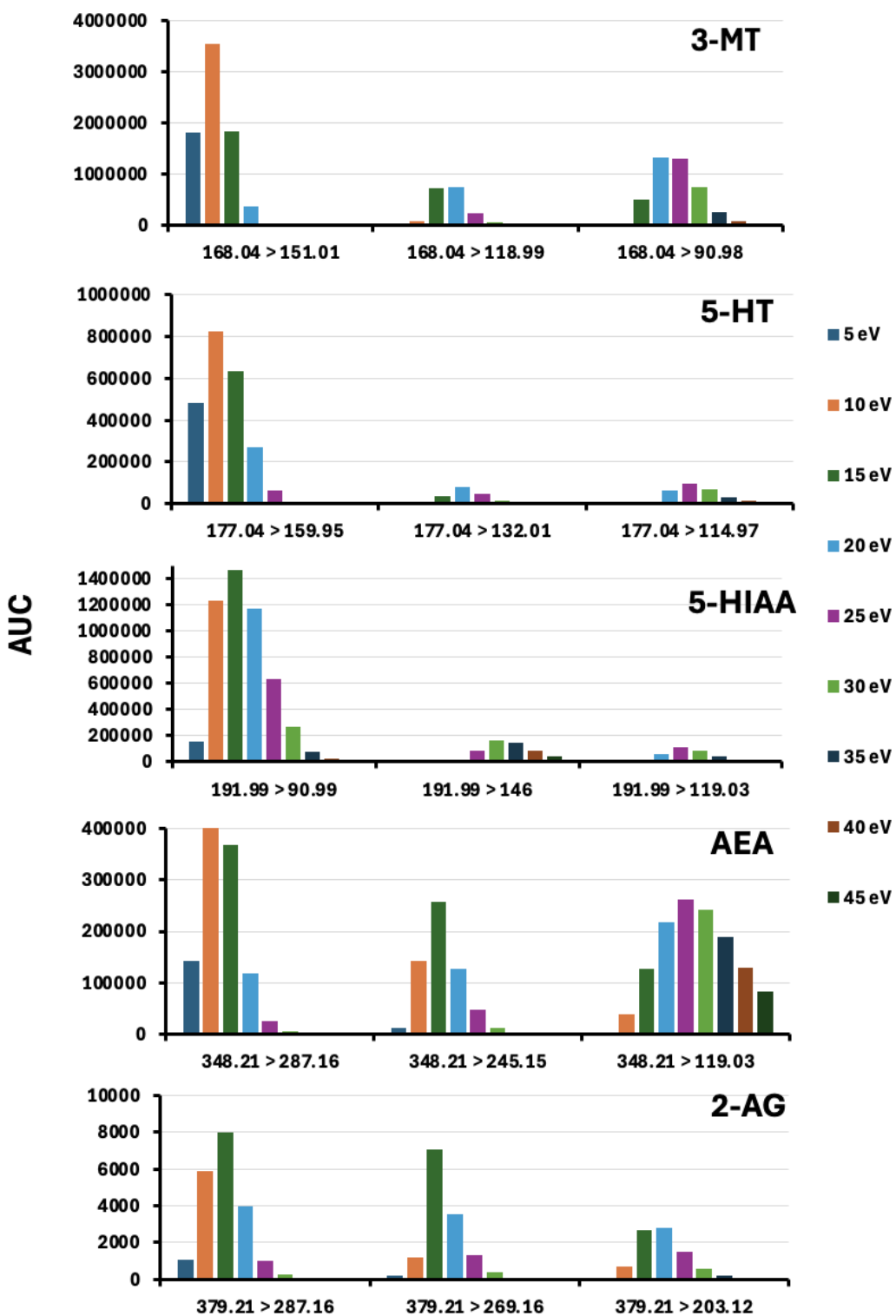
**Tabulka 13: Nejintenzivnější fragmenty skenu produktových iontů**

analyt	ESI <sup>+</sup>			ESI <sup>-</sup>		
	f1	f2	f3	f1	f2	f3
DA	137,06	118,97	90,96	121,93	93,02	134,93
HVA	N	N	N	137,04	121,94	104,92
3-MT	151,15	91,01	119,02	N	N	N
DOPAC	N	N	N	123,05	95,05	106,17
AEA	287,32	245,15	119,03	259,13	101,95	99,91
2-AG	287,32	269,09	361,23	N	N	N
GABA	87,07	68,04	86,00	84,13	62,17	70,65
GLUT	84,03	129,93	101,98	101,94	128,00	73,88
5-HIAA	146,13	118,50	90,95	146,07	143,91	130,91
5-HT	160,09	114,95	132,03	N	N	N

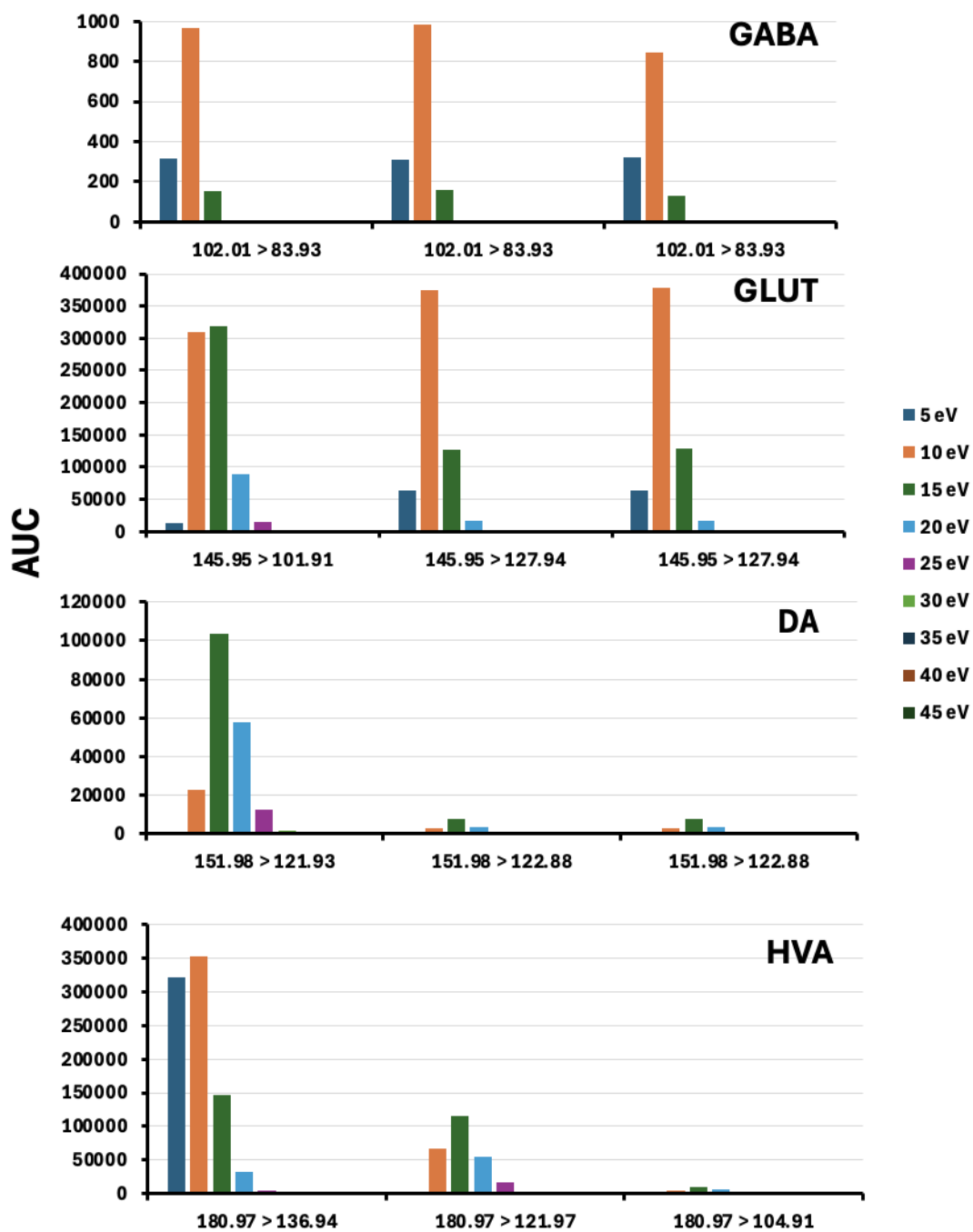
*f* - fragment, *N* - neionizuje



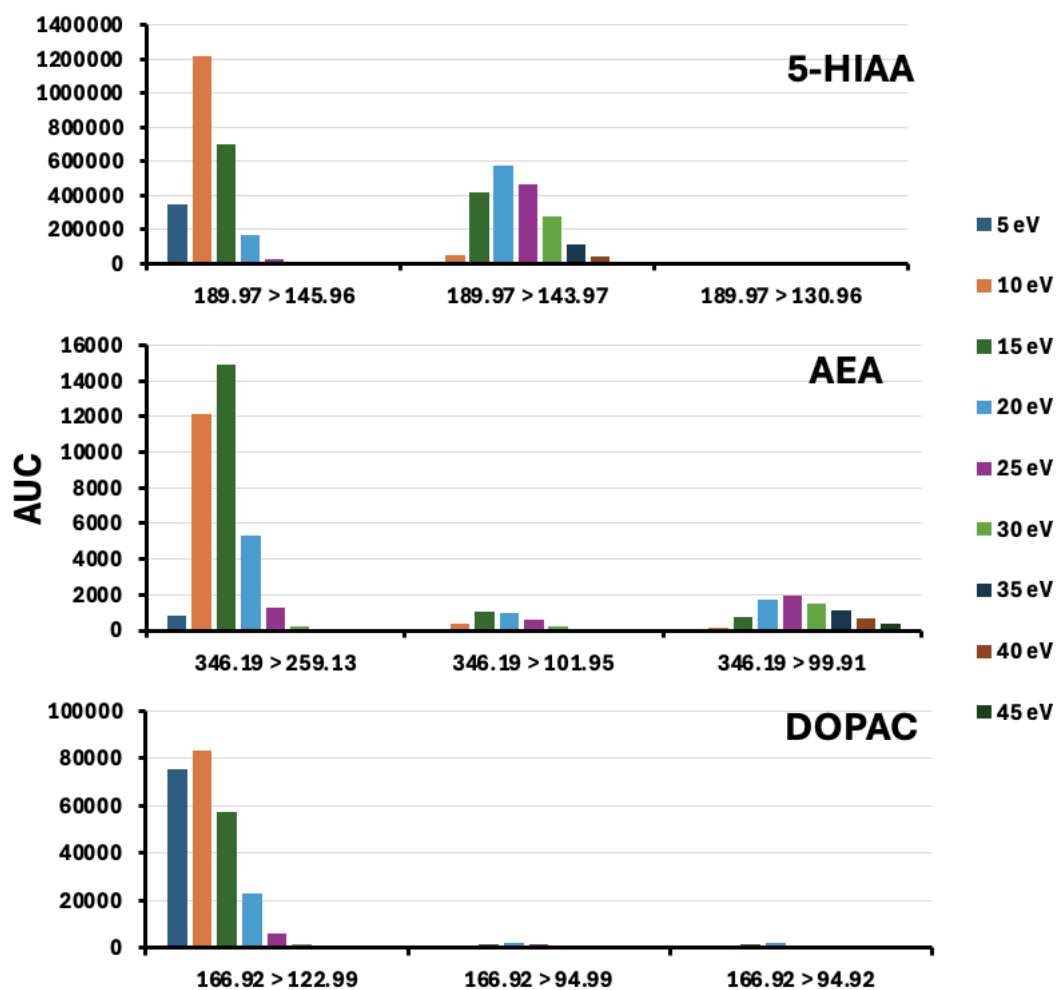
**Obrázek 8: Výsledky optimalizace kolizní energie pro GABA, GLUT, DA v ESI<sup>+</sup>**



Obrázek 9: Výsledky optimalizace kolizní energie pro 3-MT, 5-HT, 5-HIAA, AEA a 2-AG v ESI<sup>+</sup>



Obrázek 10: Výsledky optimalizace kolizní energie pro GABA, GLUT, DA, HVA v ESI



Obrázek 11: Výsledky optimalizace kolizní energie pro 5-HIAA, AEA, DOPAC v ESI<sup>-</sup>

Souhrn výsledných SRM přechodů v ESI<sup>+</sup> a ESI<sup>-</sup> s příslušnou kolizní energií je uveden v tab. 14.

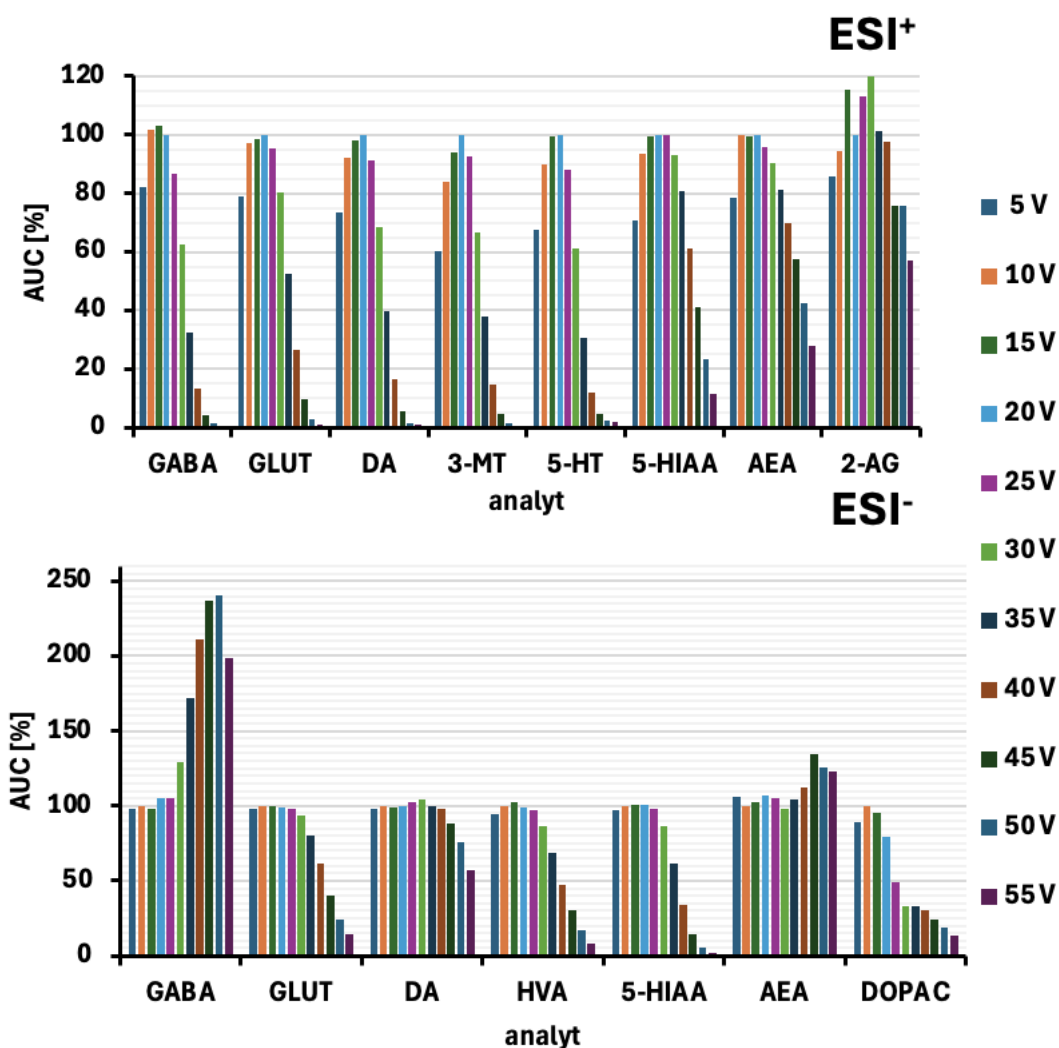
Tabulka 14: Souhrn výsledných SRM přechodů v ESI<sup>+</sup> a ESI<sup>-</sup> s příslušnou kolizní energií

analyt	ESI <sup>+</sup>		ESI <sup>-</sup>	
	SRM	CE [eV]	SRM	CE [eV]
DA	154,15 > 137,06	10	151,98 > 121,93	15
HVA	N	N	181,07 > 137,04	10
3-MT	168,17 > 151,15	10	N	N
DOPAC	N	N	167,04 > 123,05	10
AEA	348,34 > 287,32	10	346,19 > 259,13	15
2-AG	379,31 > 287,32	15	N	N
GABA	104,23 > 87,07	10	102,01 > 84,13	10
GLUT	148,11 > 84,03	10	146,17 > 128,00	10
5-HIAA	192,14 > 146,13	15	190,08 > 146,07	10
5-HT	177,16 > 160,09	10	N	N

## Optimalizace parametrů nastavení iontového zdroje

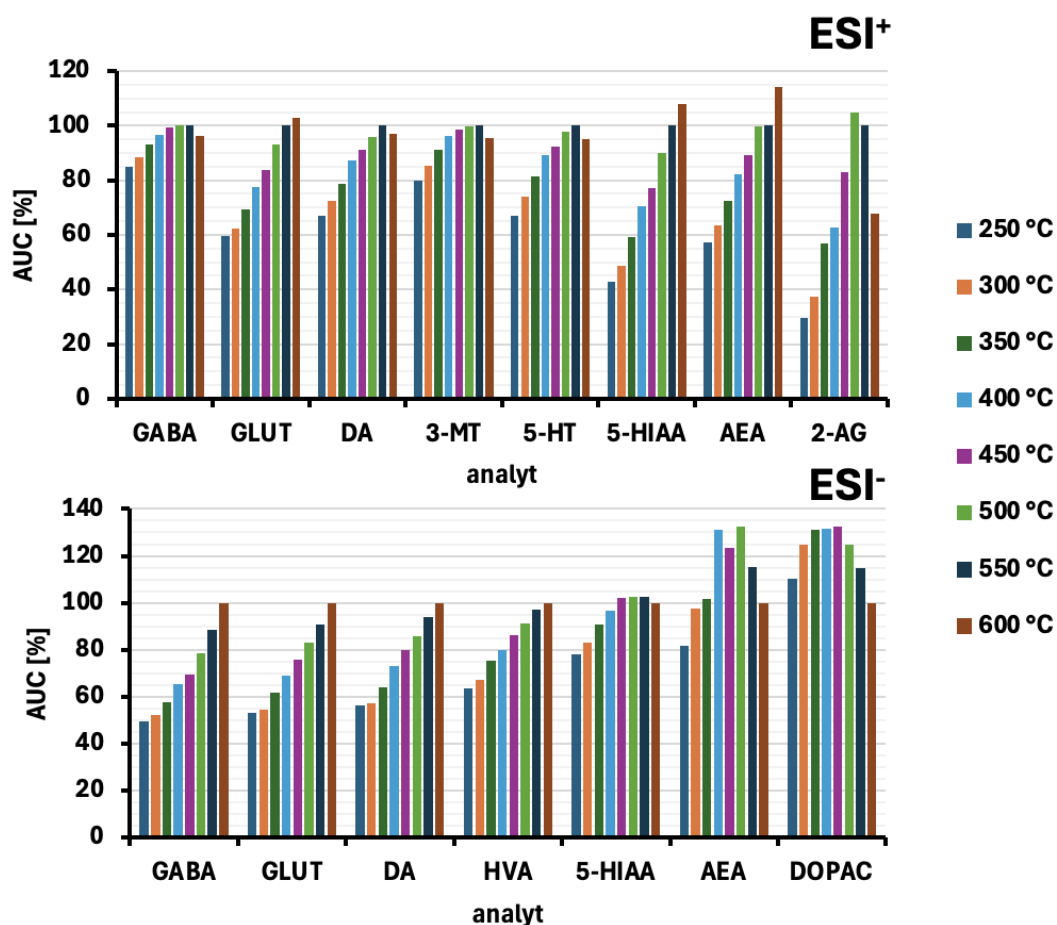
Byla provedena optimalizace nastavení parametrů iontového zdroje. Cílem optimalizace bylo nastavit parametry iontového zdroje pro maximální odezvu a citlivost sledovaných analytů. Optimalizaci parametrů nastavení iontového zdroje byly provedeny v konkrétním rozsahu dle tab. 8 v kapitole 4.4.2. Parametry byly hodnoceny v pozitivním i negativním módu. Pro přehlednější hodnocení je na obrázku znázorněna relativní plocha píků.

