



SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



25. ročník Školy hmotnostní spektrometrie

Abstrakty přednášek v sekci Mládí vpřed a plakátových sdělení



Ondřej Novák, David Friedecký, René Lenobel, Ivan Petřík (editoři)

Špindlerův Mlýn, 09. – 13. září 2024



**LABORATOŘ RŮSTOVÝCH
REGULÁTORŮ**

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
& Ústav experimentální botaniky AVČR, v. v. i.



Mass Spec.group

Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
& Fakultní nemocnice Olomouc

MLÁDÍ VPŘED

Mladí výzkumníci budou prezentovat své výsledky formou krátkých přednášek v odpolední sekci „Mládí vpřed“ ve čtvrtek 12. září 2024. Nejlepší přednáška bude oceněna „Cenou za nejlepší přednášku v sekci Mládí vpřed“. Výherce získává hrazenou účast a možnost přednášet na 26. Škole hmotnostní spektrometrie v roce 2025. Sponzorem soutěže je společnost Pragolab s.r.o.

16:30 – 16:45 **Demonstrating scalable analysis of the human chemical exposome by automated LLE-GC-[EI]-Orbitrap MS**

Kateřina Coufalíková

16:45 – 17:00 **Mapování distribuce rostlinných hormonů na (sub)buněčné úrovni**

Jakub Lemberk

17:00 – 17:15 **Multiomický přístup pro diagnózu a monitoring léčby u pediatrických pacientů trpících idiopatickými střevními záněty**

Jakub Rozhon

17:15 – 17:30 **Farmakokinetické studie nových psychoaktivních látek s využitím UHPLC MS/MS**

Magdaléna Vágnerová

17:30 – 17:45 **Effect of side chain functional groups on nitrile imine cross-linking in peptide gas-phase ions**

Mikuláš Vlk

17:45 – 18:00 **Efektivní extrakce a purifikace vzorků z buněčných populací kořenové špičky *Arabidopsis thaliana***

Pavel Hladík



autorizovaný distributor

thermoscientific

Sponzor sekce Mládí vpřed

DEMONSTRATING SCALABLE ANALYSIS OF THE HUMAN CHEMICAL EXPOSOME BY AUTOMATED LIQUID-LIQUID EXTRACTION GAS CHROMATOGRAPHY – ELECTRON IONIZATION – ORBITRAP MASS SPECTROMETRY (LLE-GC-[EI]-ORBITRAP MS)

KATEŘINA COUFALÍKOVÁ^{1,2}, MOIRA ZANABONI³, MANUELA BERGNA³, RENZO PICENONI⁴, LEA MAITRE⁵, MARTINE VRIJHEID⁵, JANA KLÁNOVÁ^{1,2}, ELLIOTT JAMES PRICE^{1,2}

¹ RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czechia

² EIRENE-CZ, Brno, Czechia

³ Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy

⁴ CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland

⁵ ISGlobal, Barcelona, Spain

e-mail: katerina.coufalikova@recetox.muni.cz

Measuring chemical exposure in large-scales studies is analytically challenging in term of robustness and reproducibility, as well as laboriousness of the entire procedure. Manual sample preparation is time consuming, requires high solvent consumption and contributes to sample-to-sample variation. Sequential on-line sample preparation offers a solution, but throughput is currently lacking in routine application. We have developed a fully automated sample preparation workflow coupled to gas chromatography – electron ionization – Orbitrap mass spectrometry (GC-[EI]-Orbitrap MS) for large-scale screening of chemical exposure agents in blood.

Within the framework of the ATHLETE (Advancing Tools for Human Early Lifecourse Exposome Research and Translation) project, the developed method has been applied to 754 adolescents of the Human Early Life Exposome (HELIX) cohort. Prior to instrumental analysis, plasma (100 µL) underwent sequential liquid-liquid extraction (LLE) via TriPlus RSH autosampler and extract injected (6 µL) on-line to programmable-temperature vaporizing (PTV) injector. LLE comprised addition of formic acid and isooctane containing deuterated internal standards to plasma, with vortexing (3 min, 1200 rpm) and centrifugation (3 min, 4800 rpm) for efficient mixing and extract separation. Analytes were separated on a 5-type column with 15-minute temperature gradient and mass spectra were recorded from 70-700 m/z at 60,000 resolving power. Quality assurance and quality control included the analysis of certified mixtures of alkanes and polychlorinated biphenyls, alongside the standard reference materials (SRM) materials NIST 1950, NIST 1957, NIST 1958 in each analytical batch.

QA/QC data were processed via targeted data processing using Skyline for small molecules. Selective ion integrations shows that batches show acceptable quality for future untargeted data processing. Average relative standard deviations (RSD) of peak areas for spiked D7 cholesterol and respective endogenous analyte are 25 % and 23 %, respectively. Retention time drift of 29 polychlorinated biphenyls measured in NIST SRM 1958 material bookending analytical batches 2-20 was 0.08 – 0.14 minutes. Deviation in accurate mass measurement for polybrominated diphenyl ether 28 and polybrominated diphenyl ether 153, representing ions at upper and lower end of m/z channel were in range 1.9 – (-2.2) ppm; 2.8 – (-3.3) ppm, respectively. The evaluated performance of the analysis assay and untargeted identification results will be presented.

Acknowledgement belongs to the RECETOX Research Infrastructure (NoLM2023069) and Teaming (H2020 CETOCOEN Excellence 857560 and OP RDE CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_043/0009632) project.

MAPOVÁNÍ DISTRIBUCE ROSTLINNÝCH HORMONŮ NA (SUB)BUNĚČNÉ ÚROVNI

JAKUB LEMBERK¹, PAVEL HLADÍK¹, VLADIMÍR SKALICKÝ², RENÉ LENOBEL¹, IVAN PETŘÍK¹,
ONDŘEJ NOVÁK¹

¹Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky & Univerzity Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Česká republika

²Umeå Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-90183 Umeå, Sweden

e-mail: jakub.lemberk@upol.cz

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou přirozeně se vyskytující organické sloučeniny, které působí jako bioaktivní signální molekuly a mají významný vliv na fyziologické procesy a vývoj rostlin. Hrají stěžejní roli v adaptaci rostlin na stres a měnící se podmínky prostředí. Velmi nízká koncentrace, v níž se fytohormony vyskytují, představuje pro jejich přímou analýzu a kvantifikaci překážku, kterou se podařilo překonat až díky nedávnému pokroku v hmotnostní spektrometrii¹ a purifikačních technik². Naše znalosti o dynamickém rozložení fytohormonů na subcelulární úrovni však stále zůstávají neúplné. Z těchto důvodů je důležité vyvinout nové metodologické přístupy, které by nám umožnili zlepšit výsledky subcelulární frakcionace a izolace.

V tomto výzkumu byla vyvinuta metoda simultánního třídění a izolace organel³ z celých rostlin modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* za využití fluorescenčně aktivovaného průtokového cytometru (FACS) a vybraných specifických fluorochromů. K určení obohacenosti frakcí o jednotlivé organely byla provedena genealogická analýza pomocí hmotností spektrometrie.

Dále byl FACS využit k třídění protoplastů získaných z fluorescenčně značených buněčných populací kořenové špičky *A. thaliana*⁴. Natříděné protoplasty byly obarveny fluorochromy pro jednotlivé organely a opětovně sortovány. Tento krok je ovšem nutné ještě optimalizovat, např. eliminovat ztráty mezi tříděními, nebo zajistit rovnoměrnou homogenizaci protoplastů.

Cílem této práce je z nasbíraných „dvojitě-natříděných“ frakcí extrahovat a kvantifikovat metabolické profily fytohormonů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií (LC-MS/MS) a sestavit mapu distribuce fytohormonů na úrovni organel v kořenové špičce *A. thaliana*.

Poznatky by pomohly objasnit metabolom a (sub)buněčný transport fytohormonů a prohloubit naše porozumění vztahu rostlinných hormonů se souvisejícími buněčnými procesy.

¹ Novák O., Napier R., Ljung K.: Zooming In on Plant Hormone Analysis: Tissue- and Cell-Specific Approaches. *Annu Rev Plant Biol.* 68: 323–48, (2017).

² Hladík P., Petřík I., Žukauskaitė A., Novák O., Pěnčík A.: Metabolic profiles of 2-oxindole-3-acetyl-amino acid conjugates differ in various plant species. *Front. Plant Sci.* 14 (2023).

³ Skalický V., Antoniadis I., Pěnčík A., Chamrád I., Lenobel R., Kubeš M.F., Zatloukal M., Žukauskaitė A., Strnad M., Ljung K. and Novák O.: Fluorescence-activated multi-organelle mapping of subcellular plant hormone distribution. *The Plant Journal*, 116: 1825–1841 (2023).

⁴ Petersson S.V., Johansson A.I., Kowalczyk M., Makoveychuk A., Wang J.Y., Moritz T., Grebe M., Benfey P.N., Sandberg G., Ljung K.: An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* 21: 1659–1668, (2009).

Tato práce byla realizována za podpory ERDF programu OP JAK projektu Nové poznatky pro plodiny nové generace (TANGENC, CZ.02.01.01/00/22_008/0004581).

MULTIOMICKÝ PŘÍSTUP PRO DIAGNÓZU A MONITORING LÉČBY U PEDIATRICKÝCH PACIENTŮ TRPÍCÍCH IDIOPATICKÝMI STŘEVNÍMI ZÁNĚTY

JAKUB ROZHON¹, ALEŠ KVASNIČKA¹, RADANA BRUMAROVÁ¹, RENÉ LENOBEL³, JAROSLAVA FRIEDECKÁ³, DAVID FRIEDECKÝ¹, EVA KARÁSKOVÁ²

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

² Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

³ Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

e-mail: jakub.rozhon@upol.cz; kuba.rozhon@gmail.com

Úvod: Chronická onemocnění projevující se opakovanými záněty gastrointestinálního traktu (GIT) jsou známá pod názvem idiopatické střevní onemocnění (angl.: inflammatory bowel disease; IBD). Hlavními podtypy IBD jsou ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD). UC je charakterizována zánětem žaludeční sliznice postihujícím celé tlusté střevo nebo jeho část. Naproti tomu CD je charakterizována zánětlivým lézemi v rámci celého GIT. Standardní monitorovací postupy, jako je například detekce kalprotektinu ve stolici, poskytují nižší citlivost a vysokou variabilitu mezi vzorky pacientů. Proto byl v rámci této studie zvolen multiomický přístup analýzy vzorků zahrnující charakteristické změny v lipidomu a proteomu dětských pacientů trpících UC a CD v porovnání se zdravými kontrolami s cílem najít změny související s těmito onemocněními.

Metody: Byla provedena lipidomická analýza séra dětských pacientů trpících UC (n = 31), CD (n = 43) a zdravých kontrol (n = 27). Analýza byla provedena pomocí HPLC-MS/MS na přístrojích Exion LC (Sciex) a QTRAP 6500+ (Sciex). Separace více než 700 lipidů v rámci 20+ lipidových tříd proběhla na koloně BEH C8 (2.1 mm, 100 mm, 1.7 µm, Waters). Proteomická analýza byla provedena ze sér vybraných UC (n = 7), CD (n = 8) a kontrolních (n = 11) pacientů za pomoci spojení kapilární kapalinové chromatografie (Ultimate 3000 RSLCnano, Thermo Scientific) s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Bruker Daltonics TimsTOF Pro 2), přičemž bylo detekováno celkem 151 proteinů a peptidů. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí univariálních a multivariálních statistických metod.

Výsledky: Multivariální analýza pomocí analýzy hlavních komponent lipidomu IBD pacientů odhalila jejich částečnou separaci od zdravých kontrol. V séru CD pacientů bylo pozorováno systematické snížení hladiny fosfatidylcholinových plasmalogenů a sfingomyelinů. Dále byla u všech IBD pacientů pozorována významně zvýšená hladina kyseliny dokosaheptaenové (DHA či FA 22:6) ve srovnání s kontrolami. Proteom IBD pacientů odhalil buněčné odpovědi organismu na zánět, a to prostřednictvím proteinů akutní fáze (SHBG, α2-makroglobulin, inhibitor inter-α-trypsinu), koagulačních faktorů (FXII, plasminogen, protein S, kallikrein, anitrombin III, angiotensinogen a jiné), proteinových reaktantů v rámci imunity (C1, C2, faktor H komplementu, IgA1, IgA2, IgG2, IgG3, κ-variabilní řetězce imunoglobulinů a další) a antioxidantního systému (cerruloplasmin, AMBP) a také proteinů spojených s transportem a metabolismem lipidů (ApoCI, ApoCII, ApoCIII, ApoAII, ApoM, ApoE atd).

Závěr: Systematické změny v lipidomu a proteomu poukazují na souvislost s chronickými zánětlivými procesy, přičemž u CD pacientů byly tyto změny závažnější, což podporují i klinické údaje. Na základě této studie by mohla být důkladněji prozkoumána míra celkové patologie IBD onemocnění a efektivita procesu jeho léčby, ať už konzervativního, či biologického původu.

Grantová podpora: MZ ČR - RVO (FNOI, 00098892).

