



27. ročník Školy hmotnostní spektrometrie
pořádaný Spektroskopickou společností Jana Marka Marci

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

**„HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE:
OD NÁVRHU EXPERIMENTU K INTERPRETACI DAT“**

Wellness Hotel Frymburk, 21. – 25. 9. 2026



SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

Úterý 22.9.2026, 13:30 – 14:30 ... lichá čísla

Čtvrtek 24.9.2026, 13:30 – 14:30 ... sudá čísla

1. **Matyáš Crhák, Vítězslav Maier** – LC-MS/MS metoda pro rychlé stanovení semisyntetických kanabinoidů (SEC) v krevním séru pro klinickou a forenzní toxikologii
2. **Kseniya Dryahina, Miroslav Polášek, Patrik Španěl** – Comparison of direct injection mass spectrometry (DIMS) methods for trace VOC detection
3. **Viktória Ďurčová, Marta Pelcová, Pavel Šmak, Ondřej Peš, Ondřej Strýček, Zdeněk Glatz, Jan Juřica** – Analysis of dried blood spots for therapeutic drug monitoring of antiseizure drugs by UHPLC-MS/MS
4. **Klára Faistauerová, Kateřina Plachká, Veronika Pilařová, Filip Bařinka, Lucie Nováková, Irena Murínová, Dalibor Šatínský** – Selektivní stanovení infliximabu a jeho neutralizačních a ne-neutralizačních protilátek s UHPLC-MS/MS
5. **Tadeáš Grabic, Vladimír Vrkoslav, Miroslav Polášek, Josef Cvačka** – Strukturní analýza diesterů mastných kyselin s 1,2-dioly pomocí UVPD fragmentace
6. **Vojtěch Hlavička, Vilém Neděla** – Integration of a mass spectrometer with a differential pumping systém and an ionization detector of signal electrons for A-ESEM and SEM analysis
7. **Simona Horkelová, Dušan Koval, Renáta Konášová, Václav Kašička** – Vývoj a optimalizace CZE metody kompatibilní s hmotnostní spektrometrií pro charakterizaci monoklonálních protilátek v podmínkách blízkých nativnímu stavu
8. **Miloš Hroch, Marian Kacerovský, Linda Petráčková, Stanislav Mičuda** – Novel high-throughput FA-D- μ SPE LC-MS/MS workflow for quantitative profiling of urinary bile acid sulfates
9. **Tereza Jablonská, Ondřej Brabenec, Jana Hajšlová** – UHPLC-HRMS/MS jako nástroj komplexního studia glykoalkaloidů a jejich degradačních produktů

10. **Juraj Jašík, Christoph Schäfer, Patrik Španěl** – A linear quadrupole ion trap approach to quantitative trace VOC analysis
11. **Martina Kadláčková, Aleš Kvasnička, Richard Masař, Jakub Rozhon, Markéta Trajerová, Eva Kriegová, David Friedecký, Radana Brumarová, Jiří Gallo** – Lipidomika synoviální tekutiny pro identifikaci kompozitního biomarkeru infekční artritidy
12. **Renáta Konášová, Dušan Koval, Milan Vrábel, Simona Horkelová, Václav Kašička** – Analysis of trastuzumab digestion products by capillary electrophoresis with nano sheath liquid flow interface for ESI/MS detection
13. **Dominik Krupka, Helena Řehulková, Alžběta Dlabková** – Analýza triethanolaminu v plazmě jako průkaz otravy dusíkatým yperitem
14. **Petr Kučera, Jakub Tomáško, Ondřej Pařízek, Tomáš Gramblička, Jana Pulkrabová** – Endokrinní disruptory v jedlém hmyzu a potravinách na bázi hmyzu
15. **Ivana Lemak, Peter Kotora, Matej Horváth, Svetlana Hrouzková** – Development of a method for efficient separation and detection of *N*-nitrosamines in cyclizine using APCI-HPLC-MS/MS
16. **René Lenobel, Jaroslava Friedecká, Natálie Zemánková, Hana Svobodová, David Friedecký, Ondřej Novák** – Porovnání způsobů zpracování lidského séra pro necílenou LC–MS proteomiku a peptidomiku
17. **Dita Leštinová, Marie Suchanová** – Stanovení FTOH pomocí GC-MS/MS
18. **Jan Macháň, Vojtěch Sedláček, Richard Masař, Martin Trnečka, Lukáš Najdekr** – PySPRESSO: Python framework pro reprodukovatelné a automatizované zpracování LC–MS dat
19. **Richard Masař, Martina Kadláčková, Martina Skácelová, Jakub Rozhon, Eliška Ivanovová, Markéta Dudková, Pavel Horák, David Friedecký** – Lipidomická LC-MS/MS analýza a hodnocení CERT skóre u pacientů se systémovým lupusem erythematodes a lupusem nephritis
20. **Klára Odehnalová, Blahoslav Maršálek, Štěpán Zezulka, Pavel Sťahel, Radek Horňák, Pavel Rudolf, Martin Hudec** – CaviPlasma: Advanced technology for the decontamination of cyanobacteria and cyanotoxins
21. **Veronika Pilařová, Tereza Šlapáková, Ondřej Horáček, Lucie Nováková, Bohumír Grüner, Radim Kučera** – UHPSFC-MS/MS as a tool for the fast analysis of pharmaceutically relevant boron cluster compounds
22. **Kateřina Plachká, Štefan Kosturko, Veronika Pilařová, Šimon Koblížek, Šimon Vaněk, Lucie Nováková** – Analysis of harmful estragole and other terpenes in fennel tea by high-temperature supercritical fluid chromatography-APCI-MS/MS

23. **Kateřina Pražáková, Kateřina Plachká, Štefan Kosturko, Filip Bařinka, Lucie Nováková** – Vliv složení přídavné kapaliny na ionizační účinnost a tvorbu aduktů v SFC-ESI-MS
24. **Jakub Rozhon, Martina Kadláčková, Richard Masař, Balnka Stibůrková, Radana Brumarová, David Friedecký** – Plazmatický lipidom pacientů trpících autoimunitními revmatickými onemocněními: Potenciální prediktor kardiovaskulárního rizika
25. **Anatolii Spesyvyi, Chen Wang, Ales Charvat, Heber Barragán-Mayet, Marek Cebecauer, Agnieszka Olżyńska, Miroslav Polášek, Ján Žabka, Bernd Abel** – Lipid fragment anions desorbed from membrane in single-vesicle hypervelocity impacts
26. **Lucie Stará, Tomáš Kouřimský, Beverly Hradecká, Jana Hajšlová** – Charakterizace profilu fenolických látek a dalších sekundárních metabolitů ve slunečnicovém proteinovém koncentrátu metodou UHPLC-HRMS/MS
27. **Barbora Strasserová, Lucie Stará, Beverly Hradecká, Jana Hajšlová, Lenka Dědinová, Aristeidis S. Tsagkaris** – Porovnání enzymatické metody a UHPLC-HRMS pro stanovení volného L-asparaginu v cereáliích
28. **Václava Škopová, Olsa Součková, Stanislav Kmoch, Marie Zikánová** – Diagnostický význam věkově specifických referenčních rozmezí metabolitů *de novo* syntézy purinů v moči
29. **Pavel Šmak, Jana Gregorová, Katarína Kostolánská, Jakub Vanko, Libor Ustohal, Eliška Bartečková, Marta Vyoralová, Jan Juřice, Ondřej Peš** – Stanovení vlasového kortizolu pomoci online SPE LC/MS u pacientů se schizofrenií
30. **Hana Tlačilová, Andrea Vojs Staňová** – Vývoj a validace HPLC-MS/MS metody pro sledování 12 prioritizovaných polutantů ve vodách a hodnocení účinnosti pokročilých čistících technologií
31. **Andrea Vernerová, Lucie Oravová, Jan Snow, Rudi P. Nielsen, Anna Tode, Ditte Højland, Morten E. Simonsen, Antoine Vardon, Pavel Kuráň** – Development of an analytical methodology for PFAS determination in textile recycling process matrices
32. **Zuzana Vosáhllová, Veronika Šubrtová, Ondřej Peterka, Robert Jirásko, Michal Holčapek** – Development of HILIC-MS methodology for the analysis of miRNA
- 33.* **Antonín Bednařik** – Basic Fuchsin – nová víceúčelová MALDI matrice pro multimodální zobrazování klinických tká

Pokyny pro prezentaci plakátových sdělení:

- Prosíme všechny prezentující, aby svá plakátová sdělení vyvěsili nejpozději během pondělního odpoledne.
- Žádáme prezentující, aby byli u svých plakátových sdělení přítomni v době 13:30 – 14:30 v úterý 22. 9. 2026 (lichá čísla) nebo ve čtvrtek 24. 9. 2026 (sudá čísla).
- Další diskuze může probíhat kdykoliv v průběhu přestávek.
- Hodnocení plakátových sdělení provedou členové hodnotící komise.
- Vyhlášení oceněných sdělení proběhne v pátek 25. 9. 2026 během závěrečné přednášky.

Plakátová sdělení – abstrakty

LC-MS/MS METODA PRO RYCHLÉ STANOVENÍ SEMISYNTETICKÝCH KANABINOIDŮ (SEC) V KREVNÍM SÉRU PRO KLINICKOU A FORENZNÍ TOXIKOLOGII

MATYÁŠ CRHÁK ¹, VÍTEŽSLAV MAIER ²

¹ Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Ústav farmakologie, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc, Česká republika

² Ústav soudního lékařství a medicínského práva, Fakultní nemocnice Olomouc, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc, Česká republika

E-mail: matyas.crhak01@upol.cz

Úvod:

Semisyntetické kanabinoidy (SEC) jsou v současnosti uváděny na trh jako náhražky THC, často ve formě vape produktů, edibles výrobků nebo konopných květů s nástřikem SEC. Mezi dosud popsané SEC patří zejména H4-CBD, Δ9-THC-C8 (THC-JD), Δ9-THC-V, Δ9-THC-B, Δ9-THC-P, HHC, HHC-O, HHC-P, HHC-B, HHC-H a HHC-C8. SEC jsou záměrně odvozeny od struktury THC či CBD, jako časté strukturní modifikace je využívána např. hydrogenace, acylace nebo modifikace alkylového řetězce. Tyto modifikace ovlivňují afinitu k CB1 receptorům, farmakokinetiku a výslednou závažnost intoxikace, přičemž skutečná účinná dávka je pro uživatele obtížně predikovatelná. Zároveň zůstává farmakologický a toxikologický profil SEC, včetně jejich metabolismu a dlouhodobých zdravotních dopadů, z velké části nedostatečně charakterizován. Od roku 2022 je evropskou agenturou EUDA monitorováno již několik desítek těchto látek¹. Cílem této práce bylo vyvinout rychlou, selektivní a dostatečně citlivou metodu pro stanovení vybraných SEC pomocí LC-MS (QTrap) v krevním séru s využitím co nejjednodušší metody přípravy vzorku. Dále byly s využitím mikrosomální metabolisme připraveny produkty I. fáze metabolismu vybraných SEC, které jsou důležité pro potvrzení jejich užití.

Metodika:

V rámci práce byla vyvinuta metoda pro LC-MS analýzu CBD, H4-CBD, Δ9-THC, Δ9-THC-C8 (THC-JD), Δ9-THC-V, Δ9-THC-B, Δ9-THC-P, 11-OH-THC, 11-nor-9-karboxy-THC, HHC, HHC-O, HHC-P, HHC-B, HHC-H a HHC-C8. Měření bylo provedeno s využitím kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (trojitý kvadrupól/lineární iontová past) na přístroji AB Sciex QTRAP 6500+ s kapalinovou chromatografií Shimadzu Nexera X3. Chromatografická separace probíhala na koloně Luna Omega Polar C18 1.6 mm (100 × 2,1 mm) při 40 °C s využitím gradientové eluce (mobilní fáze A: voda s přidavkem 0,1 % mravenčí kyseliny; mobilní fáze B: methanol s přidavkem 0,1 % mravenčí kyseliny). Celkový čas analýzy byl 22 min., nástřik vzorků 10 µl. Měření na trojitém kvadrupólu probíhalo s využitím monitorování charakteristických fragmentačních přechodů (MRM – multiple reaction monitoring). Pro přípravu vzorku byla použita jednoduchá deproteinace; pro analýzu bylo využito 50 µL krevního séra.

V rámci studie byla provedena in vitro inkubace vybraných SEC s frakcí lidských jaterních mikrosomů (délka inkubace: 30 min) za účelem přípravy metabolitů I. fáze. Připravené metabolity I. fáze byly následně využity pro spolehlivější identifikaci jednotlivých SEC v biologickém materiálu, a to i přesto, že nejde o komerčně dostupné standardy.

Výsledky a diskuze:

Většina dosavadních postupů pro analýzu kanabinoidů v krevním séru využívá většího objemu vzorku a jeho složitější úpravu (např. 1 ml vzorku, L-L extrakci a následné zakoncentrování). Pro rychlou kvantitativní analýzu je zjednodušení přípravy a snížení objemu vzorku významným faktorem. Minimální objem vzorku zároveň umožňuje provést analýzu opakovaně i v případě, kdy je k dispozici minimum biologického materiálu (klinické i forenzní vzorky).

Vyvinutý postup umožňuje stanovení většiny dostupných a známých SEC analýzou v délce 22 min s limitem kvantifikace 1 ng/mL. Vyvinutá LC-MS/MS metoda byla aplikována na reálné vzorky krevního séra. Metoda

byla aplikována i pro měření vzorků mezinárodního mezilaboratorního porovnání (QSA) pro stanovení THC a jeho hlavních metabolitů (11-OH-THC a THC-COOH).

Závěry:

Byla vyvinuta rychlá, selektivní a citlivá LC-MS/MS metoda pro stanovení vybraných SEC v krevním séru s jednoduchou přípravou vzorků a minimální spotřebou biologického materiálu. Metoda umožňuje stanovení SEC v koncentracích relevantních pro klinickou i forenzní toxikologii. In vitro generované metabolity I. fáze byly využity k posílení spolehlivé identifikace SEC a jejich hlavních biotransformačních produktů.

Proč je prezentovaná studie významná:

Prezentovaná studie představuje rychlou a kvantitativní LC-MS/MS metodu pro stanovení širokého spektra SEC v krevním séru, navrženou s ohledem na potřeby klinické a forenzní toxikologie. Jednoduchá příprava vzorku s minimálním použitým objemem séra a dostatečná citlivost umožňují efektivní screening i kvantifikaci SEC. Využití metabolitů I. fáze studovaných SEC vede ke spolehlivějšímu průkazu užití SEC a zpřesňuje interpretaci u intoxikací SEC.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Doktorand – Toxikologie (1. ročník).

Literatura:

1. Ujváry I.: Drug Test. Anal. 16, 127 (2024). <https://doi.org/10.1002/dta.3519>.

Autoři děkují podpoře MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892) a IGA UPOL LF_2026_006.

COMPARISON OF DIRECT INJECTION MASS SPECTROMETRY (DIMS) METHODS FOR TRACE VOC DETECTION

KSENIYA DRYAHINA¹, MIROSLAV POLÁŠEK¹, PATRIK ŠPANĚL¹

¹ Heyrovského ústav AV ČR, v. v. i., Česko

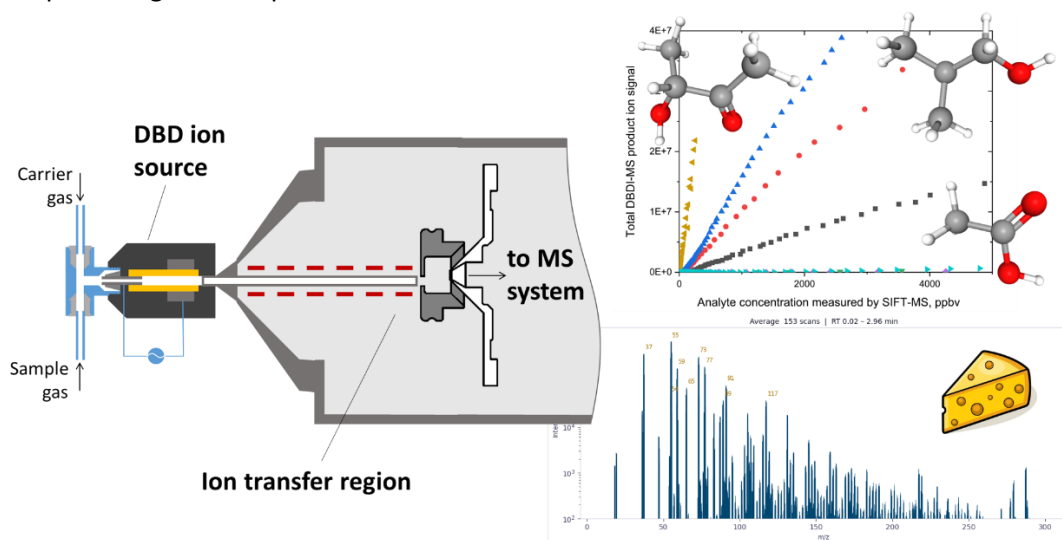
e-mail: kseniya.dryahina@heu.cas.cz

Introduction:

Direct Injection Mass Spectrometry (DIMS) represents a group of analytical approaches that combine direct sample introduction with soft ionisation and mass spectrometric detection, enabling rapid, real-time analysis of volatile organic compounds (VOCs) without chromatographic separation. Among the most widely used DIMS techniques are Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS), Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS), Secondary Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (SESI-MS), and various forms of ambient pressure chemical ionisation, including Dielectric Barrier Discharge Ionisation Mass Spectrometry (DBDI-MS)¹. These techniques differ in their ionisation mechanisms, reagent ion chemistry, sensitivity, and quantitative capabilities, which determine their suitability for specific applications.

Methods:

The analytical sensitivity of an active capillary DBDI-MS (SICRIT® by Plasmion GmbH, Augsburg, DE) was determined for a range of volatile compounds, including key VOCs relevant to food and breath analysis. To obtain quantitative data, DBDI-MS total product ion intensities were compared with concentrations measured by SIFT-MS. Furthermore, the performance of active capillary DBDI-MS is compared with other established DIMS techniques using real samples.



Results and Discussion:

In summary, the sensitivity of active capillary DBDI-MS varies significantly with the size and the chemical nature of the analyte molecule. The inferred ionisation mechanism relies on the formation of hydrated hydronium ions in humidified discharge gas. These ions then react by ligand switching with analyte molecules, forming hydrated protonated molecules that are dehydrated further downstream. Their composition and intensity are influenced by the temperature of the ion transfer tube, the humidity of the discharge gas² and other parameters. Understanding this chemistry is essential for (hopefully accurate) quantitation of trace amounts of VOC vapours using active capillary DBDI-MS.

Conclusions:

Whilst active capillary DBDI ion sources (like SICRIT® by Plasmion) are miniature, easy-to-install attachments to conventional MS instruments, the advantage of their simplicity and potential great sensitivity comes at the expense of complicated chemistry and quantitative sensitivity affected by multiple factors.

Why is the presented study significant:

This study provides a comparison of established DIMS techniques with the commercially successful DBDI-MS technique for trace VOC detection using both standard compounds and real samples. The results improve understanding of the factors governing DBDI-MS sensitivity and quantitative performance.

Current study/work position of the first author:
scientist

¹ Dryahina K., Polášek M., Jašík J., Sovová K., Španěl P.: Ion Chemistry in Dielectric Barrier Discharge Ionization: Recent Advances in Direct Gas Phase Analyses. *Mass Spectrometry Reviews* 45, 193 (2026).

² Polášek M., Španěl P., Dryahina K.: Effect of Humidity on Ionisation and Ion Chemistry in Active-Capillary Dielectric Barrier Discharge Ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 40, e70130 (2026).

The authors gratefully acknowledge financial support from the Czech Science Foundation (Grantová agentura České republiky, GAČR) for the project No. 24-12564S "Understanding the mechanisms of ion-molecule reactions in dielectric barrier discharge ionisation (DBDI) leading to quantification of volatiles in gas" (2024-2026).