Optimalizace napětí na vstupním kuželu je znázorněna na obr. 12. Jako 100 % v ESI<sup>+</sup> byla zvolena hodnota 20 V. V ESI<sup>+</sup> je u všech analytů pozorován podobný trend, kdy odezva nejdříve stoupá a poté s rostoucím napětím klesá. Jako 100 % v ESI<sup>-</sup> byla zvolena hodnota 10 V. V ESI<sup>-</sup> analyty vykazují velmi odlišné trendy. GABA a AEA s rostoucím napětím stoupá, zatímco GLUT, DA, HVA, 5-HIAA a DOPAC klesá. Napětí na vstupním kuželu bylo nastaveno pro každý analyt individuálně. V pozitivním módu bylo nastaveno pro GLUT, DA, 3-MT, 5-HT, 5-HIAA a AEA 20 V, pro GABA 15 V a pro 2-AG 30 V. V negativním módu bylo nastaveno pro GABA 50 V, DA 30 V, 5-HIAA 20 V, HVA 15 V a pro GLUT a DOPAC 10 V.



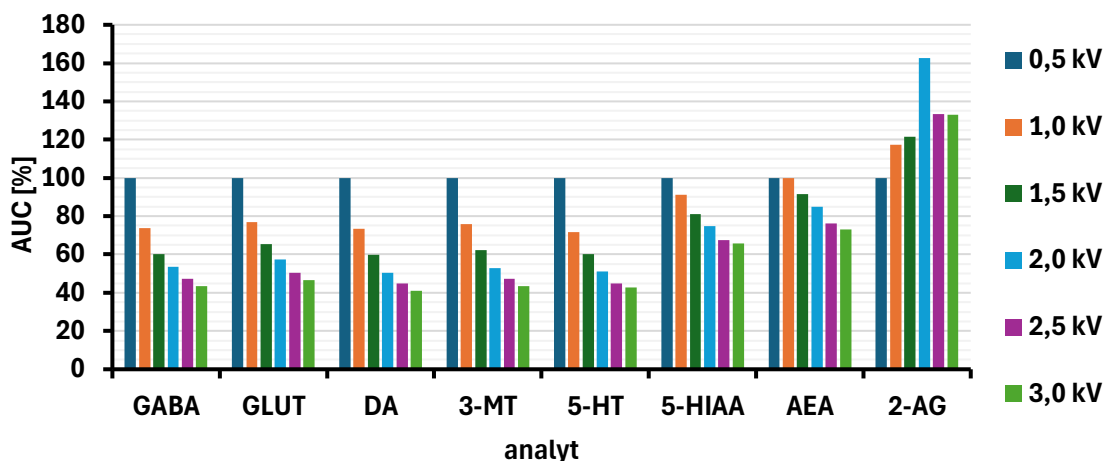
**Obrázek 12: Výsledky optimalizace napětí na vstupním kuželu**

Obr. 13 znázorňuje výsledky optimalizace desolvatační teploty. Jako 100 % v ESI<sup>+</sup> byla zvolena hodnota 550 °C a v ESI<sup>-</sup> 600 °C. U všech analytů je pozorována s rostoucí teplotou rostoucí odezva, přičemž analyty DA, 3-MT, 5-HT a 2-AG v ESI<sup>+</sup> a AEA a DOPAC v ESI<sup>-</sup> vykazují u teploty 500 °C pokles. Teplota 550 °C byla zvolena jako optimální pro oba módy, jelikož poskytovala velmi dobrou odezvu a zároveň nevede k výraznému snížení intenzity odezvy pro žádný z analytů.

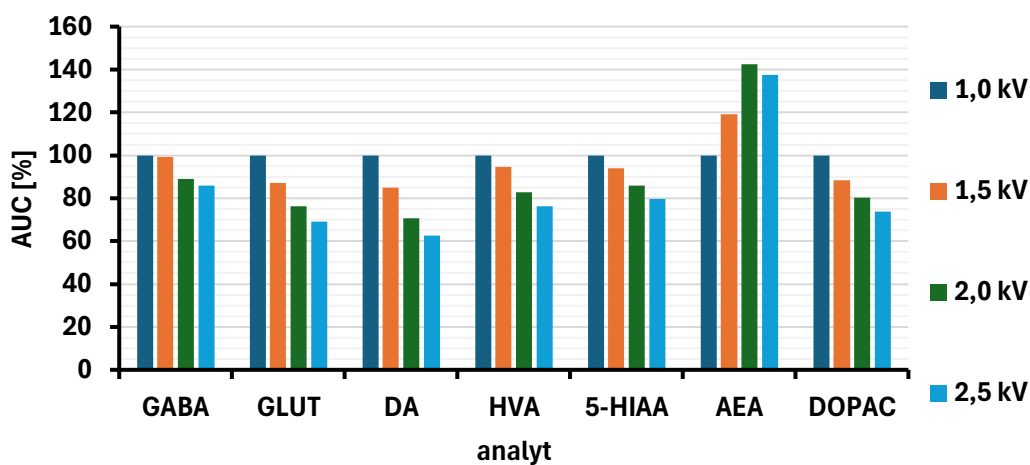


Obrázek 13: Výsledky optimalizace desolvatační teploty

Obrázek 14 znázorňuje výsledky optimalizace napětí na kapiláře v ESI<sup>+</sup>. Jako 100 % byla zvolena hodnota 0,5 kV. U všech analytů mimo 2-AG je pozorován s rostoucím napětím pokles odezvy. 2-AG naopak vykazuje růst a skok při 2 kV. Je třeba zohlednit 2-AG, jelikož ionizuje pouze v ESI<sup>+</sup>. Proto bylo zvoleno jako optimální napětí na kapiláře 1,5 kV. Výsledky optimalizace napětí na kapiláře v ESI<sup>-</sup> je zobrazeno na obr. 15. Zde byla jako 100 % zvolena hodnota 1 kV. Všechny analyty mimo AEA vykazují s rostoucím napětím klesající trend. Jako optimální zde byla zvolena hodnota 1,5 kV, která znamená vyšší odezvu pro AEA, avšak pro ostatní analyty neznamená výrazný pokles odezvy.



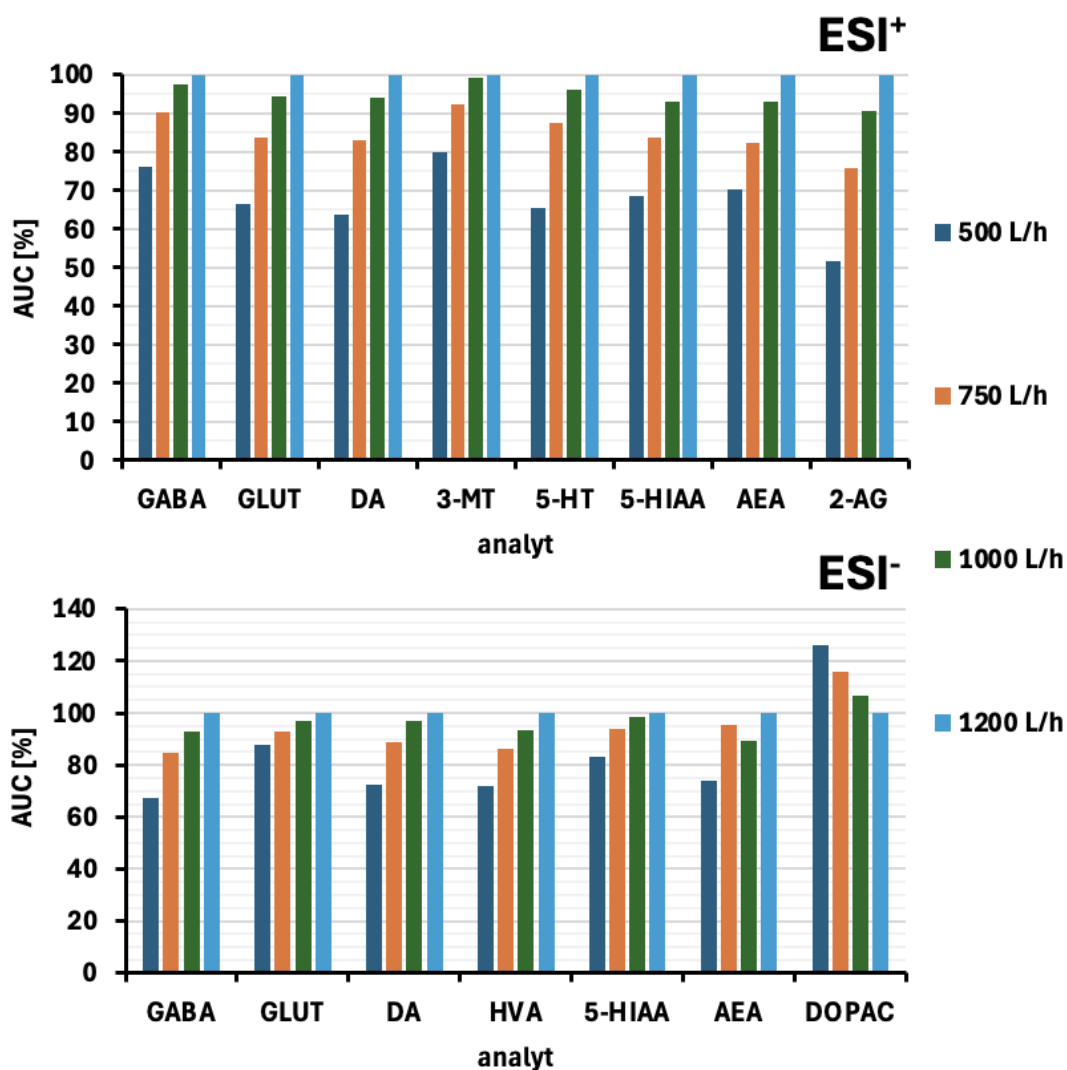
Obrázek 14: Výsledky optimalizace napětí na kapiláře v ESI<sup>+</sup>



Obrázek 15: Výsledky optimalizace napětí na kapiláře v ESI<sup>-</sup>

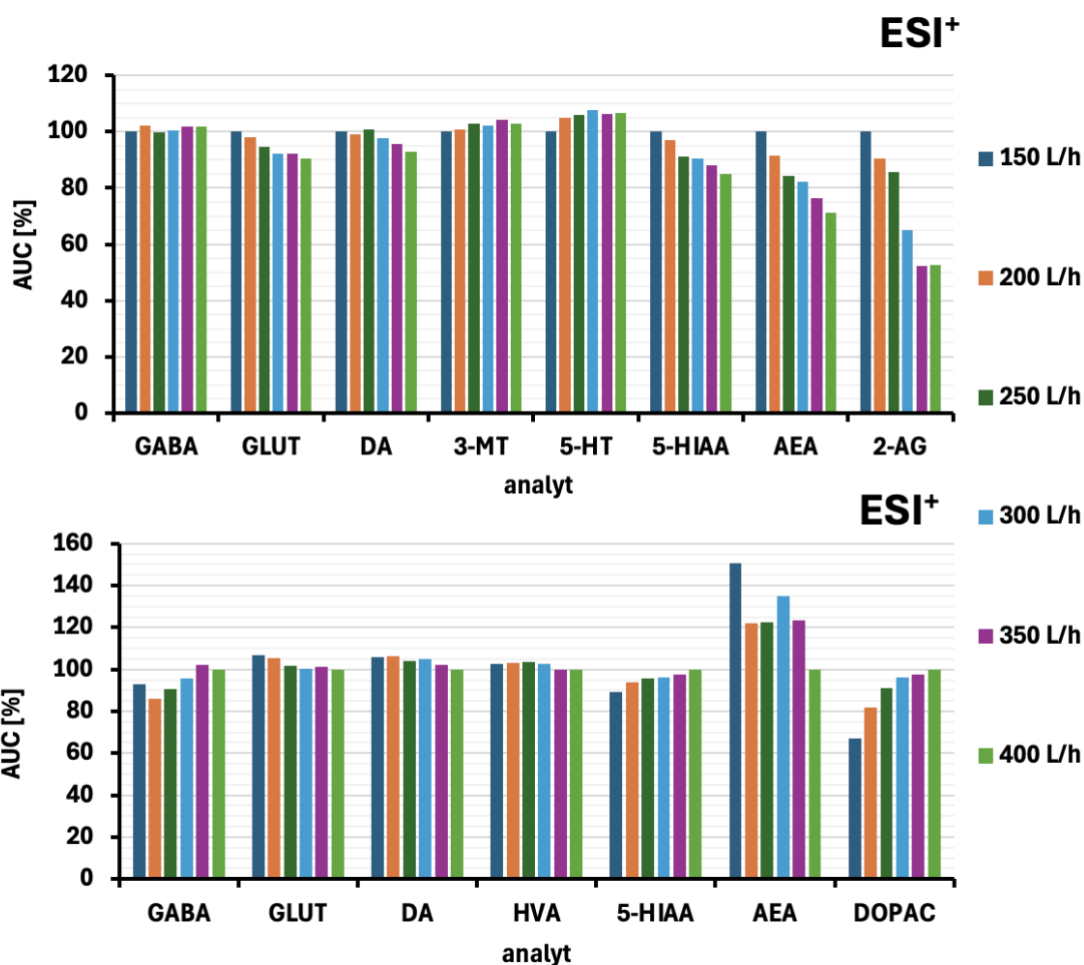
Výsledky optimalizace průtoku desolvatačního plynu jsou znázorněny na obr. 16. Jako 100 % byla zvolena hodnota 1200 L/h v obou módech. U všech analytů v pozitivním i negativním módu je pozorováno s rostoucím průtokem rostoucí odezvu mimo DOPAC v ESI<sup>-</sup>. Výsledný průtok byl nastaven 1200 L/h.





Obrázek 16: Výsledky optimalizace průtoku desolvatačního plynu

Obrázek 17 zobrazuje výsledky optimalizace průtoku plynu na vstupním kuželu. Jako 100 % byla v ESI<sup>+</sup> zvolena hodnota 150 L/h a v ESI<sup>-</sup> 400 L/h. V pozitivním módu vykazovaly AEA, 2-AG a 5-HIAA s rostoucím průtokem výraznější pokles, proto byla jako optimální hodnota zvolena 150 L/h. V negativním módu měl DOPAC rostoucí trend a AEA klesající. Hodnota průtoku plynu na vstupním kuželu byla zvolena 200 L/h.



Obrázek 17: Výsledky optimalizace průtoku plynu na vstupním kuželu

Souhrn výsledných parametrů nastavení iontového zdroje je uveden v tab. 14.

Tabulka 15: Výsledná optimalizace parametrů iontového zdroje

parametr	pozitivní mód	negativní mód
napětí na kapiláře	1,5 kV	1,5 kV
napětí na vstupním kuželu	Individuální pro každý analyt	
průtok plynu na vstupním kuželu	150 L/h	200 L/h
průtok desolvatačního plynu	1200 L/h	1200 L/h
desolvatační teplota	550 °C	550 °C

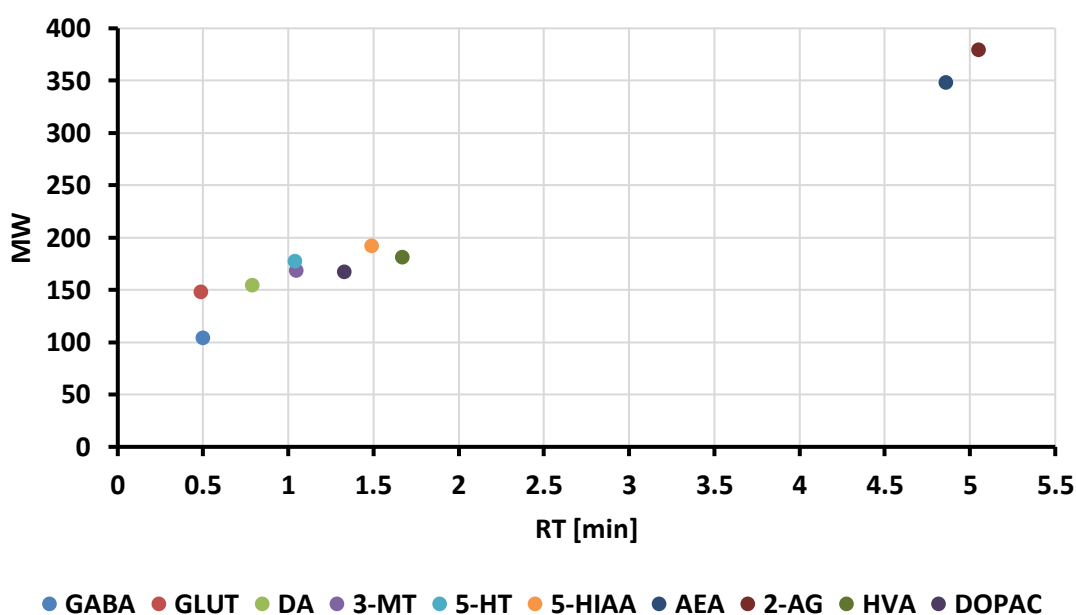
### 5.1.2 Výsledky volby stacionární fáze

Byl proveden screening čtyř stacionárních fází dle tab. 1 kapitola 3.1.1. Kolony se lišily materiálem (silikagel, BEH, CSH) a navázaným ligandem. Z naměřených retenčních časů získaných z MS skenů byly vytvořeny bodové grafy závislosti molekulové hmotnosti na čase retence, podle kterých byla vyhodnocena selektivita separace jednotlivých

kolon. Vzhledem k blízkým hodnotám molekulových hmotností byla primárně sledována separace analytického páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92).