FARMAKOKINETICKÉ STUDIE NOVÝCH PSYCHOAKTIVNÍCH LÁTEK S VYUŽITÍM UHPLCMS/MS

MAGDALÉNA VÁGNEROVÁ^{1,2}, NATALIE PAŠKANOVÁ², LUCIE JANEČKOVÁ², DAVID SÝKORA¹,
MARTIN KUCHAR²

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

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

e-mail: magdalena.vagnerova@vscht.cz

Na celosvětovém trhu s drogami se v posledních letech čím dál tím více rozšiřují tzv. nové psychoaktivní látky (NPS, z angl. *New Psychoactive Substances*). Většinou se jedná o analogy existujících kontrolovaných drog, nebo o nově syntetizované látky, které jsou vytvořeny tak, aby napodobovaly či rozšiřovaly psychoaktivní účinky již známých a zakázaných látek. Tyto sloučeniny často nejsou kontrolovány mezinárodními zákony o drogách a mohou být distribuovány bez omezení na veřejně přístupných internetových stránkách¹. NPS obecně představují velké zdravotní a sociální hrozby podobné těm, které jsou spojeny se známějšími kontrolovanými látkami. V důsledku užití těchto látek již byla zaznamenána celá řada akutních intoxikací a úmrtí². Za účelem získávání vědeckých poznatků charakterizujících zdravotní rizika NPS je nutné provádět rozsáhlé toxikologické testy a klinické studie. Přestože jsou konkrétní NPS na trhu i několik let, jejich farmakologické a toxikologické účinky často nebývají důkladně prozkoumány. Jedním z primárních kroků je pochopení farmakokinetiky, k čemuž je nezbytná komplexní analýza biologických vzorků. Během farmakokinetických studií se sleduje koncentrace látky a jejích hlavních metabolitů v biologickém materiálu v závislosti na čase. Tato práce se zabývá vývojem a validací UHPLC-MS/MS metod pro analýzu aktuálních NPS – methoxfenidinu (MXP), hexahydrokanabinolu (HHC) a 25E-NBOH – v biologickém materiálu v rámci farmakokinetických studií. Jako reálné vzorky byly využity tkáň a krevní sérum potkanů kmene Wistar. Vzhledem k složitosti matrice byl kladen důraz na eliminaci matricového efektu. Byly vyzkoušeny a porovnány různé extrakční metody – proteinová precipitace, extrakce kapaliny kapalinou, vysolování či extrakce pevnou fází. V rámci optimalizace chromatografických podmínek byl zohledněn výběr kolony, nástřik vzorku, složení mobilních fází, gradient a průtok mobilních fází, aby analýza poskytovala co nejlepší chromatografické rozlišení analytů v co nejkratším čase. Vyvinuté metody byly úspěšně validovány podle doporučení Evropské lékové agentury (EMA) a byly použity pro analýzu reálných vzorků potkaních tkání a krevního séra po podání příslušné NPS. Získaná data slouží k vytvoření farmakokinetických křivek jednotlivých NPS, které jsou dále korelovány s behaviorálními studiemi potkanů, které vedou k hlubšímu pochopení farmakologických účinků studovaných NPS.

¹ United Nations Office on Drugs and Crime: *World Drug Report 2023 - Executive Summary*. World Drug Report, Vienna 2023.

² European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: *The Drug Situation in Europe up to 2023 – an Overview and Assessment of Emerging Threats and New Developments*. European Drug Report, Lisbon 2023.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FCHI_2024_049.

EFFECT OF SIDE CHAIN FUNCTIONAL GROUPS ON NITRILE IMINE CROSS-LINKING IN PEPTIDE GAS-PHASE IONS

MIKULÁŠ VLK^{1,2,3}, JIAHAO WAN³, MARIANNA NYTKA⁴, KIM VU³, KAREL LEMR⁴,
FRANTIŠEK TUREČEK³

¹*Department of Analytical Chemistry, Charles University, Hlavova 8, Prague 128 43, Czech Republic*

²*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS, Flemingovo nám. 2, Prague 160 00, Czech Republic*

³*Department of Chemistry, Bagley Hall, Box 351700, University of Washington, Seattle, Washington 98195-1700, United States*

⁴*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, Olomouc 779 00, Czech Republic*

e-mail: vlkmi@natur.cuni.cz

Photochemical cross-linking is a widely adopted method for studying protein-protein and protein-nucleic acid complexes. A phototag attached to the studied compound undergoes photodissociation, forming a transient reactive intermediate that rapidly reacts with the proximal functional groups to form a covalent bond. Nitrile imines, produced by dissociation of 2,5-diaryltetrazole tags have been shown to be effective cross-linkers in gas-phase peptide ions¹. The tetrazole group attached to the peptide C-terminus readily dissociates upon UV light irradiation, forming a nitrile imine moiety that selectively cross-links to the N-terminal peptide chain residue and forms a cyclic peptide structure.

To investigate the effects of side chain functional groups on cross-linking, we varied the N-terminal residues of tetrazole-peptide conjugates and studied the gas-phase ions using tandem mass spectrometry, cyclic ion mobility, Born-Oppenheimer molecular dynamics (BOMD) and density functional theory (DFT) calculations. To gain further insight into the reactivity of N-terminal amide and side chain groups, we introduced specific modifications: esterification of the Asp and Glu side chain carboxyl groups, and methylation of the Lys amine group. Furthermore, exhaustive hydrogen-deuterium exchange and accurate mass measurement provided valuable information regarding the fragment identity.

The conjugates were subjected to UVPD dissociation in the MS² step, forming -N₂ fragments with up to 41% efficiency. The -N₂ fragments were isolated and further fragmented by CID-MS³ with cross-linking yields ranging from 40% to 89%, demonstrating a high efficiency of the cross-linking process. Several fragmentation pathways were identified alongside the linear peptide chain fragmentation. Conjugates with N-terminal basic amino acid residues showed a prevalent loss of phenylhydrazine followed by a loss of neutral internal residues, indicating cyclization of the peptide. The atypical loss of the N-terminal residue side chain and subsequent internal amino acid neutral losses pointed toward cross-linking at the N-terminal amide. Losses of internal neutral residues within the peptide chain confirmed cyclization. Cyclic ion mobility measurements and BOMD and DFT calculations provided complementary information regarding the gas-phase conformation of the conjugates and reaction thermodynamics.

Our multimodal approach allowed us to investigate the effects of side chain functional groups on nitrile imine cross-linking of peptide gas-phase ions, probing the applicability of this novel method.

¹ J. Wan, J., Nytká, M., Qian, H., Vu, K., Lemr, K., Tureček, F. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 35, 344 (2024). doi: 10.1021/jasms.3c00379

EFEKTIVNÍ EXTRAKCE A PURIFIKACE VZORKŮ Z BUNĚČNÝCH POPULACÍ KOŘENOVÉ ŠPIČKY *ARABIDOPSIS THALIANA*

PAVEL HLADÍK¹, LUCIE HERICHOVÁ¹, IVAN PETŘÍK¹, KRISTÝNA BIELESZOVÁ², JAKUB LEMBERK¹,
ONDŘEJ NOVÁK¹

¹Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky & Univerzity
Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Česká republika

²Katedra chemické biologie, Univerzity Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Česká republika

e-mail: pavelhladik1@gmail.com

Správný růst a vývoj rostlin je řízen rostlinnými hormony neboli fytohormony. Stanovení těchto chemicky různorodých sloučenin v rostlinných extraktech je velmi náročné z důvodu jejich velmi nízké koncentrace, která se pohybuje v pmol až fmol na gram rostlinné hmoty. Další překážkou v jejich stanovení je navíc komplexnost rostlinného metabolomu, jenž dosahuje až stovky tisíc sloučenin, které jsou přítomny na mnohem vyšších hladinách a vytvářejí silné matriční efekty. Nicméně, díky velkému rozvoji přístrojového vybavení a vývoji mikro-extrakčních a purifikačních metod v posledních letech, jsme schopni provádět analýzu fytohormonů v řádech miligramů rostlinného materiálu^{1,2}.

Každý rostlinný hormon, narozdíl od živočišných, ovlivňuje v rostlině velké množství vývojových procesů na základě jeho koncentrace a místa účinku. Z tohoto důvodu je důležité sledovat jejich množství v konkrétních buněčných typech a organelách. V našem výzkumu byl využit fluorescenčně aktivovaný průtokový cytometr (FACS), kterým byly tříděny fluorescenčně značené buněčné populace z kořenové špičky modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Z těchto populací byly následně extrahovány a kvantifikovány metabolické profily rostlinných hormonů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotností spektrometrií (LC-MS/MS).

Tato metodika nicméně přináší několik úskalí, a to jak již zmiňované nízké hladiny fytohormonů, tak také vysoké koncentrace solí v třídícím pufru. Pro měření je tedy nutné vzorky odsolit, a zároveň zachovat vysokou návratnost těchto procesů. Pro tento účel byla testována mikro-extrakce na tuhé fázi pomocí plněných špiček (μ SPE-PT), která byla využita v již dříve publikovaných pracích^{3,4}. Tato metoda nicméně prokázala špatnou robustnost, a proto byla optimalizována extrakce na tuhé fázi s disperzní maticí (DSPE), která vykazuje dobrou linearitu, robustnost a návratnost analytů, a umožňuje nám kvantifikovat rostlinné hormony v populacích obsahujících pouze 50 000 buněk. Cílem této práce je tedy vyvinout analytickou metodu, která poslouží pro sestrojení detailní mapy rostlinných hormonů v kořenové špičce *A. thaliana*.

¹ Hladík P., Petřík I., Žukauskaitė A., Novák O., Pěnčík A.: Metabolic profiles of 2-oxindole-3-acetyl-amino acid conjugates differ in various plant species. *Front. Plant Sci.* 14 (2023).

² Karady M., Hladík P., Cermanová K., Jiroutová P., Antoniadi I., Casanova-Sáez R., Ljung K., Novák O.: Profiling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and selected phytohormones in *Arabidopsis* using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 20(1), 41 (2024).

³ Pěnčík A. a 12 spoluautorů: Regulation of Auxin Homeostasis and Gradients in *Arabidopsis* Roots through the Formation of the Indole-3-Acetic Acid Catabolite 2-Oxindole-3-Acetic Acid, *The Plant Cell* 25(10), 3858 (2013).

⁴ Antoniadi I., Plačková L., Simonovik B., Doležal K., Turnbull C., Ljung K., Novák O.: Cell-Type-Specific Cytokinin Distribution within the *Arabidopsis* Primary Root Apex. *Plant Cell* 27(7), 1955 (2015).

Tato práce byla realizována za podpory ERDF programu OP JAK projektu Nové poznatky pro plodiny nové generace (TANGENC, CZ.02.01.01/00/22_008/0004581).

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

Sdělení s lichými pořadovými čísly budou prezentována v úterý 10. září 2024, 13:30 - 14:30. Sdělení se sudými pořadovými čísly budou prezentována ve čtvrtek 12. září 2024, 13:30 – 14:30. Tři nejlepší plakátová sdělení budou oceněna „Cenou za nejlepší plakátové sdělení“. Výherci získají hrazený registrační poplatek na 26. Školu hmotnostní spektrometrie v roce 2025. Sponzorem soutěže je společnost Pragolab s.r.o.

1. **Bursová M, Hložek T, Sladká Z.** Identifikace a stanovení nové syntetické drogy 2C-B ve forenzním případě.
2. **Dohnalová K, Klíma K, Chalupský K, Krutáková M, Smutná L, Sedláček R, Pávek P.** Flow injection analysis of lipids in drug-mediated inhibition of Pregnane X Receptor.
3. **Dryahina K, Polášek M, Jašík J, Sovová K, Španěl P.** Ion chemistry in Dielectric Barrier Discharge Ionisation (DBDI).
4. **Friedecká J, Lenobel R, Karásková E, Friedecký D, Novák O.** Proteomics of patients with inflammatory bowel disease.
5. **Horejšová M, Kvasnička A, Pisklákova B, Friedecký D.** Studium vlivu metabolických cest cytidinu na léčbu hematologických malignit cytarabinem.
6. **Chmelařová H, Catapano MC, Nováková L, Garrigue JC.** Non-targeted analysis as a neglected tool in pharmaceutical quality control.
7. **Jágr M, Hofinger-Horvath A, Hlásná Čepková P, Schönlechner R, Dvořáček V.** Effect of oat germination on the content of avenanthramides.
8. **Janečková H, Kittlová L, Kowalczyková L, Petrželová S, Peřinová J, Semeniuk T, Svačinková Z, Friedecký D.** Stanovení antihypertenziv v plazmě technikou kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.
9. **Kadláčková M, Dobešová D, Brumarová R, Ivanovová E, Friedecký D, Jahn P.** Vývoj LCMS/MS metody pro stanovení biomarkerů atypické myopatie koní ze suché krevní skvrny.
10. **Kaleta M, Oklešťková J, Kvasnica M, Petřík I, Novák O.** Cílené profilování sérových oxysterolů pomocí UHPLC–MS/MS.
11. **Kočová Vlčková H, Plachká K, Švec F, Nováková L.** Exploring matrix effect evaluation methods for reliable quantification in UHPLC-MS/MS bioanalysis.
12. **Koudelka Š, Coufalíková K, Price E.** Building of a high-resolution mass spectral library by LC-Orbitrap: Chemical exposure agents.
13. **Macháň J, Najdekr L.** Uživatelsky přístupná Python pipeline ke zpracování „multi-batch“ LCMS dat.
14. **Martiník J, Majtán K, Pernica M, Svoboda Z, Brányik T.** Stanovení mykotoxinové produkce biofilmem mikroskopických vláknitých hub ošetřeným *Pythium* spp.