ANALYSIS OF DRIED BLOOD SPOTS FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF ANTISEIZURE DRUGS BY UHPLC–MS/MS

VIKTÓRIA ĎURČOVÁ¹, MARTA PELCOVÁ¹, PAVEL ŠMAK², ONDŘEJ PEŠ², ONDŘEJ STRÝČEK³, ZDENĚK GLATZ¹, JAN JUŘICA^{4,5}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic,

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic,

³Brno Epilepsy Centre, First Department of Neurology, St. Anne's University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University

⁴Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Masaryk University Brno, Czech Republic

⁵Hospital Pharmacy, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

e-mail: viktor.durcova@med.muni.cz

Introduction

Epilepsy is a common chronic neurological disorder treated primarily with antiseizure medications (ASMs). Therapeutic drug monitoring (TDM) is an important tool for optimizing therapy and addressing interindividual pharmacokinetic variability. Conventional TDM requires venous blood sampling, whereas dried blood spots (DBS) offer a minimally invasive alternative created by applying a precisely measured amount of capillary blood onto a collection card, enabling simplified storage, transport, and potential for home-based sampling.

Methodology

The correlation between DBS and plasma concentrations of selected ASMs was evaluated. Lamotrigine, lacosamide, levetiracetam, and valproate were quantified using a UHPLC–MS/MS method. DBS samples were prepared from 45 µL of capillary blood collected on Whatman 903™ cards and extracted using a methanol/acetonitrile/water mixture containing isotopically labelled internal standards. Analysis was performed using a Dionex UltiMate 3000 RS system coupled to an AB Sciex QTRAP 6500+ mass spectrometer.

Results and Discussion

Strong correlations were observed between DBS and plasma concentrations for all investigated ASMs. Correlation coefficients were $r = 0.88$ for lamotrigine, $r = 0.98$ for lacosamide, $r = 0.85$ for levetiracetam, and $r = 0.95$ for valproate. DBS concentrations corresponded on average to 75%, 74%, 81%, and 54% of the respective plasma concentrations. The observed differences between DBS and plasma concentrations are likely related to matrix-specific factors, drug-dependent pharmacokinetic properties and varying degrees of protein binding.

Conclusions

DBS-based monitoring showed good agreement between plasma concentrations and DBS concentrations of the studied ASMs, supporting the use of this matrix as an alternative for TDM. The method combines minimal invasiveness with simple sample handling, making it promising for routine and decentralized patient monitoring.

Why is this study important?

The study demonstrates the potential of DBS as a practical alternative matrix for ASM monitoring. Its implementation could improve patient comfort, facilitate repeated sampling, and increase the accessibility of TDM, particularly for patients requiring long-term follow-up.

Acknowledgement: This work was supported by the Czech Health Research Council of the Ministry of Health of the Czech Republic under project No. NU23-08-00229.

SELEKTIVNÍ STANOVENÍ INFLIXIMABU A JEHO NEUTRALIZAČNÍCH A NE-NEUTRALIZAČNÍCH PROTILÁTEK S UHPLC–MS/MS

KLÁRA FAISTAUEROVÁ ¹, KATEŘINA PLACHKÁ ¹, VERONIKA PILAŘOVÁ ¹, FILIP BAŘINKA ¹, LUCIE NOVÁKOVÁ ¹,
IRENA MURÍNOVÁ ², DALIBOR ŠATÍNSKÝ¹

¹ Katedra analytické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Akademia Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Česká republika

² Katedra sociální a klinické farmacie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Akademia Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Česká republika

e-mail: faistauk@faf.cuni.cz

Úvod:

Účinnost biologické terapie založené na monoklonálních protilátkách klesá vlivem reakce imunitního systému pacienta na biolécivo. Imunitní systém produkuje obecné a neutralizační protilátky, takzvané „anti-drug antibodies“ (ADA), které se váží na biolécivo a brání jeho vazbě na receptor. Proto byla vyvinuta UHPLC–MS/MS metoda pro biologické léčivo infliximab (INF) a jeho ADA ve vzorcích krevního séra.

Metodika:

Sada Melon Gel pro purifikaci byla použita v prvním kroku přečištění INF společně s ostatními protilátkami typu imunoglobulin G z matrice krevního séra. Aktivní INF byl oddělen od jeho komplexů s neutralizačními ADA pomocí imunoafinitní SPE. Frakce volného INF a frakce INF s navázanými neutralizačními ADA byly enzymaticky štěpeny za vzniku peptidů. Přesná hmota peptidů byla určena vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií (HRMS), konkrétně s využitím orbitální pasti. Na základě těchto dat a databáze Skyline byly vybrány peptidy charakteristické pro INF. Tato data byla použita pro vývoj kvantifikační UHPLC–MS/MS metody s trojitým kvadrupólem. Zde byly pro charakteristické peptidy optimalizovány přechody v režimu SRM a následně také ionizační podmínky ESI s využitím přístupu statistického plánování experimentů. Se zapojením selektivní metody izolace INF a komplexů INF s ADA ze vzorku séra a UHPLC–MS/MS analýzou bylo možno stanovit poměr volného a neutralizovaného INF.

Výsledky a diskuze:

V jednotlivých krocích vývoje metody přípravy vzorku byla selektivita hodnocena pomocí výtěžnosti a vlivu matricových efektů. V prvním kroku byl optimalizován poměr vzorku séra k množství Melon Gelu, tak aby bylo docíleno dostatečného přečištění vzorku, minimalizaci vlivu matrice a zachování dostatečné výtěžnosti. Extrační výtěžnost po prvním kroku purifikace dosahovala 102% a vliv matricového efektu dosahoval 3751%. Po spojení kroku purifikace Melon Gelem s dalším krokem izolace INF s imunoafinitním SPE byla extrakční výtěžnost zachována a vliv matricového efektu minimalizován. Ve druhém kroku byla testována kapacita imunoafinitní SPE v rozmezí klinických koncentrací INF 3–8 µg/mL. Po ověření tvorby komplexů INF s oběma typy ADA byla stanovena afinita těchto komplexů k vázanému antigenu využívanému pro imunoafinitní SPE a byla provedena frakcionace aktivního INF od neutralizovaného INF. V posledním kroku byla pomocí optimalizovaného postupu a vyvinuté UHPLC–ESI–MS/MS metody stanovena koncentrace aktivního INF ve vzorcích séra pacientů.

Závěry:

Byla vyvinuta metoda přípravy vzorku pro UHPLC–MS/MS analýzu INF a jeho ADA ve vzorku krevního séra použitelná pro terapeutické sledování hladin INF.

Proč je prezentovaná studie významná:

Terapii biologickými léčivy založenými na monoklonálních protilátkách podstupují v České republice tisíce pacientů s dermatologickým onemocněním. Bohužel ale každoročně u stovky pacientů dojde ke změně,

přerušení nebo ukončení terapie v důsledku nedostatečné účinnosti, ekonomických důvodů nebo nežádoucích účinků. Vývoj metod pro terapeutické hodnocení hladiny volného a neutralizovaného biologického léčiva v krevním séru pacienta přispívá k objektivnímu hodnocení terapie, snížení ekonomické zátěže biologické léčby na zdravotnický systém a vyšší kvalitě zdraví pacientů.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Studentka doktorského studijního programu farmaceutická analýza

Tato práce vznikla s podporou projektu New Technologies for Translational Research in Pharmaceutical Sciences /NETPHARM, project ID CZ.02.01.01/00/22_008/0004607

STRUKTURNÍ ANALÝZA DIESTERŮ MASTNÝCH KYSELIN S 1,2-DIOLY POMOCÍ UVPD FRAGMENTACE

TADEÁŠ GRABIC^{1,2}, VLADIMÍR VRKOSLAV², MIROSLAV POLÁŠEK³, JOSEF CVAČKA^{1,2}

¹ Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, Česká republika

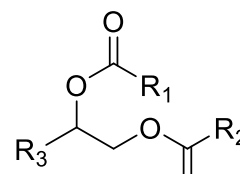
² Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Flemingovo náměstí 542/2, 160 00 Praha 6, Česká republika

³ Heyrovského ústav AV ČR, v. v. i., Dolejškova 2155/3, 182 00 Praha 8, Česká republika

e-mail: grabict@natur.cuni.cz

Úvod:

Diestery 1,2-diolů (1,2-DDE; obr. 1) jsou třídou lipidů, která se u člověka vyskytuje především v novorozeneckém mázku (*vernix caseosa*). Tyto lipidy mohou tvořit velké množství izomerů, jejichž struktury není možné určit bez fragmentačních experimentů. Standardní metodou fragmentace iontů je CID, při které jsou ionty aktivovány pomocí srážek s neutrálními molekulami v plynné fázi. Tento způsob aktivace však u 1,2-DDE neumožňuje určit polohy acylových skupin na řetězci diolu. Alternativní metodou



Obr. 1: 1,2-DDE

fragmentace je UVPD, během které je iont aktivován ozařováním UV fotony. Tento způsob aktivace může vést k reakcím Norrishova typu na esterové skupině.

Metodika:

Pro experiment byly použity standardy šesti různých 1,2-DDE. Tyto standardy byly naředěny do směsi iPrOH/MeOH/CHCl₃ (4:2:1) obsahující 2 mM mravenčan lithný tak, aby konečná koncentrace daného standardu činila 10 μmol/l. Výsledný roztok byl pomocí zdroje TriVersa NanoMate (Advion) zaváděn do hmotnostního spektrometru Orbitrap IQ-X Tribrid (Thermo Scientific). Lithné adukty 1,2-DDE byly izolovány pomocí iontové pasti (šířka izolačního okna 1 Da) a fragmentovány. Měřena byla CID fragmentace a UVPD fragmentace, přičemž produktové ionty byly detegovány orbitální pastí za rozlišení 120 000 FWHM nebo pomocí iontové pasti.

Výsledky a diskuze:

Experiment na standardech 1,2-DDE ukázal, že UVPD fragmentace poskytuje oproti CID fragmentaci jiné produktové ionty. Na základě těchto iontů je možné určit polohy dvojných vazeb v řetězci a polohu acylových skupin na řetězci diolu.

Závěry:

Bylo ukázáno, že UVPD fragmentace lithných aduktů 1,2-DDE umožňuje určit polohy jednotlivých acylových skupin v řetězci. Zároveň bylo potvrzeno, že i na této skupině látek probíhají fotochemické reakce Norrishova typu.

Proč je prezentovaná studie významná:

Výsledky této studie je možné použít jako odrazový můstek pro strukturní analýzu 1,2-DDE obsažených v novorozeneckém mázku. Prezentované fotochemické reakce by zároveň měly probíhat také na lithných aduktech triacylglycerolů, což otevírá nové možnosti strukturní analýzy této skupiny látek.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Student magisterského programu Analytická chemie na PŘF UK.

Poděkování: Tato studie byla financována Grantovou agenturou České republiky, číslo grantu 26-20832S.

INTEGRATION OF A MASS SPECTROMETER WITH A DIFFERENTIAL PUMPING SYSTEM AND AN IONIZATION DETECTOR OF SIGNAL ELECTRONS FOR A-ESEM AND SEM ANALYSIS

VOJTĚCH HLAVIČKA^{1,2}, VILÉM NEDĚLA¹

¹ Environmental electron microscopy, Institute of Scientific Instruments of the Czech Academy of Sciences, v. v. i.,
Královopolská 147, 612 00 Brno-Královo Pole, Czech Republic

² The Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00
Brno-Královo Pole, Czech Republic

e-mail: vojtah@isibrno.cz

Introduction:

In recent years, electron microscopy has increasingly been integrated with complementary analytical techniques. High-resolution morphological analysis is typically performed by scanning electron microscopy (SEM), while chemical information can be obtained using time-of-flight secondary ion mass spectrometry¹. However, application of this method is limited by the vacuum requirements of SEM, which makes the analysis of wet, non-conductive, or vacuum-sensitive specimens challenging². Environmental scanning electron microscopy (ESEM) enables imaging in a gaseous environment, allowing observation of samples in their native state. Nevertheless, its performance depends on the thermodynamic conditions in the microscope specimen chamber, such as pressure, temperature, and humidity. These parameters can affect electron beam scattering and water layer formation on the sample surface, degrading image quality³. Advanced environmental scanning electron microscopy (A-ESEM), developed by Vilém Neděla's team at the Institute of Scientific Instruments of the CAS, allows greater control over thermodynamic conditions. It enables stable imaging across a wider range of pressures and humidities, reducing artefacts induced by the beam and the environment⁴. This work focuses on the integration of a mass spectrometer (MS) into an ESEM to enable correlative nano-morphological and chemical analysis using A-ESEM under controlled thermodynamic conditions and on the preliminary validation of the integrated system.

Methodology:

Integration of the MS into the ESEM was achieved using a newly developed differential pumping system with an ionization detector of signal electrons (HSID)⁵ (Fig. 1). The concept of the integrated HSID system was partially introduced in our previous work⁶. The HSID consists of a differential pumping chamber that maintains the pressure difference between the gas environment of the ESEM specimen chamber and the high vacuum conditions required by the quadrupole MS. Signal electrons generated by the interaction of the electron beam with the sample are detected by the ionization detector. Gaseous molecules released from the sample as a result of localized heating by an electron beam or pyrolysis are transferred through the differential pumping system to the MS for analysis.



Fig. 1: Prototype of the HSID integrated into the ESEM chamber.

Results and discussion:

The HSID was integrated into the ESEM and initial vacuum tests were performed with the ESEM interface closed. The analytical chamber was evacuated below the maximum operating pressure of 5×10^{-3} Pa required

for the quadrupole MS. Mass spectra acquired under these conditions contained residual gases typical of the vacuum background, such as H₂, H₂O, N₂, O₂, and CO₂, together with traces of organic contamination. After repeated pumping and bake-out, the level of organic contamination decreased, which indicates progressive conditioning of the vacuum system. These preliminary results confirm the functionality of the HSID and provide the basis for subsequent testing of the fully integrated system.

Conclusions:

The HSID has been integrated into the ESEM and the standalone system was initially tested with the ESEM interface closed. Pumping below the maximum operating pressure confirmed proper operation of the vacuum system. Initial mass spectra contained residual gases typical of the vacuum background and organic contamination decreased after repeated pumping and bake-out. These tests provided the basis for future validation of the integrated HSID system and correlative nano-morphological and chemical analysis of biological and hydrated specimens under controlled thermodynamic conditions.

Why is the presented study significant:

The integration of MS into ESEM enables simultaneous nano-morphological and chemical analysis using A-ESEM under controlled thermodynamic conditions. This approach has the potential to enable in-situ studies of biological and hydrated specimens in their native state. Future applications of the HSID system include the analysis of microplastics in environmental samples, which remains challenging using existing analytical approaches.

Current study/work position of the first author:

Vojtěch Hlavička is currently pursuing the Ph.D. degree in Microelectronics at the Brno University of Technology. Since 2024, he has been a researcher with the Institute of Scientific Instruments of the CAS. His research focuses on the integration of MS with ESEM.

¹ Rickard W. D. A., Sun X., Aleshin M., Martin L., Kracica M., et al.: *Microsc. Microanal.* 29 (Suppl. 1), 528 (2023).
<https://doi.org/10.1093/micmic/ozad067.248>

² Zhang Y., Huang T., Jorgens D. M., Nickerson A., Lin L.-J., Pelz J., Gray J. W., López C. S., Nan X.: *PLoS ONE* 12, e0176839 (2017).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176839>

³ Neděla V., Tihlaříková E., Maxa J., Imrichová K., Bučko M., Gemeiner P.: *Ultramicroscopy* 211, 112954 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2020.112954>

⁴ Neděla V., Tihlaříková E., Cápál P., Doležel J.: *Sci. Rep.* 14, 63515 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63515-9>

⁵ Neděla V.: *An Equipment for an Image and Chemical Spectroscopic Analysis*. Patent No. 310063, Industrial Property Office, Prague (Czech Republic), 2024.

⁶ Hlavička V., Neděla V.: *Integrated mass spectrometer with a differential pumping system and an ionization detector of signal electrons for innovative morphological and chemical sample analysis in A-ESEM and SEM*. In: *Proceedings Latest Trends in In Situ and Correlative Electron Microscopy*, 38 (2025). ISBN 978-80-87441-36-7.

This research is supported in part by the Czech Science Foundation, the AV21 Strategy Project Breaking Technologies for the Future – Sensing, Digitization, Artificial Intelligence and Quantum Technologies (research activity New correlative techniques for the analysis and imaging of biological and synthetic polymeric materials), and by the Operational Programme Technologies and Applications for Competitiveness (OPTAK) – Integrated mass spectrometer with ionization detector of electrons for ESEM and SEM.

VÝVOJ A OPTIMALIZACE CZE METODY KOMPATIBILNÍ S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ PRO CHARAKTERIZACI MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK V PODMÍNKÁCH BLÍZKÝCH NATIVNÍMU STAVU

SIMONA HORKELOVÁ^{1,2}, DUŠAN KOVAL¹, RENÁTA KONÁŠOVÁ¹, VÁCLAV KAŠIČKA¹

¹ Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 160 00 Prague 6, Česká republika

² Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 2030/8, 128 00 Prague 2, Česká republika

e-mail: simona.horkelova@uochb.cas.cz

Úvod:

Monoklonální protilátky (mAbs) patří mezi nejvýznamnější a nejrychleji rostoucí skupiny biologických léčiv, která jsou využívána zejména v terapii nádorových onemocnění. Pro zajištění jejich kvality, bezpečnosti a požadovaného terapeutického účinku je nezbytné detailně sledovat jejich strukturní vlastnosti, včetně posttranslačních modifikací, jež mohou významně ovlivnit jejich biologickou aktivitu. Pro analýzu intaktních mAbs popsali He a kol. metodu kapilární zónové elektroforézy (CZE) využívající základní elektrolyt (BGE) složený z 400 mM ϵ -aminokapronové kyseliny (EACA), 2 mM triethylentetraminu (TETA) a 0,05 % (m/v) hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC) při pH 5,7¹. Tato metoda je běžně využívána v rámci farmaceutické kontroly kvality ve spojení s UV detekcí. Přímé spojení této metody s hmotnostní spektrometrií (MS) je však problematické, protože obsahuje netěkavé složky elektrolytu, které nejsou pro MS analýzu vhodné.

Metodika:

Cílem práce bylo vyvinout CZE metodu kompatibilní s MS nahrazením nevolatilních složek základního elektrolytu vhodnými alternativami. Funkce HPMC a TETA, spočívající v potlačení elektroosmotického toku (EOF) a omezení adsorpce analytů na stěnu kapiláry, byla nahrazena různými typy kapilárních coatingů. Testovány byly neutrální coatingy na bázi HPMC, polyakrylamidu a polyvinylalkoholu a dále kationtový coating APTAC s různými procenty nabitých složek². HPMC v elektrolytu byla nahrazena 5 % a 10 % (v/v) isopropanolem. Metoda byla nejprve systematicky optimalizována s UV detekcí a následně byly optimalizované separační podmínky přeneseny do CE-MS.

Výsledky a diskuze:

Bylo prokázáno, že přídavek isopropanolu poskytuje srovnatelnou separační účinnost jako původní HPMC při současném zachování plné kompatibility s MS detekcí. Všechny testované coatingy účinně potlačovaly adsorpci analytů na stěnu kapiláry, přičemž neutrální coatingy zároveň potlačily EOF. Za optimalizovaných podmínek byla úspěšně provedena profilace izoform monoklonálních protilátek IgG1 trastuzumabu (pI 9,1), cetuximabu (pI 8,8) a rituximabu (pI 9,4). Koncentrace EACA a pH elektrolytu byly pro vybrané mAbs optimalizovány na 600 mM a pH 5,5.

Závěry:

Vyvinutá CZE metoda umožňuje excelentní separaci izoform monoklonálních protilátek v podmínkách blízkých nativnímu stavu při pH 5,5. Současně eliminuje většinu nevolatilních složek původního elektrolytu a umožňuje přímé spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Metoda tak představuje perspektivní nástroj pro pokročilou charakterizaci biofarmaceutik.

