

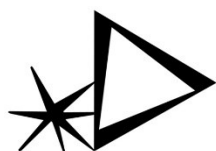


26. ročník
8. – 12. září 2025, Špindlerův Mlýn

Abstrakty přednášek v sekci Mládí vpřed a plakátových sdělení



Ondřej Novák, David Friedecký, René Lenobel, Pavel Hladík (editoři)



SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



© Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2025

ISBN: **978-80-88195-68-9**

MLÁDÍ VPŘED

Mladí výzkumníci budou prezentovat své výsledky formou krátkých přednášek v odpolední sekci „Mladí vpřed“ ve čtvrtek 11. září 2025. Nejlepší přednáška bude oceněna „Cenou za nejlepší přednášku v sekci Mladí vpřed“. Výherce získává hrazenou účast a možnost přednášet na 27. Škole hmotnostní spektrometrie v roce 2026. Sponzorem soutěže je společnost Pragolab s.r.o.

16:30 – 16:45	ANALÝZA AROMATICKÝCH AMINŮ V ODPADNÍCH VODÁCH POMOCÍ IN SITU DERIVATIZACE, SBSE A LC-MS <i>ADAM BŘEZINA</i>
16:45 – 17:00	NOVÁ DERIVATIZAČNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ KYSELINU 3-(CHLOROSULFONYL)BENZOOVOU PRO ANALÝZU ACYLGLYCEROLŮ, STEROLŮ A PRENOLŮ METODOU RP-UHPLC/MS/MS V NEGATIVNÍM IONTOVÉM MÓDU <i>YASMIN KADYRBEKOVA</i>
17:00 – 17:15	PYSPRESSO: PYTHON MODUL PRO JEDNODUCHÉ ZPRACOVÁNÍ MULTI-BATCH LCMS DAT <i>JAN MACHÁŘ</i>
17:15 – 17:30	AMBIENTNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S DIELEKTRICKÝM VÝBOJEM JAKO NÁSTROJ PRO RYCHLÝ SCREENING ZAKÁZANÝCH ANABOLIK <i>ALŽBĚTA NEMEŠKALOVÁ</i>
17:30 – 17:45	STUDIUM OXYSTEROLOVÉHO METABOLOMU: CÍLENÉ PROFILOVÁNÍ SÉROVÝCH OXYSTEROLŮ POMOCÍ UHPLC–MS/MS <i>MICHAL KALETA</i>
17:45 – 18:00	FIA-MS/MS ZE SUCHÝCH KREVNÍCH SKVRN BEZ DERIVATIZACE PRO VČASNOU A DOSTUPNOU DIAGNOSTIKU ATYPICKÉ MYOPATIE U KONÍ <i>MARTINA KADLÁČKOVÁ</i>



autorizovaný distributor

thermoscientific

Sponzor sekce Mladí vpřed

ANALÝZA AROMATICKÝCH AMINŮ V ODPADNÍCH VODÁCH POMOCÍ IN SITU DERIVATIZACE, SBSE A LC-MS

ADAM BŘEZINA ¹, KATEŘINA DOLEŽELOVÁ ¹, MAREK STIBOREK ¹, BRANISLAV VRANA ¹

¹ Masarykova Universita, Přírodovědecká fakulta, Centrum RECETOX, Česká republika

e-mail: adam.brezina@recetox.muni.cz

Aromatické aminy (AA) kontaminanty životního prostředí s prokázanými nebo předpokládanými mutagenními a karcinogenními vlastnostmi. Pocházejí z různých zdrojů, včetně průmyslových odpadních vod (například z továren na barvení textilu), odpadních vod z nemocnic a domácností, povrchového odtoku ze silnic a dalších, přičemž často končí v městských kanalizačních systémech a společně přispívají k environmentálnímu zatížení odpadních vod. Jejich přítomnost v odpadních vodách, které se vypouští do povrchových vod, vyvolává obavy ohledně možných rizik pro vodní ekosystémy. Jelikož se AA v odpadních a povrchových vodách vyskytují v nízkých koncentracích (řádově jednotky až desítky ng/L) a jejich analýzu současně komplikuje složitá matrice, je jejich spolehlivá detekce a kvantifikace analyticky náročná.¹⁻³