15. **Mrňavá M, Vágnerová M, Jurásek B, Kuchař M.** Identifikace metabolitů metoxfenidinu v moči potkanů a lidských jaterních mikrozomech.
16. **Pěničik A, Hladík P, Žukauskaite A, Zatloukal M, Novák O.** Metabolismus fytohormonů u vyšších rostlin: studium nových drah a metabolitů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.
17. **Pilařová V, Plachká K, Kosturko Š, Škop J, Švec F, Nováková L.** UHPSFC-MS/MS with multimodal ionization source as a universal tool for target analysis of complex plant extracts.
18. **Pirova H, Hradecka B, Hajslova J.** Ultra-high pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry (U-HPLC-MS) for the determination of free asparagine – a key precursor of acrylamide formation in cereals.
19. **Piskláková B, Kvasnička A, Rozhon J, Táborský M, Friedecký D.** Cardiovascular event risk assessment using the CERT score.
20. **Praská A, Jelínková A, Novotný J, Šantrůček J, Karamonová L.** Imunomagnetická separace membránových proteinů *Cronobacter* spp.
21. **Seličová H, Price EJ, Coufalíková K, Jbebli A.** Automated and derivatization-free GC-MS analysis of SCFAs in human biospecimen.
22. **Simerský R, Chamrád I, Vlčko T.** Difrenční proteomická analýza odhaluje vliv inositoltrisfosfát kinázy ITPK1 na fotomorfogenezi a metabolismus fytohormonů ječmene.
23. **Škopová V, Součková O, Zikánová M.** Screening intermediátů *de novo* syntézy purinů v moči pomocí LC-MS/MS.
24. **Šmak P, Porokh V, Gregorová J, Nezvedová M, Kyjovská D, Peš O, Holubcová Z.** Extracellular metabolomics from in vitro fertilization cultivation media.
25. **Spesvyvi A, Cebecauer M, Žabka J, Olszynska A, Malečková M, Johanovská Z, Polášek M, Charvát A, Abel B.** From space to cell: Separation of charged vesicles.
26. **Starovoit MR, Jadeja S, Lenčo J.** Snížení výskytu artefaktů vznikajících na koloně během LC-MS peptidů v proteomických analýzách a kontrole kvality bioléciv.
27. **Vozandychová V, Řehulka P, Hercík K, Pavlík P, Špidlová P, Stulík J.** Změna aktivity hostitelských deubikvitinačních enzymů v lidských makrofázích během infekce bakterií *Francisella tularensis*.
28. **Vrobel O, Supíková K, Tarkowski P, Grúz J.** Vývoj a optimalizace UHPLC-MS/MS metody pro analýzu fenylsulfátů v rostlinných materiálech.



thermoscientific

Sponzor Ceny za nejlepší plakátové sdělení

IDENTIFIKACE A STANOVENÍ NOVÉ SYNTETICKÉ DROGY 2C-B VE FORENZNÍM PŘÍPADĚ

MIROSLAVA BURSOVÁ^{1,2}, TOMÁŠ HLOŽEK², ZDEŇKA SLADKÁ¹

¹ *Vojenský ústav soudního lékařství, Ústřední vojenská nemocnice Praha, U Vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6, Česká republika*

² *Ústav soudního lékařství a toxikologie, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Ke Karlovu 2, 120 00 Praha 2, Česká republika*

e-mail: bursova.miroslava@uvn.cz

Tento příspěvek se týká identifikace a stanovení nové syntetické drogy s názvem 2C-B (4-brom-2-,5-dimethoxyfenylethylamin) a jejích několika metabolitů v biologickém materiálu (krev, moč, žaludeční obsah), který byl odebrán v rámci pitvy u zemřelé ženy.

Identifikace 2C-B a jeho metabolitů byla provedena pomocí metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) s iontovou pastí. Kvantitativní stanovení 2CB bylo provedeno pomocí metody kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).

Droga 4-brom-2-,5-dimethoxyfenylethylamin (2C-B) se řadí do skupiny syntetických psychedelik. Na černém trhu se prodává ve formě tabletek či jako bílý prášek. Její účinky závisí na užití dávce, kdy při nižších koncentracích se objevuje stimulační efekt; při vyšších dávkách může působit jako halucinogen. Při akutních intoxikacích se objevuje nevolnost, zvracení, třes, deprese až toxická psychóza. Akutní intoxikace trvá v rozmezí 3 až 6 hodin¹. V tomto případě byla koncentrace 2C-B ve vzorku krve zemřelé stanovena na 11 ng/ml a v moči byla stanovena koncentrace na 1940 ng/ml. Identifikace a stanovení syntetické drogy 2C-B v biologickém materiálu je poprvé uvedena v rámci forenzního případu.

¹ Nugteren–van Lonkhuyzen J. J., de Lange D. W., van Riel A. J. H. P., Vrolijk R. Q., Ohana D., Hondebrink L: Ann. Emerg. Med. 76, 303 (2020).

Autoři děkují za finanční podporu z Ministerstva vnitra České republiky v rámci řešení projektu VI20192022168 „Vytvoření metodiky screeningu a konfirmace syntetických kanabinoidů v biologickém materiálu“.

FLOW INJECTION ANALYSIS OF LIPIDS IN DRUG-MEDIATED INHIBITION OF PREGNANE X RECEPTOR

KLÁRA DOHNALOVÁ^{1,2}, KRYŠTOF KLÍMA¹, KAREL CHALUPSKÝ¹, MÁRIA KRUTÁKOVÁ³,
LUCIE SMUTNÁ³, JAN PROCHÁZKA¹, RADISLAV SEDLÁČEK¹, PETR PÁVEK³

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

²*First Faculty of Medicine, Charles University*

³*Faculty of Pharmacy, Charles University*

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

Pregnane X Receptor (PXR) is an intracellular receptor activated by approximately one third of all drugs and contaminants. Due to its involvement in metabolic pathways, PXR activation causes unwanted effects in living organisms, particularly triglyceride accumulation in liver. Therefore, inhibiting PXR activity should potentially result in lower levels of liver lipids, besides further metabolic changes. However, antagonists of PXR known to date face limitations in selectivity and efficacy.

In this study, we employed a newly synthesised ligand with favourable selectivity and pharmacokinetic properties, MI891, to investigate the effects caused by blocking PXR function. To detect changes in lipid spectra, both *in vitro* and *in vivo*, we used high-resolution mass spectrometry flow injection analysis (FIA) approach, with simultaneous acquisition of MS and MS/MS data.

First, we used a cell culture of human hepatocytes; we observed lower levels of cholesterol esters in treated cells, together with substantial increase of lysophosphatidylcholines, but no effect on triglycerides. To better investigate systemic effects, we analyzed livers of mice on high fat diet, which were administered with five doses of MI891. In the mouse livers, we observed lower levels of cholesterol esters, and, importantly, also a significant reduction in triglycerides. This result suggests that inhibition of PXR could be utilized in medicine for treatment of liver diseases characterized by excess fat in the liver. Our study is thus introducing new possible treatment approach.

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

ION CHEMISTRY IN DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE IONISATION (DBDI)

KSENIYA DRYAHINA, MIROSLAV POLÁŠEK, JURAJ JAŠÍK, KRISTÝNA SOVOVÁ, PATRIK ŠPANĚL

¹ J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, v.v.i., ASCR

e-mail: kseniya.dryahina@jh-inst.cas.cz

The Dielectric Barrier Discharge Ionization (DBDI) method is becoming useful for online real-time soft ionisation of vaporised and gaseous samples.^{1,2} In DBDI, a high voltage is applied across a pair of electrodes, separated by a dielectric material. This creates a non-thermal plasma discharge in the gas phase, forming ions from the analyte molecules. It is thus important to understand the ion chemistry involved in producing observable product ions, even though commercial implementations tend to focus more on the statistical processing of numerical data. In our research, we specifically examined the ionisation mechanisms that occur in the presence of air constituents, such as water vapour. This study offers insight into the formation of product ions from various analytes. While DBDI technology has been commercialised and can be found in products like the SICRIT and DBDI-100 ion sources, there is still much to be learned about the fundamental mechanisms of ionisation. Understanding these mechanisms is essential for the reliable and responsible application of DBDI and for the proper interpretation of mass spectra and real-time signal changes. An overview of the ion chemistry involved in DBDI is presented based on original experimental data obtained in various carrier gases:

- Nitrogen, compressed gas at 5.0 purity, containing 3 ppm of water and 2 ppm of O₂.
- Synthetic air, compressed gas at 5.0 purity, containing 5 ppm of water and 20% of O₂.
- ZeroAir from a generator containing 100 ppm of water, 20% of O₂ and >0.1 % CO₂

All carrier gases can be dry as supplied or humidified up to saturated water vapour pressure.

The study covers a range of analytes representing compounds relevant to the practical needs of VOC analyses, including ketones, alcohols and acids. Importance to analyses in biomedical, food and environmental applications is discussed.

¹ Pape A., Schmitz O. J.: TrAC Trends in Analytical Chemistry 170, 117420 (2024).

² Gyr L., Wolf J.-C., Franzke J., Zenobi R.: Analytical Chemistry 90, 2725 (2018).

Acknowledgements: 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).

PROTEOMICS OF PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

JAROSLAVA FRIEDECKÁ¹, RENÉ LENOBEL¹, EVA KARÁSKOVÁ², DAVID FRIEDECKÝ³,
ONDŘEJ NOVÁK¹

¹ Laboratory of Growth Regulators, Palacký University Olomouc and Institute of Experimental Botany AS CR, Czech Republic; ² Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital Olomouc, Czech Republic; ³ Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc, and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Czech Republic.

jaroslava.friedecka@upol.cz

Inflammatory bowel disease (IBD) is a term for two conditions, Crohn's disease CD and ulcerative colitis (UC), that are characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal (GI) tract. Despite UC being first described in 1875 and CD in 1932, the pathogenesis of IBD is still not fully understood. Prolonged inflammation results in damage to the GI tract. Both conditions have significant differences in manifestation: (1) UC is limited to the colon, while CD can occur anywhere between the mouth and the anus; (2) In CD, healthy parts of the intestine are intermixed between the inflamed areas, whereas in UC there is a continuous inflammation of the colon; (3) CD can occur in all the layers of the bowel walls, UC only affects the innermost lining of the colon. Common symptoms are persistent diarrhoea, abdominal pain, rectal bleeding, bloody stools, weight loss, fatigue, failure to thrive. Diagnosis is mainly based on endoscopy, which is very unfavourable especially for paediatric patients. Proteins (e.g. CRP, calprotectin) are known to play an important role in the development of IBD. However, there is a lack of specific biomarkers to diagnose IBD, differentiate CD from UC, monitor treatment, determine extent of damage and localization.

In this preliminary study, the proteins from serum of 10 CD and 10 UC paediatric patients and 15 healthy paediatric controls were isolated by acetonitrile precipitation, reduced, alkylated and digested in solution by protease SoluTrypsin. Released peptides were purified in 2 steps (ethyl acetate extraction, C18 microcolumn), transferred into LC vials and subjected to untargeted proteomic analysis using capillary LC-MS/MS analysis: RSLCnano 3000 Ultimate LC system (Thermo) connected to Tims TOF Pro 2 mass spectrometer (Bruker) equipped with ion mobility. Peptide separation and identification were conducted on the reverse-phase CSH C18 column (Waters) with DDA data acquisitions. Raw data were processed by MaxQuant against human protein database (UniProt). Data filtering, statistical analysis and identification of the discriminating proteins are conducted using software packages (Perseus, Simca, R-package). Functional analysis of important proteins was done using the WEB tools STRING, DAVID and UniProt.

In proteomic study, 151 proteins were identified in the samples and the results clearly shows that the patients' bodies respond to inflammation: (1) Through acute phase proteins, e.g. SHBG (reduced in both CD $p=0.035$, and UC $p=0.016$), $\alpha 2$ -macroglobulin (reduced in CD $p=7e-4$, and in UC $p=4e-4$); (2) Coagulation factors, e.g. reduced plasminogen (in CD $p=0.018$), protein S (in UC, $p=0.017$), plasma kallikrein (in UC, $p=0.001$), antithrombin III (in CD, $p=0.01$); (3) Immune reactions: elevated immunoglobulins IgA1 ($p=2e-4$ in CD, $p=0.011$ in UC), IGLL5 ($p=0.01$ in CD, $p=0.04$ in UC) in both groups, while IgG2 and IgA2 increased only in CD ($p=0.025$, $p=4e-5$, resp.). In UC, many variable chains of immunoglobulin kappa (Ig κ) are elevated ($p<0.003$); (4) Antioxidant systems: ceruloplasmin is reduced namely in UC ($p=0.040$); (5) proteins related to lipid transport and metabolism: e.g. ApoCII ($p=4e-5$ in CD, $p=4e-6$ in UC), ApoCI ($p=0.003$ in CD, $p=0.043$ in UC), and ApoAII ($p=0.006$ in CD, $p=0.023$ in UC) significantly reduced in both groups, while ApoCIII ($p=0.04$) and ApoM ($p=0.030$) was reduced only in UC.

Acknowledgements: This work was supported by MHCZ-DRO FNOL 00098892.

STUDIUM VLIVU METABOLICKÝCH CEST CYTIDINU NA LÉČBU HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT CYTARABINEM

MARTINA HOREJŠOVÁ^{1,2}, ALEŠ KVASNIČKA^{1,2}, BARBORA PISKLÁKOVÁ^{1,2}, DAVID FRIEDECKÝ¹

¹Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Česká republika

²Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika

e-mail: martinahorejsov@seznam.cz

Hematologické malignity jsou nádorová onemocnění krve zahrnující formy akutních a chronických myeloproliferativních či lymfoproliferativních onemocnění¹. Jednou z možných terapií hematologických malignit se pak nabízí léčba cytarabinem (ara-C), což je nukleosidový analog přirozeně se vyskytujícího cytidinu. Ara-C je transportovaný do nádorových buněk specializovanými nukleosidovými transportéry, ve kterých je podroben tříkrokové fosforylaci na aktivní ara-C trifosfát, který se následně inkorporuje do DNA a blokuje tam syntézu DNA². Fosforylace ara-C je ovšem ovlivněna dalšími enzymy, které tento analog přeměňují na neaktivní uridinovou formu. Naopak deaminace 5-ethynyl-2'-deoxycytidinu (EdC) na jeho uridinový protějšek je díky jeho vysoké toxicitě pro buněčný růst v protinádorové léčbě žádoucí³.

Tato práce je zaměřena na popis metabolické dráhy vedoucí k přeměně ara-C na neaktivní produkt uracilarabinosid (ara-U) cytidindeaminasou (CDA).