Proč je prezentovaná studie významná:

Vyvinutá metoda rozšiřuje možnosti původní CE-UV analýzy monoklonálních protilátek o přímé propojení s hmotnostní spektrometrií, čímž umožňuje provádět také strukturní analýzu. Zachovává vysokou separační

účinnost pro profilaci izoform a současně využívá podmínky kompatibilní s MS. To rozšiřuje možnosti detailní charakterizace biofarmaceutik v rámci vývoje i kontroly kvality. Za stejných separačních podmínek lze metodu využít jak ve spojení s MS pro strukturní analýzu, tak s UV detekcí pro kvantifikaci jednotlivých izoform.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Doktorandka

¹ He Y., Isele C., Hou W., Ruesch M.: J. Sep. Sci. 34, 548–555 (2011). <https://doi.org/10.1002/jssc.201000719>

² Konášová R., Butnariu M., Šolínová V., Kašička V., Koval D.: Anal. Chim. Acta 1178, 338789 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338789>

Tato práce byla podpořena Akademií věd České republiky v rámci vědeckého projektu RVO 61388963.

NOVEL HIGH-THROUGHPUT FA-D- μ SPE LC-MS/MS WORKFLOW FOR QUANTITATIVE PROFILING OF URINARY BILE ACID SULFATES

MILOŠ HROCH¹, MARIAN KACEROVSKÝ², LINDA PETRÁČKOVÁ¹, STANISLAV MIČUDA³

¹ Ústav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika

² Porodnicko-gynekologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, Univerzita Palackého, Česká republika

³ Ústav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika

Introduction:

Urinary bile acid-3-sulfates (BA-S) are important end products of bile acid detoxification and promising non-invasive biomarkers of hepatobiliary disorders, including intrahepatic cholestasis of pregnancy^{1,2}. Conventional urine sample preparation approaches for BA-S quantification based on organic solvent addition result in pronounced matrix effects, whereas traditional solid-phase extraction methods are labor-intensive, solvent-consuming, expensive, and difficult to scale for large clinical studies. The study aimed to develop a high-throughput LC-MS/MS workflow based on a novel filtration-assisted dispersive micro-solid phase extraction (FA-D- μ SPE) approach in a 96-well filtration plate for quantitative analysis of ten major human urinary BA-S.

Methodology:

Sample preparation was performed in 96-well filtration plates as follows: To the wells containing 10 mg of Strata X-AW weak anion-exchange sorbent, 100 μ L of 1% (v/v) formic acid in methanol, 50 μ L of SIL-IS solution, and 100 μ L of urine were added. After sealing, samples were vortexed (5 min, 1200 rpm) and processed on a 96-well vacuum manifold to draw the sample solution through the sorbent. The sorbent was washed with 600 μ L of 50% methanol and analytes were eluted with 300 μ L of 100 mmol L⁻¹ ammonium formate in methanol containing 4.63% (w/w) ammonia. Eluates were evaporated to dryness under reduced pressure at 45 °C, and reconstituted in 100 μ L water/propan-2-ol/acetonitrile (50:25:25, v/v/v). Samples were vortexed (5 min, 1200 rpm), sealed, and stored in the autosampler at 10 °C prior to analysis. Chromatographic separation was performed on an Acquity I-Class UPLC system equipped with an Acquity C18 column (50 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m) protected by an Arion C18 guard column. Separation was carried out at 40 °C using gradient elution at a flow rate of 0.40 mL min⁻¹. Mobile phase A consisted of water and mobile phase B consisted of methanol, both containing 1 mmol L⁻¹ ammonium formate. The gradient program was 40–60% B (0.00–4.00 min), 60–63% B (4.00–6.00 min), 63–70% B (6.00–7.50 min), followed by 100% B (7.51–8.00 min) and re-equilibration at 40% B until 10.00 min. Detection was performed using a Xevo TQ-XS tandem mass spectrometer operating in ESI(-) with multiple reaction monitoring (MRM). Optimized ion source conditions were: capillary voltage 1.5 kV, cone voltage 35 V, desolvation temperature 650 °C, desolvation gas flow 1100 L h⁻¹, and cone gas flow 150 L h⁻¹. Collision energies ranged from 25 to 40 eV depending on analyte type. The method was validated according to ICH M10 guidelines using pooled rat urine as a surrogate matrix due to endogenous BA-S presence in human urine.

Results and Discussion:

The developed workflow enabled rapid parallel processing of up to 96 samples within approximately 20 minutes, excluding evaporation. Compared with conventional SPE approaches, the method substantially reduced solvent consumption, consumable costs, and manual handling. The custom 3D-printed dispenser provided reproducible sorbent loading and flexible in-house preparation of extraction plates. The validated method demonstrated excellent linearity over the concentration range 10–4000 nmol L⁻¹ ($r^2 > 0.998$). Intra-day and inter-day precision (CV) remained below 7.81%, and accuracy (RE) ranged from -9.96% to -2.79%. Urinary BA-S profiling revealed significantly increased concentrations of glyco- and taurocholic acid-3-sulfate in pregnant women compared with men and non-pregnant women. Urine samples from patients with ICP exhibited markedly altered BA-S profiles with total urinary BA-S concentrations approximately two orders of magnitude higher than in healthy pregnant women.

Conclusions: A novel high-throughput FA-D- μ SPE LC-MS/MS workflow was successfully developed for quantitative analysis of urinary BA-S. Integration of dispersive extraction and filtration in a 96-well format enabled rapid sample preparation suitable for clinical and epidemiological studies. The method demonstrated robust analytical performance in accordance with ICH M10 requirements and successfully captured markedly altered BA-S profiles associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. The proposed workflow represents a practical platform for future urinary BA-S biomarker studies.

Why is the presented study important:

Intrahepatic cholestasis of pregnancy is a serious pregnancy-associated cholestatic disorder linked to increased risk of fetal distress, spontaneous preterm birth, and intrauterine fetal death, highlighting the need for reliable patient monitoring. Compared with plasma or serum analysis, urinary BA-S profiling represents a non-invasive approach that enables easier and more acceptable repeated sampling during pregnancy. The study introduced a novel concept of high-throughput filtration-assisted μ SPE in a 96-well format, enabling rapid and cost-effective urinary BA-S profiling. The use of a custom 3D-printed sorbent dispenser for in-house preparation of extraction plates substantially improved analytical throughput, flexibility, and cost-effectiveness. The method demonstrated good applicability for detecting altered BA-S profiles associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy.

Current study/work position of the first author:

Associate professor at Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic

1. Alnouti Y.: *Toxicol Sci* 108, 225 (2009), <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn268>

2. Ovadia C., Seed P.T., Sklavounos A., Geenes V., Di Illio C., Chambers J., Kohari K., Bacq Y., Bozkurt N., Brun-Furrer R., et al.: *Lancet* 393, 899 (2019), [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31877-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31877-4)

Acknowledgement: *This work was supported by the ERDF-Project New Technologies for Translational Research in Pharmaceutical Sciences/NETPHARM, No. CZ.02.01.01/00/22_008/0004607 and by the Cooperatio Program, research area DIAG.*

UHPLC-HRMS/MS JAKO NÁSTROJ KOMPLEXNÍHO STUDIA GLYKOALKALOIDŮ A JEJICH DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ

TEREZA JABLONSKÁ¹, ONDŘEJ BRABENEC¹, JANA HAJŠLOVÁ¹

¹ Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5, 166 28 Praha 6,
Česká republika

e-mail: tereza.jablonska@vscht.cz

Úvod:

Glykoalkaloidy představují skupinu toxických steroidních sekundárních metabolitů přirozeně se vyskytujících v bramborách (*Solanum tuberosum*), hlavními zástupci jsou α -solanin a α -chakonin. Vzhledem k jejich potenciálním zdravotním rizikům vydala Evropská komise Doporučení (EU) 2022/561, které stanovuje orientační hodnotu 100 mg/kg pro sumu α -solaninu a α -chakoninu v bramborách a výrobcích z nich a současně doporučuje monitorovat také jejich degradační produkty: β -solanin, β -chakonin, γ -solanin, γ -chakonin a aglykon solanidin¹⁻³. Přestože byly publikovány analytické metody založené na LC-MS pro stanovení glykoalkaloidů, jsou zpravidla zaměřeny pouze na α -solanin, α -chakonin, případně solanidin, zatímco ostatní degradační produkty nejsou běžně zahrnuty^{4,5}. V návaznosti na uvedené doporučení (EU) bylo proto cílem práce vyvinout a validovat UHPLC-HRMS/MS metodu umožňující jejich současné stanovení.

Metodika:

Cílem práce bylo vyvinout a validovat metodu ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (UHPLC-HRMS/MS) pro kvantifikaci hlavních glykoalkaloidů a cílený screening jejich degradačních produktů v rámci jediné analýzy. Pro extrakci sledovaných analytů z bramborových hlíz byl použit 50% methanol ve vodě okyselený 0,1 % kyselinou octovou. Analýzy byly prováděny na systému Agilent 1290 Infinity UHPLC ve spojení s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem Agilent 6560 typu Q-TOF s elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu. Chromatografická separace byla provedena na koloně ACQUITY UPLC BEH Amide (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m). Jako mobilní fáze byl použit 5 mM octan amonný ve vodě (A) a 5 mM octan amonný ve směsi acetonitril:voda (95:5, v/v) (B), obě fáze okyselené 0,1 % kyselinou octovou. Separace probíhala za podmínek gradientové eluce. Metoda byla validována pro kvantitativní stanovení α -solaninu, α -chakoninu, γ -chakoninu a solanidinu s využitím referenčních standardů. Součástí vývoje metody byla také optimalizace cíleného HRMS/MS screeningu β -solaninu, β -chakoninu a γ -solaninu založeného na přesné hmotnosti prekurzorových iontů a charakteristických HRMS/MS fragmentačních spektrech. Interpretace fragmentačních spekter umožnila potvrdit identitu jednotlivých glykoalkaloidů na základě postupného odštěpování sacharidových jednotek a vzniku charakteristických iontů společného aglykonového skeletu.

Výsledky a diskuze:

Vyvinutá metoda byla úspěšně validována a vykazovala vysokou selektivitu, uspokojivou linearitu v rozsahu 2–500 mg/kg a dostatečnou citlivost pro kvantifikované analyty. Limity kvantifikace dosahovaly 1–2 mg/kg, což umožňuje stanovení těchto látek v koncentracích relevantních pro hodnocení bezpečnosti potravin. Kombinace chromatografické separace, přesné hmotnosti a interpretace HRMS/MS fragmentačních spekter umožnila jednoznačně odlišit strukturně příbuzné glykoalkaloidy a potvrdit identitu jejich degradačních produktů. Oproti dosud publikovaným LC-MS metodám rozšiřuje vyvinutý postup analytické možnosti o současnou kvantifikaci čtyř glykoalkaloidů a cílený HRMS/MS screening tří dalších produktů hydrolýzy doporučených Evropskou komisí k monitorování. Metoda byla následně aplikována ke sledování hydrolýzy glykoalkaloidů po dezintegraci bramborových hlíz, kdy bylo možné současně monitorovat koncentrační úbytek mateřských glykoalkaloidů i vznik degradačních produktů a získat tak komplexnější informace o změnách glykoalkaloidového profilu.

Závěry:

Vyvinutá UHPLC-HRMS/MS metoda představuje komplexní analytický přístup umožňující kvantifikaci hlavních glykoalkaloidů i cílený screening jejich degradačních produktů v rámci jediné analýzy. Díky vysoké selektivitě a možnostem HRMS/MS identifikace umožňuje spolehlivou charakterizaci glykoalkaloidového profilu a sledování jeho změn během degradace. Metoda tak představuje vhodný nástroj pro studium přeměn glykoalkaloidů během technologického zpracování i pro komplexnější hodnocení bezpečnosti brambor a výrobků z nich.

Proč je prezentovaná studie významná:

Přestože Doporučení Komise (EU) 2022/561 zmiňuje potřebu monitorovat produkty hydrolýzy glykoalkaloidů, jejich analytické sledování je dosud limitováno nedostatkem vhodných analytických metod i referenčních standardů. Studie přináší metodický přístup, který umožňuje komplexnější sledování změn glykoalkaloidového profilu a reaguje na současné požadavky evropských doporučení v oblasti bezpečnosti potravin.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Studentka 1. ročníku doktorského studia studijního programu Potravin a přírodní produkty na Ústavu analýzy potravin a výživy VŠCHT Praha.

1. Schrenk D., a 20 spoluautorů. EFSA CONTAM Panel, Risk assessment of glycoalkaloids in feed and food, in particular in potatoes and potato-derived products. EFSA Journal 2020, 18 (8), e06222. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6222>.
2. Evropská komise, Doporučení Komise (EU) 2022/561 ze dne 6. dubna 2022 o monitorování přítomnosti glykoalkaloidů v bramborách a výrobcích z brambor. 2022. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32022H0561>, staženo 26. 06. 2026
3. Ordóñez Vásquez A., Aguirre-Arzola V., De La Garza-Ramos M., Urrutia-Baca V., Suárez-Obando F. Toxicity, Teratogenicity and Anti-cancer Activity of α -solanine: A Perspective on Anti-cancer Potential. International Journal of Pharmacology, 15, 301-310 (2019). DOI: <https://doi.org/10.3923/ijp.2019.301.310>.
4. Nielsen S. D., Schmidt J. M., Kristiansen G. H., Dalsgaard T. K., Larsen L. B. Liquid Chromatography Mass Spectrometry Quantification of α -Solanine, α -Chaconine, and Solanidine in Potato Protein Isolates. Foods, 9, 416 (2020). <https://doi.org/10.3390/foods9040416>.
5. Liu W., Zhang N., Li B., Fan S., Zhao R., Li L. P., Wu G. H., Zhao Y. Determination of α -chaconine and α -solanine in commercial potato crisps by QuEChERS extraction and UPLC-MS/MS. Chem. Pap. 68, 1498–1504 (2014). <https://doi.org/10.2478/s11696-014-0617-8>

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky (projekt č. QL26010005) a grantem specifického vysokoškolského výzkumu VŠCHT Praha (grant č. A1_FPBT_2026_001). Práce zároveň používá [data/nástroje/slужby/zařízení], které poskytuje výzkumná infrastruktura METROFOOD-CZ (<https://metrofood.cz>) podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. LM2023064).

A LINEAR QUADRUPOLE ION TRAP APPROACH TO QUANTITATIVE TRACE VOC ANALYSIS

JURAJ JAŠÍK¹, CHRISTOPH SCHÄFER¹, PATRIK ŠPANĚL¹

¹Heyrovský Institute of the CAS, Prague

email: juraj.jasik@jh-inst.cas.cz

Quantifying trace volatile organic compounds (VOCs) in ambient air and in highly humid matrices, such as exhaled breath, requires sensitive detection and tightly controlled ion–molecule reactions. Conventional selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) relies on continuous carrier-gas flow and typically fixes pressure and reaction time. We implement SIFT-MS chemistry in a linear quadrupole ion trap (LQIT), allowing independent adjustment of pressure and reaction time, lower helium consumption, and integrated MSⁿ, and collision-induced dissociation (CID). We operate a custom LQIT with pulsed helium, generate H₃O⁺ reagent ions in the trap by reacting Ar⁺, formed by electron ionization, with trace H₂O, and then mass-isolate the H₃O⁺ ions. Two fast-pulsed valves independently inject helium and sample gas, providing millisecond control over neutral density and reaction time. We use resonant secular excitation to mass-analyze the trapped-ion population and eject ions toward off-axis detectors, enabling the acquisition of a complete mass spectrum in a single scan. We can subsequently isolate selected product ions and subject them to CID when required. We efficiently generate, trap, and isolate H₃O⁺ in the LQIT and drive controlled reactions with trace VOCs. We determine VOC concentrations using known reaction rate coefficients, controlled reaction times, and calibrated neutral densities. The instrument integrates MS analysis, ion isolation, and MSⁿ in periodic sequences, enabling real-time concentration monitoring. These results demonstrate the potential of ion-trap SIFT-MS as a flexible, gas-efficient approach to quantitative VOC analysis.

Acknowledgment: The authors thank for the financial support from the Praemium Academiae funding provided by the Czech Academy of Sciences (Project No. AP2102).

LIPIDOMIKA SYNOVIÁLNÍ TEKUTINY PRO IDENTIFIKACI KOMPOZITNÍHO BIOMARKERU INFEKČNÍ ARTRITIDY

MARTINA KADLÁČKOVÁ ^{1,2}, ALEŠ KVASNIČKA ³, RICHARD MASAŘ ^{1,2}, JAKUB ROZHON ^{1,2}, MARKÉTA
TRAJEROVÁ ⁴, EVA KRIEHOVÁ ⁴, DAVID FRIEDECKÝ ^{1,2}, RADANA BRUMAROVÁ ^{1,2}, JIŘÍ GALLO ⁵

¹ Laboratoř dědičných metabolických poruch, Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Palackého,
Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc, Česká republika

² Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků
248/7, 779 00 Olomouc, Česká republika

³ Department of Medical Biochemistry, Oslo University Hospital, 4950 Sognsvannsveien 20, 0372 Oslo, Norsko

⁴ Ústav imunologie, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, Česká republika

⁵ Ortopedická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, Česká republika

e-mail: martina.kadlackova01@upol.cz

Úvod:

Infekční artritida představuje závažný klinický stav, při kterém může rychle docházet k destrukci kloubních struktur, ztrátě funkce kloubu a rozvoji systémových komplikací včetně sepse. Včasné a přesné odlišení infekčního a neinfekčního poškození kloubu je proto zásadní pro zahájení cílené léčby a prevenci nevratného poškození. Současná diagnostika však zůstává obtížná zejména u pacientů s nejednoznačným cytologickým, biochemickým nebo mikrobiologickým nálezem, při nízkostupňových infekcích, po předchozí antibiotické terapii nebo před dostupností výsledků kultivace^{1,2}. Synoviální tekutina přímo odráží lokální děje probíhající v kloubním prostoru, a představuje tak vhodný biologický materiál pro hledání nových molekulárních biomarkerů^{3,4}. Cílem této studie bylo zhodnotit, zda cílené lipidomické profilování synoviální tekutiny pomocí LC-MS/MS umožňuje zachytit společný lipidový vzorec asociovaný s infekční artritidou a popsat metabolické změny související s infekčním zánětem kloubu.

Metodika:

Cílená lipidomická analýza synoviální tekutiny byla provedena pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) u 250 vzorků pacientů s osteoartrózou (OA), nativní kloubní infekcí (INF), aseptickou revizí totální kloubní náhrady (OA/TJR) a periprotetickou infekcí (PPI). Studie zahrnovala exploratorní část a následnou zaslepenou validační fázi. Získaná data byla hodnocena pomocí univariantských a multivariantských (PCA, OPLS-DA) statistických metod. Pro biologickou interpretaci změn byly využity lipidové mapy v prostředí Cytoscape a analýza lipidových drah pomocí nástroje BioPAN. Pro výběr lipidů s nejvyšším diagnostickým potenciálem byl následně vytvořen kompozitní lipidový biomarker založený na devíti lipidech vybraných pomocí LASSO logistické regrese implementované v programovacím jazyce Python.

Výsledky a diskuze:

Infekční artritida byla charakterizována komplexním a reprodukovatelným lipidovým profilem synoviální tekutiny, který byl potvrzen v nezávislé validační kohortě. Celkem bylo detekováno a semikvantifikováno 378 lipidových druhů napříč 20 lipidovými třídami. Nejvýraznější změny zahrnovaly pokles lysofosfolipidů, zejména lysofosfatidylcholinů (LPC) a lysofosfatidylethanolaminů (LPE) obsahujících kyselinu linolovou [FA(18:2)], a současné zvýšení etherových a vinyl-etherových fosfatidylcholinů (PC) a fosfatidylethanolaminů (PE), především z podtříd PC O-/P- a PE O-/P-. Dále byla u infekčních vzorků pozorována akumulace nenasycených triacylglycerolů (TG), zejména druhů s vyšším počtem dvojných vazeb. Tyto změny naznačují koordinovanou remodelaci lipidového metabolismu v prostředí infikovaného kloubu, pravděpodobně spojenou s oxidačním stresem, aktivací fosfolipasových drah a adaptivní ochranou buněčných membrán. Multivariantská analýza umožnila spolehlivé odlišení infekčních a neinfekčních vzorků. OPLS-DA model vytvořený v exploratorní fázi dosáhl vysoké klasifikační přesnosti u pacientů s INF a OA a jeho robustnost byla následně potvrzena v zaslepené validační fázi. Pomocí LASSO logistické regrese bylo následně vybráno devět

lipidů, které vytvořily kompozitní lipidové skóre se senzitivitou 0,90–1,00 a specifitou 0,93–0,98. Ve validační kohortě nebyl zaznamenán žádný falešně negativní případ. Lipidové skóre korelovalo s procentuálním zastoupením neutrofilů v synoviální tekutině, avšak zachovalo si diskriminační schopnost i v překrývajících se cytologických rozmezích, což naznačuje, že odráží nejen buněčné složení vzorku, ale také hlubší metabolickou odpověď hostitele na infekci.