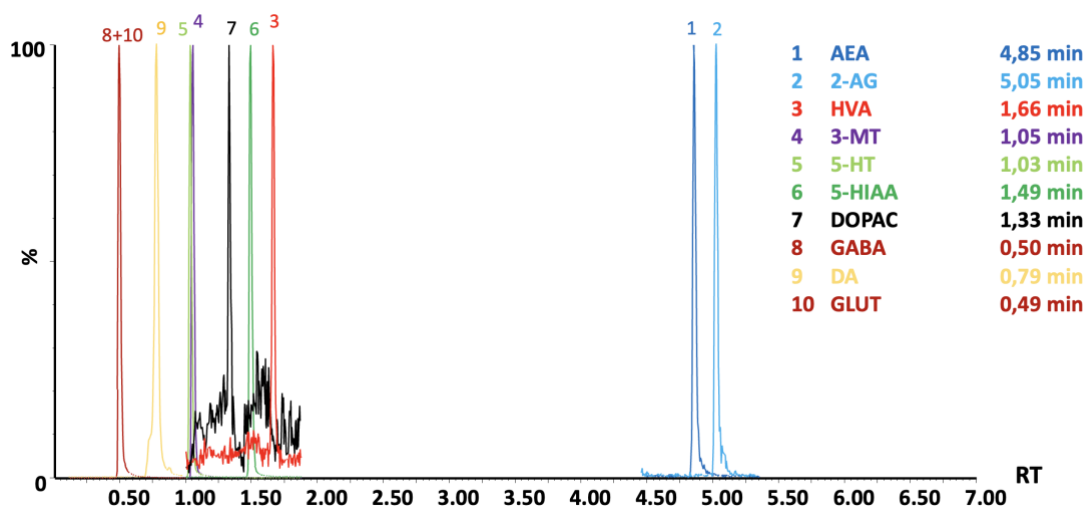
### Výsledky separace na koloně ACQUITY UPLC BEH C18

Kolona C18 je nejčastěji používanou kolonou v rešerši a představuje kolonu první volby pro RP. Většina analyzovaných látek obsahuje hydrofobní části, jako je benzenové jádro, nebo dlouhý alifatický řetězec, například endokanabinoidy. Tyto látky interagují s nepolárními C18 řetězci prostřednictvím hydrofobních (van der Waalsových) interakcí. Naopak, analyty jako GABA a GLUT, které postrádají hydrofobní struktury, s touto stacionární fází neinteragují a eluují se dle očekávání v mrtvém čase. Byla použita 0,1% FA jako vodná složka a ACN jako organická složka MF. Výsledek separace je uveden na obr. 18. Dle očekávání došlo k eluci všech analyzovaných látek. V případě analytických párů GABA/GLUT (104,00/147,98), stejně jako 3-MT/5-HT (168,04/177,04) nedocházelo k separaci. Jelikož mají odlišnou  $m/z$  Je možné je hmotnostní detekcí jednoznačně identifikovat. K separaci kritického páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) docházelo. Analyty GABA a GLUT se eluují v mrtvém čase, což znamená, že nejsou na koloně dostatečně zadržovány. To je způsobeno jejich vysokou polaritou a nízkou molekulovou hmotností.



Obrázek 18: Závislost MW na retenčním čase na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 při použití 0,1% FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF

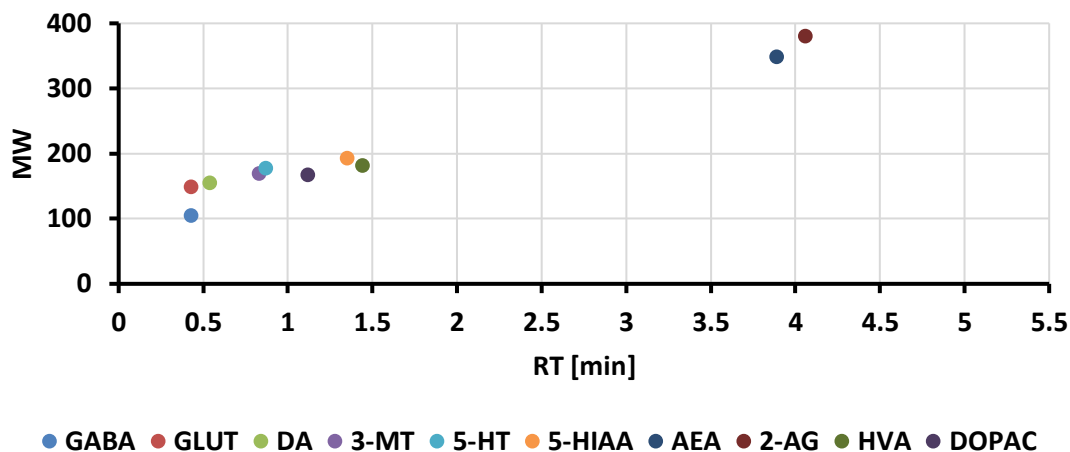
Na obr. 19 je zobrazen chromatogram s příslušnými retenčními časy znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 při použití 0,1% FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Píky všech analytů jsou úzké a symetrické, ovšem u DOPAC a HVA je pozorován výraznější šum.



**Obrázek 19: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 při použití 0,1% FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

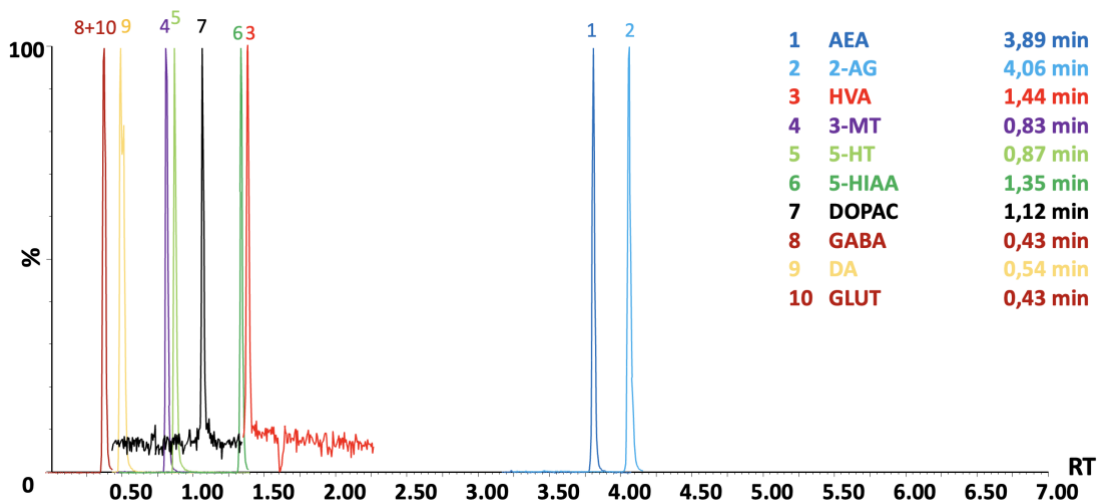
### Výsledky separace na koloně Kinetex F5

Pentafluorofenylová skupina na koloně Kinetex F5 zvyšuje retenci aromatických sloučenin silným  $\pi$ - $\pi$  interakcím s elektronově bohatými benzenovými jádry. Většina analytů obsahuje benzenové jádro, a proto se očekává jejich retence a separace. Naproti tomu GABA a glutamát, které postrádají hydrofobní části, nejsou zadržovány stacionární fází a jsou eluovány v mrtvém čase, stejně jako na koloně ACQUITY UPLC BEH C18. Byla použita 0,1% FA jako vodná složka a ACN jako organická složka MF. Výsledek separace je uveden na obr. 20. Dle očekávání došlo k eluci všech analyzovaných látek. Stejně jako na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 nedocházelo v případě páru GABA/GLUT (104,00/147,98) k separaci a eluovaly se v mrtvém čase. K separaci kritického páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) docházelo.



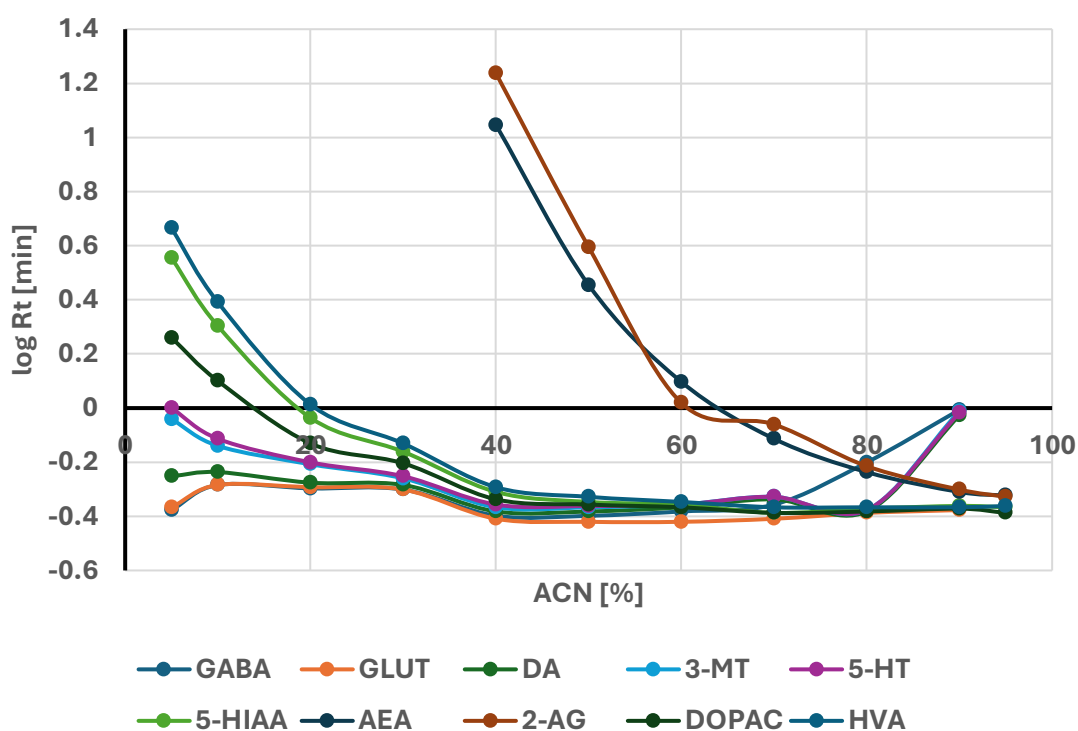
**Obrázek 20: Závislost MW na retenčním čase na koloně Kinetex F5 při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

Na obr. 21 je zobrazen chromatogram s příslušnými retenčními časy znázorňující separaci analytů na koloně Kinetex F5 při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Píky všech analytů jsou úzké a symetrické, a podobně jako na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 u DOPAC a HVA je pozorován výraznější šum.



**Obrázek 21: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně Kinetex F5 při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

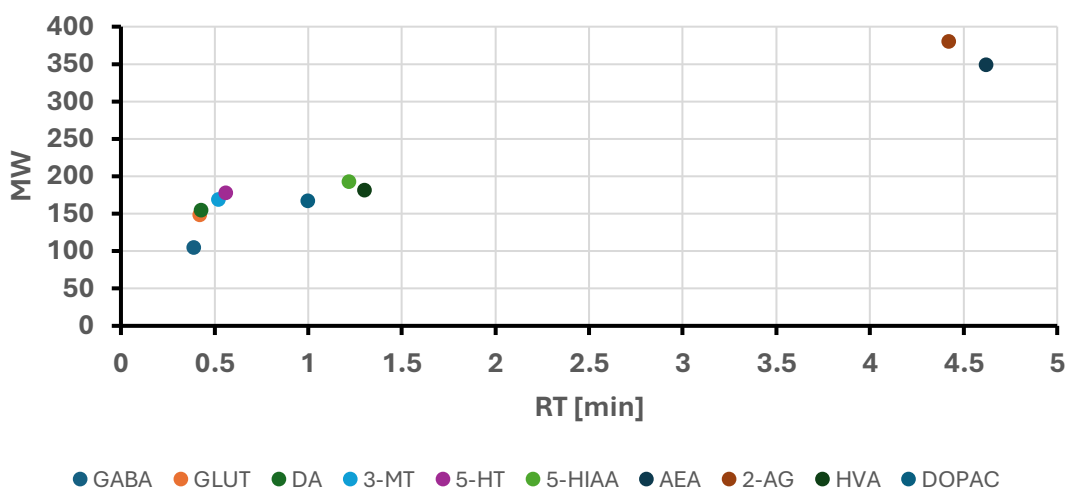
Na této koloně byl také testován vliv procentuálního podílu organické složky MF na logaritmus retenčního času. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 22. Pokud mají analyty velmi podobné tvary křivek, naznačuje to jejich obtížnou separaci. Pro většinu analytů je možné pozorovat s rostoucím podílem ACN v MF klesající retenční čas. U analytu GLUT je nejdříve pozorován mírný nárůst a poté pokles. Pro GABA je podobně jako GLUT pozorován nejdříve nárůst a poté pokles retenčního času, ovšem od 70 % ACN je opět pozorován růst. 3-MT a 5-HT je pozorován pokles a od 80 % výrazný růst retenčního času. Z grafu je patrné, že analyty GABA/GLUT a 3-MT/5-HT budou mít podobné retenční časy. Výsledky korelují s chromatografem na obr. 21.



Obrázek 22: Vliv podílu organické složky MF na logaritmus retenčního času jednotlivých analytů

## Výsledky separace na koloně ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18

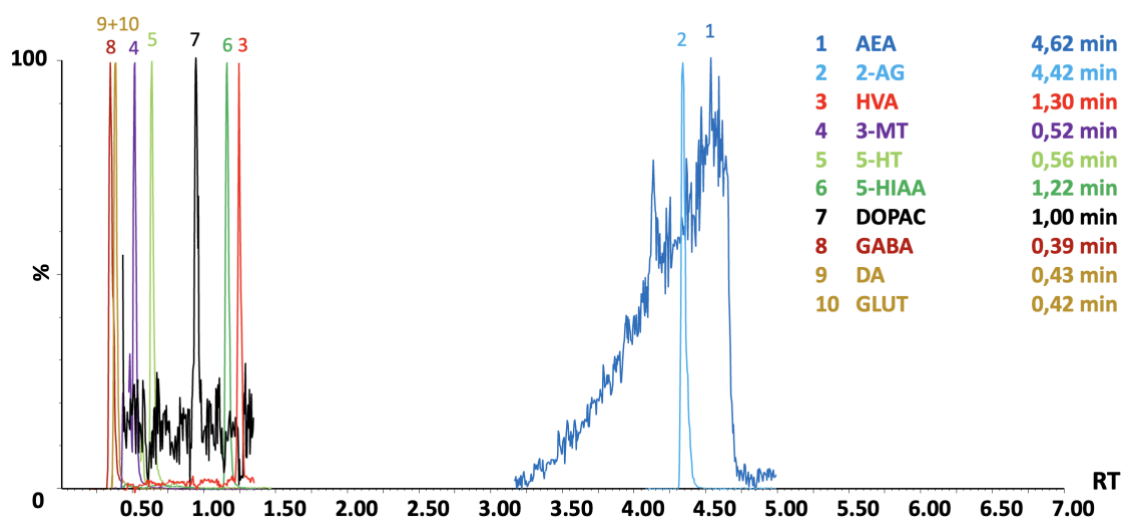
Kolona ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18 kombinuje klasickou C18 stacionární fází s karbamátovou skupinou, a to tím způsobem, že na stacionární fází je nejprve navázaná karbamátová skupina. Tato skupina působí jako polární ochranná vrstva, která minimalizuje nespecifické interakce s volnými silanoly silikagelu. Na karbamátovou skupinu je poté připojen C18 řetězec, který umožňuje specifické hydrofobní (van der Waalsovy) interakce s analyty. Byla použita 0,1% FA jako vodná složka a ACN jako organická složka MF. Výsledek separace je uveden na obr. 23. Došlo k eluci všech analyzovaných látek. Nedošlo k separaci páru DA/GLUT (154,01/147,98), které dokáže hmotnostní detekce identifikovat na základě jejich  $m/z$ . Na této koloně je v mrtvém čase pouze GABA, ovšem DA a GLUT jsou mrtvému času velmi blízko.



**Obrázek 23: Závislost MW na retenčním čase na koloně ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18 při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

Na obr. 24 je zobrazen chromatogram s příslušnými retenčními časy znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18 při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Píky všech analytů jsou úzké a symetrické, mimo AEA. U AEA bylo pozorováno výrazné frontování a rozmývání píku, což znemožnilo určit jeho retenční čas. To může být způsobeno specifickými interakcemi mezi AEA a stacionární fází kolony, která kombinuje hydrofobní vlastnosti C18 s hydrofilní karbamátovou vrstvou. Tyto kombinované vlastnosti stacionární fáze mohly vést k nerovnoměrné retenci AEA, což způsobuje deformaci píku a jeho frontování. U DOPAC

je pozorován výraznější šum. Oproti koloně ACQUITY UPLC BEH C18 je pozorován menší šum u analytu HVA.