Pro stanovení aktivity CDA byly využity nádorové buněčné linie, linie tvořené diploidními buňkami, linie imortalizovaných diploidních buněk a PDX modely vzorků myšího tumoru a plasmu. Buněčné lyzáty a plasma byly inkubovány s ara-C, EdC, cytidinem (Cr), 5-brom-2'-deoxycytidinem (BrdC), 5-chlor-2'-deoxycytidinem (CldC), 5-iod-2'-deoxycytidinu (IdC) a 5-fluorocytidinem (FC) za různých podmínek pro sledování přeměny na jejich uridinové produkty. Vzorky byly analyzovány modifikovanou in-house cílenou metabolickou metodou využívající HILIC-MS/MS. Analýza byla provedena pomocí Exion LC (Sciex) a kolony Luna NH₂ (3 μm, 100 mm x 2 mm, Phenomenex) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500+ (Sciex) v MRM módu⁴. Získané výsledky byly zpracovány a z úbytku substrátu či přídavku produktu byla vypočtena aktivita CDA.

Vysoká aktivita CDA byla pozorovatelná v rámci nádorových buněčných linií po ošetření ara-C, ve zbylých případech byla zaznamenána nízká až nulová aktivita enzymu. Také byla zaznamenána rozdílná substrátová specifita CDA pro substráty ara-C, EdC, Cr, BrdC, CldC, IdC a FC. Deaminace ara-C využívaného pro jeho antineoplastickou aktivitu v chemoterapeutické léčbě může vést ke snížení terapeutických účinků⁵. Studium deaminace nukleosidových analog enzymem CDA má tedy potenciál v souvislosti s jejich využitím při léčbě hematologických malignit i v personalizované medicíně⁶.

¹ Giordano M., Croci D. O., Rabinovich G. A.: Curr. Opin. Hematol. 20, 327 (2013). doi:10.1097/MOH.0b013e328362370f

² Yamauchi T., Negor, E., Kishi S., Takagi K., Yoshida A., Urasaki Y., Iwasaki H., Ueda T.: Biochem. Pharmacol. 77, 1780 (2009). doi:10.1016/j.bcp.2009.03.011.

³ Ligasová A., Strunin D., Friedecký D., Adam T., Koberna K.: PLoS ONE 10, 1 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0117459

⁴ Ligasová A., Pisklákova B., Friedecký D., Koberna K.: Sci. Rep. 13, 20530 (2023). doi:10.1038/s41598-023-47792-4

⁵ Hamada A., Kawaguchi T., Nakano M.: Clin. Pharmacokinet. 41, 705 (2002). doi:10.2165/00003088-200241100-00002

⁶ Yoshio E., Obata T., Murata D., Ito M., Sakamoto K., Fukushima M., Yamasaki Y., Yamada Y., Natsume N., Sasaki T.: Cancer Sci. 98, 1633 (2007). doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00581.x

Grantová podpora: MZ ČR – AZV NU22-08-00148, MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892).

NON-TARGETED ANALYSIS AS A NEGLECTED TOOL IN PHARMACEUTICAL QUALITY CONTROL

HANA CHMELAROVÁ¹, MARIA CARMEN CATAPANO¹, LUCIE NOVÁKOVÁ¹,
JEAN-CHRISTOPHE GARRIGUE²

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

² *Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, France*

e-mail: chmelarha@faf.cuni.cz

Quality control (QC) is crucial in pharmaceutical industry. Quality standards for pharmaceutical substances, i.e., API and excipients, are covered e.g., by the European Pharmacopoeia, which include also validated analytical methods for their testing. These pharmacopeial procedures target specified components, often utilizing LC-UV as a fundamental method for detecting impurities. However, these methods may fail to detect unknown or unexpected substances, such as those with missing chromophore when using UV detection. In contrast, the non-targeted approach can uncover unexpected details about formulations and accompanying substances. Indeed, the efficacy of this approach was demonstrated in the levothyroxine case study¹.

Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with data-independent acquisition high-resolution mass spectrometry (UHPLC-DIA-HRMS) was utilized for deep exploration of six formulation types of levothyroxine, differing in excipient composition. UHPLC-DIA-HRMS enabled the detection of compounds originating from excipients used in the formulations. Among these, we identified compounds resulting from reactions between excipients, e.g., mannitol citrate, stearate, and palmitate. Additionally, undeclared phospholipids were found in the samples with starch as an excipient.

To confirm the hypothesis that the phospholipids were introduced into the formulations with starch, we subsequently analyzed 11 batches of pharmaceutical starch with various botanical origin (corn, wheat, and potato) and with various technological treatment (natural and pregelatinized). The presence of phospholipids in pharmaceutical starch was confirmed. The dominant HRMS signals belonged to lysophosphatidylcholines with palmitic, linoleic, and oleic acid in the molecule, with an average ratio of 71:21:8 in corn starch and 66:29:5 in wheat starch. Unlike the corn and wheat starch, only traces of phospholipids were found in potato starch. Since levothyroxine is a low-dose drug with a narrow therapeutic index, it is particularly sensitive to the composition precision^{2,3}. Thus, the change in starch type or amount cause the change of phospholipids content. Their amount can easily exceed the amount of levothyroxine in dose, and thus, its bioavailability can be significantly affected.

This study confirmed that the non-targeted analytical approach using UHPLC-DIA-HRMS plays an indispensable role in pharmaceutical quality control and can help to reveal previously undiscovered facts, even in case of well-established excipients such as starch.

¹ Chmelařová H., Catapano M. C., Garrigues J.-C., Švec F., Nováková L.: *Journal of Pharmaceutical Analysis* 100970 (2024).

² Ledeři I., Romanescu M., Cîrcioabă D., Ledeři A., Vlase G., Vlase T., Suciu O., Murariu M., Olariu S., Matusz P.: *Pharmaceutics* 12, 58 (2020).

³ Fliers E., Demeneix B., Bhaseen A., Brix T. H.: *European thyroid journal* 7, 238 (2018).

Acknowledgement: This work was supported by the project EFSA-CDN (No.CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by ERDF and by the Cooperatio Program, research area Pharmaceutical Sciences.

EFFECT OF OAT GERMINATION ON THE CONTENT OF AVENANTHRAMIDES

MICHAL JÁGR ¹, ANDREAS HOFINGER-HORVATH ², PETRA HLÁSNÁ ČEPKOVÁ ¹
REGINE SCHÖNLECHNER ², VÁCLAV DVOŘÁČEK ¹

¹ Crop Research Institute, Drnovská 507/73, 16106 Prague 6, Czech Republic

² University of Natural Resources and Life Sciences, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

e-mail: jagr@vurv.cz

Avenanthramides (AVNs) are a group of phenolic compounds found exclusively in oats, and in processed oat products. AVNs are found to provide many health benefits in mammals (including humans), such as anti-oxidation, anti-inflammation, anti-atherosclerosis, anti-diabetic, anti-hypertensive, and anti-cancer properties¹. The chemical profile and the levels of AVNs in oat varieties after germination have been examined. In the present study, 12 distinct oat varieties were germinated for 0–192 h and a total of 28 AVNs and 3 AVN-hexosides were determined in these samples. Among them, three novel AVNs were synthesized (AVN 1a, AVN 2a, and AVN 2ad), characterized using NMR techniques (1D- and 2D-NMR), and assessed in real samples for the first time. The most abundant AVNs in the samples were AVN 2c, AVN 2p, AVN 2f, and their long-chained analogues AVN 2 cd, AVN 2pd, AVN 2fd, together representing 75–85 % of the total AVNs content. The highest total AVN level was observed on average after 48–72 h of germination time and it reached a value 1–1.2 mg/g. Out of 12 investigated oat varieties, CDC Boyer, Diadem, and Rozmar have proved to be the most suitable genotypes for germination².

¹ Wise, M. L. Avenanthramides: Chemistry and biosynthesis. In: Chu Y ed. *Oats Nutrition and Technology*. John Wiley& Sons. Ltd., pp. 195–226 (2014).

² Jágr M., Hofinger-Horvath A., Ergang P., Hlásná Čepková P., Schönlechner R., Pichler E. Ch., D'Amico S., Grausgruber H., Vagnerová K., Dvořáček V. *Food Chem.* 437, 137807 (2024).

This work was financed by the project NAZV QK1810102 of the National Agency for Agricultural Research of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, and partially funded by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, institutional support MZE-RO0423. This work was also financed by the Czech Science Foundation Grant 21- 10845S, and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Subsidy Programme - the National Program for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources and Agrobiodiversity (no. MZE-62216/ 2022-13113/6.2.14). The cooperation of the Austrian and Czech project team was financially supported by the Austria's Agency for Education and Internationalisation, programme WTZ (project Nr. CZ 01/2022) and by the project 8J22AT020 (IK 1702) of the Czech Ministry of Education Youth and Sports.

STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV V PLAZMĚ TECHNIKOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE VE SPOJENÍ S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

JANEČKOVÁ H., KITTLOVÁ L., KOWALCZUKOVÁ L., PETRŽELOVÁ S., PEŘINOVÁ J., SEMENIUK T., SVAČINKOVÁ Z., FRIEDECKÝ D.

Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc

Úvod: Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí ve většině vyspělých zemí. Většina pacientů užívá kombinovanou terapii na různém mechanismu (inhibitory systému renin-angiotensin-aldosteron, diuretika, blokátory kalciového kanálu, alfa-blokátory, statiny apod). Cílem stanovení léků je především sledování spolupráce pacienta.

Metodika: Na našem pracovišti je vyšetřováno v plazmě (K_3EDTA) celkem 21 léků a 5 metabolitů. Úprava vzorku spočívá v deproteinaci po přidání deuterovaných standardů s následným odpařením pod dusíkem a rekonstitucí v mobilní fázi. Analýzy jsou prováděny pomocí HPLC (Ultimate 3000, Dionex) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (TripleQuad 6500, SCIEX) v režimu sledování rozpadu molekulárního iontu. Separace probíhá na koloně ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm při 50 °C s aplikací gradientové eluce (A - mravenčan amonný, 28 mmol/l, pH 2,8; B – methanol) s celkovou dobou analýzy 3,8 min. K vyhodnocování je používán program Sciex OS.

Výsledky: Na základě požadavku z kardiologické kliniky jsme začali antihypertenziva vyšetřovat od června 2012 (amlodipin, indapamid, nitrendipin, perindopril, perindoprilát, ramipril, ramiprilát, spironolacton, telmisartan). Od února 2020 pak došlo k jejich rozšíření o další léky v rámci kardiovaskulární terapie (amilorid, atorvastatin, candesartan, doxazosin, eplerenon, furosemid, hydrochlorothiazid, chlortalidon, lercanidipin, losartan, losartan-metabolit, rosuvastatin, sacubitril, sacubitrilát, trandolapril, trandolaprilát, valsartan). Před zavedením do rutinního monitorování byla vždy metoda validována. Dosud bylo v naší laboratoři vyšetřeno téměř 3000 vzorků plazem. Metoda umožňuje stanovovat léky ve vzorcích plazem pacientů v širokém koncentračním rozsahu od 0,5 µg/l (atorvastatin, amilorid) až 2 mg/l (furosemid, sacubitrilát). V příspěvku budou diskutovány zkušenosti spojené s vyšetřováním léků (možné interference dalších léků, non-adherence pacientů apod.).

Závěry: Metoda je úspěšně používána v rutinní praxi a umožňuje tak lékařům sledovat adherenci pacientů k léčbě či odhalit případnou intoxikaci.

VÝVOJ LCMS/MS METODY PRO STANOVENÍ BIOMARKERŮ ATYPICKÉ MYOPATIE KONÍ ZE SUCHÉ KREVNI SKVRNY

MARTINA KADLÁČKOVÁ¹, DANA DOBEŠOVÁ¹, RADANA BRUMAROVÁ¹, ELIŠKA IVANOVÁ¹,
DAVID FRIEDECKÝ¹, PETR JAHN²

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

² Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

e-mail: martinaivanova33.mi@gmail.com

Atypická myopatie (AM) je onemocnění provázené akutní rhabdomyolýzou a rozvíjí se zejména u koní bez předchozí fyzické zátěže. Příčinou rozvoje tohoto onemocnění je intoxikace hypoglycinem A (HGA) a methylenecyklopropylglycinem (MCPPrG) přítomných v některých druzích javoru (*Acer*). Tyto neproteinogenní aminokyseliny se po pozření v těle zvířat metabolizují a způsobují inhibici β oxidace mastných kyselin¹.

V České republice bylo mezi lety 2011–2020 evidováno celkem 112 případů AM². V Evropě průměrně tři čtvrtiny pacientů umírají do 72 hodin od prvních příznaků³. S tím souvisí problematika rychlosti a dostupnosti diagnostiky, která je v progresi tohoto onemocnění stěžejní. Toxiny způsobující AM se v laboratořích ale neanalyzují rutinně. V ČR jsou zavedeny metody pro stanovení toxinů pouze v Laboratoři dědičných metabolických poruch Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v toxikologické laboratoři Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství Veterinární univerzity Brno². Jednou z analytických technik, která odpovídá výše zmíněným požadavkům diagnostiky, je kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LCMS/MS). Dosavadní LCMS/MS metody pro analýzu diagnosticky významných látek ze suchých krevních skvrn (DBS) však zahrnují derivatizaci analytů, což významně prodlužuje dobu přípravy vzorku⁴. V této práci byla vyvinuta a částečně validována LCMS/MS metoda bez nutnosti derivatizace analytů ve vzorku. Metoda se vyznačuje jednodušší a kratší přípravou vzorku (zkrácení ze 2 dnů na přibližně 4 hodiny), krátkou dobou analýzy (9 minut) a nízkou finanční nákladovostí. Touto metodou lze stanovit toxiny prokazující AM, konkrétně HGA a MCPPrG a metabolit odvozený od HGA – methylenecyklopropylacetylkarnitin (MCPA_karnitin), dále také osm acylkarnitinů a čtyři acylglyciny signifikantně se zvyšující v krvi koní s AM.