Závěry:

Cílená LC-MS/MS lipidomika synoviální tekutiny umožňuje zachytit reprodukovatelnou metabolickou odpověď spojenou s infekčním zánětem kloubu. Identifikovaný lipidomický profil je tvořen především poklesem lysofosfolipidů, zvýšením etherových fosfolipidů a zvýšením nenasycených TG, což odpovídá infekčně indukované fosfolipidové remodelaci a adaptaci na oxidační stres. Kompozitní lipidový biomarker představuje kompaktní a biologicky interpretovatelný diagnostický nástroj, který může v budoucnu doplnit současné cytologické, mikrobiologické a biochemické postupy, zejména u pacientů s nejednoznačným nálezem při primárních diagnostických postupech.

Proč je prezentovaná studie významná:

Rychlé a přesné rozlišení infekční a neinfekční artritidy je zásadní pro včasné zahájení cílené léčby, prevenci poškození kloubu a snížení rizika systémových komplikací včetně sepse. Navržený kompozitní lipidový biomarker dosáhl vysoké senzitivity i specifity a může pomoci zpřesnit diagnostiku zejména u pacientů v tzv. diagnostické „šedé zóně“, například při nejednoznačném cytologickém, biochemickém nebo mikrobiologickém nález. Studie tak podporuje využití cílené LC-MS/MS lipidomiky synoviální tekutiny jako potenciálního doplňkového nástroje pro časnější a přesnější diagnostické rozhodování u kloubních infekcí.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Doktorandka programu Lékařská chemie a klinická biochemie a výzkumná a vývojová pracovnice Laboratoře dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc

¹ Magruder M. L., Heckmann N. D., Lieberman J. R., Scuderi G. R., Lustig S., Parvizi J., et al.: J. Arthroplasty 41, 551 (2026).

² Manasherob R., Warren S. I., Flanagan C. M., Arora P., Heo L., Moore C. J., et al.: J. Transl. Med. 23, 1 (2025).

³ Zhou Q., Ghorasaini M., Cornelis F. M. F., Assi R., de Roover A., Giera M., et al.: Ann. Rheum. Dis. 84, 1264–1276 (2025).

⁴ Kvasnička A., Najdekr L., Dobešová D., Pisklákova B., Ivanovová E., Friedecký D.: Clin. Chem. Lab. Med. 61, 587–598 (2023).

Práce byla podpořena MZ ČR (DRO FNOI, 00098892; AZV NW24-10-00395) a Evropským fondem pro regionální rozvoj v rámci projektu „Interdisciplinární přístupy pro vývoj a aplikaci nových materiálů v lékařské praxi – Nové omické technologie“ (No. CZ.02.01.01/00/23_021/0009224).

ANALYSIS OF TRASTUZUMAB DIGESTION PRODUCTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH NANO SHEATH LIQUID FLOW INTERFACE FOR ESI/MS DETECTION

RENÁTA KONÁŠOVÁ, DUŠAN KOVAL, MILAN VRÁBEL, SIMONA HORKELOVÁ, VÁCLAV KAŠIČKA

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 542/2, Prague 6, 160 00, Czech Republic

E-mail: renata.konasova@uochb.cas.cz

Since the discovery of hybridoma technology in 1975, monoclonal antibody (mAb) development has grown rapidly. In recent years, numerous mAb-based therapeutics have been approved and introduced into clinical practice. Capillary electrophoresis (CE) with UV detection is a well-established method for the analysis of mAbs, particularly in their native state ¹. Recently, CE-ESI/MS methods have been developed, especially for the more detailed characterization of mAb charge variants ². In this work, CE-MS methods employing a nano-sheath liquid flow CE-ESI/MS interface were applied to characterize trastuzumab and its digestion products at different stages of enzymatic cleavage, including the analysis of the intact (native) mAb, middle down analysis of its fragments, and peptide mapping of peptides generated by pepsin and papain proteolyses. The aim of this study was to develop CE-ESI-MS methods for optimizing digestion conditions to maximize the yield of the trastuzumab Fab fragment.

Near-native CE-ESI/MS was used to monitor the extent of digestion and identify the products, whereas CE-ESI/MS performed with an acidic background electrolyte (BGE) and a positively coated fused-silica capillary enabled detailed characterization of the resulting fragments. Large-volume sample stacking (LVSS) in a positively PAMAPTAC-coated fused-silica capillary ³ was employed for the analysis of the generated peptides.

The combination of these CE-ESI/MS methods enabled the optimization of the trastuzumab digestion workflow. The highest yield of the Fab fragment was achieved by sequential proteolysis of the intact mAb using pepsin for 4 h, followed by papain digestion for 16 h. Longer pepsin digestion times resulted in further degradation of the generated F(ab')₂ fragments. The generated F(ab')₂ species were readily accessible to subsequent papain cleavage. This approach eliminated the need for papain reactivation during digestion and provided a higher Fab fragment yield than digestion with papain alone.

1. Baxter J., Waltham K., Fitton L., Sanger-van de Griend C. E.: *Electrophoresis* 47, 15 (2026). <https://doi.org/10.1002/elps.70089>.
2. Schwenzer A. K., Neususs C.: *Anal Chem* 97, 17598 (2025). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c02760>.
3. Konasova R., Butnariu M., Solinova V., Kasicka V., Koval D.: *Anal Chim Acta* 1178, 338789 338789 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338789>.

This work was supported by the Czech Academy of Sciences, project no. RVO 61388963.

ANALÝZA TRIETHANOLAMINU V PLAZMĚ JAKO PRŮKAZ OTRAVY DUSÍKATÝM YPERITEM

DOMINIK KRUPKA, HELENA ŘEHULKOVÁ, ALŽBĚTA DLABKOVÁ

Univerzita obrany, Vojenská lékařská fakulta, Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Třebešská 1575, 500 01 Hradec
Králové

Email: dominik.krupka@unob.cz

Dusíkaté yperity jsou vysoce toxické sloučeniny, které jsou přísně kontrolovány Úmluvou o zákazu chemických zbraní. Ačkoli nebyly dosud použity při teroristických útocích ani válečných konfliktech, jejich snadná syntéza [1] představuje riziko jejich zneužití. Náš výzkum se zaměřuje především na vytvoření analytické kvantitativní metody pro detekci tris(2-chlorethyl)aminu (HN3) ze vzorku plazmy. HN3 tvoří stabilní adukty reakcí s nukleofilními řetězci proteinů [2]. Tyto adukty by mohly být použity pro forenzní účely v případech podezření na otravu HN3. Naše metoda přípravy vzorku se zaměřila na hydrolýzu aduktů a následnou extrakci, zkoncentrování a derivatizaci triethanolaminového produktu. Triethanolamin byl derivatizován pomocí heptafluorbutyrylimidazolu a poté analyzován pomocí GC/MS s elektronovou ionizací a analyzátozem typu trojitého kvadrupólu. Hmotnostní spektrometrie byla zaměřena na sledování iontových přechodů m/z 510→241 a 241→169, které měly nejvyšší odezvu signálu.

1. Otsuka, M.; Miyaguchi, H. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Nitrogen Mustard Degradation Products after Derivatization with Benzoylimidazole. *Microchemical Journal* 2024, 207, 111842, doi:10.1016/j.microc.2024.111842.
2. R Thompson, V.; P DeCaprio, A.P.D. Covalent Adduction of Nitrogen Mustards to Model Protein Nucleophiles. *Chem. Res. Toxicol* 26, 1263–1271, doi:10.1021/tx400188w.

Práce byla podpořena MŠMT ČR (Specifický výzkum SV/VLF202404).

ENDOKRINNÍ DISRUPTORY V JEDLÉM HMYZU A POTRAVINÁCH NA BÁZI HMYZU

KUČERA PETR¹, TOMÁŠKO JAKUB¹, PAŘÍZEK ONDŘEJ¹, GRAMBLIČKA TOMÁŠ¹, PULKRABOVÁ JANA¹

¹VŠCHT Praha, Technická 5, 160 00, Praha 6- Dejvice

e-mail: kucera@vscht.cz

Úvod:

Rostoucí světová populace zvyšuje potřebu nových, udržitelných zdrojů potravin. Za účelem snížení environmentální zátěže spojené s tradiční živočišnou výrobou se intenzivně hledají alternativní zdroje bílkovin. Jedlý hmyz představuje slibného kandidáta, neboť jeho nutriční hodnota je srovnatelná s konvenčními živočišnými produkty, zatímco jeho chov vyžaduje méně prostoru a vody a produkuje nižší emise skleníkových plynů¹. Potraviny na bázi hmyzu byly Evropskou unií oficiálně uznány jako nové potraviny v roce 2018. Ačkoli byl jedlý hmyz historicky získáván převážně z volné přírody, moderní hmyzí farmy umožňují chov v kontrolovaném prostředí s regulovanou dietou, což napomáhá snížení rizika kontaminace³. Přestože existuje dostatek důkazů o nutričních benefitech hmyzu, jeho chemická bezpečnost zůstává oblastí aktivního výzkumu. Stejně jako jiné potraviny může i hmyz akumulovat potenciálně škodlivé kontaminanty v průběhu produkčního řetězce. Expozice hmyzu může být přímá nebo nepřímá, například prostřednictvím krmiva či prostředí, ve kterém je chován (např. chovné nádoby nebo podloží)³. Endokrinní disruptory (ED) představují skupinu kontaminantů, která v posledních letech přitahuje zvýšenou pozornost. Jedná se o látky, které narušují endokrinní systém inhibicí biosyntézy a metabolismu hormonů a narušením homeostázy organismu⁴. Zatímco výskyt ED v potravinách je v literatuře dobře zdokumentován, jejich přítomnost v jedlém hmyzu je dosud nedostatečně prozkoumána. Vzhledem k předpokladům, že se poptávka po jedlém hmyzu do roku 2030 ztrojnásobí, je jeho chemická bezpečnost zásadní.

Metodika:

Analýza ED v jedlém hmyzu byla provedena pomocí pokročilých instrumentálních metod. Soubor vzorků byl podroben analýze na obsah 3 skupin CP, 10 látek ze skupiny bisfenolů (BP) a 13 ftalátů (PHT). Vzorky byly extrahovány do ethylacetátu, případně acetonitrilu, primární extrakty byly následně přečištěny pomocí disperzní extrakce na tuhou fázi (dSPE) pomocí sorbentu Z-Sep+ nebo extrakce na tuhou fázi (SPE) na kolonkách se silikagelem. Veškeré použité analytické postupy byly před aplikací na reálné vzorky validovány na dvou hladinách, zvolených tak, aby odrážely reálné nálezy z předchozích studií a literatury. Analýza CP s krátkým a středním řetězcem byla provedena na plynové chromatografii ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (GC-HRMS) a hmotnostním analyzátozem typu orbitální iontová past. Analýza CP s dlouhým řetězcem byla provedena pomocí techniky ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (UHPLC-HRMS) a hmotnostním analyzátozem typu orbitální iontová past. Analýza PHT byla provedena pomocí GC-MS/MS s hmotnostním analyzátozem typu trojitý kvadrupól. Bisfenoly byly analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS.

Výsledky a diskuze:

Pro jednotlivé použité metody bylo dosaženo limitů kvantifikace (LOQ) 0,2–10 ng/g pro ftaláty, 0,1 ng/g pro bisfenoly a 1 ng/g pro CP. Výsledky analýz reálných vzorků, získaných v rámci projektových spoluprací a z české tržní sítě, jsou momentálně procesovány a budou prezentovány na konferenci. Celkem bude analýze na obsah ED podrobeno 50 vzorků potravin na bázi hmyzu.

Závěry:

Tato studie podle našich znalostí, představuje první vhled do problematiky výskytu ED v potravinách na bázi hmyzu, zároveň potvrzuje jejich výskyt v těchto potravinách a akcentuje důležitost dalšího výzkumu. V rámci navazujících studií se plánujeme zaměřit primárně na zdroje kontaminace v procesu chovu a zpracování hmyzu. Studované vzorky byly analyzovány na přítomnost výše uvedených ED. Soubor vzorků zahrnoval hmyz chovaný v insektáriu České zemědělské univerzity a potraviny na bázi hmyzu zakoupené na českém trhu

(chipsy, proteinový prášek, čokoláda, proteinové tyčinky). Studie dále hodnotí expozici člověka vybraným ED při konzumaci jedlého hmyzu a posuzuje jejich možné dopady na lidské zdraví.

Proč je prezentovaná studie významná:

Předkládaná studie je jedna z prvních zabývajících se analýzou jedlého hmyzu na obsah více látek ze skupiny ED. Výsledky mohou přinést důležitý vhled do problematiky chemické bezpečnosti jedlého hmyzu, jakožto perspektivní nové potraviny.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora: Student prvního ročníku doktorského studia, zaměstnanec Ústavu chemie a analýzy potravin a výživy

1. van Huis A., v knize: Handbook of Eating and Drinking: Interdisciplinary Perspectives (Meiselman H. L., ed.), str. 1367. Springer Nature Switzerland, Cham 2026. https://doi.org/10.1007/978-3-032-03228-7_123.
2. Mancini S., Sogari G., Espinosa Diaz S., Menozzi D., Paci G., Moruzzo R.: Foods 11, 455 (2022).
3. Meyer A. M., Meijer N., Hoek-van den Hil E. F., van der Fels-Klerx H. J.: Journal of Insects as Food and Feed 7, 823 (2021). <https://doi.org/https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0085>.
4. Kabir E. R., Rahman M. S., Rahman I.: Environmental Toxicology and Pharmacology 40, 241 (2015). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>.

Tato práce byla podpořena grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR INTER-COST-LUC25, číslo LUC25019. Práce využila [data/nástroje/slужby/infrastrukturu] poskytované výzkumnou infrastrukturou METROFOOD-CZ (<https://metrofood.cz>), podporovanou Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt č. LM2023064). Tato práce byla podpořena granty Specifického vysokoškolského výzkumu VŠCHT Praha – granty č. A2_FPBT_2024_024, A1_FPBT_2024_001, A1_FPBT_2025_001, A2_FPBT_2025_014 a A1_FPBT_2026_001

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EFFICIENT SEPARATION AND DETECTION OF *N*-NITROSAMINES IN CYCLIZINE USING APCI-HPLC-MS/MS

IVANA LEMAK^{1,2}, PETER KOTORA¹, MATEJ HORVÁTH¹, SVETLANA HROUZKOVÁ²

¹ hameln rds s.r.o., Horná 36, 900 01, Modra, Slovakia

² Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovakia

e-mail: i.lemak@hameln-rds.sk

N-nitrosamines are chemical compounds classified as potential human carcinogens. They are formed through the reaction of secondary or tertiary amines with nitrous acid (HNO₂) under acidic conditions. Consequently, *N*-nitrosamines can be found in the environment (e.g., drinking and wastewater), various food products, and pharmaceuticals¹. Since 2018, when elevated concentrations of *N*-nitrosodimethylamine were detected in the drug Valsartan, regulatory attention on the presence of *N*-nitrosamines in pharmaceuticals has significantly increased².

According to the ICH M7(R1) guideline³, acceptable limits for *N*-nitrosamines are established based on toxicological data and daily intake, considering the maximum daily dose of each active pharmaceutical ingredient (API) in the EU.

This study employed an Agilent 1200 liquid chromatograph coupled with a 6470 Triple Quadrupole (QQQ) tandem mass spectrometer using Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI). Chromatographic separation of seven *N*-nitrosamines was achieved using a YMC-Triart C18 ExRS column (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) at 40 °C. The mobile phases consisted of 10 mM ammonium carbonate (phase A) and methanol (phase B), with an injection volume of 10 μL. Detection and identification were carried out multiple reaction monitoring (MRM) transitions using Agilent MassHunter 10.1 software.

A key challenge during method development was the separation of *N*-nitrosodiisopropylamine (NDiPA) and *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), which have identical molecular mass and MRM transitions. Optimization of chromatographic parameters did not improve their resolution, thus, two separate time windows were implemented in the acquisition program to distinguish between NDiPA and NDPA.

The goal was to separate seven *N*-nitrosamines in a Cyclizine sample, ensuring their elution prior to the main Cyclizine peak. Given the dissociation constant of Cyclizine (pK_a = 8.2), a mobile phase with 10 mM ammonium carbonate at pH 9.0 was found optimal. To minimize detector contamination, a third time window was incorporated into the MS acquisition method to divert the Cyclizine directly to waste.

The developed APCI-HPLC-MS/MS method successfully enabled the efficient separation and detection of seven *N*-nitrosamines in Cyclizine samples and can be further adapted for the analysis of other pharmaceutical products.

¹ Parfamt, T. P. et al.: European Journal of Pharmaceutical Sci. 2024, doi: 10.1016/j.ejps.2023.106633.

² Mavis, E. M. et al.: J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2023, doi: 10.1016/j.jchromb.2023.123593.

³ ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk – Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA).

POROVNÁNÍ ZPŮSOBŮ ZPRACOVÁNÍ LIDSKÉHO SÉRA PRO NECÍLENOU LC–MS PROTEOMIKU A PEPTIDOMIKU

René Lenobel^{1,2}, Jaroslava Friedecká^{1,2}, Natálie Zemánková¹, Hana Svobodová¹, David Friedecký³, Ondřej Novák^{1,2}

¹ Laboratoř růstových regulátorů, PŘF, Univerzita Palackého Olomouc, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Česká republika

² Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky AVČR, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Česká republika

³ Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Chemistry, Palacký University and University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Úvod: Lidské sérum představuje analyticky náročný biologický materiál s mimořádně širokým rozsahem koncentrací proteinů. Vysoce abundanční proteiny omezují detekci potenciálně biologicky významných nízkoabundantních složek, zatímco deplece a frakcionace mohou zvyšovat hloubku analýzy za cenu změny složení vzorku a vyšší analytické variability. Cílem práce bylo porovnat dostupné přístupy ke zpracování séra a posoudit jejich vliv na počet identifikovaných proteinů, zastoupení nízkoabundantních složek a reprodukovatelnost relativní kvantifikace.

Metody: Bylo porovnáno štěpení proteinů přímo v roztoku, štěpení po srážení proteinů acetonem a zpracování metodou FASP. Možnosti oddělení peptidomu a nízkomolekulární proteomové frakce byly hodnoceny pomocí centrifugačních filtrů s mezí molekulové hmotnosti 10 a 30 kDa. Jako ekonomicky dostupné depleční postupy byly testovány precipitace 0,5 M kyselinou chloristou a 70% methanolem. Reprodukovatelnost zpracování nativního a kyselinou chloristou precipitovaného séra byla posouzena v osmi nezávislých dnech, vždy s deseti technickými replikáty (celkem 80 analýz pro každý postup). Vzorky byly analyzovány rychlou nanoLC–dia-PASEF–MS/MS metodou s iontovou mobilitou. Hodnoceny byly počty identifikovaných proteinů, překryv proteinových souborů, variabilita normalizovaných intenzit a struktura dat pomocí PCA a OPLS-DA.