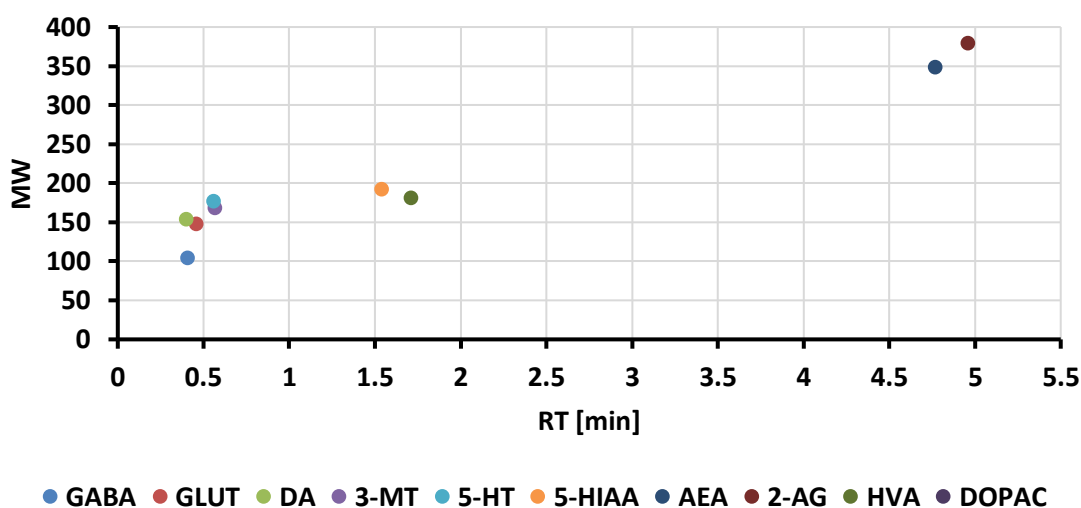
Obrázek 24: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC BEH Shield RP C18 při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF

### Výsledky separace na koloně ACQUITY UPLC BEH CSH RP C18

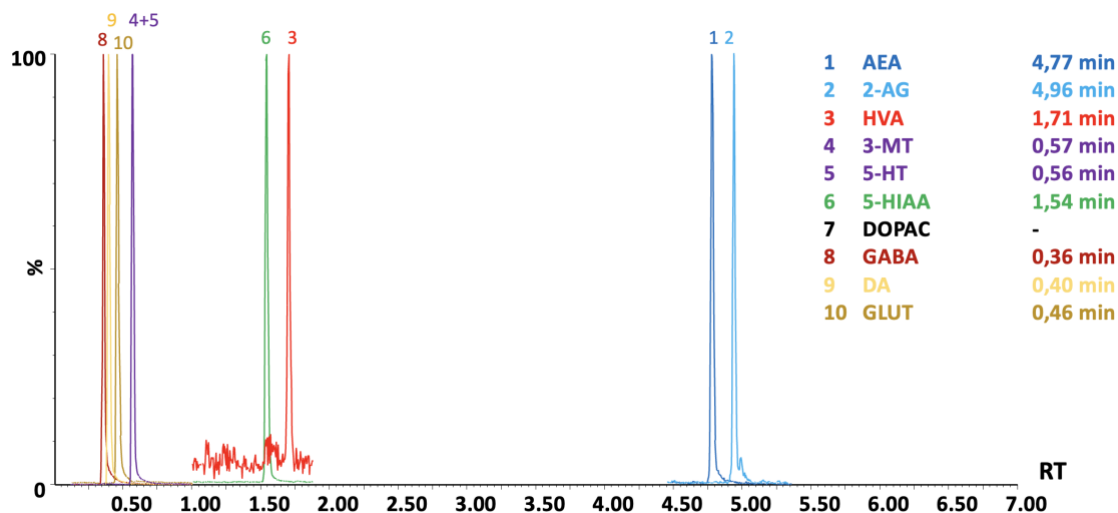
Kolona ACQUITY UPLC BEH CSH RP C18 představuje alternativu ke klasické C18 koloně. Liší se přítomností permanentního povrchového náboje, který umožňuje elektrostatické interakce mezi nabitými funkčními skupinami v analytech a náboji na stacionární fázi. Je vhodná při separaci bazických analytů. Byla použita 0,1% FA jako vodná složka a ACN jako organická složka MF. Výsledek separace je uveden na obr. 25. Separace analytického páru GABA/GLUT (104,00/147,98) nebylo dosaženo a dle očekávání se analyty nacházely v mrtvém čase. K separaci kritického páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) sice docházelo, ale záznam pro DOPAC vykazoval výrazný šum a značnou deformaci píku. To nedovoluje jednoznačně určit retenční čas pro DOPAC. Chromatogram znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC CSH C18 za použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF je uveden na obr. 26.



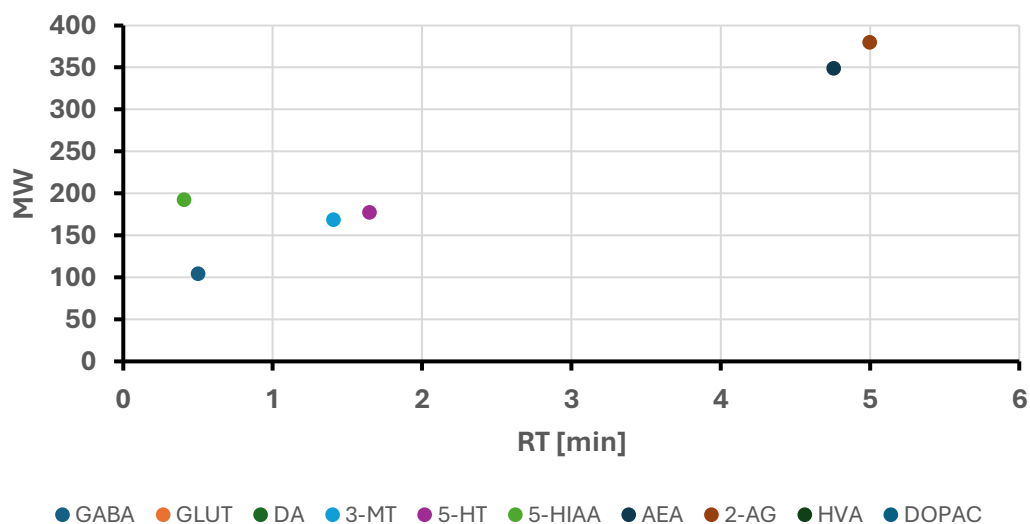
Na této koloně byl také testován vliv 0,1% NH<sub>4</sub>OH jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Výsledek je uveden na obr. 27. Úprava složení vodné složky MF způsobila, že DA neionizoval a neposkytoval odezvu na detektoru, proto jej nebylo možné hodnotit. Taktéž není možné hodnotit DOPAC a HVA, jelikož se jedná o kyseliny, které jsou v zásaditém prostředí 0,1% NH<sub>4</sub>OH ionizované, a proto může docházet k nežádoucím interakcím s nabitým povrchem kolony. Byl ovšem pozorován také výrazný šum a deformaci píků, proto není možné jednoznačně určit jejich retenční časy. GLUT je amfoterní látka, která v zásaditém pH vykazuje kyselou povahu. To způsobilo nerovnoměrnou interakci se stacionární fází a rozmytí píku tak, že nelze retenční čas vyhodnotit. GABA a 5-HIAA se eluují v mrtvém čase. Chromatogram znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC CSH C18 za použití 0,1% NH<sub>4</sub>OH jako vodné složky a ACN jako organické složky MF je uveden na obrázku 28.



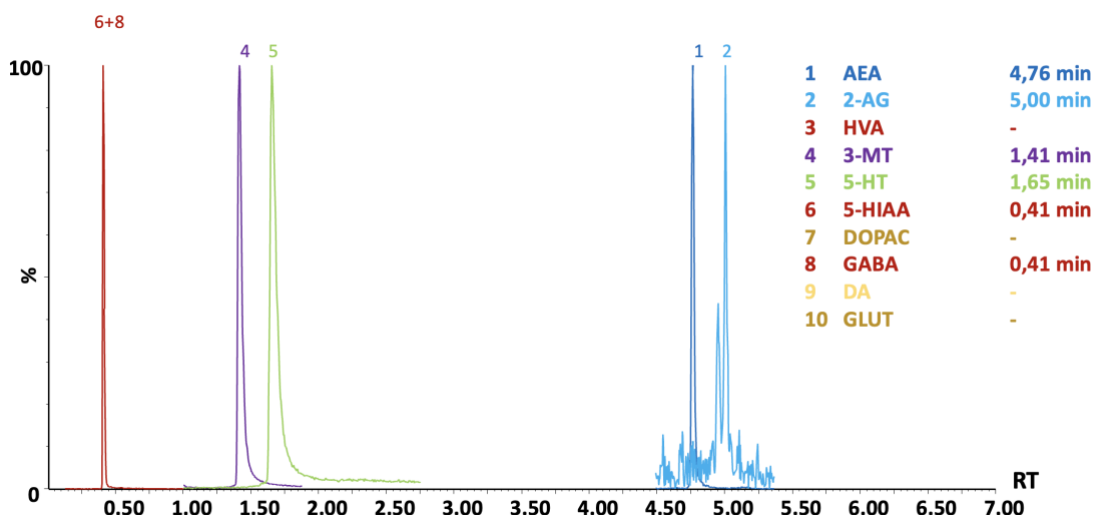
Obrázek 25: Závislost MW na retenčním čase na koloně ACQUITY UPLC CSH C18 za použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF



Obrázek 26: Chromatogram znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC CSH C18 za použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF



Obrázek 27: Závislost MW na retenčním čase na koloně ACQUITY UPLC CSH C18 za použití 0,1 % NH<sub>4</sub>OH jako vodné složky a ACN jako organické složky MF



**Obrázek 28:** Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně ACQUITY UPLC CSH C18 za použití 0,1 % NH<sub>4</sub>OH jako vodné složky a ACN jako organické složky MF

K eluci a ionizaci všech analytů docházelo na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 a na koloně Kinetex F5 při použití 0,1% FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Na obou kolonách nedocházelo k separaci analytů GABA a GLUT, jelikož ale mají odlišné *m/z* je hmotnostní detekce schopná tento pár rozlišit. Taktéž se oba analyty na obou kolonách eluovaly v mrtvém čase, tedy neinteragovaly se stacionární fází. To může být způsobeno jejich vysokou polaritou a nízkou molekulovou hmotností.

Vybraná stacionární fáze pro další měření byla ACQUITY UPLC BEH C18.

### 5.1.3 Měření kalibrační závislosti

Kalibrační křivka byla měřena rozmezí 0,1 až 500 ng/mL. Roztoky byly měřeny v triplikátu. Byla použita byla lineární regrese s logaritmickou transformací dat, což snížilo procento chyby [error%] oproti vážené funkci  $1/x$  a  $1/x^2$ , což vedlo k lepším korelačním koeficientům a koeficientům determinace. V tab. 16 jsou uvedeny koeficienty determinace (R<sup>2</sup>) a dolní limity kvantifikace (LLOQ) pro jednotlivé analyty.

Mezi analýzou roztoků o různých koncentracích byly vloženy dva blanky, aby se zabránilo případným přenosům mezi nástřiky.

**Tabulka 16: Výsledky kalibrační křivky**

Analyt	LLOQ [ng/mL]	R <sup>2</sup>
GABA	0,10	0,997970
GLUT	0,25	0,982975
DA	0,10	0,999528
3-MT	0,10	0,999715
5-HT	0,10	0,996098
5-HIAA	2,50	0,995870
AEA	25	0,913422
2-AG	25	0,925873
HVA	25	0,991570
DOPAC	50	0,932043

#### 5.1.4 Měření opakovatelnosti metody

Bylo provedeno měření opakovatelnosti deseti replikátů ve čtyřech koncentračních hladinách za optimalizovaných podmínek na koloně ACQUITY UPLC BEH C18. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 17.

Pro analyty HVA, 2-AG, AEA, 5-HIAA a DPAC byly měřeny koncentrační hladiny, které jsou menší než jejich LLOQ, proto u těchto analytů nejsou uvedeny hodnoty ve všech měřených koncentračních hladinách. Retenční časy byly opakovatelné pro všechny koncentrace s RSD v rozmezí 0,00-0,43 %. Opakovatelnost ploch píků pro koncentrace měla RSD v rozmezí 0,65-8,42 %. V žádném případě hodnoty RSD nepřesáhly 10 % a proto byly hodnoceny jako optimální. Asymetrie píků se pohybovala v rozmezí 0,98-5,67.

**Tabulka 17: Výsledky opakovatelnosti RP metody**

analyt	koncentrace 0,1 [ng/mL]			koncentrace 1 [ng/mL]		
	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku
GABA	0,26	6,26	2,62	0,00	1,24	3,21
GLUT	0,43	2,97	2,00	0,00	1,30	1,91
DA	0,27	1,89	1,13	0,31	1,05	1,07
3-MT	0,12	3,20	1,05	0,00	1,97	1,34
5-HT	0,15	8,42	1,64	0,00	1,77	2,33
5-HIAA	-	-	-	-	-	-
AEA	-	-	-	-	-	-
2-AG	-	-	-	-	-	-
HVA	-	-	-	-	-	-
DOPAC	-	-	-	-	-	-
analyt	koncentrace 10 [ng/mL]			koncentrace 100 [ng/mL]		
	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku
GABA	0,00	1,83	5,67	0,00	0,65	4,88
GLUT	0,00	0,91	2,87	0,00	0,87	4,27
DA	0,31	0,95	0,98	0,33	1,18	1,06
3-MT	0,00	1,04	3,55	0,00	0,71	5,58
5-HT	0,00	1,58	4,47	0,00	0,86	5,27
5-HIAA	0,00	1,95	1,89	0,00	1,38	3,95
AEA	-	-	-	0,00	3,60	2,13
2-AG	-	-	-	0,04	4,72	2,77
HVA	-	-	-	0,00	2,18	1,45
DOPAC	-	-	-	0,13	6,69	1,78

### 5.1.5 Souhrn optimalizovaných podmínek pro metodu na reverzních fázích

V tab. 18 jsou shrnuty výsledky optimalizace metody na reverzních fázích. Použitá gradientová eluce je shodná s výchozím nastavením a je uvedena na obr. 6 kapitola 4.4.1.

**Tabulka 18: Souhrn výsledných optimalizovaných podmínek pro metodu RP-UHPLC-MS/MS**

Parametr		Nastavení parametru
kolona		ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)
mobilní fáze	složka A	0,1% FA
	složka B	ACN
průtoková rychlost		0,5 mL/min
doba analýzy		7 min
nastříkovaný objem vzorku		2 µL
teplota kolony		40 °C
teplota dávkovače vzorku		10 °C
purge		10% ACN
wash		100% ACN
rozpuštědlo standardu		0,1% FA
Nastříkovaný objem vzorku		2 µL
typ eluce		gradientová, viz obrázek 6

## 5.2 Vývoj HILIC-UHPLC-MS/MS metody

### 5.2.1 Výsledky volby stacionární fáze a optimalizace složení mobilní fáze

Byl proveden screening šesti stacionárních fází s příslušnými mobilními fázemi podle tab. 11 v kapitole 4.5.2. Testované kolony se lišily materiálem částic (silikagel, BEH) a navázaným ligandem. Na základě naměřených retenčních časů byly sestaveny bodové grafy zobrazující závislost molekulové hmotnosti na retenčním čase, které sloužily k hodnocení selektivity separace jednotlivých kolon. Grafy byly vytvořeny pouze pro ty podmínky, kde bylo možné jednoznačně stanovit retenční čas všech analytů. Za ostatních testovaných podmínek nebylo možné jednoznačně stanovit retenční časy, protože nedocházelo k dostatečné retenci, ionizaci či eluci analytů z kolony, což vedlo k výraznému rozmývání a deformaci píků. Prioritou byla separace 3-MT a DOPAC, vzhledem k jejich blízkým molekulovým hmotnostem a to 168,04 a 166,92.

Retenční časy všech analytů bylo možné jednoznačně určit pouze na dvou stacionárních fázích. Na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC a koloně BEH Amide HILIC při následujících podmínkách:

- **BEH Amide HILIC:**

- A: 0,1% FA

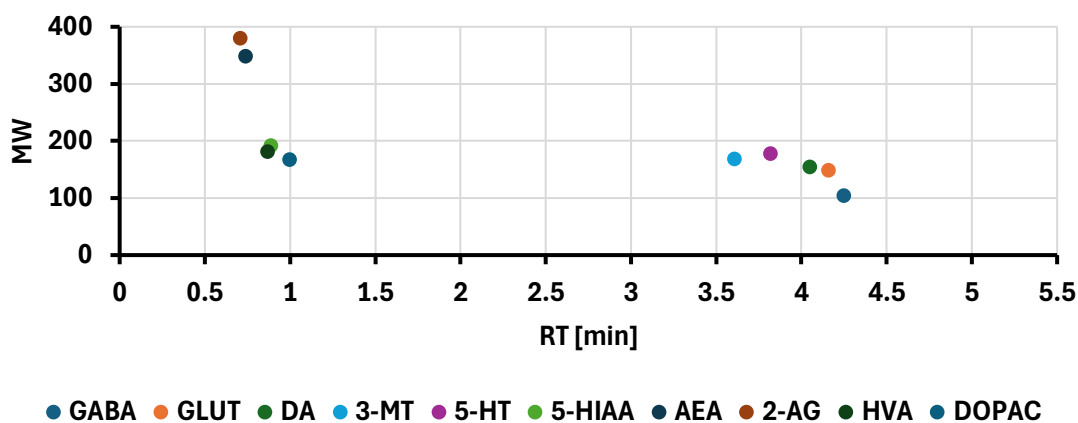
- B: ACN;

▪ **Atlantis Premier BEH Z HILIC:**

- |              |                   |
|--------------|-------------------|
| ○ A: 0,1% FA | B: 0,1% FA v ACN; |
| ○ A: 0,5% FA | B: 0,5% FA v ACN; |
| ○ A: 0,1% AA | B: 0,1% AA v ACN; |
| ○ A: 0,5% AA | B: 0,5% AA v ACN; |
| ○ A: 0,5% AA | B: ACN.           |

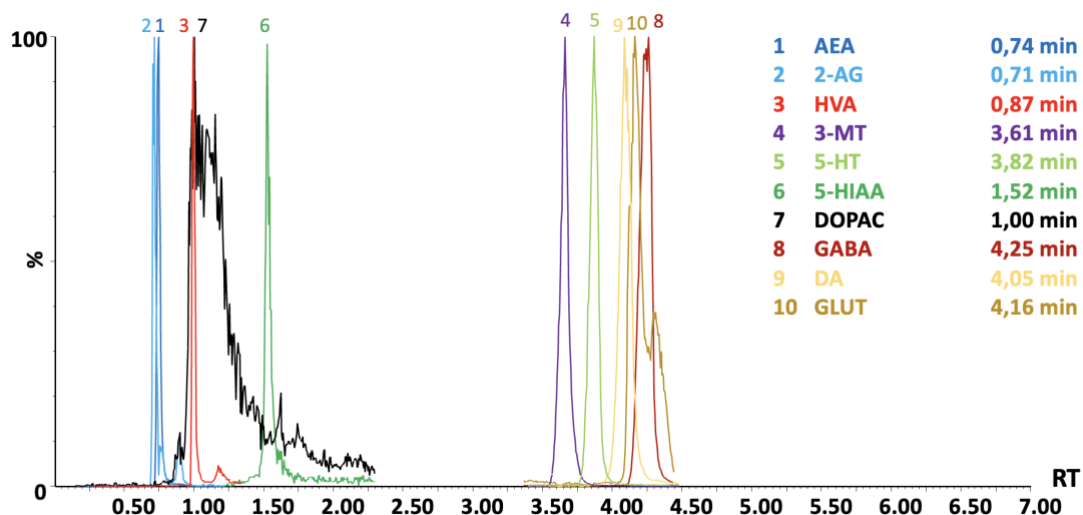
**Výsledky separace na koloně BEH Amide HILIC**

Amidové skupiny na povrchu stacionární fáze poskytují polární interakce, zejména vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce s polárními funkčními skupinami v analytech, jako jsou hydroxylové, aminové a karbonylové skupiny. Na obr. 29 je zobrazena závislost MW na retenčním čase při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Při těchto podmínkách docházelo k eluci všech analyzovaných látek. Separace páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) bylo dosaženo. 2-AG se eluoval v mrtvém čase. AEA se eluoval téměř současně s 2-AG. To naznačuje velmi nízkou retenci na stacionární fázi, což je způsobeno vysokou polaritou analytů.