Nově vyvinutá LCMS/MS metoda má potenciál pro zavedení do rutinní diagnostické praxe, což by umožnilo rychlou diagnostiku pacientů, včasné nasazení léčby a příznivé ovlivnění progresu AM.

¹ Bochnia M., Sander J., Ziegler J., Terhardt M., Sander S., Janzen N., Cavalleri J. V., Zuraw A., Wensch-Dorendorf M., Zeyner A.: PLoS One 14, e0211698 (2019).

² Šamonilová E., Jahn P., Jandová V., Tůmová P., Novotná T., Maršálek P., Brumarová R., Friedecký, D., Dobešová D.: Veterinářství 72, 164 (2022).

³ van Galen G. a 24 spoluautorů: Equine Veterinary Journal 44, 614 (2012).

⁴ Karlíková R. a 10 spoluautorů: J Vet Intern Med 32, 1768 (2018).

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky (projekt č. QL24010403 – Diagnostika a možnosti prevence atypické myopatie koní v podmínkách České republiky).

CÍLENÉ PROFILOVÁNÍ SÉROVÝCH OXYSTEROLŮ POMOCÍ UHPLC–MS/MS

MICHAL KALETA^{1,2}, JANA OKLEŠŤKOVÁ¹, MIROSLAV KVASNICA¹, IVAN PETŘÍK¹,
ONDŘEJ NOVÁK¹

¹ *Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci a Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, 779 00 Olomouc, Česká republika*

² *Neurologická klinika, Univerzita Palackého v Olomouci, 779 00 Olomouc, Česká republika*

e-mail: michal.kaleta@upol.cz

Oxysteroly jsou významnou skupinou kyslíkatých derivátů cholesterolu, o nichž se předpokládá, že přirozeně regulují buněčnou signalizaci, vykazují imunomodulační vlastnosti a fyziologicky se podílejí i na dalších procesech, jako je biosyntéza steroidních hormonů nebo mastných kyselin nebo homeostáza cholesterolu¹⁻⁴. Tyto látky se pravděpodobně rovněž podílejí na patogenezi celé řady kardiovaskulárních (např. aterosklerózy), neurodegenerativních (např. Alzheimerova choroba), nádorových (např. rakovina prsu, plic, žaludku) a dalších onemocnění^{2,4-7}. K produkci oxysterolů v lidském těle dochází především intracelulární enzymatickou oxidací cholesterolu, ale může být také výsledkem neenzymatické autooxidace^{2,8}. Předpokladem pro komplexní studium metabolismu oxysterolů je však dostupnost spolehlivých analytických přístupů. Tato práce představuje vysoce výkonnou metodu založenou na časově úsporné přípravě vzorků a citlivé detekci pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie kombinované s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC–MS/MS) umožňující metabolické profilování několika cílových oxysterolů v lidském krevním séru. Stěžejní krok přípravy vzorků představuje precipitace sérových proteinů a jejich následné odstranění filtrací. Vysoce účinná chromatografická separace na reverzní fázi umožňuje simultánní profilování deseti metabolicky příbuzných oxysterolových sloučenin v jediném experimentu, a to i ve vzorcích séra o objemu pouhých několika mikrolitrů. Vyvinutá a validovaná metoda má potenciál pro využití v cílených metabolických studiích zaměřených na hodnocení změn metabolických drah oxysterolů při různých fyziologických nebo chorobných stavech. Získané poznatky by mohly být využity k objevení biomarkerů pro prevenci, diagnostiku nebo sledování progresu onemocnění a ke zlepšení terapeutických přístupů.

¹ Borah K., Rickman O. J., Voutsina N., Ampompong I., Gao D., Baple E. L., Dias I. H. K., Crosby A. H., Griffiths H. R.: *Redox Biol.* 36, 101595 (2020).

² Chen L., Xiu R., Wang H., Wang L. X., Wu G. M., Liang J., Han X. F.: *Chromatographia* 82, 553 (2019).

³ de Freitas F. A., Levy D., Reichert C. O., Cunha-Neto E., Kalil J., Bydlowski S. P.: *Cells* 11, 1251 (2022).

⁴ Kloudova-Spalenkova A., Holy P., Soucek P.: *Br. J. Pharmacol.* 178, 3235 (2021).

⁵ Dias I. H. K., Shokr H., Shephard F., Chakrabarti L.: *J. Alzheimer's Dis.* 87, 1527 (2022).

⁶ Papassotiropoulos A., Lütjohann D., Bagli M., Locatelli S., Jessen F., Rao M. L., Maier W., Björkhem I., von Bergmann K., Heun R.: *Neuroreport* 11, 1959 (2000).

⁷ Kloudova-Spalenkova A., Ueng Y. F., Wei S., Kopeckova K., Guengerich F. P., Soucek P.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 197, 105566 (2020).

⁸ Olkkonen V. M., Gylling H., Ikonen E.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169, 4 (2017).

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt GA23-05389S).

EXPLORING MATRIX EFFECT EVALUATION METHODS FOR RELIABLE QUANTIFICATION IN UHPLC-MS/MS BIOANALYSIS

HANA KOČOVÁ VLČKOVÁ, KATEŘINA PLACHKÁ, FRANTIŠEK ŠVEC, LUCIE NOVÁKOVÁ

Department of Analytical chemistry, Faculty of Pharmacy in v Hradci Králové, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

e-mail: vlckh3aaaf.cuni.cz

Matrix effect (ME) evaluation is an indispensable part of validation of analytical methods with mass spectrometry detection, including ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC-MS) methods. Although there are several approaches to evaluating matrix effects (MEs), post-extraction addition is the most widely used quantitative assessment, as well as the approach recommended by bioanalytical guidelines. Nevertheless, there are numerous studies using the comparison of the slopes of standard and matrix calibration curve to quantify ME. Thus, our study aimed to assess the reliability of ME results obtained by the calibration curve slope approach and to compare it to post-extraction addition approach. A systematic comparison of these two ME evaluation strategies was carried out using 26 compounds. The analytes were determined in serum treated by protein precipitation and analyzed using UHPLC-MS/MS in negative and positive ionization mode.

A selection of appropriate calibration models with respect to the % errors, coefficient of determination, and calibration curve range was necessary due to its significant impact on ME results obtained by the calibration curve slope approach. Several calibration models were evaluated including models with $1/X^0$, $1/X$, and $1/X^2$ weighting, and with logarithmic transformation. The $1/X^0$ had the highest % errors showing its unsuitability contrary to the model with logarithmic transformation which was the most suitable model with respect to % errors.

The evaluation of matrix effects based on post-extraction addition takes into account the presence of rotational matrix effects, i.e., analyte concentration dependent MEs, as well as translational matrix effects, i.e., concentration independent MEs. However, all tested calibration models provided underestimated ME results compared to the post-extraction addition, because calibration curve slope approach does not take into account the translation ME. The change in the calibration curve slope is only affected by rotational matrix effects. Therefore, we proposed an equation to calculate the translational ME based on the comparison of intercepts. Indeed, the combination of ME calculated from slopes and intercepts closely matched the ME obtained by the post-extraction addition approach. For this reason, the calibration curve slope approach cannot be generally recommended to obtain relevant and accurate results of matrix effects and reliable quantification of targeted compounds without a means to calculate also translational ME.

BUILDING OF A HIGH-RESOLUTION MASS SPECTRAL LIBRARY BY LC-ORBITRAP: CHEMICAL EXPOSURE AGENTS

ŠTĚPÁN KOUDELKA, KATEŘINA COUFALÍKOVÁ, ELLIOTT PRICE

RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 753/5, pavilion A29, 625 00 Brno, Czech Republic

e-mail: stepan.koudelka@recetox.muni.cz

Spectral library searching of tandem mass spectra against reference databases represents the gold standard approach for compound annotations in small molecule liquid chromatography - mass spectrometry. However, there is a lack of openly available reference mass spectra, especially for environmental chemicals, hindering chemical exposure studies.

Furthermore, the most widely used mass spectral database for environmental chemicals, MassBank EU¹, implements a semi-automated 'cleaning' and curation procedure². In particular, the removal of ions without in silico sub-formulae, normalisation and mass recalibrations are applied. Whilst beneficial for spectral sharing and reuse, such cleaning comes with a limitation: archived spectra no longer represent empirical data. In many cases, the initial data quality cannot be assessed and metadata regarding acquisition is limited.

Instead, we have acquired high resolution, i.e., 60k tandem mass spectra of 367 environmental chemicals comprising 225 pharmaceuticals and 203 pesticides. The mass range of analytes was 110 – 900 m/z, log P of -4 to 10 and elements including C, H, N, O, P, S, Cl, Br, F, and I.

Full scan was collected at 120k resolution and data-dependent acquisition (DDA) with scan range of 85-1275 m/z. Tandem mass spectra were acquired with real-time collision energy optimization for positive and negative electrospray ionization. Preceding chromatography was based upon a pentabromobenzyl (PBz) column, and a 9 min gradient from 35 % to 98 % methanol containing 0.1 % formic acid. Full analytical methodology in a detail is reported³.

Notably, all analytes were injected at fixed amount, i.e., 1 ng on column and non-normalised spectral abundances provided. This will facilitate the adoption of the unified mzSpecLib format for small molecules. As such, the dataset represents the first extensive characterisation of the PBz phase and is valuable for future retention and ionisation efficiency predictions.

¹ <https://massbank.eu/MassBank/>, staženo 28. 5. 2024.

² Stravs M. A. , Schymanski E. L. , Singer H. P., Holender J.: J. Mass. Spectrom. 48, 89 (2013).

³ Koudelka Š., Price E.: <https://zenodo.org/records/10891336>, staženo 28. 5. 2024.

Acknowledgement belongs to the financial support for the RECETOX RI LM2023069 obtained by the Ministry of Education, Youth and Sports, and the CETOCOEN Excellence CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_043/0009632 project supported by the Operational Programme Research, Development and Innovation.

UŽIVATELSKY PŘÍSTUPNÁ PYTHON PIPELINE KE ZPRACOVÁNÍ „MULTI-BATCH“ LCMS DAT

JAN MACHÁŇ¹, LUKÁŠ NAJDEKR¹

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

V naší práci představujeme open-source off-line Python pipeline, která je navržena pro zjednodušení zpracování velkých „multi-batch“ LCMS dat. Tento nástroj obsahuje různé filtry, korekční metody a statistické nástroje, které uživatelům umožňují přizpůsobit nastavení konkrétním potřebám jejich dat a uložit si tato nastavení pro opakované použití. Pipeline jsme koncipovali jako all-in-one řešení pro zpracování dat následující po použití „peak-picking“ softwarů jako například MZmine. Pipeline efektivně řeší problémy s batch efektem a dalšími analytickými chybami. Kromě zpracování dat jsou hlavními výhodami schopnost generovat obrázky vhodné pro prezentace, či publikace a následná tvorba reportovacího PDF souboru, který uživatelům umožňuje sledovat jednotlivé kroky procesování dat do nejmenšího detailu. Schopnost pracovat off-line s „multi-batch“ LCMS daty, včetně těch s mnoha chybějícími hodnotami, se především hodí pro případy důvěrných nebo příliš velkých souborů, které jsou nevhodné pro nahrávání do populárních online nástrojů. Uživatel může workflow spustit lokálně a velmi rychle se dostat k samotné interpretaci dat. Kód na pozadí je celý napsaný v Pythonu, což zajišťuje přístupnost a snadnou implementaci nových filtrů a procesů. Díky Pythonu, jakožto hlavnímu jazyku strojového učení, je pipeline rovněž připravena na integraci různých AI modelů pro predikci vlastností, klasifikaci dat, nebo například dalších metod korekce, jakou je SERRF. Tato pipeline může přispět nejen k automatizaci a zrychlení analýzy a vyhodnocování dat, ale také ke zlepšení reprodukovatelnosti a sjednocení přístupů napříč vědeckými týmy díky svému plně dostupnému kódu.

Financováno z projektu: JG_2024_026 (UPOL).

STANOVENÍ MYKOTOXINOVÉ PRODUKCE BIOFILMEM MIKROSKOPICKÝCH VLÁKNITÝCH HUB OŠETŘENÝM PYTHIUM SPP.

JAN MARTINÍK^{1,2}, KATARÍNA MAJTÁN^{1,2}, MAREK PERNICA¹, ZDENĚK SVOBODA^{1,3},
TOMÁŠ BRÁNYIK^{1,2}

¹Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Lípová 511/15, 120 00 Praha

²Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 160 00 Praha

³Ústav chemie potravin a biotechnologií, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464, 612 00 Brno

e-mail: martinik@beerresearch.cz

Výskyt kontaminujících mikroorganismů v potravinářském průmyslu a riziko kontaminace potravin závisí na složitých hygienických standardech potravinářských provozů, ale při výskytu kontaminace je často zdrojem problému biofilm. *Pythium* spp. se řadí mezi půdní oomycety, které lze použít k potlačení růstu vláknitých hub díky své antagonistické a parazitické aktivitě. *Pythium* spp. není patogenní pro rostliny a je tak schopný přímo i nepřímo chránit rostliny před houbovými infekcemi. Neexistují však žádné informace o interakci *Pythium* spp. s houbovými biofilmy. Mikroskopické vláknité houby *Aspergillus niger* a *Fusarium graminearum* byly kultivovány v mikrotitračních destičkách, kdy v průběhu kultivace bylo přidáno mykoparazitikum *Pythium* spp., a to v časech 0h, 24h, 48h, a v kombinaci 0+24+48h. Pro extrakci a stanovení mykotoxinů z těchto kultur byla provedena validace, která byla selektivní pro 23 mykotoxinů. *F. graminearum* neprodukovalo žádné z 23 sledovaných mykotoxinů, a to ani po přidání *Pythium* spp. Naopak *A. niger* produkoval mykotoxiny ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB) a fumonisin B2 (FB2) s i bez přidání *Pythium* spp. při kultivaci. Hodnoty celkového obsahu těchto mykotoxinů byly měřeny v biofilmu, v kultivačním médiu a v celkovém obsahu mikrotitrační jamky. Naměřené hodnoty se pohybovaly od 5,9 do 491,2 ng pro OTA, od 1,2 do 1331,0 ng pro OTB a od 6,7 do 14154,2 ng pro FB2. Byly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi produkcí mykotoxinů, a to hlavně v produkci FB2 při kultivaci bez a s přidáním *Pythium* spp.