Výsledky: V nativním séru bylo identifikováno 312 proteinů, po precipitaci kyselinou chloristou 433 proteinů a po precipitaci methanolem 351 proteinů. Všechny tři postupy sdílely 235 proteinů, zatímco 122 proteinů bylo detekováno pouze po precipitaci kyselinou chloristou. Tento postup zvýšil zastoupení tkáňově specifických proteinů z 94 na 218 a signálních proteinů z 10 na 25. Vyšší hloubka proteomové analýzy však byla doprovázena metodicky závislým zvýšením variability, nejvýraznějším u methanolové precipitace. Multivariační analýza současně odhalila systematický vliv dne zpracování, což zdůrazňuje význam standardizace preanalytické fáze a pravidelného zařazování kontrolních vzorků. Zkrácení nanoLC gradientu z 85 na 25 minut nesnížilo hloubku analýzy a vedlo k identifikaci 407 oproti 379 proteinům.

Závěr: Volba způsobu zpracování zásadně ovlivňuje hloubku, složení i kvantitativní reprodukovatelnost sérového proteomu. Precipitace kyselinou chloristou představuje dostupný způsob rozšíření detekce nízkoabundantních proteinů, vyžaduje však důslednou kontrolu mezidenní variability. Ultrafiltrace, FASP a precipitační postupy poskytují komplementární možnosti cíleného získání proteomové a peptidomové frakce. Pro klinickou proteomiku proto nelze doporučit jediný univerzální postup; metoda musí být zvolena podle biologického cíle studie a požadované kvantitativní přesnosti.

Financování: Práce byla podpořena z Evropského fondu pro regionální rozvoj: Projekt „Interdisciplinární přístupy pro vývoj a aplikaci nových materiálů v medicínské praxi – nové omické technologie“ (č. CZ.02.01.01/00/23_021/0009224) a Agenturou pro zdravotnický výzkum ČR (AZV - NW26-01-00189): Projekt „Multiomika u pacientů se zánětlivým střevním onemocněním.“

STANOVENÍ FTOH POMOCÍ GC-MS/MS

DITA LEŠTINOVÁ¹, MARIE SUCHANOVÁ¹

¹ ALS ČR (Technické oddělení), Na Harfě 336/9, Praha 9, Česká republika

e-mail: dita.lestinova@alsglobal.com

Úvod:

Fluorotelomerní alkoholy (FTOH) patří do skupiny per- a polyfluorovaných látek (PFAS). Jsou důležitými meziprodukty při výrobě fluorovaných polymerů, které díky svým hydrofobním a oleofobním vlastnostem nacházejí široké uplatnění v obalových materiálech, textiliích, lepidlech a dalších produktech. FTOH jsou prekurzory perfluorovaných karboxylových kyselin (PFCA), například kyseliny perfluorooktanové (PFOA), která je známá svou vysokou perzistencí v životním prostředí. Vzhledem ke své těkavosti se FTOH snadno uvolňují během výroby, používání i likvidace výrobků obsahujících PFAS. Byly proto detekovány ve vzorcích vod, půd, sedimentů i ovzduší^{1,2,3}.

S neustále se zpřísnujícími požadavky na sledování PFAS a snižováním limitů pro jejich stanovení roste potřeba citlivých a validovaných analytických metod umožňujících monitorování těchto látek. V návrhu revize Water Framework Directive (WFD) jsou 6:2 a 8:2 FTOH zahrnuty do skupiny 24 PFAS, pro které budou platit jistá omezení⁴. V reakci na tento regulační požadavek a potřebu monitoringu těchto látek v životním prostředí byla v laboratořích ALS vyvinuta a validována metoda pro stanovení FTOH ve vodných vzorcích.

Metodika:

Příprava vzorků zahrnuje SPE extrakci, následnou extrakci do pentanu, zakoncentrování extraktu a stanovení pomocí plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií s pozitivní chemickou ionizací (GC-MS/MS-PCI). V průběhu vývoje metody byla optimalizována chromatografická separace, teplotní program i konfigurace kolony. Součástí optimalizace bylo také zavedení analytického protektantu, který eliminoval sorpci analytů na aktivních místech systému a zlepšil opakovatelnost nástřiků. Vzhledem k problematické stabilitě analytů, těkavosti a zároveň jejich schopnosti sorpce na různé typy povrchů, byl nejnáročnějším krokem vývoje metody výběr vhodné vzorkovnice a fixačního činidla pro zajištění stejné koncentrace analytů od vzorkování až po zpracování vzorku.

Výsledky a diskuze:

Vyvinutá metoda umožňuje stanovení FTOH s mezí stanovitelnosti 5 ng/L (6:2, 8:2 FTOH) a 10 ng/L (4:2, 10:2 FTOH). Validace byla provedena na různých typech vodných matric. Výtěžnosti uměle kontaminovaných vzorků dosahovaly 94–115 % a opakovatelnost se pohybovala v rozmezí 2–12 %. Funkčnost metody byla ověřena na několika mezilaboratorních porovnáních včetně komerčně dostupného proficiency testingu od firmy LGC.

Závěry:

Byla zavedena metoda pro analýzu 4:2, 6:2, 8:2 a 10:2 FTOH v pitných, povrchových, podzemních a odpadních vodách pomocí GC-MS/MS. Optimalizace chromatografických podmínek, výběru kolony a použití protektantu vedly k dosažení požadované citlivosti a reprodukovatelnosti metody. Dalším krokem bude rozšíření metody na stanovení FTOH v zeminách.

Proč je prezentovaná studie významná:

Fluorotelomerní alkoholy patří mezi významné prekurzory PFAS, jejichž sledování je zmiňováno v připravovaných evropských regulačních požadavcích. Uvedená metoda umožňuje stanovení čtyř zástupců FTOH v různých typech vod. Získané poznatky i metoda samotná tak přispívají ke zlepšení monitorování PFAS v životním prostředí.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora: Validační specialista, ALS Praha

- 1 Habib A., Landa E. N., Holbrook K. L., Walker W.S., Lee W.-Y.: Chemosphere 338, 139439 (2023) <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4456903>
- 2 Titaley I. A.: Environ. Sci.: Advances, 3, 1364 (2024) <https://doi.org/10.1039/d4va00019f>
- 3 Portolés T., Rosales L. E., Sancho J. V., Santos F. J., Moyano E.: J. Chromatogr. A 1264, 75 (2012) <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.016>
- 4 Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC, 2006/118/EC and 2008/105/EC, COM(2022) 540 final (2022) [EUR-Lex - 52022PC0540 - EN - EUR-Lex](#)

PYSPRESSO: PYTHON FRAMEWORK PRO REPRODUKOVATELNÉ A AUTOMATIZOVANÉ ZPRACOVÁNÍ LC–MS DAT

JAN MACHÁŇ¹, VOJTĚCH SEDLÁČEK², RICHARD MASAR¹, MARTIN TRNEČKA², LUKÁŠ NAJDEKR¹

1 Institute of Molecular and Translational Medicine; Palacký University Olomouc; Hněvotínská 1333/5; Olomouc 779 00; Czech Republic

2 Department of Computer Science; Faculty of Science; Palacký University Olomouc; 17. listopadu 12; Olomouc 779 00; Czech Republic

Úvod:

Zpracování rozsáhlých LC–MS omických dat, zejména v případě multi-batch datasetů, vyžaduje kombinaci několika navazujících kroků, jako jsou filtrace dat, normalizace, korekce batch efektu, statistická analýza, vizualizace a tvorba výstupních reportů. Tyto kroky jsou často prováděny pomocí různých nástrojů nebo individuálně psaných skriptů, což může snižovat reprodukovatelnost analýzy a znesnadňovat její opakování nebo úpravu pro jiné experimentální uspořádání. PySPRESSO je open-source framework vyvíjený v jazyce Python, jehož cílem je sjednotit hlavní kroky LC–MS datové analýzy do modulárního, transparentního a reprodukovatelného pracovního prostředí.

Metodika:

PySPRESSO je navrženo jako modulární framework umožňující sestavení analytického workflow z jednotlivých kroků datového zpracování. Součástí workflow jsou metody pro načtení dat, práci s metadaty, filtraci proměnných a vzorků, normalizaci, korekci batch efektů, statistické vyhodnocení, tvorbu grafických výstupů a automatizované generování reportů. Důraz je kladen na transparentní dokumentaci provedených kroků, možnost opakovaného spuštění analýzy a přizpůsobení workflow různým typům experimentálních designů. Vedle samotného Python frameworku je vyvíjeno také grafické uživatelské rozhraní, jehož cílem je umožnit sestavení a spuštění analytického workflow i uživatelům bez znalosti programovacích jazyků.

Výsledky a diskuze:

V rámci této práce je představena počáteční veřejně dostupná verze nástroje PySPRESSO a jeho vyvíjeného grafického uživatelského rozhraní. Framework integruje klíčové kroky LC–MS datové analýzy do jednoho prostředí a umožňuje jejich kombinaci v rámci reprodukovatelného workflow. Výstupem analýzy jsou nejen zpracovaná data a grafické výsledky, ale také report shrnující provedené kroky, použité parametry a získané výstupy. Tím PySPRESSO podporuje lepší dohledatelnost analytického postupu a usnadňuje porovnání výsledků mezi různými běhy analýzy. Offline charakter nástroje je výhodný zejména pro citlivá nebo rozsáhlá data, která není vhodné zpracovávat pomocí webových platforem. Vyvíjené grafické rozhraní zároveň rozšiřuje použitelnost nástroje pro širší okruh výzkumníků, kteří potřebují analyzovat LC–MS data bez nutnosti přímého psaní kódu.

Závěry:

PySPRESSO představuje modulární open-source řešení pro automatizované a reprodukovatelné zpracování LC–MS dat. Spojuje flexibilitu Python frameworku s cílem vytvořit uživatelsky přístupné prostředí pro sestavování analytických workflow. První veřejně dostupná verze nástroje poskytuje základ pro další rozvoj směrem ke standardizovanější, transparentnější a lépe reprodukovatelné LC–MS datové analýze.

Proč je prezentovaná studie významná:

PySPRESSO reaguje na potřebu transparentního a reprodukovatelného zpracování rozsáhlých LC–MS dat. Díky kombinaci modulárního Python frameworku a vyvíjeného grafického rozhraní může zpřístupnit pokročilé analytické workflow i uživatelům bez programátorských zkušeností. Offline zpracování zároveň umožňuje použití nástroje i pro citlivé nebo velkoobjemové datové soubory.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Doktorand v oboru Bioinformatika a výpočetní biologie

Chci poděkovat svému školiteli Lukáši Najdekovi za podporu, odborné vedení a cennou zpětnou vazbu. Dále děkuji Vojtěchovi Sedláčkovi za výbornou spolupráci při integraci backendové části nástroje s frontendovou částí grafického uživatelského rozhraní.

LIPIDOMICKÁ LC-MS/MS ANALÝZA A HODNOCENÍ CERT SKÓRE U PACIENTŮ SE SYSTÉMOVÝM LUPUSEM ERYTHEMATODES A LUPUSEM NEPHRITIS

RICHARD MASARŽ^{1,2}, MARTINA KADLÁČKOVÁ^{1,2}, MARTINA SKÁCELOVÁ³, JAKUB ROZHON^{1,2},
ELIŠKA IVANOVÁ², MARKÉTA DUDKOVÁ³, PAVEL HORÁK³, DAVID FRIEDECKÝ^{1,2}

¹ Laboratoř dědičných metabolických poruch, Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc, Česká republika

² Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, Česká republika

³ III. interní klinika – nefrologická, revmatologická a endokrinologická, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, Česká republika

e-mail: richard.masar01@upol.cz

Úvod:

Systémový lupus erythematoses (SLE) je chronické autoimunitní onemocnění charakterizované systémovým zánětem, oxidativním stresem a postupným orgánovým poškozením. Lupus nephritis (LN) představuje jednu z nejzávažnějších manifestací SLE a je spojena s progresivním poškozením ledvin a dlouhodobou morbiditou a vyšší mortalitou pacientů¹. Cílená lipidomická LC-MS/MS analýza séra představuje vhodný nástroj pro charakterizaci metabolických změn asociovaných se SLE a LN. Cílem studie bylo porovnat sérový lipidom pacientů se SLE bez nefritidy, pacientů s LN a zdravých kontrol a současně vyhodnotit CERT1 a CERT2 skóre jako ukazatele kardiovaskulárního rizika spojeného s ceramidovým a fosfatidylcholinovým metabolismem².

Metodika:

Do studie byly zařazeny vzorky séra pacientů se SLE bez nefritidy (n = 36), pacientů s lupusovou nefritidou (n = 50) a zdravých kontrol odpovídajících věkem a pohlavím (HC; n = 30). Lipidomické profilování bylo provedeno cílenou metodou RP-LC-MS/MS v režimu sMRM s přepínáním polarizace ionizace. Analýza zahrnovala více než 900 lipidových druhů napříč hlavními lipidovými třídami. Navíc byla provedena cílená LC-MS/MS analýza CERT1 a CERT2 skóre, která byla vypočítána z absolutních koncentrací vybraných ceramidů (Cer) a fosfatidylcholinů (PC) a dále pak zařazeny dle kvartilů do rizikových kategorií. Data byla vyhodnocena pomocí univariantských a multivariantských statistických metod, doplněných o vizualizaci lipidových tříd v prostředí Cytoscape a analýzu lipidových drah pomocí BioPAN.

Výsledky a diskuse:

U SLE i LN pacientů byly ve srovnání se skupinou HC pozorovány výrazné změny v lipidovém metabolismu. Kombinace p-hodnot v rámci lipidových tříd získaná Fisherovým testem ukázala, že nejvýznamnější statistické změny v porovnání SLE vs. HC byly po Benjaminiho-Hochbergově korekci (BH-FDR) pozorovány u PC (BH-FDR = $2,73 \times 10^{-20}$), sfingomyelinů (SM; BH-FDR = $1,09 \times 10^{-12}$) a vinyl-etherových fosfatidylcholinů (PC P-; BH-FDR = $8,00 \times 10^{-11}$). Univariantská statistická analýza odhalila signifikantní pokles vybraných polynenasycených fosfatidylcholinů (PUFA-PC; PC(42:10), $p = 5,5 \times 10^{-4}$; PC(37:6), $p = 8 \times 10^{-4}$) doprovázený zvýšením cirkulujících polynenasycených mastných kyselin (FA; FA(22:5), $p = 1,2 \times 10^{-4}$; FA(22:6), $p = 1 \times 10^{-3}$). Tyto změny, vizualizované pomocí krabicových grafů reprezentativních lipidových druhů, odpovídají dysregulaci metabolismu membránových glycerofosfolipidů a zapojení PUFA-PC do zánětlivých procesů. Snížené hladiny vybraných fosfatidylserinů (PS; PS(36:1), $p = 3,8 \times 10^{-4}$; PS(38:4), $p = 6,5 \times 10^{-4}$) dále podporují narušenou homeostázu membránových fosfolipidů u SLE a LN. Analýza pomocí BioPAN potvrdila charakter změn membránových fosfolipidů, přičemž statisticky významné Z-skóre bylo zjištěno u drah propojujících fosfatidylethanolaminy (PE) a PS u SLE vs. HC i LN vs. HC ($|Z| > 1,645$). Rovněž byl pozorován pokles alkyl- a vinyl-etherových fosfolipidů PC O-/P- a PE P-. Tento nálezn je v souladu s dříve popsáným poklesem plasmalogenů u SLE a podporuje souvislost se zvýšeným oxidativním stresem a narušenou homeostázou

membránových lipidů. Zvýšené hladiny lysoetherových forem fosfolipidů, především LPC O-, dále naznačují zvýšenou degradaci membránových fosfolipidů a membránovou remodelaci^{3, 4}.

CERT1 i CERT2 skóre byla zvýšena u pacientů se SLE a LN ve srovnání se zdravými kontrolami, což ukazuje na posun směrem k lipidovému profilu podporujícímu aterosogenezi. CERT2 skóre vykazovalo výraznější schopnost odlišit studované skupiny ($p < 0,05$) a bylo rovněž asociováno s kategoriemi aktivity onemocnění podle SLEDAI ("Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index").

Závěry:

Pomocí lipidomické analýzy séra byly odhaleny koordinované změny lipidového metabolismu u pacientů se SLE a LN, zejména v oblasti alkyl-/vinyl-etherových fosfolipidů a lysofosfolipidů, polynenasycených fosfolipidů, mastných kyselin a fosfatidylserinů. Zvýšené hodnoty CERT1 a CERT2 skóre současně ukazují na vyšší kardiovaskulární riziko u pacientů se SLE a LN.

Proč je prezentovaná studie významná:

Studie propojuje cílenou LC-MS/MS lipidomiku s hodnocením CERT skóre u pacientů se SLE a LN a umožňuje současně sledovat změny související s oxidativním stresem, membránovou remodelací a kardiovaskulárním rizikem. Výsledky ukazují, že lipidomické změny u SLE a LN nejsou pouze izolovanými změnami jednotlivých lipidů, ale odrážejí koordinované změny v lipidových drahách. Tyto nálezy pomáhají zúžit další výzkum na konkrétní oblasti lipidomu, které mohou být následně ověřeny u nově diagnostikovaných, dosud neléčených nebo longitudinálně sledovaných pacientů.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Ph.D. student / výzkumný pracovník, Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

¹ Hoi A., Igel T., Mok C. C., Arnaud L.: Lancet 403, 2326 (2024).

² Hilvo M., Vasile V. C., Donato L. J., Hurme R., Laaksonen R.: Front. Endocrinol. 11 (2020). doi: 10.3389/fendo.2020.570628.

³ Hu C., Zhou J., Yang S., Li H., Wang C., Fang X., Fan Y., Zhang J., Han X., Wen C.: Free Radic. Biol. Med. 101, 475 (2016).

⁴ Lu L. a 10 spoluautorů: Biomolecules 8, 105 (2018).

Práce byla podpořena projektem ITI OP JAK (CZ.02.01.01/00/23_021/0009224) a Ministerstvem zdravotnictví České republiky (DRO, FNOI, 00098892).

CAVIPLASMA: ADVANCED TECHNOLOGY FOR THE DECONTAMINATION OF CYANOBACTERIA AND CYANOTOXINS

KLÁRA ODEHNALOVÁ¹, BLAHOSLAV MARŠÁLEK¹, ŠTĚPÁN ZEŽULKA¹, PAVEL ŠŤAHEL², RADEK
HORŇÁK², PAVEL RUDOLF³, MARTIN HUDEC³

¹ Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie, Botanický ústav AV ČR, v.v.i., Lidická 25/27, 602 00 Brno, Česká republika

² Ústav fyziky a technologií plazmatu, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno, Česká republika

³ Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Odbor fluidního inženýrství Viktora Kaplana, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Česká republika

e-mail: klara.odehnalova@ibot.cas.cz

Introduction:

Cyanobacteria are essential photoautotrophic microorganisms that have a significant role in providing oxygen and maintaining ecological balance. However, they are becoming overabundant due to excessive human nutrient inputs and climate change. As a result, cyanobacterial blooms producing toxic secondary metabolites, cyanotoxins that can harm the ecosystem and pose a public health risk, form on surface water bodies. These cyanotoxins, considered among the most lethal biological poisons currently known, exhibit a vast diversity in their chemical structures, toxic potencies, and the specific physiological mechanisms and organ systems they affect^{1,2}.

To address this global environmental challenge, CaviPlasma technology (CP) has been developed as an innovative device for the large-scale elimination of biological and chemical pollutants. The core principle of the system relies on the synergy of hydrodynamic cavitation and low-temperature plasma discharge to generate highly reactive species directly in the water^{3,4}. Unlike traditional laboratory-scale systems, this technology is capable of treating thousands of litres per hour (up to 4,000 L·h⁻¹), making it suitable for real-world applications.

Methods:

Laboratory-scale experiments were conducted using a pilot treatment unit with a flow rate of 25–28.4 L·min⁻¹ and an applied power of 1.35–4 kW. The scalability of the process was assessed using a CP unit with a nominal treatment capacity of 4,000 L·h⁻¹. The unit incorporated transparent polymethyl methacrylate nozzles (14–16 mm diameter) and electrodes fabricated from either titanium or chrome-plated steel. High-voltage power was supplied through specialised generators, including advanced high-frequency (70 kHz) 7.5 kW pulsed power supplies designed to optimise discharge stability and energy efficiency. Biological and physico-chemical vitality was assessed through the measurement of chlorophyll-a and phycocyanin concentrations, as well as photosynthetic activity via chlorophyll fluorescence induction. A critical component of the methodology was the advanced monitoring of cyanotoxin kinetics. Changes in cyanotoxin concentrations were monitored using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS).