**Obrázek 29: Závislost MW na retenčním čase na koloně BEH Amide HILIC při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

Na obr. 30 je uveden chromatogram separace na koloně BEH Amide HILIC při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. U DOPAC bylo pozorováno výrazné chvostování. Nerovnoměrná interakce analytu se stacionární fází může být způsobena interakcí DOPAC s amidovými skupinami stacionární fáze.

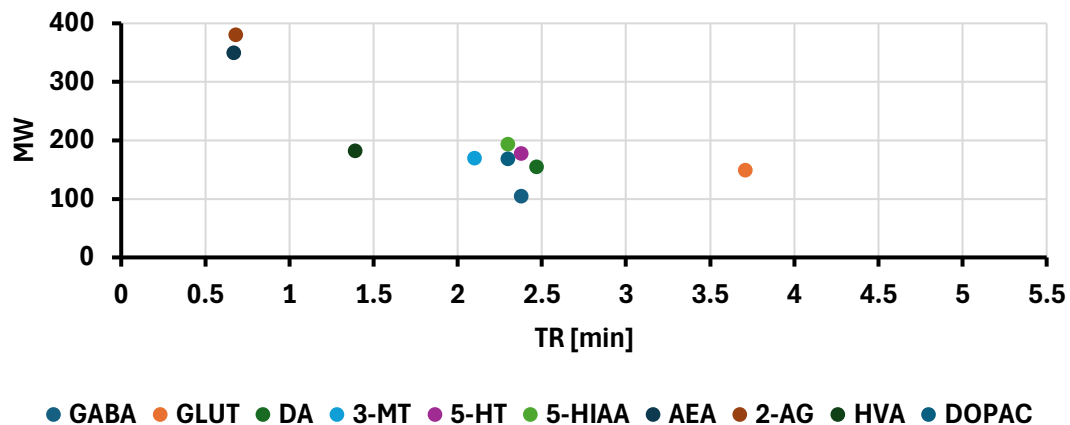


**Obrázek 30: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně BEH Amide HILIC při použití 0,1 % FA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

### **Výsledky separace na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC**

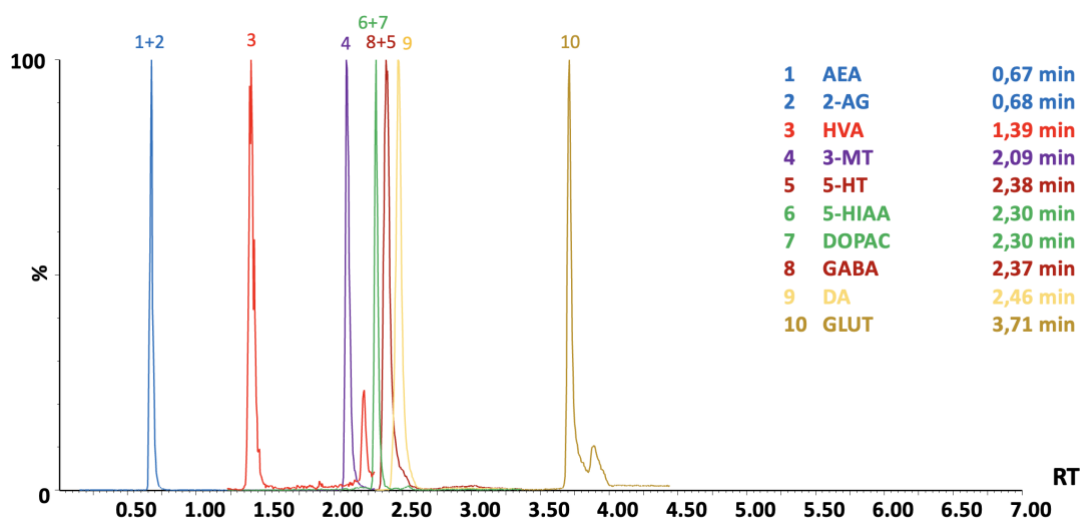
Kolona BEH Z HILIC je obsahuje zwitteriontovou stacionární fází, která obsahuje kombinaci kladných a záporných nábojů. Tato kombinace umožňuje specifické elektrostatické a iontové interakce. Vykazuje zvýšenou selektivitu pro látky obsahující více ionizovatelných skupin, například aminokyseliny. Na obr. 31 je zobrazena Závislost MW na retenčním čase při použití 1 použití 0,1 % FA jako vodné složky a 0,1 % FA v ACN jako organické složky MF. Při těchto podmínkách docházelo k eluci všech analyzovaných látek. Separace páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) bylo dosaženo. Nebylo docíleno separace párů DOPAC/5-HIAA (166,92/191,99) a GABA/5-HT (104,00/177,04) a 2-AG/AEA (379,21/348,21), jelikož mají rozdílné  $m/z$  MS je dokáže spolehlivě identifikovat. Dle očekávání jsou nepolární analyty AEA a 2-AG eluovány v mrtvém čase.





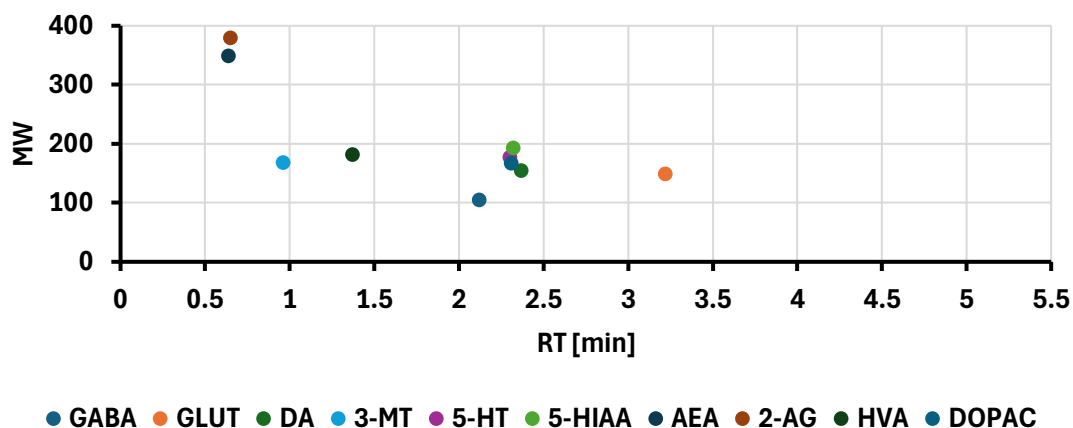
Obrázek 31: Závislost MW na retenčním čase na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,1 % FA jako vodné složky a 0,1 % FA v ACN jako organické složky MF

Na obr. 32 je zobrazen chromatogram separace na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,1 % FA jako vodné složky a 0,1 % FA v ACN jako organické složky MF. Píky jsou úzké a symetrické. U analytu GLUT je možno pozorovat zdvojení.



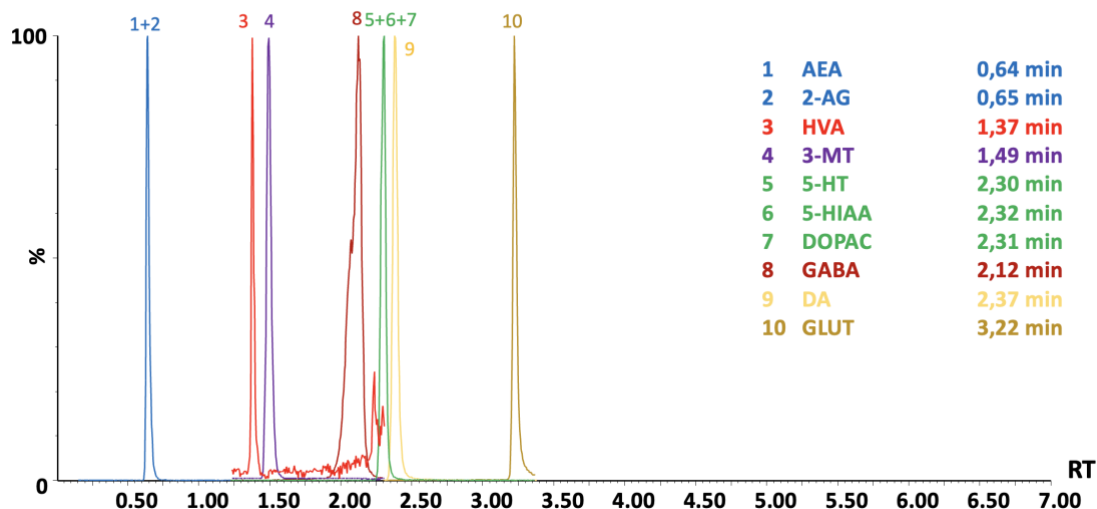
Obrázek 32: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,1 % FA jako vodné složky a 0,1 % FA v ACN jako organické složky MF

Na obr. 33 je zobrazena Závislost MW na retenčním čase při použití 0,5 % FA jako vodné složky a 0,5 % FA v ACN jako organické složky MF. Při těchto podmínkách docházelo k eluci všech analyzovaných látek. Separace analytického páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) bylo dosaženo. Nebylo dosaženo separace trojce DOPAC/5-HIAA/5-HT (166,92/191,99/177,04), které MS dokáže spolehlivě identifikovat na základě jejich  $m/z$ .



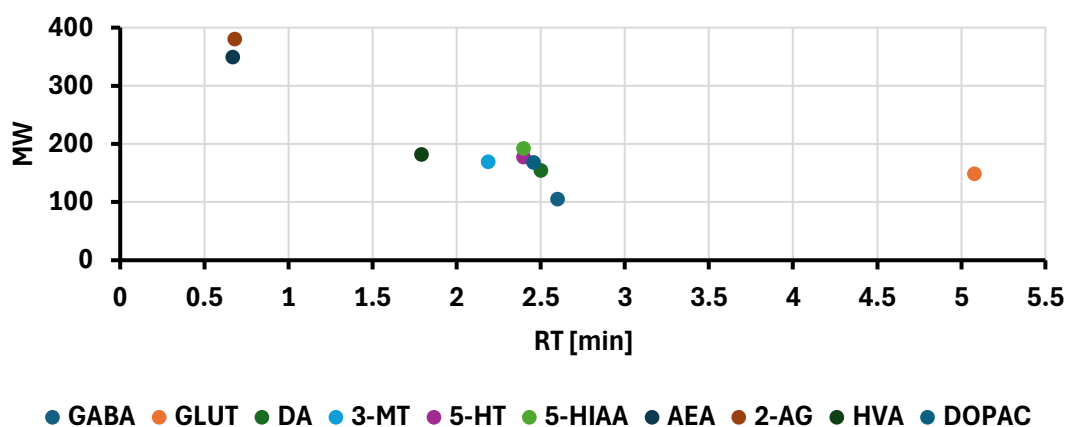
**Obrázek 33: Závislost MW na retenčním čase na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % FA jako vodné složky a 0,5 % FA v ACN jako organické složky MF**

Na obr. 34 je zobrazen chromatogram separace na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % FA jako vodné složky a 0,5 % FA v ACN jako organické složky MF. Píky jsou úzké a symetrické mimo GABA, která má pík širší, ovšem stále symetrický. U analytu HVA je možno pozorovat výraznější šum. Dle očekávání jsou nepolární analyty AEA a 2-AG eluovány v mrtvém čase.



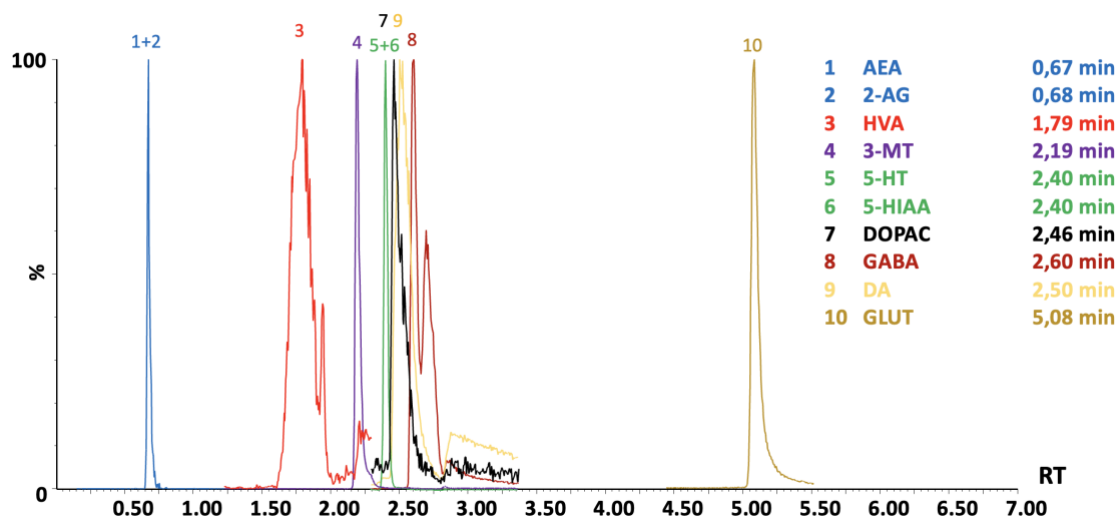
**Obrázek 34: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % FA jako vodné složky a 0,5 % FA v ACN jako organické složky MF**

Na obr. 35 je zobrazena Závislost MW na retenčním čase při použití 0,1 % AA jako vodné složky a 0,1 % AA v ACN jako organické složky MF. Při těchto podmínkách docházelo k eluci všech analyzovaných látek. Separace analytického páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) bylo dosaženo. Nedošlo k separaci párů 2-AG/AEA (379,21/348,21), které jsou dle očekávání eluovány v mrtvém čase. Dále nedocházelo k separaci 5-HT/5-HIAA (191,99/177,04). Neseparované analyty dokáže MS spolehlivě identifikovat.



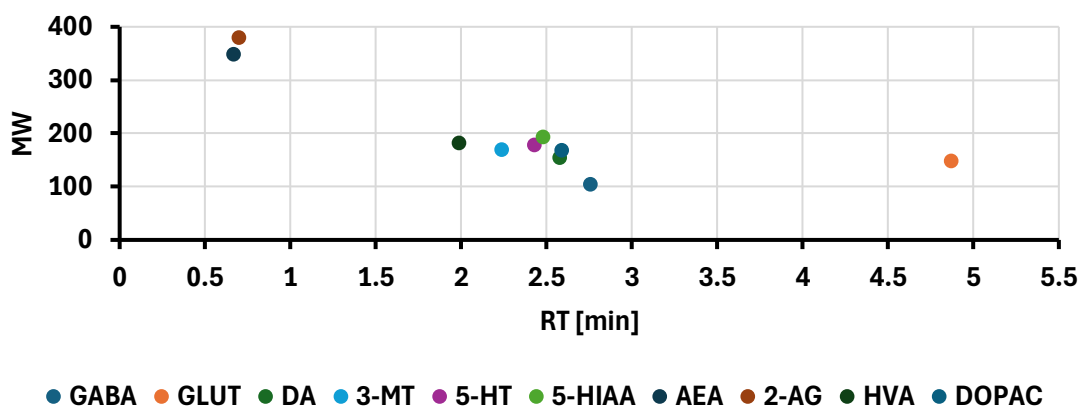
**Obrázek 35: Závislost MW na retenčním čase na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,1 % AA jako vodné složky a 0,1 % AA v ACN jako organické složky MF**

Na obr. 36 je zobrazen chromatogram separace na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,1 % AA jako vodné složky a 0,1 % AA v ACN jako organické složky MF. Oproti použití 0,1 % FA jako vodné složky a 0,1 % FA v ACN jako organické složky MF jsou píky analytů DOPAC, HVA a GABA širší nepravidelné a s vyšším šumem. U analytů DOPAC, GLUT a DA je pozorováno chvostování píků a u GABA zdvojený pík.



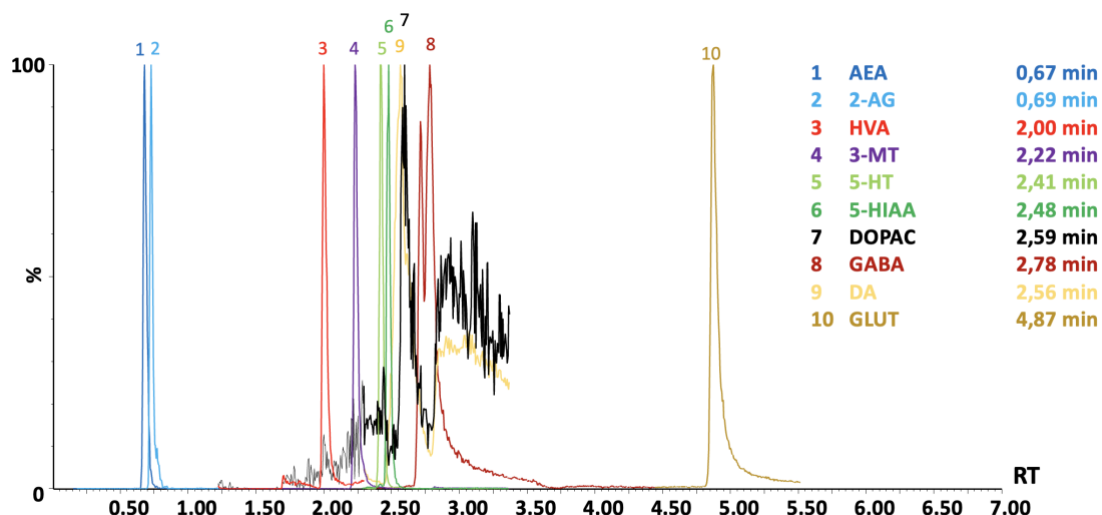
**Obrázek 36: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,1 % AA jako vodné složky a 0,1 % AA v ACN jako organické složky MF**

Na obr. 37 je zobrazena Závislost MW na retenčním čase při použití 0,5 % AA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Při těchto podmínkách docházelo k eluci všech analyzovaných látek. Separace 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) bylo dosaženo. Nebylo dosaženo separace DOPAC/DA (166,92/154,01), které MS dokáže spolehlivě identifikovat. Dle očekávání AEA eluují v mrtvém čase a analyt 2-AG eluují těsně po něm.