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1923 a projektů QL24010109 a GAČR 22-13745S.

IDENTIFIKACE METABOLITŮ METOXFENIDINU V MOČI POTKANŮ A LIDSKÝCH JATERNÍCH MIKROSOMECH

MONIKA MRŇAVÁ¹, MAGDALÉNA VÁGNEROVÁ^{1,2}, BRONISLAV JURÁSEK¹, MARTIN KUČAŘ¹

¹Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6

²Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

e-mail: monika.mrnava@vscht.cz

Nové psychoaktivní látky (NPS, z angl. New Psychoactive Substances), známé také jako syntetické drogy, jsou analoga stávajících drog nebo nově syntetizované chemické látky, na které se nevztahují mezinárodní dohody o kontrole omamných a psychotropních látek. Často jsou prodávány jako sběratelské předměty, vykuřovadla nebo koupelové soli, tedy jako produkty, které nejsou určeny ke konzumaci. Tímto způsobem se jejich výrobci snaží vyhnout právním postihům¹. Méně častou, ale velmi nebezpečnou skupinou NPS jsou disociativní anestetika, mezi něž patří metoxfenidin (2-MeO-difenidin, MXP), původně patentovaný jako potenciální lék na léčbu neurotoxického poškození v roce 1989². MXP je antagonist *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) glutamátových receptorů vyhledávaný uživateli pro své halucinogenní účinky, doprovázené odpojením myšlení, identity a paměti³. Ačkoli je MXP na černém trhu dostupný již nejméně deset let a je s ním spojována řada intoxikací a potvrzené nejméně tři úmrtí, informace o jeho farmakologických a toxikologických vlastnostech stále chybí. K poskytnutí základu pro tyto informace je důležité identifikovat metabolity MXP a navrhnout jeho biotransformační cesty.

Pro tvorbu metabolitů fáze I a fáze II jsme použily dva biotransformační modely: *in vivo* (moč potkanů) a *in vitro* (lidské jaterní mikrosomy). Vzorke byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu Thermo Scientific™ Vanquish™ spojeného s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris 120 vybaveným iontovým zdrojem H-ESI+ (Thermo Fisher Scientific, USA). Metabolity byly navrženy pomocí programu Compound Discoverer a jejich struktura byla potvrzena porovnáním fragmentačních spekter a retenčních časů s in-house syntetizovanými (referenčními) standardy. Takto navržené struktury odpovídaly biotransformačním reakcím fáze I, kdy se tvořily převážně hydroxylované metabolity. Ve vzorcích potkaní moči jsme pak stanovili i metabolity fáze II jako například konjugáty s kyselinou glukuronovou. Získané údaje poskytují nejen základ pro objasnění farmakologických a toxikologických charakteristik MXP, ale také umožní klinickým lékařům potvrdit užití této psychoaktivní látky.

1.Fojtíková L., Holubová B., Kuchař M.: Chem. Listy 111, 234-238 (2017).

2.Gray N. M., Cheng B. K., EPO. EP 0 346 791 B1 (1989).

3.Li L., Vlisides P.: Front. Hum. Neurosci. 10 (2016).

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2024_035.

METABOLISMUS FYTOHORMONŮ U VYŠŠÍCH ROSTLIN: STUDIUM NOVÝCH DRAH A METABOLITŮ POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

ALEŠ PĚNČÍK¹, PAVEL HLADÍK², ASTA ŽUKAUSKAITĚ², MAREK ZATLOUKAL², ONDŘEJ NOVÁK¹

¹ Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky & Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc

² Katedra chemické biologie, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc

e-mail: ales.pencik@upol.cz

Auxiny jsou skupinou fytohormonů, které hrají klíčovou roli v regulaci růstu a vývoje rostlin. Hlavním a také nejintenzivněji studovaným auxinem je kyselina indol-3-octová (IAA). Další zástupce, kyselina fenylactová (PAA), je u mnoha rostlinných druhů přítomná v pletivech v daleko vyšších koncentracích než IAA, nicméně její fyziologická role není doposud úplně známá ¹. Hladiny volné IAA jsou rostlinou regulovány kromě *de novo* biosyntézy také nevratným oxidačním katabolismem a reverzibilní konjugací s cukry a aminokyselinami. Tyto konjugáty, které slouží jako neaktivní skladovací formy auxinu a/nebo meziprodukty degradace, mohou být také oxidovány za vzniku 2-oxindol-3-acetyl-1-O- β -D-glukózy (oxIAA-glc) a oxIAA-aminokyselin (oxIAA-AAs) ². Až dosud byly v rostlinách identifikovány pouze oxIAA konjugáty s aspartátem (oxIAA-Asp) a glutamátem (oxIAA-Glu). Podrobné informace o endogenních hladinách těchto a dalších potenciálních oxIAA-aminokyselinových konjugátů v různých rostlinných druzích a jejich prostorové distribuci však nebyly známy.

Identifikovali a charakterizovali jsme dva nové přirozeně se vyskytující auxinové metabolity v rostlinách, jmenovitě oxIAA-leucin (oxIAA-Leu) a oxIAA-fenylalanin (oxIAA-Phe). Následně bylo pomocí nově vyvinuté metody založené na kapalinové chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) provedeno kvantitativní stanovení metabolitů IAA, včetně nově charakterizovaných oxIAA konjugátů, ve čtyřech vybraných rostlinných modelech: huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana* L.), hrachu (*Pisum sativum* L.), pšenici (*Triticum aestivum* L.) a kukuřici (*Zea mays* L.). Distribuce různých skupin auxinových metabolitů se výrazně lišila mezi studovanými druhy i částmi rostlin. Například oxIAA-AA konjugáty byly hlavními metabolity nalezenými v hrachu, zatímco v huseníčku dominoval oxIAA-glc ³. Dále byl v kotyledonech hrachu detekován N-glukosid IAA (IAA-N-glc), který byl dříve identifikován pouze u zástupců nahosemenných a jednoděložných rostlin.

Hladina PAA je regulována analogickými konjugacími procesy jako IAA, zprostředkovanými identickými enzymy. Důkladný screening pomocí LC-MS/MS vedl k identifikaci čtyř nových metabolitů: fenylacetyl-leucin (PAA-Leu), fenylacetyl-fenylalanin (PAA-Phe), fenylacetyl-valin (PAA-Val) a fenylacetyl-glukóza (PAA-glc). Tvorba těchto nových konjugátů a jejich význam pro udržování homeostáze PAA byl zkoumán pomocí exogenní aplikace PAA a analýzy mutantů. Komplexní LC-MS profilování odhalilo významné rozdíly v distribuci PAA konjugátů mezi studovanými druhy, což naznačuje velkou rozmanitost auxinových metabolických cest v suchozemských rostlinách.

¹ Cook S.D.: Plant Cell Physiol. 60, 243 (2019).

² Casanova-Sáez R., Mateo-Bonmatí E., Ljung K.: Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 13, a039867 (2021).

³ Hladík P., Petřík I., Žukauskaitė A., Novák O., Pěnčík A.: Front. Plant Sci. 14, 1217421 (2023).

Tato práce byla realizována za podpory projektu 22-17435S financovaného Grantovou agenturou České republiky.

UHPSFC-MS/MS WITH MULTIMODAL IONIZATION SOURCE AS A UNIVERSAL TOOL FOR TARGET ANALYSIS OF COMPLEX PLANT EXTRACTS

VERONIKA PILAŘOVÁ¹, KATEŘINA PLACHKÁ¹, ŠTEFAN KOSTURKO¹, JAN ŠKOP¹, FRANTIŠEK ŠVEC¹, LUCIE NOVÁKOVÁ¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, 50003 Hradec Králové, Czech Republic

e-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

The analysis of complex plant extracts is often challenging, especially when focusing on different plant metabolites. Indeed, described primary and secondary metabolites vary in their physicochemical properties, including their molecular weight, lipophilicity, and acidic-basic properties, as well as in their content. Thus, different analytical techniques are usually involved in the analysis of metabolite classes, such as volatiles, terpenes, carotenoids, vitamins, flavonoids, and phenolic acids. Typically, gas chromatography (GC) is required for the analysis of nonpolar molecules, while liquid chromatography (LC) is widely used in the analysis of more polar metabolites.

In our study, we developed a holistic two-injection approach for plant extract analysis, which is carried out within one instrument without any need for manual intervention between the analytical runs.¹ Ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC) with tandem mass spectrometry (MS/MS) was employed due to its undoubted advantages based on the nature of the mobile phase comprising supercritical carbon dioxide and polar organic modifier.

During the method development, different stationary phases and mobile phase compositions were examined to achieve a separation of 17 volatile terpenes, 3 terpenoic acids, and 20 phenolics. The final approach separated volatile terpenes using a porous graphitic carbon column and CO₂/MeOH gradient in 7.5 min. The other group of compounds was analyzed on a short diol column using CO₂/MeOH + 5% water gradient within 15.5 min. Consequently, four ionization sources, i.e., electrospray ionization (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI), UniSpray (US), and multimodal ionization source combining ESI/APCI (ESCI), were tuned via the design of experiments to find optimal conditions of ionization source parameters. The make-up solvent composition and flow rate were tested to increase the method sensitivity. ESI and US provided comparable sensitivity for phenolics with the lower limit of quantifications (LLOQs) in the range of 0.5 – 20 ng/mL, while some volatiles were not detected. On the other hand, APCI showed very good sensitivity for volatiles with LLOQ 0.01 – 1 ng/mL, but the sensitivity for phenolics was critical, the LLOQs were higher than 500 ng/mL. Based on these results, the ESCi was selected as a compromise for a final method, enabling the simultaneous analysis and sufficient quantification of all target analytes. The optimized method was used for the analysis of complex plant extracts to show the potential of the UHPSFC-ESCI-MS/MS method to be a viable and beneficial option for such applications instead of typically used GC and LC analyses.

¹ Plachká K., Pilařová V., Kosturko Š., Škop J., Svec F., Nováková L.: Anal. Chem. 96, 2840 (2024).

The study was supported by the project Cooperatio Program "Pharmaceutical Sciences", EFSA-CDN reg. No.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841 funded by ERDF and the Projects of Specific Research SVV 260 662.

ULTRA-HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY (U-HPLC-MS) FOR THE DETERMINATION OF FREE ASPARAGINE – A KEY PRECURSOR OF ACRYLAMIDE FORMATION IN CEREALS

HANA PIROVA¹, BEVERLY HRADECKA¹, JANA HAJŠLOVA¹

¹ *University of Chemistry and Technology in Prague, Department of Food Analysis and Nutrition, Technická 3, Prague 6-Dejvice*

e-mail: Hana.Pirova@vscht.cz

Following the discovery of acrylamide in heat-processed foods in 2002, acrylamide has become a food safety concern not only due to its probable carcinogenic properties (classified by the IARC as Group 2A), but also because of its genotoxic and neurotoxic effects^{1,2}. Acrylamide formation occurs during the Maillard reaction at temperatures above 120 °C. Its main precursors are reducing sugars and free asparagine, which is the key precursor in cereals. Since asparagine is found in a very wide concentration range, monitoring of its content in grains seems to be essential³. The UCT Prague, Department of Food Analysis and Nutrition, is an integral part of the project ACRYRED – COST Action CA21149, aiming at reduction of acrylamide exposure of consumers by a cereal supply-chain approach targeting asparagine.

In the framework of this project, we outlined methods for the determination of free asparagine by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry employing an Orbitrap mass analyzer (U-HPLC-HRMS).

Several extraction techniques were tested: (i) extraction with deionized water using ultrasound, (ii) extraction with 10 mM formic acid using Carrez reagents, (iii) extraction with water, (iv) extraction with methanol (20% and 50%, v/v) acidified with 1% (v/v) formic acid, and (v) extraction with 50% (v/v) methanol at elevated temperature 50 °C. The extraction method that was selected as the best in terms of both efficiency and recovery was pure deionized water. Prior to analysis the samples were diluted in methanol (50%, v/v). The separation was performed employing a BEH amide column with gradient elution. The mobile phase consisted of (A) acidified water with formic acid (0.1%, v/v) and (B) acidified acetonitrile with formic acid (0.1%, v/v).

The method allowed us to separate 20 proteinogenic amino acids with repeatability of up to 10 %. Leucine and isoleucine were quantified together since the separation of these two amino acids was not achieved.

1. Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M.: J. Agric. Food Chem. 50, 4998 (2002).

2. IARC: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono60-16.pdf>, staženo 5. 1. 2024.

3. Žilić S., Dodig D., Basić Z., Vančetović J., Titan P., Đurić N., Tolimir N.: Food Additives & Contaminants: Part A 34, 705 (2017).

This work was financially supported from project LUC23140 provided by MSMT, program INTER-EXCELLENCE II.