Results and discussion:

A major objective of the study was to evaluate both cyanobacterial inactivation and the subsequent fate of released cyanotoxins in treated surface waters. The technology achieved up to 95% removal of cyanobacterial biomass, including representatives of the genera *Microcystis*, *Planktothrix*, and *Aphanizomenon*. Cyanobacterial destruction was induced by intense oxidative stress, resulting in loss of cellular integrity, collapse of gas vesicles, and subsequent irreversible sedimentation of damaged cells. Particular attention was devoted to the dynamics of cyanotoxin release and degradation following cell disruption. Cyanotoxin concentrations were comprehensively monitored using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), enabling sensitive and selective quantification of both intracellular and

extracellular toxin fractions. LC–MS/MS analyses revealed that approximately 40% of intracellular cyanotoxins were released into the dissolved phase immediately after treatment. However, a progressive decline in dissolved cyanotoxin concentrations was observed during the following seven days, indicating ongoing degradation driven by residual oxidising species and probably naturally occurring microbial processes.

Conclusion:

The research and field validation of CaviPlasma technology demonstrate its exceptional potential as a broad-spectrum, high-throughput solution for the remediation of water bodies affected by toxic cyanobacterial blooms. While the initial destruction of cyanobacterial cells triggers a release of intracellular toxins—typically around 40% of the total concentration—long-term monitoring confirms that these toxins are not persistent in the treated environment.

Proč je prezentovaná studie významná:

This study provides an integrated evaluation of cyanobacterial inactivation and cyanotoxin degradation, addressing two key challenges in the management of harmful algal blooms. The application of LC–MS/MS enabled detailed monitoring of cyanotoxin release and degradation kinetics following treatment. The findings demonstrate the effectiveness and safety of plasma-based technology and support its potential for large-scale water treatment applications.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Vědecký pracovník

¹ J. S. Metcalf, G. A. Codd, *Toxins* 12 (2020).

² Z. Svircev, D. Lalic, G. Bojadzija Savic, N. Tokodi, D. D. Backovic, L. Chen, J. Meriluoto, G. A. Codd, *Arch. Toxicol.* 93 (2019).

³ J. Cech, P. Stahel, L. Prokes, D. Trunec, R. Hornák, P. Rudolf, B. Marsálek, E. Marsálková, P. Lukes, *Plasma Sources Sci. Technol.* 34 (2025).

⁴ K. Odehnalova, J. Cech, E. Marsalkova, P. Stahel, B. Mayer, V. T. Santana, P. Rudolf, B. Marsalek, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 32 (2025).

This work was supported by the Ministry of the Interior of the Czech Republic under Project No. VB02000041.

UHPSFC-MS/MS AS A TOOL FOR THE FAST ANALYSIS OF PHARMACEUTICALLY RELEVANT BORON CLUSTER COMPOUNDS

VERONIKA PILAŘOVÁ¹, TEREZA ŠLAPÁKOVÁ¹, ONDŘEJ HORÁČEK¹, LUCIE NOVÁKOVÁ¹, BOHUMÍR
GRÜNER², RADIM KUČERA¹

¹ Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, 50003 Hradec Králové, Czechia

² Institute of Inorganic Chemistry of the Czech Academy of Sciences, 250 68 Husinec-Řež, Czechia

e-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

Introduction:

Boron cluster compounds, particularly carboranes and metallacarboranes, represent a rapidly expanding class of molecules in boron chemistry. Among them, a group of [*nido*-7,8-C₂B₉H₁₂]⁻ and cobalt bis(dicarbollide) derivatives has attracted considerable attention due to their exceptional thermal and chemical stability. Hence, they find applications in materials science, electrochemistry, analytical chemistry, and medicinal chemistry¹. Boron cluster incorporation in the drugs structure often substantially alters the physicochemical and pharmacological properties, potentially leading to improved selectivity, enhanced biological activity, and novel mechanisms of action². Therefore, the development of methods to assess the pharmacokinetic behavior of boron-containing drug candidates is essential for their further development.

Methodology:

Ultra-high-performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry employing electrospray ionization (UHPSFC-ESI-MS/MS) and UniSpray ionization (UHPSFC-US-MS/MS) was developed for the analysis of 14 boron cluster compounds. Six stationary phases, namely diol, 2-picolylamine, 1-aminoanthracene, HSS C18, pentabromobenzyl (PBrB), and porous graphitic carbon, were evaluated. During method development, the effects of mobile-phase composition, organic modifiers, additives, gradient conditions, column temperature, and back-pressure regulator pressure were investigated. Selected reaction monitoring (SRM) transitions were optimized for all analytes. The Design of Experiments (DoE) approach was subsequently employed to optimize ionization-source parameters and makeup solvent composition for both ESI and US interfaces.

Results and discussion:

Among the tested stationary phases, diol and PBrB columns provided the most favorable selectivity and peak shapes, while HSS C18 yielded broader peaks. Critical analyte pairs differing by only 1 Da were successfully resolved. Two compounds exhibited strong retention, which required the mobile phase composition tuning to increase its elution strength. It was confirmed that ammonia was necessary for elution, as water in methanol did not elute the problematic compounds. On the other hand, acetonitrile in the organic modifier improved elution, resolution, and peak shape. Finally, 50 mm diol with methanol/acetonitrile + 5 mmol/l ammonia in CO₂ and gradient elution from 10 to 65 % enabled the separation of all 14 analytes in only 8 min. Optimization of ESI and UniSpray parameters using a DoE approach with 27 experiments generated statistically valid models describing the influence of instrumental factors on signal intensity. Only neat organic solvents without any additives, i.e., ethanol for ESI and methanol for US, were selected as makeup solvents. Final methods were used to evaluate linearity over the calibration range of 50 ng/mL to 500 ng/mL and repeatability at 3 concentration levels. The UHPSFC-ESI-MS/MS method provided higher sensitivity and a wider linear dynamic range than UHPSFC-US-MS/MS. Repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD, %), was comparable between the two methods: RSD < 15.5% for peak areas and < 3.6% for retention times, respectively.

Conclusions:

A rapid, selective, and sensitive UHPSFC-MS/MS method was developed for the analysis of 14 various structural types of boron cluster compounds. Complete separation of all analytes, including critical compounds, was achieved within 8 min. Evaluation of ESI and US interfaces confirmed ESI as the more suitable ionization technique due to its higher sensitivity and broader linear range. The developed method serves as a valuable analytical tool for future studies focused on the metabolism and pharmacokinetics of boron-based drug candidates.

The importance of the study:

The developed method provides a general analytical platform for the rapid characterization of boron cluster compounds with potential pharmaceutical applications. Its high selectivity and sensitivity make it suitable for future analysis of biological samples, enabling studies of metabolism, biotransformation, and pharmacokinetic behavior of boron-modified drug candidates.

Current position of the presenting author: AP/ VP- Junior.

1. Horáček O., Dhaubhadel U., Holub J., Grüner B., Armstrong D. W., Kučera R.: *Chirality* 35, 937 (2023).
2. Gabel D.: *Pure and Applied Chemistry* 87, 173 (2015).

The study was supported by the projects GA CR [25-16216S](#) and New Technologies for Translational Research in Pharmaceutical Sciences /NETPHARM, project ID CZ.02.01.01/00/22_008/0004607, co-funded by the European Union.

ANALYSIS OF HARMFUL ESTRAGOLE AND OTHER TERPENES IN FENNEL TEA BY HIGH-TEMPERATURE SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY–APCI-MS/MS

KATEŘINA PLACHKÁ, ŠTEFAN KOSTURKO, VERONIKA PILAŘOVÁ, ŠIMON KOBLIŽEK, ŠIMON VANĚK,
LUCIE NOVÁKOVÁ

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

e-mail: plachkka@faf.cuni.cz

Introduction:

Fennel tea is widely consumed due to its beneficial effects on digestion and gastrointestinal discomfort and is frequently recommended for children and infants. However, fennel contains estragole, a naturally occurring phenylpropanoid compound associated with potentially toxic and carcinogenic effects. Therefore, the consumption of estragole-containing products should be limited, particularly in sensitive populations such as children. Special fennel teas intended for pediatric use are manufactured using modified processing and drying procedures designed to reduce estragole content. Therefore, reliable determination of estragole in fennel products is essential for assessing consumer exposure and ensuring product safety. However, the determination of estragol together with other terpenes is analytically challenging due to structural similarity and isomerism. Supercritical fluid chromatography (SFC) offers an alternative approach to typically used gas chromatography (GC). Apart from fast separation, SFC enables also hyphenation to different ionization sources which can enhance sensitivity and/or mitigate potential matrix effects.

Methodology:

A novel supercritical fluid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (SFC-APCI-MS/MS) method was developed for the separation and quantification of 20 terpenes. Chromatographic separation was achieved using a porous graphitic carbon (PGC) stationary phase operated at 150 °C. A CO₂-based mobile phase modified with 75% acetonitrile in methanol enabled efficient separation of several isomeric and/or isobaric analyte pairs. APCI parameters were optimized using a design-of-experiments approach.

Supercritical fluid extraction (SFE) was optimized by design-of-experiment approach for extraction of fennel drug samples to determine terpene profiles and estragole content directly in tea materials. Ultrasound-assisted extraction was subsequently used to verify extraction completeness. In addition, a liquid–liquid extraction procedure was developed for the extraction of target analytes from prepared tea infusions to evaluate their release during tea preparation and consumption.

Results and Discussion:

The developed SFC-APCI-MS/MS method enabled baseline or near-baseline separation of 20 target terpenes within 11 min, including several critical isomeric and isobaric pairs. The use of PGC column at elevated temperature provided unique selectivity that could not be achieved under conventional SFC temperatures, which was critical especially for early-eluting compounds. APCI proved suitable for sensitive detection of nonpolar terpene analytes, with limits of quantification for most compounds around 0.1 µg/mL.

The complete analytical workflow, including sample preparation and chromatographic analysis, was validated. Quantitative performance characteristics including calibration ranges, accuracy, precision, and sensitivity were determined. The validated method was subsequently applied to the analysis of 24 commercially available fennel tea samples, including products intended for children.

Conclusions:

A novel high-temperature SFC-APCI-MS/MS method was developed and validated for the determination of estragole and 19 other terpenes in fennel tea samples. The combination of PGC stationary phase at high temperature, APCI-MS/MS detection, and optimized extraction procedures enabled efficient analysis of structurally similar terpenes. The developed workflow provides a suitable tool for assessing estragole content in fennel products and evaluating its release into consumed tea infusions. It is also a faster and more economically-friendly alternative to typically used GC.

Importance of the study:

The study introduces a new SFC-APCI-MS/MS method that enables the separation and quantification of 20 terpenes, including isomeric compounds, in a single 11min analysis. The method was used to assess the content of the potentially toxic compound estragole in fennel teas, including products intended for children. The results may contribute to a more objective assessment of consumer exposure to estragole from commonly consumed beverages.

Current position of the first author:

postdoc

The study was supported by the NETPHARM, project ID CZ.02.01.01/00/22_008/0004607, co-funded by the European Union..

VLIV SLOŽENÍ PŘÍDAVNÉ KAPALINY NA IONIZAČNÍ ÚČINNOST A TVORBU ADUKTŮ V SFC-ESI-MS

KATEŘINA PRAŽÁKOVÁ, KATEŘINA PLACHKÁ, ŠTEFAN KOSTURKO, FILIP BAŘINKA, LUCIE NOVÁKOVÁ

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Akademika Heyrovského 1203,
Hradec Králové, Česká republika

e-mail: prazakokat@faf.cuni.cz

Úvod:

Superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (SFC-MS) představuje rychlou, účinnou a environmentálně šetrnější alternativu LC-MS. Její využití se rozšiřuje ve farmaceutické analýze, bioanalýze, analýze přírodních látek, potravin a omických přístupech, přičemž nejčastěji je používána ionizace pomocí elektrospreje (ESI). Spojení SFC-MS je však vzhledem k přítomnosti CO₂ v mobilní fázi náročnější než v LC-MS a vyžaduje optimalizované rozhraní se zavedením přídatné kapaliny. Tato kapalina zabraňuje srážení analytů po dekompresi CO₂ a zároveň ovlivňuje ionizaci. Předchozí studie ukázaly, že složení přídatné kapaliny má významný vliv na intenzitu iontů protonovaných, respektive deprotonovaných molekul^{1,2}. Dosud však nebylo systematicky studováno, zda jsou pozorované změny způsobeny odlišnou ionizační účinností nebo redistribucí signálu směrem k aduktovým iontům.

Metodika:

V této studii byl hodnocen vliv složení přídatné kapaliny a podílu organického modifikátoru v mobilní fázi na ionizační účinnost a tvorbu aduktů v SFC-ESI-MS. Analyzováno bylo více než 140 látek za použití 12 přídatných kapalin na bázi methanolu, ethanolu a isopropanolu, s přídatkem těkavých aditiv – amoniaku, kyseliny mravenčí nebo vody, i bez nich. Pro posouzení vlivu složení mobilní fáze byly testovány čtyři izokratické podmínky s rozdílným zastoupením methanolu jako organického modifikátoru. Analýzy byly provedeny v pozitivním a negativním módu ionizace v režimu MS skenu.

Výsledky a diskuze:

Hmotnostní spektra byla vyhodnocena z hlediska přítomnosti a intenzity iontů protonovaných/deprotonovaných molekul a dále z hlediska výskytu a relativního zastoupení aduktových iontů. Pozornost byla věnována nejen aduktům souvisejícím s přítomností aditiv v přídatné kapalině, ale také případným méně obvyklým iontům, jejichž vznik může být podporován přítomností CO₂ v mobilní fázi. Výsledky potvrdily výrazný vliv podílu organického modifikátoru v mobilní fázi na MS odezvu analytů, přičemž vyšší zastoupení methanolu vedlo k vyšší intenzitě MS odezvy. Rozdíly ve spektrálním profilu byly pozorovány také v závislosti na typu aditiva a alkoholu tvořícím základ přídatné kapaliny.

Závěry:

Studie rozšířila poznatky o vlivu složení mobilní fáze a přídatné kapaliny na SFC-ESI-MS odezvu širokého souboru analytů. Hodnocení intenzity iontů protonovaných/deprotonovaných molekul a aduktů umožnilo posoudit, zda jsou změny MS odezvy spojeny převážně se změnou ionizační účinnosti nebo se změnou zastoupení aduktů.

Proč je prezentovaná studie významná:

Prezentovaná studie přispívá k hlubšímu porozumění vlivu složení mobilní fáze a přídatné kapaliny na účinnost ionizace a tvorbu aduktů v SFC-ESI-MS. Získané výsledky mohou zároveň podpořit racionálnější výběr přídatné kapaliny při vývoji nových SFC-ESI-MS metod.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

První autorka je PhD studentkou na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

¹ Akbal L., Hopfgartner G.: J. Chromatogr. A 1517, 176 (2017).

² Plachká K., Gazárková T., Škop J., Guillaume D., Svec F., Nováková L.: Anal. Chem. 94, 4841 (2022).

Studie byla finančně podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 256326) a Regionálním výzkumným a inovačním fondem Královéhradeckého kraje (projekt č. 25INV06-0005).

PLAZMATICKÝ LIPIDOM PACIENTŮ TRPÍCÍCH AUTOIMUNITNÍMI REVMATICKÝMI ONEMOCNĚNÍMI: POTENCIÁLNÍ PREDIKTOR KARDIOVASKULÁRNÍHO RIZIKA

JAKUB ROZHON ¹, MARTINA KADLÁČKOVÁ ¹, RICHARD MASAR ¹, BLANKA STIBŮRKOVÁ ², RADANA BRUMAROVÁ ¹, DAVID FRIEDECKÝ ¹

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

² Revmatologický ústav, Oddělení molekulární biologie a genetiky, Praha, Česká republika

e-mail: jakub.rozhon@upol.cz

Úvod:

Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM) a systémová sklerodermie (SSc) představují heterogenní autoimunitní revmatická onemocnění spojená se systémovým zánětem, imunitně zprostředkovaným poškozením tkání, vaskulární dysfunkcí a zvýšeným kardiovaskulárním (KV) rizikem. U pacientů s IZM bylo popsáno zvýšené riziko koronárního postižení a častější výskyt tradičních KV rizikových faktorů, zatímco u SSc je zvýšené KV riziko spojováno zejména s endoteliální dysfunkcí, mikrovaskulárním postižením, zánětem a změnami lipidového metabolismu¹. Lipidomická analýza krevní plazmy založená na kapalinové chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) představuje vhodný neinvazivní nástroj pro charakterizaci systémových metabolických změn a KV stratifikaci pacientů trpících těmito onemocněními^{2,3}. Cílem předložené studie bylo porovnat plazmatický lipidom pacientů s IZM, SSc a zdravých kontrol (ZK). Současně také vyhodnotit skóre CERT1 a CERT2 jako ukazatele potenciálního KV rizika souvisejícího s uvedenými onemocněními.

Metodika:

Do studie bylo zařazeno celkem 390 vzorků krevní plazmy, zahrnujících pacienty trpící IZM, SSc a věkově odpovídající kohortu ZK. Lipidomické profilování bylo provedeno metodou RP-LC-MS/MS v režimu sMRM s přepínáním polarizace ionizace. Analýza zahrnovala více než 500 semikvantifikovaných lipidových druhů napříč 21 hlavními lipidovými třídami. Paralelně byla provedena cílená RP-LC-MS/MS analýza vybraných ceramidů (Cer) a fosfatidylcholinů (PC) za účelem výpočtu CERT1 a CERT2 skóre. Tato analýza byla provedena v pozitivním režimu MRM a zahrnovala celkem 7 vybraných Cer a PC s příslušnými interními standardy. Všechna data byla vyhodnocena pomocí univariantských (UVA) a multivariantských (MVA) statistických přístupů.

Výsledky a diskuse:

Pomocí MVA byl pozorován trend stratifikace patientských skupin vůči ZK, což poukazuje na výraznou systémovou remodelaci lipidomu, přičemž IZM oproti ZK vykazuje širší rozsah změn než SSc. UVA odhalila u IZM pacientů ve srovnání se ZK nárůst vybraných Cer, sfingomyelinů (SM), triacylglycerolů (TG), diacylglycerolů (DG), lysofosfatidylethanolaminů (LPE) a části etherových fosfolipidů (PL). Současně byly sníženy některé fosfatidylinositoly (PI), cholesterylestery (CE) a polynenasycené fosfatidylcholiny (PUFA-PC). Změny v lipidových profilech mohou souviset s kombinací systémového zánětu, alterovanou energetickou homeostázou, membránovou remodelací a aktivací sfingolipidového metabolismu. Zvýšení Cer a SM je biologicky významné zejména v rámci jejich vztahu k buněčnému stresu, zánětlivé signalizaci, insulinové rezistenci, endoteliální dysfunkci a aterogenním procesům. U SSc pacientů byly v porovnání se ZK patrné výrazné změny ve třídách membránových PL. Nejvýraznější trend představoval pokles řady PC, etherových fosfatidylethanolaminů (PE P-/O-), lysofosfatidylcholinů (LPC), PI a volných mastných kyselin (FA), doprovázený zvýšením podílu TG a DG. Výsledky mohou souviset s porušenou homeostázou membránových lipidů, zvýšeným oxidativním stresem, vaskulárním postižením a remodelací lipidových zásob. Pokles alkyl- a vinyl-etherových PC (PC O-/P-) a PE O-/P- je z biologického hlediska zajímavý v souvislosti s oxidativním stresem a membránovou integritou. Přímé porovnání IZM a SSc pacientů ukázalo, že IZM je spojena s vyšší hladinou většiny změřených Cer, SM a části lyso-/etherových PL, zatímco u SSc byl patrnější relativní pokles

membránových a polynenasycených PL. Uvedené rozdíly naznačují, že ačkoliv obě onemocnění sdílejí systémový zánětlivý charakter, jejich lipidomické profily se liší v míře zapojení metabolismu SM, membránové remodelaci a lipidů asociovaných s KV postižením.