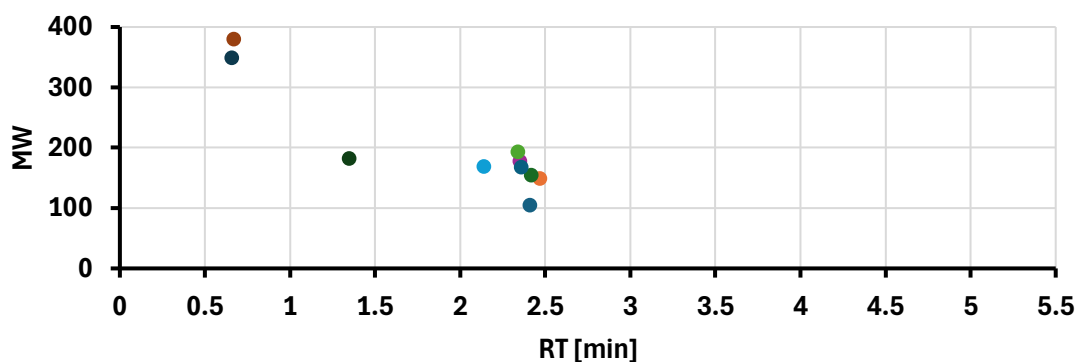
**Obrázek 37: Závislost MW na retenčním čase na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % AA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

Na obr. 38 je zobrazen chromatogram separace na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % AA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Píky analytů HVA a GABA jsou oproti použití 0,1 % AA jako vodné složky a 0,1 % AA v ACN jako organické složky MF užší a více symetrické. DOPAC stále vykazuje velmi výrazný šum.



**Obrázek 38: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % AA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF**

Na obr. 39 je zobrazena Závislost MW na retenčním čase při použití 0,5 % AA jako vodné složky a 0,5% AA v ACN jako organické složky MF. Při těchto podmínkách docházelo k eluci všech analyzovaných látek. Separace 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) bylo dosaženo. Nebylo dosaženo separace trojce analytů 5-HIAA/5-HT/DOPAC (191,99/177,04/166,92) a dvojce DA/GABA (154,01/104,00) a AEA/2-AG (379,21/348,21), které MS dokáže spolehlivě identifikovat. Dle očekávání AEA a 2-AG eluují v mrtvém čase, tedy jsou nedostatečně zadržovány kolonou.

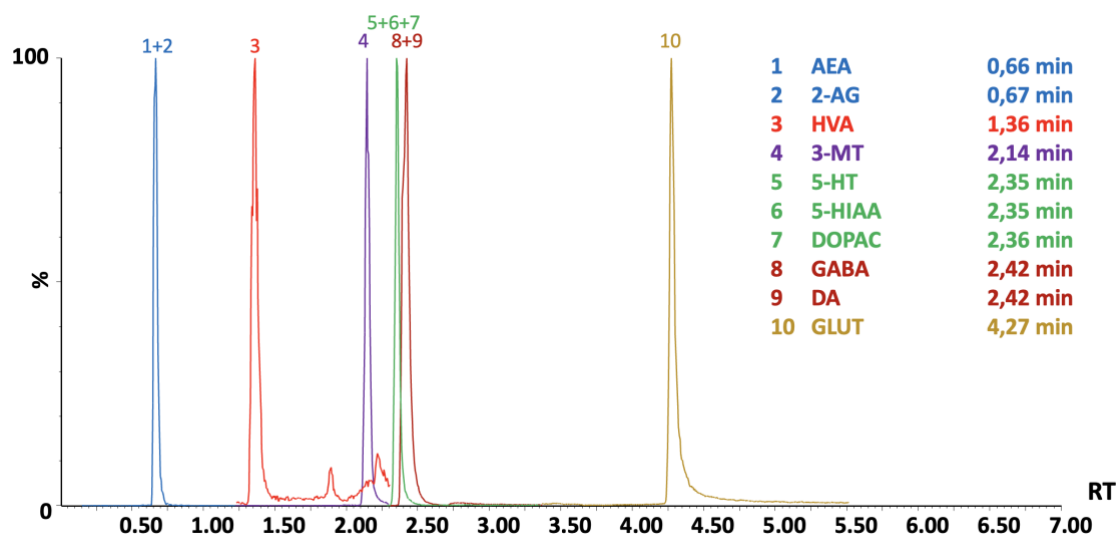


● GABA ● GLUT ● DA ● 3-MT ● 5-HT ● 5-HIAA ● AEA ● 2-AG ● HVA ● DOPAC

**Obrázek 39: Závislost MW na retenčním čase na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % AA jako vodné složky a 0,5 % AA v ACN jako organické složky MF**

Na obr. 40 je zobrazen chromatogram separace na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % AA jako vodné složky a ACN jako organické složky MF. Píky všech analytů jsou úzké a symetrické, což má větší prioritu než úplná separace analytů, které

dokáže MS rozlišit. Tvar píků má vliv na kvantifikaci. Úzké a symetrické píky znamenají spolehlivější výsledky i při překrývání některých analytů na chromatografické koloně.

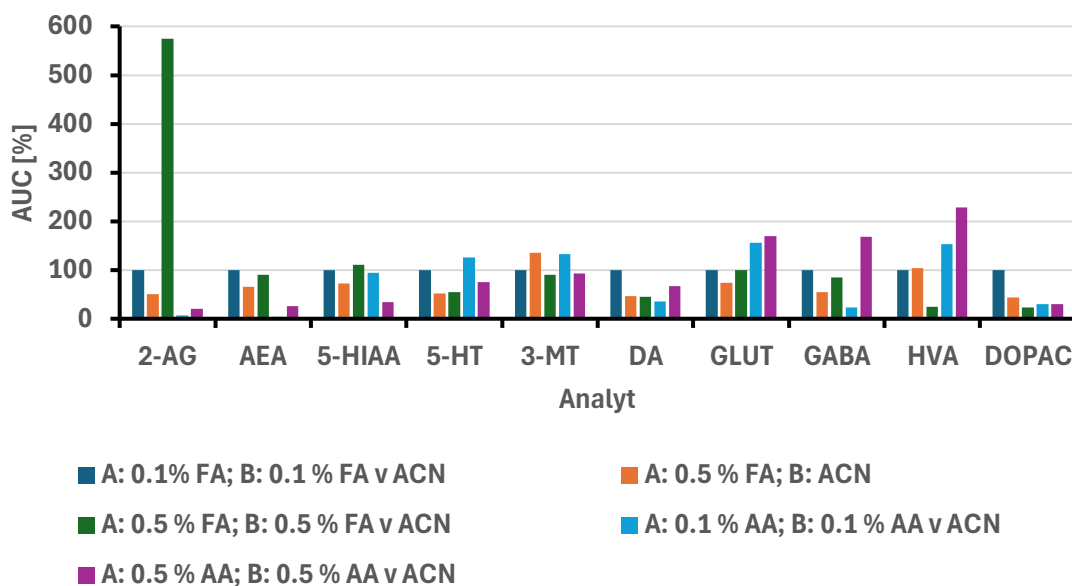


**Obrázek 40: Chromatogramy znázorňující separaci analytů na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % AA jako vodné složky a 0,5 % AA v ACN jako organické složky MF**

Za všech výše uvedených podmínek bylo dosaženo separace kritického páru DOPAC a 3-MT.

Na obr. 41 je znázorněn vliv testovaných MF na relativní plochu píku na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC. Jako 100 % byla zvolena MF s 0,1% FA jako vodná složka a 0,1% FA v ACN jako organická složka. Zvýšení koncentrace FA na 0,5 % ve vodné složce MF způsobilo snížení odezvy u většiny analytů, pouze u 3-MT a HVA je pozorováno zvýšení odezvy. Koncentrace FA 0,5 % jak ve vodné, tak v organické složce MF způsobilo výrazné zvýšení odezvy pro 2-AG, ovšem pro ostatní analyty zůstala odezva buď srovnatelná, nebo se snížila. Záměna FA za AA znamenala zvýšení odezvy u analytů 5-HT, 3-MT, GLUT a HVA, ovšem pro AEA a 2-AG způsobila výrazný pokles. Použití 0,5% AA jako vodná složka a 0,5% AA v ACN jako organická složka MF znamenala zvýšení odezvy pro GLUT, GABA a HVA. Pro ostatní analyty byla odezva nižší.

0,1% FA jako vodná složka a 0,1% FA v ACN jako organická složka MF vykazovala největší plochy píků pro nejvíce analytů v porovnání s ostatními testovanými složkami MF.



**Obrázek 41: Vliv složení mobilní fáze na relativní plochu píku na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC**

Nejlepší separace tedy rozdělení většího počtu analytů v porovnání s jinými podmínkami, bylo dosaženo na koloně BEH Amide HILIC při použití mobilní fáze s 0,1% FA jako vodnou složkou a ACN jako organickou složkou. Tato kolona však nebyla považována za optimální z důvodu výrazného rozmývání píku pro DOPAC. Jako optimální byla zvolena kolona Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5% AA jako vodné složky a 0,5% AA v ACN jako organické složky MF. Přestože zde nebylo dosaženo separace páru 2-AG/AEA (348,21/379,21), DA/GABA (154,01/104,00) a trojice 5-HIAA/5-HT/DOPAC (191,99/177,04/166,92), lze je spolehlivě identifikovat pomocí MS na základě jejich  $m/z$ . Separace kritického páru 3-MT/DOPAC (168,04/166,92) bylo úspěšně dosaženo. Toto složení MF vedlo k dosažení nejlepších tvarů píků a minimalizoval problémy jako chvostování nebo rozdvojení vrcholu píku, které byly přítomné u jiných mobilních fází.

### 5.2.2 Měření kalibrační závislosti

Kalibrační křivka byla měřena rozmezí 0,1 až 500 ng/mL. Roztoky byly měřeny v triplikátu. Byla použita lineární regrese s logaritmickou transformací dat, což snížilo procento chyby [error%] oproti vážené funkci  $1/x$  a  $1/x^2$ , což vedlo k lepším korelačním koeficientům a koeficientům determinace. V tab. 19 jsou uvedeny koeficienty determinace ( $R^2$ ) a dolní limity kvantifikace (LLOQ) pro jednotlivé analyty. Mezi analýzou roztoků o různých koncentracích byly vloženy dva blanky, aby se pokud možno zabránilo

případným přenosům mezi nástřiky. Jelikož byly měřeny vysoké koncentrace analytů existuje riziko přenosů mezi nástřiky, které mohlo ovlivnit výsledky měření.

**Tabulka 19: Výsledky kalibrační křivky**

Analyt	LLOQ [ng/mL]	R <sup>2</sup>
GABA	25	0,982188
GLUT	5	0,849941
DA	2,50	0,981289
3-MT	0,10	0,999390
5-HT	0,25	0,998635
5-HIAA	2,50	0,978943
AEA	5	0,994873
2-AG	10	0,996982
HVA	50	0,983610
DOPAC	50	0,994577

### 5.2.3 Měření opakovatelnosti metody

Bylo provedeno měření opakovatelnosti deseti replikátů ve čtyřech koncentračních hladinách za optimalizovaných podmínek na koloně Atlantis Premier BEH Z HILIC. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 20.

Pro analyty GABA, 2-AG, AEA a DOPAC byly měřeny koncentrační hladiny, které jsou menší než jejich LLOQ, proto u těchto analytů nejsou uvedeny hodnoty ve všech měřených koncentračních hladinách. Retenční časy byly opakovatelné pro všechny koncentrace s RSD v rozmezí 0,00-0,31 %. Opakovatelnost ploch píků pro koncentrace měla RSD v rozmezí 0,61-7,34 %. V žádném případě hodnoty RSD nepřesáhly 10 % a proto byly hodnoceny jako optimální. Asymetrie píků se pohybovala v rozmezí 1,51-7,19.



**Tabulka 20: Výsledky opakovatelnosti HILIC metody**

analyt	koncentrace 10 [ng/mL]			koncentrace 25 [ng/mL]		
	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku
GABA	-	-	-	0,08	1,18	2,45
GLUT	0,05	6,57	3,85	0,00	4,48	6,11
DA	0,05	2,05	1,51	0,07	1,31	1,99
3-MT	0,00	1,04	4,33	0,06	0,61	4,11
5-HT	0,09	1,65	4,19	0,05	1,11	4,56
5-HIAA	0,07	1,67	3,73	0,00	1,61	3,98
AEA	0,00	2,70	4,20	0,00	2,66	4,34
2-AG	-	-	-	0,00	7,34	2,64
HVA	-	-	-	-	-	-
DOPAC	-	-	-	-	-	-
analyt	koncentrace 100 [ng/mL]			koncentrace 250 [ng/mL]		
	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku	RSD RT [%]	RSD plochy [%]	asymetrie píku
GABA	0,12	1,26	2,85	0,10	0,96	4,61
GLUT	0,00	2,14	7,19	0,00	1,66	6,63
DA	0,09	1,90	2,15	0,07	1,72	2,12
3-MT	0,06	0,84	4,53	0,06	0,78	4,17
5-HT	0,09	1,54	4,37	0,08	1,48	3,91
5-HIAA	0,05	1,40	4,51	0,00	1,40	3,70
AEA	0,00	1,88	5,67	0,00	1,93	5,31
2-AG	0,00	4,44	3,34	0,31	3,09	2,59
HVA	0,07	5,66	2,83	0,07	2,44	3,87
DOPAC	0,00	4,33	1,58	0,07	2,77	2,02

## 5.2.4 Souhrn výsledných podmínek pro metodu HILIC-UHPLC-MS/MS

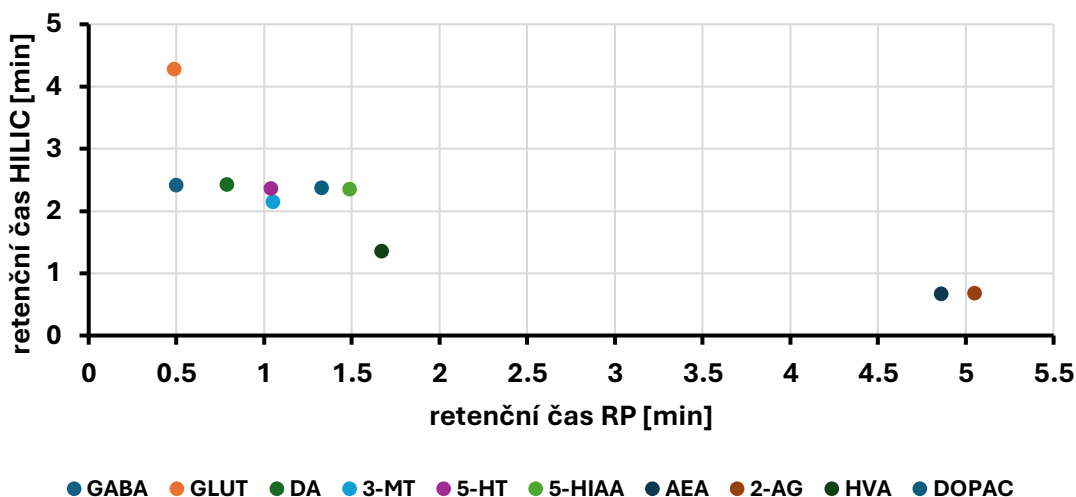
V tab. 21 jsou shrnuty výsledné podmínky metody HILIC-UHPLC-MS/MS.

**Tabulka 21: Souhrn výsledných podmínek pro metodu HILIC-UHPLC-MS/MS**

Parametr		Nastavení parametru
kolona		Atlantis Premier BEH Z HILIC (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)
mobilní fáze	složka A	0,5% AA
	složka B	0,5 % AA v ACN
průtoková rychlost		0,5 mL/min
doba analýzy		7 min
nastříkovaný objem vzorku		2 µL
teplota kolony		40 °C
teplota dávkovače vzorku		10 °C
purge		50% ACN
wash		100% ACN
rozpuštědlo standardu		ACN
Nastříkovaný objem vzorku		2 µL
typ eluce		gradientová, viz obrázek 6

### 5.3 Porovnání RP a HILIC UHPLC metody

Výsledky porovnání retenčních časů metody HILIC a RP jsou graficky znázorněny na obr. 42. V rámci HILIC metody bylo dosaženo separace menšího počtu látek oproti metodě RP. Při obou metodách byl separován kritický pár 3-MT/DOPAC (168,04/166,92). Metodou HILIC nebyly separovány 2 páry 2-AG/AEA (348,21/379,21), DA/GABA (154,01/104,00) a trojice 5-HIAA/5-HT/DOPAC (191,99/177,04/166,92). Metodou RP nebyly separovány dva páry GABA/GLUT (104,00/147,98), a 3-MT/5-HT (168,04/177,04). V módu RP bylo dosaženo také lepšího tvaru píků, tedy úzké, symetrické a nerozmyté píky. Metoda HILIC byla lepší případě analytů DOPAC a HVA, jelikož byl pozorován menší šum. Při obou metodách byly pozorovány dva analyty v mrtvém čase. V RP se jednalo o GABA a GLUT, což jsou malé, polární analyty a v metodě HILIC se jednalo o AEA a 2-AG. To jsou naopak nepolární analyty.



Obrázek 42: porovnání retenčních časů RP a HILIC

Bylo provedeno porovnání pomocí kalibračních křivek. Výsledky měření jsou znázorněny v tab. 22, kdy zeleně jsou vyznačeny analyty s nižším LLOQ a fialově jsou vyznačeny analyty se shodným LLOQ. Metoda HILIC byla citlivější pro 2 analyty, konkrétně pro AEA a 2-AG. GLUT má v HILIC koeficient determinace pouze 0,8849941, to znamená nízkou linearitu. Shodná citlivost byla u analytů 3-MT a DOPAC. Ostatní analyty byly citlivější v RP. Z LLOQ jednotlivých analytů lze konstatovat, že citlivější je metoda na reverzních fázích.