CARDIOVASCULAR EVENT RISK ASSESSMENT USING THE CERT SCORE

BARBORA PISKLÁKOVÁ¹, ALEŠ KVASNIČKA¹, JAKUB ROZHON¹, MILOŠ TÁBORSKÝ², DAVID FRIEDECKÝ^{1,3}

¹ Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital Olomouc

² 1st Internal Clinic - Cardiology, University Hospital Olomouc

³ Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc

e-mail: bapisklakova@gmail.com

Lipids are generally associated with the development and pathology of atherosclerotic cardiovascular disease. Based on the 2019 recommendations of the European Society of Cardiology and the European Atherosclerosis Society, the SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) metric is recommended as a baseline assessment of these diseases. SCORE is based on a combination of factors such as age, sex, smoking, blood pressure and total cholesterol. However, not only cholesterol and triacylglycerols, but also ceramides and phosphatidylcholines, which are associated with myocardial infarctions, ischemic heart disease, stroke and increased mortality in general, play a major role in these inflammatory diseases. To create a simple score for predicting these cardiovascular events, measured ceramide and phosphatidylcholine concentrations were combined with advanced statistical models. Among these developed scores, CERAM (Mayo Clinic, USA), CERT1 and CERT2 (Zora Biosciences, Finland) have a great potential. CERAM and CERT1 include the calculation of this score only in the context of ceramide concentration, whereas CERT2 also takes into account phosphatidylcholines concentration. In the present study, serum concentrations of selected ceramides and phosphatidylcholines were measured in a cohort of patients from the Department of Cardiology of the University Hospital Olomouc. For this purpose, the LC-MS/MS method (1,2) was optimized for the analysis of ceramides: Cer 18:1/16:0, Cer 18:1/18:0, Cer 18:1/24:0, Cer 18:1/24:1, and phosphatidylcholines: PC 16:0/16:0, PC 14:0/22:6, PC 16:0/22:5. Analysis was performed using an Acquity BEH C18 2.1 × 75 mm × 1.7 µm column (Waters), an Exion LC HPLC instrument (SCIEX), and a QTRAP 6500+ mass spectrometer (SCIEX). Mobile phase A contained 10 mM ammonium acetate + 0.1% formic acid and mobile phase B contained 10 mM ammonium acetate in acetonitrile:2-propanol (4:3, v/v) + 0.1% formic acid. The column heating was set at 60 °C, the flow rate at 0.5 ml/min, sample injection at 0.5 µl and analysis time was 5 min. Concentrations of analytes were calculated based on their respective stable isotope-labeled internal standards. Subsequently, the CERT score and its quartiles were calculated, and risk groups were determined according to these results. In addition, these results were subjected to correlation analysis with routine biochemical parameters. The results show that this rapid quantitative analysis and the subsequent calculation of the CERT score have great potential for cardiovascular event prediction and prevention.

¹ Kauhanen D., Sysi-Aho M., Koistinen K.M., Laaksonen R., Sinisalo J., Ekroos K.: Development and validation of a high-throughput LC-MS/MS assay for routine measurement of molecular ceramides. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(13):3475-3483. doi:10.1007/s00216-016-9425-z

² Katajamäki T.T., Koivula M.K., Hilvo M., et al.: Ceramides and Phosphatidylcholines Associate with Cardiovascular Diseases in the Elderly. *Clin Chem.* 2022;68(12):1502-1508. doi:10.1093/clinchem/hvac158

This work was supported by: FNOI (IP-2023-000017), MH CZ- DRO FNOI, 00098892.

IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE MEMBRÁNOVÝCH PROTEINŮ

Cronobacter spp.

ANNA PRASKÁ, ANNA JELÍNKOVÁ, JIŘÍ NOVOTNÝ, JIŘÍ ŠANTRŮČEK, LUDMILA KARAMONOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28
Praha 6 – Dejvice, Česká republika

e-mail: praskaa@vscht.cz

Bakterie rodu *Cronobacter*, řazené do čeledi *Enterobacteriaceae*, mohou způsobovat vzácně se vyskytující infekce u novorozenců s nízkou porodní váhou a u imunokompromitovaných jedinců. U těchto ohrožených skupin obyvatelstva se infekce může projevit ve formě nekrotizující enterokolitidy nebo meningitidy^{1,2}. Tento rod bakterií je schopen snášet suché prostředí, což mu poskytuje výhodu pro přežití například v sušené kojenecké výživě^{3,4}. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) je celý rod *Cronobacter* považován za patogenní, ačkoli jsou některé druhy (*C. sakazakii* a *C. malonaticus*) s vážnými infekcemi spojovány častěji než ostatní druhy *Cronobacter*^{5,6}. Současně je o mechanismu patogenního působení a faktorech virulence *Cronobacter* spp. známo velmi málo. Je proto důležité získat co nejvíce informací o proteinech vnější membrány bakterií, která jako první přichází do styku s hostitelskými buňkami a bývá místem s častým výskytem faktorů virulence. Zároveň by se identifikované unikátní proteiny mohly stát vhodnými markery pro vývoj spolehlivých metod detekce bakterií *Cronobacter* např. v potravinách.

V rámci této práce byly izolovány a identifikovány proteiny nacházející se ve frakci vnější membrány zástupců všech druhů *Cronobacter* spp. K izolaci bakteriálních proteinů byla použita imunomagnetická separace, která využívá magnetické částice s navázanými specifickými polyklonálními protilátkami. Izolované proteiny byly následně analyzovány pomocí LC-ESI-Q-TOF MS a identifikovány programem Mascot. Na základě *in silico* analýzy byla určena lokalizace proteinů v buňce a jejich potenciální funkce. Zároveň byly vyhledávány proteiny, které jsou jedinečné pro více patogenní druhy *Cronobacter*.

Součástí práce bylo i testování různých způsobů uvolňování proteinů z jejich vazby na protilátkách imobilizovaných na magnetických částicích. Tento krok předcházel trypsinovému štěpení proteinů a MS analýze. Podmínky využívající vysoké či nízké pH (s následnou neutralizací i bez ní) nebo vysokou iontovou sílu byly porovnávány s metodou, při které k trypsinovému štěpení proteinů dochází ještě za jejich vazby na protilátkách. Metoda přímého štěpení se nakonec ukázala jako nejvhodnější, jelikož po MS analýze poskytla největší množství identifikovaných proteinů. Tento způsob byl následně uplatněn na další analýzy vnějších membránových frakcí *Cronobacter* spp. Celkově bylo ve vnějších membránových frakcích *Cronobacter* spp. zachyceno 311 různých proteinů. Z toho 51 proteinů se vyskytovalo pouze u více virulentních druhů *C. sakazakii* (kmen Cb 35) a *C. malonaticus* (kmen Cb 51), zatímco z ostatních kmenů izolovány nebyly. Po určení biologické funkce bylo vybráno 39 proteinů, které byly označeny za potenciálně virulentní.

1. Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B. D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 1442 (2008).
2. Forsythe S. J. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 9, 23 (2018).
3. Breeuwer P., Lardeau A., Peterz M., Joosten H. M.: J. Appl. Microbiol. 95, 967 (2003).
4. Kalyantanda G., Shumyak L., Archibald L. K.: Frontiers in Pediatrics 3, 56 (2015).
5. FAO/WHO: Microbiological risk assessment series; no. 15 90 stran (2008).
6. Forsythe S. J., Dickins B., Jolley K. A.: BMC Genomics 15, 1121 (2014).

AUTOMATED AND DERIVATIZATION-FREE GC-MS ANALYSIS OF SCFAS IN HUMAN BIOSPECIMEN

HANA SELIČOVÁ¹, ELLIOTT J. PRICE^{1,2}, KATEŘINA COUFALÍKOVÁ^{1,2}, AKREM JBEBLI¹

¹RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, Brno 625 00, Czechia

²EIRENE-CZ, Brno, Czech Republic

email: hana.selicova@recetox.muni.cz

Short-chain fatty acids (SCFAs) are end products of gut microbiota fermentation, sourced from dietary fiber or indigestible dietary protein. Their pivotal role in human health, including epithelial barrier stabilization and cholesterol synthesis inhibition, underscores their significance. Imbalances in SCFA levels correlate with metabolic pathologies such as inflammatory bowel diseases, obesity, diabetes, and colorectal cancer, emphasizing the necessity for the precise and practical analytical methodology. Among various methods, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) stands out for its superior sensitivity¹. While often used, derivatization in GC-MS sample preparation enhances metabolite stability, it also prolongs analysis time and involves the use of toxic reagents. Hence, we developed an accurate and efficient, derivatization-free, fully automated method using single quadrupole (GC-Q-MS) for SCFA analysis. The method combines acidification and MTBE extraction. By automating sample preparation and overlapping it with instrumental acquisition, we mitigate time-related intensity loss and reduce the number of preanalytical errors, achieving a sample-to-sample run-time of ~20 minutes. Moreover, a significant innovation introduced by our method is the addition of full-scan instrumental acquisition to selected ion monitoring (SIM), i.e. full scan-SIM. Incorporating full scan acquisition allows comprehensive profiling of metabolites and metabolic pathways not covered by SIM, while also providing increased flexibility in data analysis and improved sensitivity to detect low-abundance ions. This newly introduced streamlined approach offers precise SCFA analysis without the drawbacks of derivatization, enhancing efficiency and reliability for practical applications via the automated sample preparation and introduces full scan-SIM instrumental acquisition that enables both quantification of SCFAs and metabolite profiling in a single assay.

¹ Zhang S., Wang H., Zhu M.J.: Talanta 196, 249 (2019).

DIFERENČNÍ PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODHALUJE VLIV INOSITOLTRISFOSFÁT KINÁZY ITPK1 NA FOTOMORFOGENEZI A METABOLISMUS FYTOHORMONŮ JEČMENE

RADIM SIMERSKÝ¹, IVO CHAMRÁD², TOMÁŠ VLČKO²

¹ *Katedra chemické biologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc*

² *Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky & Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc*

e-mail: radim.simersky@upol.cz, ivo.chamrad@upol.cz

Fosfoinositidy představují důležitou skupinu primárních metabolitů vstupujících velmi komplexním způsobem do pochodů zásadních pro přežití, růst a rovnováhu každé buňky¹. U rostlin byl mimo jiné popsán význam těchto látek při reakcích na různé typy abiotického stresu, v metabolismu fytohormonů, či jako fosfát skladujících molekul zásadních pro vývoj semen². Fosforylační reakce fosfatidylinositolů jsou katalizovány enzymy ze skupiny fosfatidylinositol kináz (IPKs). Jedním z důležitých členů této skupiny je inositol-1,3,4,-trisfosfát kináza 1 (ITPK1)³.

Vliv ITPK1 na fotomorfogenezi rostlin ječmene setého (*Hordeum vulgare*) byl studován na dvou itpk1 mutantních liniích pěstovaných v podmínkách kontinuálního červeného světla. Vzhledem k významným rozdílům ve fenotypu kořenového systému itpk1 mutantních a kontrolních (WT) rostlin, byla provedena zevrubná proteomická kvantitativní analýza vzorků kořenů těchto tří linií, která odhalila zásadní rozdíly zejména v zastoupení proteinů zodpovědných za růst a vývoj kořenového systému.

¹ Tu-Sekine B., Kim S.F.: Int. J. Mol. Sci. 23, 6747 (2022).

² Marathe A., Krishnan V., Thimmegowda V., Dahuja A., Jolly M., Sachdev A.: Plant. Physiol. Bioch. 123, 7 (2017).

³ Riemer E. a 15 autorů: Molecular Plant. 14, 11 (2021).

SCREENING INTERMEDIÁTŮ DE NOVO SYNTÉZY PURINŮ V MOČI POMOCÍ LC-MS/MS

VÁCLAVA ŠKOPOVÁ¹, OLGA SOUČKOVÁ^{1,2}, 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

Puriny jsou klíčovými složkami nukleotidů, které tvoří stavební bloky DNA a RNA, a hrají důležitou roli v energetickém metabolismu, buněčné signalizaci a jako koenzymy enzymatických reakcí. Jejich dostupnost zajišťují především recyklační dráhy, zatímco v případě zvýšené potřeby je aktivována *de novo* syntéza purinů (DNPS) katalyzovaná 6 enzymy. Při defektu jednotlivých enzymů dochází k hromadění defosforylovaných forem intermediátů DNPS v tělních tekutinách. Klinické projevy těchto deficitů jsou velmi rozmanité, od autismu až po těžkou psychomotorickou retardaci či úmrtí v neonatálním období.

Naše skupina se zaměřuje na screening intermediátů DNPS v moči pacientů s nespecifickými neurologickými a psychomotorickými poruchami pomocí LC-MS/MS. Separace jednotlivých metabolitů je zajištěna kapalinovou chromatografií na koloně plněné reverzní fází (Bischoff Prontosil C18 AQ) a detekce na spektrometru s trojitým kvadrupólem v módu pozitivní ionizace elektrosprejem v režimu monitoringu selektivních reakcí (SRM). Tato metoda umožňuje detekci i těch intermediátů dráhy, které nejsou vzhledem ke své struktuře nebo nízké koncentraci detekovatelné pomocí HPLC.

Zjistili jsme, že mnohé metabolity se v dětském věku mění dynamičtěji, než se předpokládalo, a proto bylo potřeba v rámci této studie upřesnit jejich fyziologické rozmezí. Dosud bylo známé věkové stratifikované rozmezí jen některých z nich¹. Zároveň nedávné případové studie mírných forem DNPS onemocnění ukázaly mnohem nižší koncentrace metabolitů v moči, než bylo dříve zaznamenáno.

Rozšířili jsme soubor kontrolních vzorků močí na více než 300 a stanovili jsme fyziologické rozmezí pro jednotlivé metabolity DNPS i některé metabolity recyklačních drah pro 6 dětských a 1 dospělou věkovou skupinu. U všech sledovaných metabolitů je v prvním roce života široké rozmezí a zároveň nejvyšší hladiny metabolitů a postupně dochází k jejich poklesu.

Za necelé 2 roky jsme screeningově vyšetřili cca 5000 vzorků močí, z nichž přibližně 5 % mělo více než 10krát vyšší hodnoty některých purinových metabolitů oproti mediánu dané série. Tyto vzorky následně přeměňujeme kvantifikační metodou, získané hodnoty porovnáváme s nově stanoveným fyziologickým rozmezím a zkoumáme patofyziologické podklady abnormalit purinového profilu.