Cílená LC-MS/MS analýza lipidů zahrnutých do výpočtu CERT1 a CERT2 skóre podpořila lipidomické nálezy. U pacientů s IZM i SSc byl oproti ZK patrný posun směrem k vyšším hodnotám CERT1 a CERT2 skóre. Nejvýraznější rozdíly byly pozorovány u aterogenních Cer [(Cer(d18:1/16:0), IZM ($p = 3,09 \times 10^{-22}$), SSc ($p = 1,17 \times 10^{-14}$); Cer(d18:1/18:0), IZM ($p = 1,80 \times 10^{-17}$), SSc ($p = 1,95 \times 10^{-8}$); Cer(d18:1/24:1), IZM ($p = 1,73 \times 10^{-14}$), SSc ($p = 4,85 \times 10^{-3}$)], které byly u obou onemocnění zvýšené oproti ZK. Vybrané polynenasycené PC zahrnuté v CERT2 skóre [PC(16:0/22:5), IZM ($p = 2,81 \times 10^{-6}$), SSc ($p = 1,02 \times 10^{-5}$); PC(14:0/22:6), IZM ($p = 5,50 \times 10^{-3}$), SSc ($p = 4,40 \times 10^{-5}$)] byly u pacientů naopak snižené.

Závěry:

Lipidomická LC-MS/MS analýza krevní plazmy odhalila koordinované změny lipidového metabolismu u pacientů s IZM a SSc. V rámci IZM onemocnění dominoval zejména nárůst Cer, SM, TG a dalších lipidových tříd spojených se systémovou metabolickou a zánětlivou remodelací. U SSc pacientů byl pozorován výraznější pokles membránových a polynenasycených PL, včetně etherových forem, což může souviset s oxidativním stresem, membránovou dysfunkcí a vaskulárním postižením. Cílená analýza provedená za účelem výpočtu CERT1 a CERT2 skóre současně indikovala vyšší KV riziko u patientských skupin v porovnání se ZK. Nálezy naznačují, že změny Cer a PC profilů mohou u pacientů s IZM a SSc doplňovat informace získané ze standardních lipidových parametrů a přispět k přesnější charakterizaci reziduálního KV rizika souvisejícího s chronickým zánětem a lipidovou remodelací. Kombinace obou zmíněných lipidomických přístupů tak představuje slibný nástroj pro hlubší charakterizaci systémových autoimunitních revmatických onemocnění a identifikaci pacientů s potenciálně zvýšeným KV rizikem.

Proč je prezentovaná studie významná:

Význam získaných výsledků spočívá v možném klinickém přesahu směrem k individualizaci preventivní péče u pacientů s autoimunitními revmatickými onemocněními. Zejména u pacientů s IZM může být hodnocení KV rizika komplikováno současným svalovým postižením, systémovým zánětem, imunosupresivní terapií a u specifických podskupin pacientů také obavou z mytoxických či autoimunitně zprostředkovaných komplikací hypolipidemické léčby. Lipidomické profilování spolu s modely CERT1 a CERT2 by proto mohly v budoucnu představovat doplňkový nástroj pro rozlišení pacientů s výraznější proaterogenní zátěží, u nichž by bylo vhodné intenzivnější sledování KV rizika a personalizované rozhodování o preventivních či hypolipidemických strategiích.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Ph.D. student / výzkumný pracovník, Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

¹ Qin L, Li F, Luo Q, Chen L, Yang X and Wang H: Front. Med. 8:808915 (2022). doi: 10.3389/fmed.2021.808915.

² Hilvo M, Vasile VC, Donato LJ, Hurme R and Laaksonen R: Front. Endocrinol. 11:570628 (2020). doi: 10.3389/fendo.2020.570628.

³ Papazoglou AS, Stalikas N, Moysidis DV, Otountzidis N, Kartas A, Karagiannidis E, Giannakoulas G, Sianos G: Journ. of Clin. Lipidol. 16:3 (2022). doi: 10.1016/j.jacl.2022.02.001.

Práce byla podpořena projektem ITI OP JAK (CZ.02.01.01/00/23_021/0009224), BBMRI.cz (reg. no. LM2023033) a Ministerstvem zdravotnictví České republiky (DRO, FNOI, 00098892).

LIPID FRAGMENT ANIONS DESORBED FROM MEMBRANE IN SINGLE-VESICLE HYPERVELOCITY IMPACTS

ANATOLII SPESYVYI^{1,2}, CHEN WANG², ALES CHARVAT², HEBER BARRAGÁN-MAYET², MAREK
CEBECAUER¹, AGNIESZKA OLŻYŃSKA¹, MIROSLAV POLÁŠEK¹, JÁN ŽABKA¹, BERND ABEL^{1,2}

¹J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague 18223, Czechia

²Institute of Chemical Technology, Leipzig University, Leipzig 04103, Germany

e-mail: anatolii.spesyvyi@jh-inst.cas.cz

Artificial POPC lipid (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) vesicles with diameters of 30-200 nm serve as a model for real exosomes and small extracellular vesicles. These vesicles are omnipresent in living systems, acting as means of transport and communication between cells. This makes them very promising biomarker carriers for various human diseases, including cancers and autoimmune diseases. On the other hand, in the quest for life detection in space, vesicles could also be a valuable indicator of simple, single-celled organisms like bacteria. In this context, vesicles have a much higher chance of being embedded in aerosols and transferred into open space, where they can be detected by nearby impact ionization mass spectrometry probes. Here, we used vesicles within a 100–150 nm diameter range, which were positively charged via nanoelectrospray, transferred into a vacuum, and analyzed using SELINA (Selected Ion Nanoparticle Accelerator).¹⁻³ The m/z , charge, and mass of single vesicles were measured on-the-fly by charge detection mass spectrometry, with subsequent acceleration to velocities of 3.4-3.7 km/s to impact a metallic surface. The anions produced by the impact of a single vesicle were immediately analyzed by a linear time-of-flight mass spectrometer. With the help of parallel Orbitrap CID of POPC, the phosphorus-containing ions PO_2^- (m/z 63), PO_3^- (m/z 79), H_2PO_4^- (m/z 97) were assigned, together with suggested palmitic and oleic acid-related ions, and even molecular adducts. This specific mode of surface-induced dissociation can substantially enhance existing bulk mass spectrometry analyses of vesicles by overcoming sample heterogeneity and uncovering different populations of vesicles based on their physical properties (mass, charge) and single-vesicle lipid composition signatures.

¹Spesyvyi A., Cebecauer M., Žabka J., Olżyńska A., Malečková M., Johanovská Z., Polášek M., Charvat A., Abel B.: *Analytical Chemistry* 97, 9131 (2025).

²Spesyvyi A., Žabka J., Polasek M., Charvat A., Schmidt J., Postberg F., Abel B.: *J Am Soc Mass Spectr* 34, 878 (2023).

³Spesyvyi A., Žabka J., Polášek M., Malečková M., Khawaja N., Schmidt J., Kempf S., Postberg F., Charvat A., Abel B.: *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 382, 20230208 (2024).

The authors acknowledge the financial support of the Czech Science Foundation (GAČR) through grant No. 24-13757L and are grateful for funding within the European Union ERA-Chair Project 101186661 – SPACE.

CHARAKTERIZACE PROFILU FENOLICKÝCH LÁTEK A DALŠÍCH SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ VE SLUNEČNICOVÉM PROTEINOVÉM KONCENTRÁTU METODOU UHPLC-HRMS/MS

LUCIE STARÁ, TOMÁŠ KOUŘIMSKÝ, BEVERLY HRADECKÁ, JANA HAJŠLOVÁ

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5, Praha 6–
Dejvice, Česká republika

e-mail: lucie.stara@vscht.cz

Úvod:

Fenolické látky a další sekundární metabolity představují významnou skupinu sloučenin, které mohou negativně ovlivňovat senzorickou jakost rostlinných proteinů. Ta je často charakterizována „zeleným“ aromatem a trpkou až hořkou chutí, souhrnně označováno jako off-flavour¹. Problematika identifikace a eliminace těchto látek je předmětem výzkumu evropského konsorcia FLAVOURsome (COST Action CA22161), jehož cílem je podpořit vývoj senzoricky atraktivních potravin na bázi rostlinných proteinů. V rámci tohoto COST projektu Ústav analýzy potravin a výživy spolupracuje s Ústavem mléka, tuků a kosmetiky na projektu LUC24117 se zaměřením na výzkum možností získání proteinů z olejnin.

Přestože slunečnicová semínka představují perspektivní zdroj proteinů, jejich širší uplatnění v potravinářském průmyslu je stále omezené. Jedním z důvodů je nedostatek informací o profilu fenolických látek a dalších sekundárních metabolitů, které mohou mít negativní vliv na senzorické vlastnosti finálních produktů^{2,3}. Cílem této studie bylo charakterizovat jejich profil ve slunečnicovém proteinovém koncentrátu a určit sloučeniny potenciálně odpovědné za vznik off-flavour. Pro tento účel byla použita technika ultraúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-HRMS/MS).

Metodika:

Pro stanovení profilu fenolických látek a dalších sekundárních metabolitů byly připraveny 80% methanolické extrakty 16ti vzorků slunečnicových proteinových koncentrátů (1 g vzorku, MeOH:H₂O 80:20, 1:5, w/v). Extrakce byla podpořena intenzivním třepáním, následovala centrifugace a analýza získaného supernatantu metodou UHPLC-HRMS/MS. Analýza byla provedena na systému UHPLC Vanquish Horizon s kolonou ACQUITY UPLC HSS T3 (1,8 μm; 2,1 × 100 mm) ve spojení s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris 240. Jako mobilní fáze byl použit gradient H₂O a MeOH obsahujících 5 mM HCOONH₄ a 0,1 % (v/v) HCOOH. Ionizace ESI probíhala v pozitivním i negativním módu (ESI+/ESI-). Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozsahu *m/z* 100–1200 v režimu „data-dependent acquisition“ (DDA, Top 20). Získaná data byla následně zpracována pomocí MZmine 4 softwaru⁴. Anotace detekovaných sloučenin byla provedena porovnáním MS/MS spekter se spektrálními knihovnami GNPS, MassBank, MoNA a MSnLib. Pro strukturální charakterizaci sloučenin bez shody ve spektrálních knihovnách byl následně využit software SIRIUS 6.3.3⁵. Jednotlivým sloučeninám byly následně přiřazeny identifikační úrovně podle Schymanski *et al.* (2014)⁶.

Výsledky a diskuze:

Komplexní charakterizace fenolických látek a dalších sekundárních metabolitů ve slunečnicových proteinových koncentrátech představuje analytickou výzvu vzhledem k jejich interakcím s proteinovou maticí^{1,7}. Využití UHPLC-HRMS/MS v kombinaci s cíleným screeningem a pokročilými nástroji pro zpracování dat umožnilo anotovat více než 50 fenolických látek a dalších sekundárních metabolitů (level 2 a 3). Anotace byla provedena na základě porovnání experimentálních MS/MS spekter se spektrálními knihovnami, doplněná o informace ze softwaru SIRIUS (Confidence score ≥ 0,7), databází (např. FooDB) a literaturou. Pro kyselinu chlorogenovou bylo celkem anotováno pět izomerních forem, dále byly zaznamenány geometrické izomery některých fenolických látek (např. kyseliny kávové) a glykosidické deriváty flavonoidů (např. taxifolin-

7-O-glukosid). Kromě běžně popisované kyseliny chlorogenové byly anotovány také méně charakterizované sekundární metabolity, zejména flavonoidy (epikatechin, taxifolin) a kumariny (skopoletin, isofraxidin)⁷. Například skopoletin byl popsán u slunečnice v souvislosti s obrannou reakcí na stres⁸. Jeho anotace ve slunečnicovém proteinovém koncentrátu naznačuje jeho možnou stabilitu během technologického zpracování semen. V další fázi bude rovněž provedeno porovnání anotovaných sloučenin s databází BitterDB za účelem vytipování potenciálně hořkých látek a identifikace vzorků, které by mohly vykazovat zvýšený potenciál pro vznik nežádoucí off-flavour⁹.

Závěry:

S využitím UHPLC-HRMS/MS byl charakterizován profil fenolických látek a dalších sekundárních metabolitů v 16ti vzorcích slunečnicových proteinových koncentrátů, přičemž dominantní skupinu tvořily fenolické kyseliny a jejich deriváty. Ve srovnání s dosud publikovanými studiemi, které se zaměřovaly převážně na hlavní fenolické kyseliny, bylo v této práci charakterizováno široké spektrum sekundárních metabolitů přítomných ve slunečnicových proteinových koncentrátech.

Proč je prezentovaná studie významná:

Studie rozšiřuje dosavadní poznatky o chemickém složení u slunečnicových proteinových koncentrátech prostřednictvím komplexní charakterizace fenolických látek a dalších sekundárních metabolitů pomocí UHPLC-HRMS/MS, cíleného screeningu a pokročilých nástrojů pro anotaci dat. Získané výsledky představují důležitý podklad pro identifikaci sloučenin, které mohou přispívat ke vzniku nežádoucího off-flavour a limitovat senzorickou kvalitu produktů na bázi slunečnicových proteinových koncentrátů. Současně získané informace jsou důležité z pohledu hledání vhodné technologie přípravy slunečnicových proteinových koncentrátů a strategie omezení přenosu těchto látek ze vstupních surovin.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Studentka 1. ročníku doktorského studia (studijní program Potraviný a přírodní produkty), ÚAPV, VŠCHT Praha.

1. Vatansever S., Chen B., Hall C.: Sustainable Food Proteins 2, 33 (2024). <https://doi.org/10.1002/sfp2.1025>.
2. Boukid F., Mefleh M., Mameri H., Rosell C. M.: Food Bioscience 62, 105580 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105580>.
3. González-Pérez S., Vereijken J. M.: Journal of the Science of Food and Agriculture 87, 2173 (2007). <https://doi.org/10.1002/jsfa.2971>.
4. Schmid R. a 45 spoluautorů: Nat Biotechnol 41, 447 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2>.
5. Dührkop K., Fleischauer M., Ludwig M., Aksenov A. A., Melnik A. V., Meusel M., Dorrestein P. C., Rousu J., Böcker S.: Nat Methods 16, 299 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>.
6. Schymanski E. L., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H. P., Hollender J.: Environ. Sci. Technol. 48, 2097 (2014). <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
7. Saricaoglu B., Yilmaz H., Subaşı B. G., Capanoglu E.: Food Res Int 164, 112345 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112345>.
8. Kefale H., You J., Zhang Y., Getahun S., Berhe M., Abbas A. A., Ojiewo C. O., Wang L.: Physiologia Plantarum 176, e14596 (2024). <https://doi.org/10.1111/ppl.14596>.
9. Ziaikin E., David M., Uspenskaya S., Niv M. Y.: Nucleic Acids Research 53, D1645 (2025). <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1044>.

Tento výzkum byl proveden v rámci COST CA22161 FLAVOURsome. Finanční prostředky byly poskytnuty Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MŠMT) v rámci projektu LUC24117. Tato práce rovněž využila [data/nástroje/služby/infrastrukturu] poskytnuté výzkumnou infrastrukturou METROFOOD-CZ (<https://metrofood.cz>), podporovanou MŠMT České republiky (projekt č. LM2023064). Dále byla tato práce podpořena granty VŠCHT v Praze v rámci specifického vysokoškolského výzkumu – grant č. A1_FPBT_2026_001 a č. A2_FPBT_2026_025.

POROVNÁNÍ ENZYMATICKÉ METODY A UHPLC-HRMS PRO STANOVENÍ VOLNÉHO L-ASPARAGINU V CEREÁLICÍCH

BARBORA STRASSEROVÁ¹, LUCIE STARÁ¹, BEVERLY HRADECKÁ¹, JANA HAJŠLOVÁ¹, LENKA

DĚDINOVÁ², ARISTEIDIS S.TSAGKARIS¹

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, Česká republika

²Emco spol. s.r.o., Tůrkova 2319/5b, 149 00, Praha 4

e-mail: strasseb@vscht.cz, tsagkara@vscht.cz

Úvod:

Akrylamid je nežádoucí kontaminující látka vznikající během tepelného zpracování potravin bohatých na sacharidy¹. Jedním z hlavních prekurzorů je volný L-asparagin, jehož stanovení je důležité pro hodnocení surovin a pro kontrolu rizika vzniku akrylamidu. Běžně se obsah L-asparaginu stanovuje pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (např. UHPLC-HRMS), která poskytuje vysokou přesnost, avšak vyžaduje nákladné přístrojové vybavení. Cílem této práce bylo porovnat výsledky nově vyvinuté enzymatické metody se referenční metodou UHPLC-HRMS při stanovení L-asparaginu v cereálních vzorcích.

Metodika:

Analyzovány byly vzorky cereálních surovin poskytnuté průmyslovým partnerem EMCO. Byly připraveny jednotným extrakčním postupem založeným na metodě dle Žilič *et al.* a následně analyzovány dvěma nezávislými metodami². Enzymatická metoda je založena na bázi L-asparaginasy, která hydrolyzuje L-asparagin za vzniku kyseliny asparagové a amoniaku. Následně je vzniklý amoniak detekován pomocí Berthelotovy reakce a výsledný modře zbarvený produkt je změřen spektrofotometricky při vlnové délce 660 nm. Paralelně byly stejné extrakty analyzovány referenční metodou UHPLC-HRMS. Shoda mezi oběma metodami byla hodnocena pomocí statistické analýzy (např. Bland-Altman test, Tukey box plots).

Výsledky a diskuze:

Enzymatická metoda dosahovala u ovesných vzorků výtěžnosti v rozmezí 80–106 %, což potvrzuje její vhodnost pro stanovení volného L-asparaginu. Koncentrace volného L-asparaginu stanovené metodou UHPLC-HRMS se pohybovaly v rozmezí mezi 812–2057 mg/kg, zatímco enzymatickou metodou byly zjištěny koncentrace 719–1868 mg/kg. Porovnání výsledků s referenční metodou UHPLC-HRMS bylo zaměřeno na posouzení míry shody mezi oběma přístupy napříč různými typy cereálních vzorků a zhodnotit potenciál enzymatické metody jako rychlé a ekonomicky dostupné alternativy pro screening volného L-asparaginu.

Závěry:

Výsledky naznačují, že enzymatická metoda představuje perspektivní alternativu pro rychlé screeningové stanovení volného L-asparaginu v cereálních vzorcích. Další optimalizace, např. imobilizace enzymu na povrch mikrotitrační destičky či filtrační papír, a rozšíření testování na širší soubor vzorků přispějí k ověření její využitelnosti v potravinářské praxi.

Proč je prezentovaná studie významná:

Studie přispívá k vývoji rychlé a ekonomicky dostupné metody pro stanovení volného L-asparaginu, která by mohla doplnit běžně používaná instrumentální analýzy. Ověření shody s referenční metodou UHPLC-HRMS je důležitým krokem k jejímu využití pro screening cereálních surovin a výrobků v potravinářské praxi. Metoda může přispět ke zlepšení kontroly rizika vzniku akrylamidu během výroby potravin právě díky jejímu potenciálu využití mimo laboratoř.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

student 1. ročníku doktorského studia

¹ Kourimsky T., Tsagkaris A. S., Bechynska K., Koudela M., Hajslova J., Hradecka B.: **Food Chem.** 517, **149459 (2026)**.

² Žilić S., Dodig D., Basić Z., Vančetović J., Titan P., Durić N. Tolimir N.: Food Addit. Contam. Part A **34**, 705–713 (2017).

Práce používá [data/nástroje/slужby/zařízení], které poskytuje výzkumná infrastruktura METROFOOD-CZ (<https://metrofood.cz>) podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. LM2023064). Výzkum byl dále finančně podpořen z prostředků Specifického vysokoškolského výzkumu VŠCHT Praha, granty č. A1_FPBT_2026_001 a A2_FPBT_2026_021.