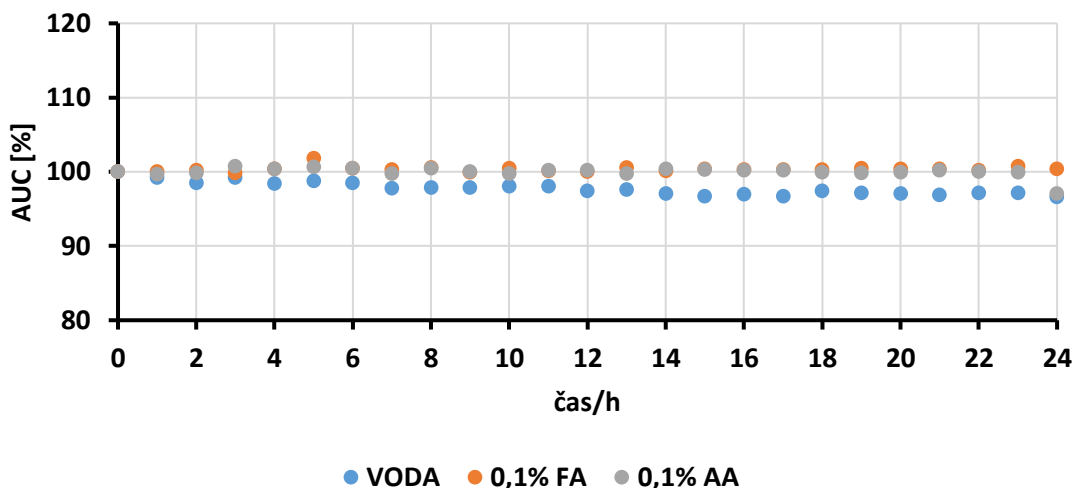
**Tabulka 22: Porovnání kalibračních křivek pro metodu v RP a HILIC módu**

analyt	RP		HILIC	
	LLOQ [ng/mL]	R <sup>2</sup>	LLOQ [ng/mL]	R <sup>2</sup>
GABA	0,1	0,997970	25,0	0,982188
GLUT	0,25	0,982975	5	0,849941
DA	0,1	0,999528	2,5	0,981289
3-MT	0,1	0,999715	0,1	0,999390
5-HT	0,1	0,996098	0,25	0,998635
5-HIAA	0,25	0,995870	2,5	0,978943
AEA	25,0	0,913422	5,0	0,994873
2-AG	25,0	0,925873	10,0	0,996982
HVA	25,0	0,991570	50,0	0,983610
DOPAC	50,0	0,932043	50,0	0,994577

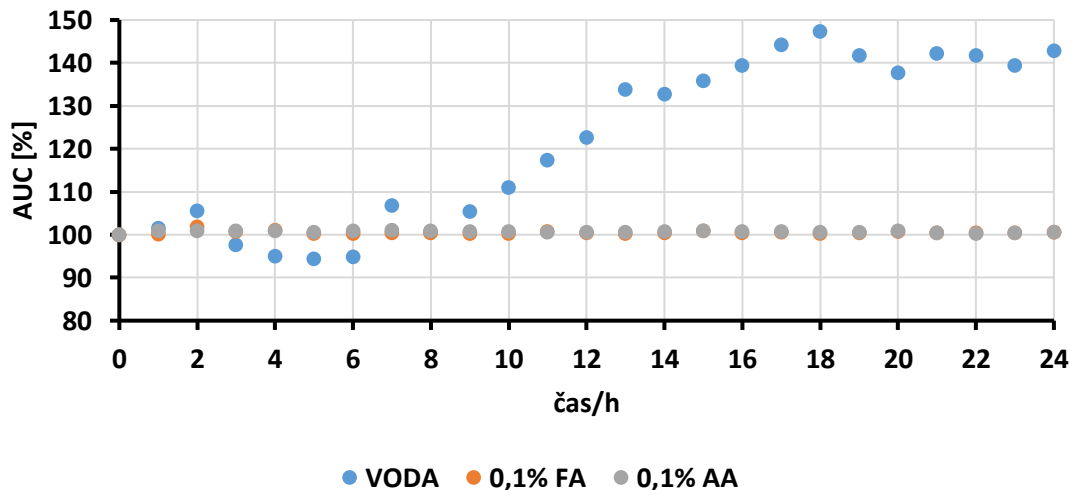
## 5.4 Studie krátkodobé stability vybraných neurotransmiterů

Vzhledem k tomu, že po 3 dnech od přípravy standardů do čiré vialky při použití vody jako rozpouštědla byla u analytů DA, 5-HT a 5-HIAA pozorována změna barvy, byla zjišťována krátkodobá stabilita po dobu 24 hodin. Byly testovány tři různá rozpouštědla voda, 0,1% FA, 0,1% AA. Hodnotila se změna plochy píku jednotlivých analytů v závislosti na čase.

Výsledky měření stability DA jsou uvedeny v obr. 43. DA je stabilní ve všech testovaných rozpouštědlech po dobu 24 hodin. Ve vodě klesla hodnota koncentrace na 96,55 %. V 0,1% FA se plocha pohybovala na 100 % po celou dobu měření. V 0,1% AA je pozorována stabilita okolo 100 % po celou dobu a ve 24. hodině je pozorován náhlý pokles na 96,99 %. Hodnoty neklesly v žádném z měřených rozpouštědel pod 95 %, proto je možné DA v testovaných rozpouštědlech považovat za stabilní.

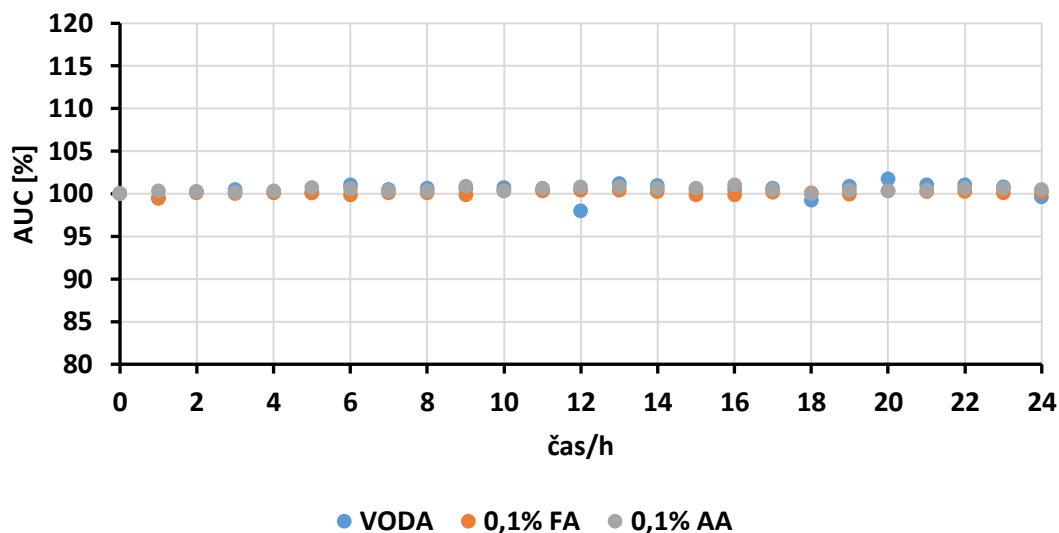


**Obrázek 43: Změna plochy píku DA v čase v různých rozpouštědlech v relativních hodnotách**  
 Výsledky měření pro 5-HT jsou uvedeny v obr. 44. 5-HT je stabilní v 0,1% FA a 0,1% AA po dobu 24 hodin. Ve vodě je pozorován pokles a poté náhlý nárůst plochy. To může být způsobeno jeho degradací na degradační produkty které mají vyšší odezvu ve stejné vlnové délce na detektoru s diodovým polem. V 0,1% FA a 0,1% AA se plocha pohybovala na 100 % po celou dobu měření.



**Obrázek 44: Změna plochy píku 5-HT v čase v různých rozpouštědlech v relativních hodnotách**

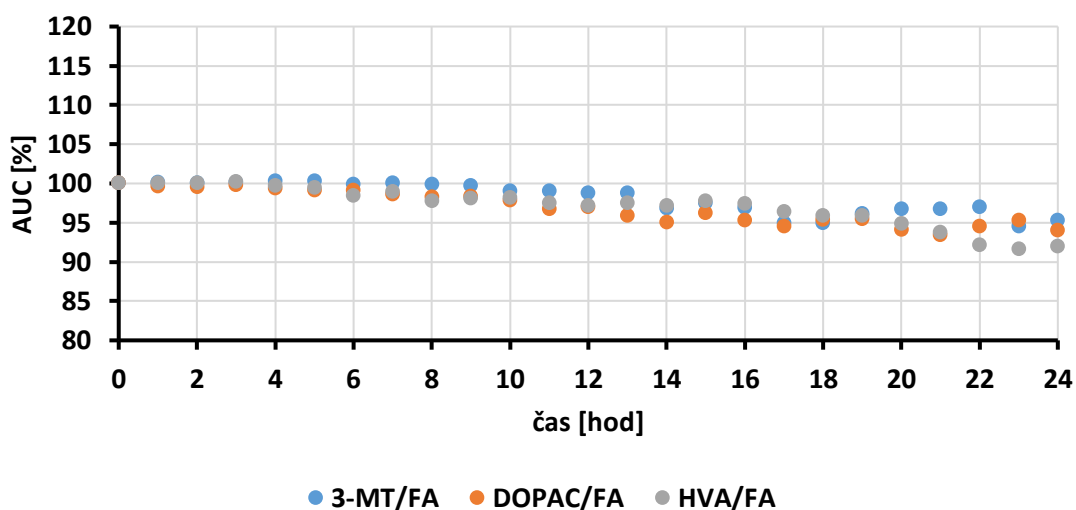
5-HIAA je stabilní ve všech testovaných rozpouštědlech po dobu 24 hodin. Výsledky měření jsou uvedeny na obr. 45. Odezva se ve všech rozpouštědlech pohybovala po celou dobu měření okolo 100 %, proto je možné považovat analyty za stabilní ve všech testovaných rozpouštědlech.



Obrázek 45: Změna plochy píku 5-HIAA v čase v různých rozpouštědlech v relativních hodnotách

DA a 5-HIAA byly stabilní ve všech testovaných rozpouštědlech a relativní hodnoty ploch píků neklesly pod 95 %. 5-HT byl nestabilní ve vodě, avšak v obou okyselených roztocích se hodnota ploch píků pohybovala stále na 100 %. Jako vhodnější rozpouštědlo pro standardy byla zvolena 0,1 % FA, jelikož se jedná také o složku MF.

Ve zvoleném rozpouštědle, 0,1% FA, byly testovány analyty 3-MT, DOPAC a HVA. Hodnoty ploch všech analyzovaných látek postupně klesaly po celou dobu měření, přičemž po 14. hodině klesly pod hranici 95 %. Proto lze analyty považovat za stabilní pouze po dobu 14 hodin. Výsledky jsou znázorněny na obr. 46.



Obrázek 46: Stabilita 3-MT, DOPAC a HVA v čase v 0,1 % FA v relativních hodnotách

Analyty 3-MT, DOPAC a HVA byly stabilní v 0,1% FA pouze po dobu 14 hodin. Po této době jejich odezva na detektoru klesla pod hranici 95 %. Z tohoto důvodu je nutné připravovat standardní roztoky těchto analytů ideálně každý den čerstvé, aby bylo zajištěno jejich spolehlivé stanovení. Analyty DA, 5-HT a 5-HIAA vykazovaly stabilitu po celou dobu měření a nemusí být proto připravovány každý den.

## ZÁVĚR

Byly vyvinuty nové metody RP-UHPLC-MS/MS a HILIC-UHPLC-MS/MS pro separaci skupiny 10 vybraných neurotransmitterů a jejich metabolitů. Byly optimalizovány chromatografické a hmotnostně spektrometrické podmínky za účelem dosažení co nejvyšší citlivosti, selektivity a symetrie chromatografických píků.

Byly úspěšně optimalizovány parametry nastavení iontového zdroje pro ESI<sup>+</sup> a ESI<sup>-</sup>.

V módu RP bylo dosaženo nejlepší separace na koloně ACQUITY UPLC BEH C18. Jako MF byla použita 0,1% FA jako vodná složka a ACN jako organická složka. Byla použita gradientová eluce 2 % – 98 % ACN do 5 minuty, od 5 minuty 2 % ACN. Celková doba analýzy byla 7 minut. Za optimalizovaných podmínek eluovaly všechny analyty a byla úspěšně změřena kalibrační křivka pro porovnání s HILIC. Retenční časy byly opakovatelné pro všechny zvolené koncentrace, a to 0,1, 1, 10 a 100 ng/mL, kdy RSD byla v rozmezí 0,00-0,43 %. RSD opakovatelnosti ploch pak byla při koncentracích 1, 10 a 100 ng/ml v rozmezí 0,65-8,42 %. Hodnoty RSD nepřesáhly 10 % a proto byly hodnoceny jako optimální. Asymetrie píků se pohybovala v rozmezí 0,98-5,67. Metoda vykazovala v závislosti na analytu linearitu s  $R^2$  0,925873-0,999715. LLOQ analytů se pohyboval v rozmezí 0,1-50 ng/mL.

Pro separaci v módu HILIC byla zvolena kolona Atlantis Premier BEH Z HILIC při použití 0,5 % AA jako vodné složky a 0,5 % AA v ACN jako organické složky MF. Byla provedena gradientová eluce od 98 % - 50 % ACN během 5 minut, od 5 minut 98 % ACN. Celková doba analýzy byla 7 minut. Za optimalizovaných podmínek eluovaly všechny analyty a byla úspěšně změřena kalibrační křivka pro porovnání s RP. Retenční časy byly opakovatelné pro všechny zvolené koncentrace, a to 010, 25, 100 a 250 ng/mL, kdy RSD byla v rozmezí 0,00- 0,31 %. RSD opakovatelnosti ploch pak byla v rozmezí 0,61-7,34 %. Hodnoty RSD nepřesáhly 10 % a proto byly hodnoceny jako optimální. Asymetrie píků se pohybovala v rozmezí 1,51-7,19. Metoda vykazovala v závislosti na analytu linearitu s  $R^2$  0,849941-0,999390. LLOQ analytů se pohyboval v rozmezí 0,1-50 ng/mL.

Byly porovnány chromatografické módy RP a HILIC pomocí retenčních časů, LLOQ a kalibrační křivky. Pro separaci analytů byla vhodnější metoda RP, jelikož se zde neseperoaly pouze 2 páry (AEA/2-AG, 5-HT/3-MT). Metoda HILIC nedokázala separovat

2 páry a jednu trojici analytů (2-AG/AEA, DA/GABA, 5-HIAA/5-HT/DOPAC). Obě tyto metody však dokázaly separovat kritický pár 3-MT/DOPAC. Metoda HILIC byla citlivější, tedy vykazovala nižší LLOQ, pro 2 analyty, konkrétně pro, AEA a 2-AG. Pro analyt 3-MT a DOPAC byly LLOQ obou metod shodné. Zbylé analyty, tedy GABA, GLUT, DA, 5-HT, 5-HIAA a HVA byly citlivější v RP. Metoda RP byla celkově hodnocena jako citlivější než HILIC.

Byla provedena studie krátkodobé stability, která byla měřena ve třech různých rozpouštědlech. Stabilita byla měřena za optimalizovaných podmínek metody na reverzních fázích. Jako kritérium stability byla stanovena hranice 95 % původní koncentrace látky v roztoku. Analyty DA, 5-HT a 5-HIAA vykazovaly stabilitu po dobu 24 hodin v rozpouštědlech 0,1% FA i 0,1% AA. Jako vhodnější rozpouštědlo byla zvolena 0,1 % FA jakožto složka MF. V tomto rozpouštědle byla testována stabilita analytů 3-MT, DOPAC a HVA. Koncentrace těchto analytů ve 14. hodině klesly pod hranici 95 %. Analyty 3-MT, DOPAC a HVA jsou považovány za stabilní pouze po dobu 14 hodin.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal a ČESLA, Petr. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [2] SNYDER, Lloyd R. a KIRKLAND, J. J. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2d ed. New York: Wiley, c1979. ISBN 0471038229.
- [3] URBÁNEK, Lubor. *VÝVOJ A VALIDACE NOVÝCH HPLC METOD PRO STANOVENÍ SPECIFICKÝCH ANALYTŮ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU*. Disertační práce, vedoucí RNDr. Petru Solich, CSc. Hradec Králové: Univerzita karlova, 2009. Dostupné také z:  
<https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/23681/140003414.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [4] SNYDER, Lloyd R.; GLAJCH, Joseph H. a KIRKLAND, Joseph J. *Practical HPLC method development*. New York: John Wiley, 1988. ISBN 0-471-62782-8.
- [5] NOVÁKOVÁ, Lucie a VLČKOVÁ, Hana. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2009, roč. 656, č. 1-2, s. 8-35. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>. [cit. 2024-02-29].
- [6] TODAY, Chromatography. *What is the Difference Between UHPLC and UPLC?* Online. Chromatography Today. 2014. Dostupné z: <https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/what-is-the-difference-between-uhplc-and-uplc/30754>. [cit. 2024-08-11].
- [7] VITHA, Mark F. *Chromatography: principles and instrumentation*. New Jersey: John Wiley, [2017]. ISBN 978-1-119-27088-1.
- [8] WATERS. *Column Particle Technologies*. Online. Waters. C2024. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=-](https://www.waters.com/waters/en_US/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=-). [cit. 2024-07-10].

- [9] *Exceed Expectations - ACQUITY UPLC Columns*. Online. In: . 2015. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001140en.pdf>. [cit. 2024-07-05].
- [10] *New Kinetex F5: HPLC/UHPLC core-shell columns*. Online. In: PHENOMENEX. Phenomenex. C2018. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/documents/2022/05/20/18/55/kinetex-f5>. [cit. 2024-07-10].
- [11] WATERS. *Column Particle Technologies*. Online. Vody. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=-](https://www.waters.com/waters/en_US/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=-). [cit. 2024-07-10].
- [12] *Waters*. Online. C2024. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/us/en.html>. [cit. 2024-07-10].
- [13] AUTOR, Nenalezený. *Synchronis™ HILIC HPLC kolony*. Online. Nenalezený vydavatel. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/97505-052130>. [cit. 2024-07-19].
- [14] AUTOR, Nenalezený. *Luna NH2 HPLC column*. Online. Phenomenex. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/products/luna-hplc-column/luna-nh2>. [cit. 2024-07-19].
- [15] DE HOFFMANN, Edmond a STROOBANT, Vincent. *Mass spectrometry: principles and applications*. Third edition. Chichester: John Wiley, [2007]. ISBN 978-047-0033-104.
- [16] AUTOR, Nenalezený. *Funkce buněk a lidského těla*. Online. Nenalezený vydavatel. Dostupné z: <https://fb.lt.cz/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/5-neurotransmisni-systemy/>. [cit. 2024-02-25].
- [17] SMITH, Colleen M.; MARKS, Allan D. a LIEBERMAN, M. A. *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2005. ISBN 07-817-2145-8.

- [18] LAU, Kristina; KOTZUR, Rebecca a RICHTER, Franziska. Blood–brain barrier alterations and their impact on Parkinson’s disease pathogenesis and therapy. Online. *Translational Neurodegeneration*. 2024, roč. 13, č. 1. ISSN 2047-9158. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40035-024-00430-z>. [cit. 2024-08-07].
- [19] KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H. a JESSELL, Thomas M. *Principles of Neural Science*. Online. 4th ed. McGraw-Hill Medical, 2000. ISBN 978-0-8385-7701-1.
- [20] ZHOU, Y. a DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. Online. *Journal of Neural Transmission*. 2014, roč. 121, č. 8, s. 799-817. ISSN 0300-9564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>. [cit. 2024-02-25].
- [21] VALEŠOVÁ, Věra. *ÚLOHA GLUTAMÁTERGNÍHO SYSTÉMU V PATOFYZIOLOGII SCHIZOFRENIE*. Dizertační práce. Praha: Univerzita karlova, 2005.
- [22] TOLLEFSBOL, Trygve O. *Medical Epigenetics*. Online. 2nd. Academic Press, 2021. ISBN 978-0-12-823928-5. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2020-0-00540-2>. [cit. 2024-02-25].
- [23] SUOMINEN, Tina; UUTELA, Päivi; KETOLA, Raimo A.; BERGQUIST, Jonas; HILLERED, Lars et al. Determination of Serotonin and Dopamine Metabolites in Human Brain Microdialysis and Cerebrospinal Fluid Samples by UPLC-MS/MS: Discovery of Intact Glucuronide and Sulfate Conjugates. Online. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 6. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068007>. [cit. 2024-02-25].