1. Cremonesi, A. *et al.* Improved diagnostics of purine and pyrimidine metabolism disorders using LC-MS/MS and its clinical application. *Clin Chem Lab Med* **61**, 1792-1801 (2023).

Tato práce je financována grantem Ministerstva zdravotnictví AZV NU23-01-00500.

EXTRACELLULAR METABOLOMICS FROM IN VITRO FERTILIZATION CULTIVATION MEDIA

PAVEL ŠMAK¹, VOLODYMYR POROKH², JANA, GREGOROVÁ¹, MARKÉTA NEZVEDOVÁ³,
DRAHOMÍRA KYJOVSKÁ^{2,4}, ONDŘEJ PEŠ¹, ZUZANA HOLUBCOVÁ^{2,4}

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

² Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic

³ Biomarkers of Disease and Health – Environmental Chemistry and Modelling, RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic

⁴ Reprofit International, Clinic of Reproductive Medicine, Brno, Czech Republic

e-mail: pavel.smak@med.muni.cz

Assisted reproduction involves the collection of gametes, in vitro fertilization (IVF), cultivation of resulting embryos, selection of viable embryos, and subsequent embryo transfer. The selection of transferable embryos mainly relies on morphological examination and pre-implantation genetic testing, the latter being an invasive technique that impairs the integrity of embryos.

Our group works with “spent” cultivation media, i.e., cultivation media after 5-6 days of cultivation of human IVF embryos created for fertility treatments. It is hypothesized that analyses of the extracellular metabolome of embryos could serve as a non-invasive functional assessment (i.e., complementary to morphology) of embryo viability. We have adapted an untargeted metabolomics workflow utilizing HPLC-ESI-qTOF. A series of analyses of cell free cultivation media were performed, and the data were processed with the use of multidimensional analysis. The obtained results provide the first glance on metabolomic profiles of human embryos with adverse biological quality.

This work has been supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. NU22-08-00543 and funds from Masaryk University MUNI/A/1564/2023, MUNI/A/1598/2023. All rights reserved.

FROM SPACE TO CELL: SEPARATION OF CHARGED VESICLES

ANATOLII SPESYVYI¹, MAREK CEBECAUER¹, JÁN ŽABKA¹, AGNIESZKA OLZYNSKA¹,
MICHAELA MALEČKOVÁ¹, ZUZANA JOHANOVSKÁ^{1,2}, MIROSLAV POLÁŠEK¹, ALES CHARVAT³,
BERND ABEL³

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

² Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Prague, Czechia

³ Institute of Chemical Technology and Wilhelm Ostwald-Institute of Physical and Theoretical Chemistry, Leipzig, 04103, Germany

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

The SELINA (Selected Ice Nanoparticle Accelerator) instrument was designed and constructed to produce mass-selected beams of water ice nanoparticles from electrospray for subsequent acceleration to mimic space dust and develop novel high-resolution impact ionization mass spectrometry space probes¹. On the one hand, its design includes common mass spectrometry techniques: electrospray ionization, quadrupole ion guide and resolving quadrupole; on the other hand, few novel techniques were introduced to approach m/z range 10^5 to 10^7 : frequency scanned quadrupole and charged detection mass spectrometry. We have successfully demonstrated its operation as a source of size-selected water ice nanoparticles in 50-1000 nm diameter range². However, the instrument design is also suitable for the mass determination of submicrometer solid particles in a liquid sample charged with electrospray, and we present a special arrangement of SELINA for mass detection of individual synthetic lipid unilamellar vesicles (LUVs) in water samples. Resolving frequency scanned quadrupole allows their mass separation on the basis of vesicle m/z . LUVs with nominal diameter distribution centered around 180-200 nm are good models for the extracellular vesicles (EVs) secreted by cells. They participate in intracellular transport and messaging. Their cargo includes proteins, amino acids, lipids and metabolites which could be biomarkers of various diseases and metabolism changes. Mass spectrometry analysis of the EVs composition is mostly provided on lysated, digested vesicles. The EVs isolation from the body fluid sample (plasma, urine, etc) requires careful procedures of ultracentrifugation, filtering, size-exclusion chromatography or affinity-based purification with functionalized beads. The size characterization of isolated EVs is provided by the following methods: direct light scattering, nanoparticle tracking analysis, flow cytometry and transmission electron microscopy. The proof-of-concept separation of LUVs by frequency-operated quadrupole in SELINA is a step forward to less laborious and more precise techniques for extracellular vesicle biomarker detection with mass spectrometry methods. The resolving regime of the quadrupole with m/z RSD < 10% allows separation of size selected distributions of LUVs with modal diameters 87, 111, 130, 160, and 181 nm at corresponding quadrupole m/z settings 2.5×10^5 , 5×10^5 , 8×10^5 , 1.5×10^6 , 2.5×10^6 at detection frequencies of 20-100 vesicles per minute.

1. Spesyvyi A., Zabka J., Polasek M., Maleckova M., Khawaja N., Schmidt J., Kempf S., Postberg F., Charvat A., Abel B.: *Philos T R Soc A* 382, (2024).

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

We are grateful for the financial support of the German Science Foundation (DFG) through grant AB 63/25-1 and by the Czech Science Foundation (grant No. 21-11931J).

SNÍŽENÍ VÝSKYTU ARTEFAKTŮ VZNIKAJÍCÍCH NA KOLONĚ BĚHEM LC-MS PEPTIDŮ V PROTEOMICKÝCH ANALÝZÁCH A KONTROLE KVALITY BIOLÉČIV

MYKYTA R. STAROVOIT, SIDDHARTH JADEJA, JURAJ LENČO

*Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie
Akademika Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Česká republika*

e-mail: starovom@faf.cuni.cz

Zvýšení teploty kolony představuje jedno z nejúčinnějších a nejdostupnějších řešení pro zlepšení separační účinnosti v LC-MS analýze peptidů. Vysoká teplota však během separace vede ke vzniku nežádoucích modifikací peptidů, což významně snižuje kvalitu a spolehlivost výstupů.¹ V naší studii jsme vyvinuli vysokoteplotní LC-MS metodu pro analýzu peptidů, která zachovává výhody zvýšené teploty kolony na jejich separaci a zároveň efektivně snižuje výskyt artefaktů. Metoda využívá krátké záchytné kolonky s nízkou retentivitou, která je umístěná před separační kolonou a udržovaná při nízké teplotě. Záchytná kolonka zkracuje pobyt peptidů ve vyhřívané separační koloně, čímž snižuje riziko vzniku jejich modifikací, avšak nezhoršuje separační účinnost. V porovnání se separací při 30 °C vyvinutá metoda poskytla o 42 % vyšší kapacitu separace v 110minutovém peptidovém mapování trastuzumabu a o 10 % víc identifikovaných peptidů v explorativní LC-MS analýze při minimálním množství modifikací. V peptidovém mapování bioléciv, kde artefakty vznikající na koloně mohou falešně zvyšovat množství některých kritických atributů kvality, metoda mj. snížila množství N-koncových pyroGlu o 63 % a oxidovaných Met o 48 % v porovnání s přímým nástřikem na separační kolonu při 60 °C, což zvyšuje spolehlivost kontrolních analýz. Naše řešení představuje jednoduchý a efektivní nástroj pro zlepšení chromatografické separace peptidů při výrazném snížení rozsahu jejich nežádoucích modifikací, a poslouží zejména v bottom-up proteomických analýzách a rutinní kontrole kvality protilátkových léčiv.

1. Lenco J., Semlej T., Khalikova M. A., Fabrik I., Svec F.: J Proteome Res 20, 420 (2021).

Studie byla podpořena projektem GAČR č. 22-21620S.

ZMĚNA AKTIVITY HOSTITELSKÝCH DEUBIKVITINAČNÍCH ENZYMŮ V LIDSKÝCH MAKROFÁZÍCH BĚHEM INFEKCE BAKTERIÍ *FRANCISELLA TULARENSIS*

VĚRA VOZANDYCHOVÁ¹, PAVEL ŘEHULKA¹, KAMIL HERCÍK², PAVLA PAVLÍK¹, PETRA ŠPIDLOVÁ¹, JIŘÍ STULÍK¹

¹ Univerzita obrany, Vojenská lékařská fakulta, Katedra molekulární patologie a biologie, Hradec Králové, Česká republika

² Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha, Česká republika

e-mail: vera.vozandychova@unob.cz

Tato práce byla zaměřena na identifikaci kvantitativních změn deubikvitinačních enzymů (DUBs) v hostitelských buňkách během infekce intracelulární bakterií *Francisella tularensis*.

Infekce bakterií *Francisella tularensis* FSC200 byla provedena na modelu lidských makrofágů, které byly diferencovány z monocytární buněčné linie THP-1. Infekce byla prováděna ve dvou časných časových intervalech – 10 min a 60 min. Relativní změny v zastoupení DUBs byly sledovány jednak v samotných buňkách a také ve vezikulách uvolněných infikovanými buňkami. Tyto změny byly analyzovány na úrovni proteomické (LC-MS analýza peptidů – využití isobarického značení a label-free kvantifikace, Western blot) a na úrovni expresní (real-time PCR).

Bionformatickým zpracováním získaných LC-MS/MS dat z analýzy infikovaných buněčných lyzátů s využitím TMT isobarického značení nebyla zjištěna signifikantní změna v profilu buněčných DUBs. Následná Western blot analýza detekovala pouze minimální změny pro vybrané DUBs. Podobně také analýza real-time PCR lyzátů infikovaných buněk neidentifikovala signifikantní změny mRNA vybraných DUBs. Využitím reakce se specifickou afinitní kotvou inhibující DUBs s následnou imunoprecipitací DUBs byla zjištěna relativní změna zastoupení tří enzymů (UCH-L5, USP10 a USP25) po infekci, a to jak proteomickou analýzou, tak i Western blotem s imunochemickou detekcí. Label-free LC-MS/MS analýza proteinů získaných z izolovaných extracelulárních vezikul infikovaných buněk umožnila nalézt relativní změny v profilech u několika DUBs (UCH-L5, USP10 a USP25).

Získané výsledky poukazují na to, že bakterie *F. tularensis* zasahuje do ubikvitinačního systému hostitele během procesu infekce. Byla prokázána zvýšená celková aktivita DUBs v lidských makrofázích v čase 60 minut po infekci. Použití inhibitorů DUBs s následnou imunoprecipitací odhalilo snížení enzymatické aktivity dvou specifických DUB: USP10 a UCH-L5 a zvýšenou aktivitu enzymu USP25. Tyto tři enzymy byly ve zvýšeném množství též identifikovány v exozomech uvolněných z buněk infikovaných bakterií *F. tularensis*¹.

¹ Vozandychova V. et al: Frontiers in Immunology, 14 (2023).

Práce byla podpořena MO ČR „Dlouhodobý plán rozvoje organizace 1011“ – Zdravotnická problematika ZHN II Vojenské lékařské fakulty Hradec Králové Univerzity obrany (DZRO-FVZ22-ZHN II) a MŠMT ČR (Specifický výzkum SV/FVZ201802).

VÝVOJ A OPTIMALIZACE UHPLC-MS/MS METODY PRO ANALÝZU FENYLSULFÁTŮ V ROSTLINNÝCH MATERIÁLECH

ONDŘEJ VROBEL^{1,2}, KLÁRA SUPÍKOVÁ³, PETR TARKOWSKI^{1,2}, JIŘÍ GRÚZ³

¹ Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Šlechtitelů 29, Olomouc, Česko

² Český institut výzkumu a pokročilých technologií, Šlechtitelů 27, Olomouc, Česko

³ Katedra experimentální biologie, Šlechtitelů 27, Olomouc, Česko

e-mail: ondrej.vrobel@upol.cz

Fenylsulfáty jsou přírodní látky, jedná se o estery kyseliny sírové a fenolických látek. Tato skupina látek je z velké části neprobádaná, jejich biologické účinky nejsou dostatečně popsány a jejich přítomnost v rostlinných pletivech byla reportována sporadicky. Vznikají činností sulfotransferas přenášející síranovou skupinu z donoru 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na hydroxylovou skupinu akceptorové molekuly. Přítomnost fenolických látek, potenciálních akceptorů, ve všech vyšších rostlinách, rozšířenost PAPS v živých organismech a existence řady domnělých genů kódujících PAPSdependentní sulfotransferasy napříč rostlinou řší společně vzbuzují otázky kde a v jakém množství se fenylsulfáty nachází, jak velký je jejich příjem z potravin či jakým způsobem ovlivňují bezpečnost a kvalitu potravin. Jedním z kroků k zodpovězení této otázky je nutná analýza fenylsulfátů v různých plodinách a potravinách. Za tímto účelem byla vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda pro analýzu fenylsulfátů. Ta je postavena na jednoduchém extrakčním postupu, následné chromatografické separaci v systému reverzních fází a detekcí pomocí tandemové hmotností spektrometrie. Přítomnost sulfátu ve struktuře analytů výrazně napomáhá ionizaci, zajišťuje pozitivní matricový efekt a poskytuje specifickou neutrální ztrátu m/z 80. Metoda tak ve výsledku disponuje vysokou selektivitou a citlivostí měření, dále bude uplatněna pro široký screening genových zdrojů nejvýznamnějších plodin a vybraných zelenin Olomouckého pracoviště Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i.

Práce autorů byla podpořena projektem 23-06931S Grantové agentury České republiky.

25. ročník Školy hmotnostní spektrometrie

Abstrakty přednášek v sekci Mládí vpřed a plakátových sdělení

pořádaný Spektroskopickou společností Jana Marka Marci

Vydala: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci
se sídlem: Ke Karlovu 2027/3, 120 00 Praha 2 – Nové Město
IČO: 00444634 DIČ: CZ00444634

Editoři: Ondřej Novák, David Friedecký, René Lenobel, Ivan Petřík

Tisk: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno

Fotografie na obálce: Fotoarchív hotelu Horal

Vydání první

ISBN: 978-80-88195-61-0