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM VĚKOVĚ SPECIFICKÝCH REFERENČNÍCH ROZMEZÍ METABOLITŮ *DE NOVO* SYNTÉZY PURINŮ V MOČI

VÁCLAVA ŠKOPOVÁ¹, OLGA SOUČKOVÁ^{1,2}, STANISLAV KMOCH¹ A MARIE ZIKÁNOVÁ¹

¹Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1.LF UK a VFN, Ke Karlovu 2, Praha

²Laboratoř hmotnostní spektrometrie Přírodovědecká fakulta UK, BIOCEV, Průmyslová 595, Vestec

Úvod:

Puriny jako základní molekuly buněčného metabolismu tvoří stavební jednotky nukleových kyselin a koenzymů enzymatických reakcí a podílejí se na energetickém metabolismu a buněčné signalizaci. Jejich intracelulární hladiny jsou udržovány převážně recyklačními drahami, v nichž hraje klíčovou roli hypoxanthin guanin fosforibosyltransferáza (HGPRT). Při zvýšené potřebě purinů je aktivována *de novo* syntéza purinů (DNPS) katalyzovaná 6 enzymy. Byla popsána vzácná dědičná onemocnění spojená s deficitem jednotlivých enzymů DNPS, vedoucí k hromadění defosforylovaných substrátů daného enzymu v tělních tekutinách. Vzhledem k jejich nespecifickým klinickým projevům, převážně neurologického charakteru, může stanovení těchto metabolitů přispět k odhalení poruch purinového metabolismu. Zaměřili jsme se proto na screening intermediátů DNPS v moči pacientů s nespecifickými neurologickými a psychomotorickými poruchami pomocí LC MS/MS.

Metodika:

Separace analytů probíhala kapalinovou chromatografií na koloně s reverzní fází (Bischoff Prontosil C18 AQ) a detekce byla realizována na hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem v režimu MRM při pozitivní ionizaci elektrosprejem. Provedli jsme validaci kvantifikační metody LC-MS/MS pro DNPS metabolity.

Výsledky a diskuze:

Na souboru přibližně 500 kontrolních vzorků močí jsme stanovili referenční rozmezí intermediátů DNPS a vybraných metabolitů recyklačních drah rozčleněná do pěti dětských a jedné dospělé věkové skupiny. U všech sledovaných metabolitů byly v prvním roce života pozorovány nejvyšší koncentrace i nejširší variační rozmezí, s následným postupným poklesem hodnot s věkem. Tato referenční rozmezí byla využita pro interpretaci výsledků screeningu více než 7500 pacientů s neurologickými obtížemi indikovaných k vyšetření purinového a pyrimidinového metabolismu. Přibližně 90 pacientů vykazovalo abnormální profil jednoho či více metabolitů DNPS. U části z nich byl zaznamenán souběžný vzestup intermediátů celé dráhy, který byl potvrzen také u pacientů s deficitem HGPRT. Odlišný profil charakterizovaný mírným zvýšením GAR, SAICar a AICar jsme pozorovali u pacientů s deficitem vitamínu B12¹.

Závěry:

Nově validovaná LC MS/MS metoda umožnila stanovit věkově specifická referenční rozmezí metabolitů DNPS a rozšířit spektrum detekovatelných purinových metabolitů. Výsledky ukazují, že profil intermediátů DNPS odráží nejen primární defekty této dráhy, ale také sekundární změny purinového metabolismu související s poruchami recyklace purinů a metabolismu jednovláknitých látek. Stanovení metabolitů DNPS tak poskytuje funkční metabolickou informaci doplňující genomická vyšetření a přispívá k interpretaci poruch purinového metabolismu.

Současná pracovní pozice prvního autora:

vědecký pracovník ve skupině doktorky Marie Zikánové

¹ Krijt J., Škopová V., Sokolová J., Zikánová M., Chrástina P., Stanovský S., Kožich V.: Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 2026, 1. <https://doi.org/10.1080/15257770.2026.2687453>

Grantová podpora: Tato práce je podpořena granty MZČR a AZV NU23-01-00500 a projektem MULTIOMICS_CZ (Program Johannes Amos Comenius, MŠMT ČR, // CZ.02.01.01/00/23_020/0008540) – Spolufinancováno EU.

STANOVENÍ VLASOVÉHO KORTIZOLU POMOCÍ ONLINE SPE LC-MS U PACIENTŮ SE SCHIZOFRENIÍ

PAVEL ŠMAK¹, JANA GREGOROVÁ¹, KATARÍNA KOSTOLANSKÁ³, JAKUB VANKO², LIBOR USTOHAL²,
ELIŠKA BARTEČKOVÁ², MARTA VYORALOVÁ³, JAN JUŘICA³, ONDŘEJ PEŠ¹

¹ Biochemický ústav, Lékařská Fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, Brno, Česká republika

² Psychiatrická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, Brno, Česká republika

³ Farmakologický ústav, Lékařská Fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, Brno, Česká republika

e-mail: opes@med.muni.cz

Úvod:

Schizofrenie je komplexní neuropsychiatrické onemocnění charakterizované narušením homeostatických a regulačních mechanismů organismu. Významným faktorem ovlivňujícím závažnost symptomů i biologickou odpověď na stres je například prožité trauma v dětství. Běžné longitudinální statistické přístupy často nedokážou zachytit latentní procesy, které stojí za pozorovaným vývojem klinického stavu.

Metodika:

Do studie byli zařazeni pacienti se schizofrenií a odpovídající zdravé párované kontroly. U účastníků byly opakovaně hodnoceny klinické a psychometrické ukazatele, zejména škály PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale), PSS (Perceived Stress Scale) a CTQ (Childhood Trauma Questionnaire). Aktivita osy hypotalamus–hypofýza–nadledviny (HPA) byla hodnocena pomocí koncentrací kortizolu v segmentovaných vlasech (Hair Cortisol Concentration, HCC), které poskytují retrospektivní (až 6 měsíců) záznam dlouhodobé endogenní aktivity HPA osy.

Vzorky vlasů byly rozděleny na segmenty o délce 1 cm, promyty izopropanolem, extrahovány methanolem a analyzovány metodou kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií za využití online extrakce na pevné fázi s nástřikovou smýčkou 0.5 mL. Kvantifikace kortizolu byla provedena pomocí izotopově značených látek (náhradní analyt, interní standard).

Pomocí Bayesovského hierarchického modelu byl latentní stav dysregulace každého jedince popsán jako spojitý stochastický proces v čase. Parametry tohoto procesu byly modelovány v závislosti na vážných traumatech z dětství. Latentní stav byl následně propojen s pozorovanými klinickými a biologickými ukazateli, což umožnilo společnou analýzu heterogenních dat získaných v nepravidelných časových intervalech.

Výsledky:

U pacientů se schizofrenií byl mezi vstupním a následným vyšetřením pozorován pokles skóre PANSS, svědčící pro zmírnění psychopatologie. Naproti tomu koncentrace kortizolu ve vlasech zůstávaly relativně stabilní a většinou se pohybovaly v referenčním rozmezí. Navržený model úspěšně integroval klinická i biologická data a umožnil odhadnout individuální trajektorie latentní dysregulace. Výsledky ukázaly, že prožité trauma v dětství významně ovlivňuje rychlost návratu systému k rovnovážnému stavu i celkovou stabilitu latentního procesu, což naznačuje dlouhodobé změny mechanismů regulace stresové odpovědi.

Závěr:

Použití Bayesovského hierarchického modelu umožnilo detailně rekonstruovat latentní dynamiku dysregulace, která není přímo pozorovatelná z klinických měření. Výsledky podporují hypotézu, že traumatické stavy dlouhodobě modifikují regulační mechanismy související s aktivitou HPA osy u pacientů se schizofrenií. Kombinace biologických markerů s klinickými ukazateli přináší komplexnější pohled na průběh onemocnění a může přispět k rozvoji individualizovaných přístupů v psychiatrii.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU23-08-00257. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

VÝVOJ A VALIDACE HPLC-MS/MS METODY PRO SLEDOVÁNÍ 12 PRIORITIZOVANÝCH POLUTANTŮ VE VODÁCH A HODNOCENÍ ÚČINNOSTI POKROČILÝCH ČISTICÍCH TECHNOLOGIÍ

HANA TLAČILOVÁ¹, ANDREA VOJS STAŇOVÁ^{1,2}

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Zátíší 728, 389 01 Vodňany

² Univerzita Komenského v Bratislave, Přírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

e-mail: htlaclilova@jcu.cz

Úvod:

Mikropolutanty, jako jsou léčiva, pesticidy, průmyslové chemikálie a látky osobní péče, představují významnou skupinu environmentálních kontaminantů. Do vodního prostředí se dostávají zejména prostřednictvím komunálních odpadních vod, přičemž konvenční technologie ČOV nejsou primárně navrženy pro jejich účinné odstraňování. V souvislosti s rostoucími koncentracemi mikropolutantů ve vodním prostředí, městských odpadních vodách a kalech došlo v roce 2022 k iniciaci revize Směrnice Rady 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod. Výsledkem je přijetí Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2024/3019, s cílem posílit ochranu životního prostředí před nepříznivými účinky vypouštěných odpadních vod. Směrnice mimo jiné zavádí povinnost implementace kvartérního stupně čištění na vybraných ČOV. Součástí legislativy je rovněž povinnost monitoringu dvanácti vybraných mikropolutantů a hodnocení účinnosti jejich odstranění na jednotlivých čistírnách.

Multi-reziduální analytické metody se stávají klíčovými pro účinnou detekci a kvantifikaci mikropolutantů ve vodním životním prostředí. Pro detekci konkrétních tříd sloučenin v povrchových a odpadních vodách je k dispozici široká škála analytických metod, avšak rychlá a účinná analytická metoda pro detekci těchto 12 konkrétních mikropolutantů (konkrétně: směs 4-/5-methyl-1H-benzotriazol, amisulprid, benzotriazol, citalopram, diklofenak, hydrochlorothiazid, irbesartan, kandesartan, karbamazepin, klarithromycin, metoprolol a venlafaxin) chybí ¹⁻³. Cílem této práce je optimalizace a validace analytické metody in-line SPE-LC-HESI-MS/MS pro stanovení 12 prioritizovaných mikropolutantů v odpadních vodách. Současně se práce zaměřuje na posouzení možností jejich odstranění pomocí elektrochemické oxidace využívající BDD elektrody.

Metodika:

Pro přípravu roztoků byly použity analytické standardy vybraných analytů a jejich izotopově značené standardy (Sigma-Aldrich, Německo). K přípravě mobilních fází byla použita kyselina mravenčí (≥98 %), acetonitril (LC-MS Chromasolv®, Sigma-Aldrich) a dvoustupňově čištěná ultračistá voda.

Pro elektrochemickou oxidaci byly použity 3D BDD elektrody připravené na FEI STU v Bratislavě. Elektrochemická oxidace probíhala v litrových nádobách s pracovním elektrolytem (NaCl, Na₂SO₄), do kterého byly přidány vybrané polutanty. Vzorky byly odebírány ve zvolených časových intervalech od 0 do 240 minut elektrochemické oxidace. Degradční experimenty byly prováděny jak v destilované vodě, tak v reálné odpadní vodě z různých ČOV.

Kvantitativní LC-MS/MS analýza vzorků vod před degradačními experimenty a po nich byla provedena pomocí trojitého kvadrupólového hmotnostního spektrometru TSQ Altis s vyhřívaným elektrosprejem v pozitivním i negativním ionizačním módu (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). K 10 ml homogenizované a přefiltrované odpadní vody přes stříkačkové filtry z regenerované celulózy o porozitě 0,22 µm byla přidána směs izotopově značených vnitřních standardů. Pro chromatografickou separaci byla jako předkolona použita Hypersil Gold aQ (20 mm × 2,1 mm, 12 µm) a jako analytická kolona C18 Arion Polar (50 mm × 2,1 mm, 5 µm). Separace probíhala gradientovou elucí s použitím vody a acetonitrilu, obou s přídavkem 5 mM kyseliny mravenčí. Nástřikový objem činil 1 ml a celková doba analýzy byla 9 minut.

Výsledky a diskuze:

Vzhledem k rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem analyzovaných látek byl výběr a optimalizace chromatografických a hmotnostně spektrometrických podmínek klíčový. Testovány byly různé kombinace předkolon a analytických kolon, a také různé složení mobilních fází. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím předkolony Hypersil Gold aQ a analytické kolony C18 Arion Polar s gradientovou elucí vody a acetonitrilu, obou s přídavkem 5 mM kyseliny mravenčí. Toto složení mobilních fází zlepšilo ionizaci vybraných analytů v obou ionizačních módech. Metoda pro stanovení 12 prioritizovaných polutantů byla validována podle běžně používaných analytických doporučení v environmentální a bioanalytické chemii⁴. Byly hodnoceny linearita, meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), správnost, opakovatelnost a matricové efekty. Linearita kalibrační křivky byla hodnocena pomocí koeficientu determinace (R^2). Ve zvoleném koncentračním rozsahu (1-2000 ng/L) vykazovaly všechny cílové látky dobrou linearitu. Vnitrodenní a mezidenní přesnost byla stanovena analýzou heptaplikátů vzorků obohacených analyty a vnitřními standardy, a to během jednoho dne a ve třech různých dnech (RSD nižší než 20 %). Meze detekce a meze kvantifikace se pohybovaly: LOD 0,20-0,9 ng/L; LOQ 0,58 až 3 ng/L. Výtěžnosti se u většiny sloučenin pohybovaly v rozmezí 65–130 %. Vyvinutá metoda byla úspěšně aplikována na analýzu odtoků z různých ČOV v České republice před elektrochemickou oxidací a po ní.

Závěry:

Byla vyvinuta a validována spolehlivá metoda vyžadující minimální přípravu vzorku pro identifikaci a kvantifikaci 12 prioritizovaných polutantů v odpadní vodě před a po elektrochemické oxidaci na BDD. Navržená metoda vykazuje dobré výkonnostní parametry z hlediska citlivosti, opakovatelnosti a správnosti. Je rychlá, jednoduchá, nevyžaduje rozsáhlou úpravu vzorku.

Proč je prezentovaná studie významná:

Vyvinutá rychlá, citlivá, účinná a spolehlivá metoda in-line SPE-LC-MS/MS pro současné stanovení dvanácti vybraných mikropolutantů představuje významný nástroj pro jejich detekci a kvantifikaci v odpadních vodách. Je zvláště důležitá v souvislosti s novou legislativou, která klade důraz na monitoring těchto látek a hodnocení účinnosti jejich odstraňování na čistírnách odpadních vod.

Současná studijní/pracovní pozice prvního autora:

Ph.D. student

1 Arenas M., Martín J., Santos J. L., Aparicio I., Alonso E.: Anal. Chim. Acta 1361, 344152 (2025).

2 Bernabeu de Maria M., Guibal R., Monneron-Gyurits M., Guibaud G.: Talanta Open 12, 100594 (2025).

3 Duque-Villaverde A., Sónora S., Antonelli R., Vilar V. J. P., Carro A. M., Dagnac T., Llompart M.: Anal. Bioanal. Chem. 417, 6475 (2025).

4 Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E.: TrAC 23, 535 (2025).

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu ČSOB (ČSOB 004/2026/CSOB Tlačilová) a Agentury na podporu výzkumu a vývoje (APVV-23-0367).

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHODOLOGY FOR PFAS DETERMINATION IN TEXTILE RECYCLING PROCESS MATRICES

ANDREA VERNEROVÁ¹, LUCIE ORAVOVÁ¹, JAN SNOW¹, RUDI P. NIELSEN², ANNA TODE³, DITTE
HØJLAND³, MORTEN E. SIMONSEN², ANTOINE VARDON², PAVEL KURÁŇ¹

¹ Faculty of Environment, Jan Evangelista Purkyně University in Ústí nad Labem, Czech Republic

² Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Esbjerg, Denmark

³ Dissolva ApS, Aarhus, Denmark

e-mail: andrea.vernerova@ujep.cz

Introduction:

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) present in textile waste represent an emerging challenge for circular economy strategies and advanced recycling technologies. Reliable determination of PFAS in recycling process streams is complicated by complex sample matrices containing salts, dyes, surfactants, degradation products, and other interfering compounds. Therefore, robust analytical methodologies are essential for obtaining accurate and reproducible results during textile recycling studies ^{1,2}.

Methodology:

This work presents the optimisation of an analytical method for PFAS determination in liquids generated during textile waste recycling within a Horizon Europe project. Sample preparation prior to LC-MS/MS analysis combines solid-phase extraction (SPE), liquid-liquid extraction (LLE), and dispersive solid-phase extraction (dSPE), depending on the characteristics of the analysed matrix, to obtain clean extracts and minimise matrix interferences. Different aqueous matrices from alkaline, acidic, and reductive treatment steps, together with pyrolysis oils, are investigated to evaluate extraction efficiency, analyte recovery, matrix effects, and method robustness.

Results and discussion:

The results demonstrate that matrix composition strongly influences extraction performance and instrumental response. The optimised sample preparation strategy significantly reduces matrix effects and enables reliable PFAS determination in complex recycling-derived matrices.

Conclusions:

The developed analytical workflow provides a robust tool for monitoring PFAS in textile recycling streams and supports future studies investigating the fate of PFAS during recycling processes.

Why is this study important:

The study provides a robust analytical methodology for PFAS determination in challenging textile recycling matrices and supports the development of safer circular textile recycling technologies.

Current position of the first author:

Assistant Professor, Faculty of Environment, Jan Evangelista Purkyně University in Ústí nad Labem.

¹ B. Cantoni, G. Bergna, E. Baldini, F. Malpei, M. Antonelli, *Process Saf. Environ. Prot.* 183 (2024) 437–445.

² D.S. Drage, M. Sharkey, H. Berresheim, M. Coggins, S. Harrad, *Toxics* 11 (2023) 55.

Funded by the European Union. Views and opinions expressed are however those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Union or REA. Neither the European Union nor the granting authority can be held responsible for them.

COMPARISON OF MIXED-MODE AND REVERSED-PHASE CHROMATOGRAPHY FOR METABOLOMICS

ZUZANA VOSÁHLOVÁ, VERONIKA ŠUBRTOVÁ, ONDŘEJ PETERKA, ROBERT JIRÁSKO,

MICHAL HOLČÁPEK

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Czech Republic

e-mail: zuzana.vosahlova@upce.cz

Introduction:

MicroRNAs (miRNAs) are short, non-coding RNA molecules consisting typically of 21–25 nucleotides. They are important regulators of gene expression at the post-transcriptional level and participate in the control of numerous cellular processes. Altered miRNA expression has been linked to a broad spectrum of pathological conditions, including cancer and inflammatory diseases, which made miRNAs promising candidates for both therapeutic applications and biomarker discovery¹.

Methodology:

Mass spectrometry (MS) coupled with liquid chromatography (LC) provides several advantages for miRNA characterization, including the separation of closely related oligonucleotide species, structural identification, quantitative analysis, and the possibility of analyzing complex biological samples. Although ion-pairing reversed-phase liquid chromatography (IPRPLC) is widely used for oligonucleotide analysis, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) offers an attractive alternative, particularly due to its compatibility with MS2.

Results and discussion:

In this work, optimization of both LC and MS parameters was performed in order to obtain the highest possible method sensitivity. Regarding LC conditions, acidic mobile phase pH confirmed to be inappropriate for miRNA analysis due to the strong nonspecific adsorption to metal surfaces. The influence of several MS parameters was systematically evaluated - transfer time, pre-pulse storage and nebulizer gas pressure appeared to be the most influential parameters.

Conclusion:

Sensitive HILIC-MS method for the analysis of miRNAs, which can be further utilized for the study of miRNA-based biomarkers, was successfully developed.

Significance:

Although HILIC offers several advantages for miRNA analysis, its application remains relatively limited due to the lower sensitivity compared to IPRPLC. Therefore, careful optimization of both LC and MS conditions is essential to maximize analytical sensitivity and facilitate the broader application of HILIC–MS for miRNA analysis.

Current position of the first author:

postdoc

¹ Cho H.D., Min J.E., Choi M., Jeong S.Y., Moon K.S., Lee J.H. , Eom H.Y.: ACS Omega 2023, 8.

² Gilar M., Koshel B.M., Birdsall R.E.: J. Chromatogr. A 2023, 1712.

Authors acknowledge the support of ERC Adv grant No. 101095860 sponsored by the European Research Council.