- [24] CARDOSO, Mariana Silva; ROCHA, Andrea Rebouças; SOUZA-JÚNIOR, José Antônio a MENEZES-FILHO, José Antonio. Analytical method for urinary homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid levels using HPLC with electrochemical detection applied to evaluate children environmentally exposed to manganese. Online. *Biomedical Chromatography*. 2023, roč. 37, č. 10. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.5699>. [cit. 2024-03-02].
- [25] MEISER, Johannes; WEINDL, Daniel a HILLER, Karsten. Complexity of dopamine metabolism. Online. *Cell Communication and Signaling*. 2013, roč. 11, č. 1. ISSN 1478-811X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-34>. [cit. 2024-04-02].
- [26] FILIPOVSKÁ, Eva. *Vliv endokannabinoidního systému na světelnou synchronizaci cirkadiánního systému potkana*. Diplomová práce. Praha: Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta, 2018.
- [27] RODRÍGUEZ DE FONSECA, FERNANDO; DEL ARCO, IGNACIO; BERMUDEZ-SILVA, FRANCISCO JAVIER; BILBAO, AINHOA; CIPPITELLI, ANDREA et al. THE ENDOCANNABINOID SYSTEM: PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY. Online. *Alcohol and Alcoholism*. 2005, roč. 40, č. 1, s. 2-14. ISSN 1464-3502. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh110>. [cit. 2024-02-25].
- [28] KARABOWICZ, Piotr; GRZĘDA, Emilia; BARANOWSKA-KUCZKO, Marta a MALINOWSKA, Barbara. Role of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the physiology and pathophysiology of the cardiovascular system. Online. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2014, roč. 68, s. 814-827. ISSN 1732-2693. Dostupné z: <https://doi.org/10.5604/17322693.1108875>. [cit. 2024-02-25].
- [29] AUTOR, Nenalezený. *CAS SciFinder®*. Online. CAS. Dostupné z: <https://www.cas.org/solutions/cas-scifinder-discovery-platform/cas-scifinder-n>. [cit. 2024-04-10].

- [30] VILLANI, Salvatore; FALLARINI, Silvia; REZZI, Sarah Jane; DI MARTINO, Rita Maria Concetta; APRILE, Silvio et al. Selective inhibition of indoleamine and tryptophan 2,3-dioxygenases: Comparative study on kynurenine pathway in cell lines via LC-MS/MS-based targeted metabolomics. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2024, roč. 237. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115750>. [cit. 2024-03-02].
- [31] CARDOSO, Mariana Silva; ROCHA, Andrea Rebouças; SOUZA-JÚNIOR, José Antônio a MENEZES-FILHO, José Antonio. Analytical method for urinary homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid levels using HPLC with electrochemical detection applied to evaluate children environmentally exposed to manganese. Online. *Biomedical Chromatography*. 2023, roč. 37, č. 10. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.5699>. [cit. 2024-03-03].
- [32] LIU, Mingxia; HE, Jing; RUAN, Canjun; PAN, Weigang; MAO, Peixian et al. Simultaneous measurement of amino acid enantiomers in the serum of late-life depression patients using convenient LC–MS/MS method with N $\alpha$ -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-l-leucinamide Derivatization. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023, roč. 230. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115387>. [cit. 2024-03-02].
- [33] ZHUANG, Kangyuan; ZHANG, Jialin; FAN, Chunlin; YAO, Zhiyi a ZHANG, Zijuan. Determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid in fermented soybean products by HPLC coupled with pre-column derivatization. Online. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2023, roč. 119. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105248>. [cit. 2024-03-02].

- [34] WANG, Yichen; ZHENG, Renjin; WU, Pingping; WU, Youjia; HUANG, Lingyi et al. Determination of Multiple Neurotransmitters through LC-MS/MS to Confirm the Therapeutic Effects of *Althaea rosea* Flower on TTX-Intoxicated Rats. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 10. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28104158>. [cit. 2024-03-02].
- [35] DAVLA, Sejal; DALY, Edward; NEDOW, Jenn; GRITSAS, Ari; CURRAN, Laura et al. An LC-MS/MS method for simultaneous analysis of up to six monoamines from brain tissues. Online. *Journal of Chromatography B*. 2023, roč. 1216. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123604>. [cit. 2024-03-02].
- [36] SHEN, Ying; LUO, Xia; LI, Huijun; CHEN, Zhongju; GUAN, Qing et al. Simple and reliable serotonin assay in human serum by LC-MS/MS method coupled with one step protein precipitation for clinical testing in patients with carcinoid tumors. Online. *Journal of Chromatography B*. 2020, roč. 1158. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122395>. [cit. 2024-03-03].
- [37] DE JONG, Wilhelmina H.A.; GRAHAM, Kendon S.; DE VRIES, Elisabeth G.E. a KEMA, Ido P. Urinary 5-HIAA measurement using automated on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Chromatography B*. 2008, roč. 868, č. 1-2, s. 28-33. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.009>. [cit. 2024-03-05].
- [38] OXELBARK, Joakim a LÖVENHAMN, Annicka. Ultrafast LC-MS/MS analysis of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in serum. Online. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2021, roč. 81, č. 5, s. 401-405. ISSN 0036-5513. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00365513.2021.1930141>. [cit. 2024-03-05].

- [39] STEPHANSON, Nikolai; HELANDER, Anders a BECK, Olof. Alcohol biomarker analysis: simultaneous determination of 5-hydroxytryptophol glucuronide and 5-hydroxyindoleacetic acid by direct injection of urine using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007, roč. 42, č. 7, s. 940-949. ISSN 1076-5174. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jms.1231>. [cit. 2024-03-05].
- [40] WANG, Haoran; ZHANG, Xiaoqing; ZHEN, Qianna; ZOU, Wenbi; CHEN, Hong et al. Detection of spot urinary free metanephrines and 3-methoxytyramine with internal reference correction for the diagnosis of pheochromocytomas and paragangliomas. Online. *Journal of Chromatography B*. 2020, roč. 1156. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122306>. [cit. 2024-03-03].
- [41] CARREÑO, Fernando; HELFER, Victória Etges; STAUDT, Keli Jaqueline; OLIVO, Laura Bem; BARRETO, Fabiano et al. Quantification of neurotransmitters in microdialysate samples following quetiapine dosing to schizophrenia phenotyped rats using a validated LC-MS/MS method. Online. *Journal of Chromatography B*. 2020, roč. 1155. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122282>. [cit. 2024-03-03].
- [42] WANG, Li-Sha; ZHANG, Meng-Di; TAO, Xue; ZHOU, Yun-Feng; LIU, Xin-Min et al. LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice. Online. *Journal of Chromatography B*. 2019, roč. 1112, s. 24-32. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.021>. [cit. 2024-03-03].
- [43] LIU, Hui; LIU, Na; TENG, Wenfeng a CHEN, Jing. Study on a dSPE-LC-MS/MS method for lysophosphatidylcholines and underivatized neurotransmitters in rat brain tissues. Online. *Journal of Chromatography B*. 2018, roč. 1096, s. 11-19. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.040>. [cit. 2024-03-03].

- [44] POLICE, Anitha; SHANKAR, Vijay Kumar a NARASIMHA MURTHY, S. RP-HPLC method for simultaneous estimation of vigabatrin, gamma-aminobutyric acid and taurine in biological samples. Online. *Journal of Chromatography B*. 2018, roč. 1076, s. 44-53. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.010>. [cit. 2024-03-03].
- [45] BUSARDÒ, Francesco Paolo; KYRIAKOU, Chrystalla; MARCHEI, Emilia; PACIFICI, Roberta; PEDERSEN, Daniel Sejer et al. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, roč. 137, s. 123-131. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.022>. [cit. 2024-03-05].
- [46] ZANDY, Shannon L.; DOHERTY, James M.; WIBISONO, Nathan D. a GONZALES, Rueben A. High sensitivity HPLC method for analysis of in vivo extracellular GABA using optimized fluorescence parameters for o-phthalaldehyde (OPA)/sulfite derivatives. Online. *Journal of Chromatography B*. 2017, roč. 1055-1056, s. 1-7. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.003>. [cit. 2024-03-03].
- [47] MORAES, Edinaldo Rogério da Silva; GRISOLIA, Alan Barroso Araújo; OLIVEIRA, Karen Renata Matos; PICANÇO-DINIZ, Domingos Luiz Wanderley; CRESPO-LÓPEZ, Maria Elena et al. Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (HPLC) in preparations of retinal tissue. Online. *Journal of Chromatography B*. 2012, roč. 907, s. 1-6. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.027>. [cit. 2024-03-03].



- [48] NGUYEN, A.T.; AERTS, T.; VAN DAM, D. a DE DEYN, P.P. Biogenic amines and their metabolites in mouse brain tissue: Development, optimization and validation of an analytical HPLC method. Online. *Journal of Chromatography B*. 2010, roč. 878, č. 29, s. 3003-3014. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.09.019>. [cit. 2024-03-03].
- [49] GRECCO, Caroline Fernandes; MIRANDA, Luis Felipe Cabral a COSTA QUEIROZ, Maria Eugênia. Aminopropyl hybrid silica monolithic capillary containing mesoporous SBA-15 particles for in-tube SPME-HILIC-MS/MS to determine levodopa, carbidopa, benserazide, dopamine, and 3-O-methyldopa in plasma samples. Online. *Microchemical Journal*. 2020, roč. 157. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105106>. [cit. 2024-03-03].
- [50] BIDEL, Flavie; CORVAISIER, Sophie; JOZET-ALVES, Christelle; POTTIER, Ivannah; DAUPHIN, François et al. An HPLC-ECD method for monoamines and metabolites quantification in cuttlefish (cephalopod) brain tissue. Online. *Biomedical Chromatography*. 2016, roč. 30, č. 8, s. 1175-1183. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.3663>. [cit. 2024-03-03].
- [51] MUSTAFA, Gulam; AHMAD, Niyaz; BABOOTA, Sanjula; ALI, Javed a AHUJA, Alka. UHPLC/ESI-Q-TOF-MS method for the measurement of dopamine in rodent striatal tissue: A comparative effects of intranasal administration of ropinirole solution over nanoemulsion. Online. *Drug Testing and Analysis*. 2013, roč. 5, č. 8, s. 702-709. ISSN 1942-7603. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/dta.1426>. [cit. 2024-03-03].
- [52] LI, Li; CHEN, Naijiang; GU, Puzhong; LI, Honglei; LI, Mengqing et al. Quantitation of Four Tryptophan-Related Impurities in Compound Amino Acid Injection-18 AA by HPLC-PDA. Online. *Chromatographia*. 2020, roč. 83, č. 2, s. 205-217. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03847-1>. [cit. 2024-03-05].

- [53] WU, Dong; XIE, He; LU, Haifeng; LI, Wei a ZHANG, Qunlin. Sensitive determination of norepinephrine, epinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine by coupling HPLC with  $[Ag(HIO_6)_2]^{5-}$ –luminol chemiluminescence detection. Online. *Biomedical Chromatography*. 2016, roč. 30, č. 9, s. 1458-1466. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.3704>. [cit. 2024-03-03].
- [54] TONG, Qing; SONG, Jia; YANG, Guangjie; FAN, Li; XIONG, Wei et al. Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, xanthurenic acid and 5-hydroxytryptamine in human plasma by LC-MS/MS and its application to acute myocardial infarction monitoring. Online. *Biomedical Chromatography*. 2018, roč. 32, č. 4. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.4156>. [cit. 2024-03-03].
- [55] MILLER, Adrian G.; BROWN, Heather; DEGG, Tim; ALLEN, Keith a KEEVIL, Brian G. Measurement of plasma 5-hydroxyindole acetic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry—Comparison with HPLC methodology. Online. *Journal of Chromatography B*. 2010, roč. 878, č. 7-8, s. 695-699. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.01.010>. [cit. 2024-03-05].
- [56] SU, Fenli; WANG, Feng; ZHU, Ronghua a LI, Huande. Determination of 5-Hydroxytryptamine, Norepinephrine, Dopamine and Their Metabolites in Rat Brain Tissue by LC–ESI–MS–MS. Online. *Chromatographia*. 2009, roč. 69, č. 3-4, s. 207-213. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0879-9>. [cit. 2024-03-05].
- [57] KARIMI, Morvarid; CARL, Juanita L.; LOFTIN, Susan a PERLMUTTER, Joel S. Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. Online. *Journal of Chromatography B*. 2006, roč. 836, č. 1-2, s. 120-123. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.027>. [cit. 2024-03-05].

- [58] FUERTIG, René; CECI, Angelo; CAMUS, Sandrine M; BEZARD, Erwan; LUIPPOLD, Andreas H et al. LC–MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain. Online. *Bioanalysis*. 2016, roč. 8, č. 18, s. 1903-1917. ISSN 1757-6180. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0111>. [cit. 2024-03-05].
- [59] DEFAIX, Celine; SOLGADI, Audrey; PHAM, Thu Ha; GARDIER, Alain M.; CHAMINADE, Pierre et al. Rapid analysis of glutamate, glutamine and GABA in mice frontal cortex microdialysis samples using HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, roč. 152, s. 31-38. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.039>. [cit. 2024-03-05].
- [60] SYSLOVÁ, Kamila; RAMBOUSEK, Lukáš; KUZMA, Marek; NAJMANOVÁ, Věra; BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ, Věra et al. Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: Method combining freeze-drying with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Chromatography A*. 2011, roč. 1218, č. 21, s. 3382-3391. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.006>. [cit. 2024-03-05].
- [61] SUSTKOVA-FISEROVA, Magdalena; JERABEK, Pavel; HAVLICKOVA, Tereza; KACER, Petr a KRŠIAK, Miloslav. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. Online. *Psychopharmacology*. 2014, roč. 231, č. 14, s. 2899-2908. ISSN 0033-3158. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3466-9>. [cit. 2024-03-05].

- [62] KONIECZNA, Lucyna; ROSZKOWSKA, Anna; STACHOWICZ-STENCEL, Teresa; SYNAKIEWICZ, Anna a BĄCZEK, Tomasz. Bioanalysis of a panel of neurotransmitters and their metabolites in plasma samples obtained from pediatric patients with neuroblastoma and Wilms' tumor. Online. *Journal of Chromatography B*. 2018, roč. 1074-1075, s. 99-110. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.031>. [cit. 2024-03-05].
- [63] RICHARD, Vincent R.; ZAHEDI, René P.; EINTRACHT, Shaun a BORCHERS, Christoph H. An LC-MRM assay for the quantification of metanephrines from dried blood spots for the diagnosis of pheochromocytomas and paragangliomas. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2020, roč. 1128, s. 140-148. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.020>. [cit. 2024-03-05].
- [64] KIRKWOOD, Jay S.; BROECKLING, Corey D.; DONAHUE, Seth a PRENNI, Jessica E. A novel microflow LC-MS method for the quantitation of endocannabinoids in serum. Online. *Journal of Chromatography B*. 2016, roč. 1033-1034, s. 271-277. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.035>. [cit. 2024-03-03].
- [65] GARST, Christopher; FULMER, Makenzie; THEWKE, Doug a BROWN, Stacy. Optimized extraction of 2-arachidonyl glycerol and anandamide from aortic tissue and plasma for quantification by LC-MS/MS. Online. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2016, roč. 118, č. 5, s. 814-820. ISSN 1438-7697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500115>. [cit. 2024-03-05].
- [66] BÉQUET, Frédéric; UZABIAGA, Françoise; DESBAZEILLE, Mathieu; LUDWICZAK, Pascal; MAFTOUH, Mohamed et al. CB1 receptor-mediated control of the release of endocannabinoids (as assessed by microdialysis coupled with LC/MS) in the rat hypothalamus. Online. *European Journal of Neuroscience*. 2007, roč. 26, č. 12, s. 3458-3464. ISSN 0953-816X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05900.x>. [cit. 2024-03-05].

- [67] JIAN, Wenying; EDOM, Richard; WENG, Naidong; ZANNIKOS, Peter; ZHANG, Zhiming et al. Validation and application of an LC–MS/MS method for quantitation of three fatty acid ethanolamides as biomarkers for fatty acid hydrolase inhibition in human plasma. Online. *Journal of Chromatography B*. 2010, roč. 878, č. 20, s. 1687-1699. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.024>. [cit. 2024-03-10].
- [68] GACHET, María Salomé; RHYN, Peter; BOSCH, Oliver G.; QUEDNOW, Boris B. a GERTSCH, Jürg. A quantitative LC-MS/MS method for the measurement of arachidonic acid, prostanooids, endocannabinoids, N-acylethanolamines and steroids in human plasma. Online. *Journal of Chromatography B*. 2015, roč. 976-977, s. 6-18. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.001>. [cit. 2024-03-03].
- [69] PAUDEL, Kalpana S.; CHEN, Jing a STINCHCOMB, Audra L. LC–MS Method for the Pharmacokinetic Evaluation of 2-Arachidonoyl Glycerol in Small Volume Plasma Samples. Online. *Chromatographia*. 2010, roč. 71, č. 1-2, s. 65-70. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1413-4>. [cit. 2024-03-05].
- [70] PALANDRA, Joe; PRUSAKIEWICZ, Jeff; OZER, Josef S.; ZHANG, Yanhua a HEATH, Timothy G. Endogenous ethanolamide analysis in human plasma using HPLC tandem MS with electrospray ionization. Online. *Journal of Chromatography B*. 2009, roč. 877, č. 22, s. 2052-2060. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.043>. [cit. 2024-03-05].
- [71] NEY, Luke J.; FELMINGHAM, Kim L.; BRUNO, Raimondo; MATTHEWS, Allison a NICHOLS, David S. Chloroform-based liquid-liquid extraction and LC–MS/MS quantification of endocannabinoids, cortisol and progesterone in human hair. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021, roč. 201. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114103>. [cit. 2024-03-05].

- [72] BOBRICH, Maria; SCHWARZ, Rico; RAMER, Robert; BORCHERT, Philipp a HINZ, Burkhard. A simple LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of endocannabinoids in biological samples. Online. *Journal of Chromatography B*. 2020, roč. 1161. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122371>. [cit. 2024-03-02].