Pro řešení problému matricových interferencí při analýze AA v odpadních a povrchových vodách byla vyvinuta a optimalizována robustní analytická metoda pro detekci a kvantifikaci 22 primárních AA. Metoda zahrnuje in situ derivatizaci AA pomocí benzoyl chloridu a současnou extrakci derivátů (benzamidů) pomocí miktoextrakce na magnetickém míchadélku (Stir Bar Sorptive Extraction; SBSE) s následnou analýzou derivátů LC–MS/MS. Pro SBSE extrakci byly testovány dva různé polymery na magnetických míchadélkách, polydimethylsiloxan (PDMS) a ethylenglykol–silikon (EG). Optimalizované parametry SBSE včetně doby extrakce, počtu extrakčních kroků, doby desorpce, s cílem zvýšit přesnost analytické metody. V rámci vývoje instrumentální metody byly zavedeny izotopově značené analogy benzamidů, připravené derivatizací AA pomocí deuterovaně značeného benzoyl chloridu. Tento přístup usnadňuje korekci a kompenzaci matricových efektů v reálných vzorcích, čímž zvyšuje spolehlivost analýzy. Robustnost metody byla ověřena na reálných vzorcích, včetně odpadní vody na přítoku a odtoku z ČOV v Modřicích a povrchové vody z řeky Svratky. Za účelem ověření metody v reálných podmínkách bylo využito přídavku standardu ke vzorku pro stanovení koncentrace a ověření přesnosti. Tyto poznatky přispívají k hlubšímu pochopení osudu AA v rámci ČOV a poskytují klíčové informace pro návrh strategií zaměřených na zmírnění jejich dopadů na životní prostředí a veřejné zdraví.

¹ Edeballi O., Krupcikova S., Goellner A., Vrana B., Muz M., Melymuk L.: Environ Sci Technol Lett 11, 397 (2024).

² Widner B., Kido Soule M. C., Ferrer-Gonzalez F. X., Moran M. A., Kujawinski E. B.: Anal Chem 93, 4809 (2021).

³ Krupcikova S., Stiborek M., Kalouskova P., Urik J., Simek Z., Melymuk L., Muz M., Vrana B.: Sci Total Environ 939, 173196 (2024).

Výsledky projektu vznikly s finanční podporou poskytovatele Grantové agentury České republiky v rámci projektu „Akumulace v textilu a uvolňování při praní jako emisní cesta pro aromatické aminy z vnitřního prostředí do odpadních a povrchových vod“ č. GF22-06020K.

FIA-MS/MS ZE SUCHÝCH KREVŇÍCH SKVRN BEZ DERIVATIZACE PRO VČASNOU A DOSTUPNOU DIAGNOSTIKU ATYPICKÉ MYOPATIE U KONÍ

MARTINA KADLÁČKOVÁ ¹, RADANA BRUMAROVÁ ¹, DANA DOBEŠOVÁ ¹, ELIŠKA IVANOVÁ ¹,
PETR JAHN ², EVA ŠAMONILOVÁ ², DAVID FRIEDECKÝ ¹

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: martina.kadlackova01@gmail.cz; martina.kadlackova01@upol.cz

Atypická myopatie (AM) představuje onemocnění charakterizované rychle progredující rhabdomyolýzou a vysokou mortalitou (přes 75 % postižených koní umírá do 72 hodin od nástupu klinických příznaků)¹. Nejčastěji postihuje koně po pastvě bez předchozí fyzické zátěže. AM je způsobena požitím hypoglycinu A (HGA) a/nebo methylencyklopropylglycinu (MCPrG). Tyto protoxiny, přítomné v semenech a semenáčcích některých druhů javoru (*Acer*), se v organismu metabolizují na toxické sloučeniny, které inhibují βoxidaci mastných kyselin a katabolismus leucinu³.

Vzhledem k akutnímu průběhu onemocnění a vysoké úmrtnosti je klíčová dostupná a včasná diagnostika. Stávající LC-MS/MS metody jsou však závislé na vzorcích séra nebo moči, což omezuje jejich využití při odběru v terénu, a navíc vyžadují derivatizaci, která prodlužuje dobu analýzy.

Tato práce představuje diagnostický přístup založený na analýze suchých krevních skvrn (DBS) pomocí metody FIA-MS/MS, která nevyžaduje derivatizaci. Vzorek krve (50 µl) je aplikován na odběrovou kartu (Whatman 903), usušen při pokojové teplotě za absence přímého slunečního záření a následně zaslán běžnou poštou do laboratoře. Vyvinutá FIA-MS/MS analýza umožňuje kvantifikaci HGA a jeho metabolitu, MCPA-karnitinu (methylencyklopropylacetyl-karnitin), které slouží jako biomarkery AM, společně se sedmi klinicky relevantními acylkarnitiny.

Metoda se vyznačuje jednoduchou přípravou vzorku, krátkou dobou analýzy (1 min) a nízkými finančními náklady. Metoda byla validována dle doporučení Evropské lékové agentury (EMA). Dosahuje dostatečné linearity ($R^2 > 0,994$) s nízkými limity kvantifikace (0,013–0,110 µmol/L). Zároveň vykazuje odpovídající správnost (76–144 %) a přesnost (CV < 34,7 %) jak v rámci jednoho dne, tak mezi dny. Analyty zůstávají v suché krevní skvrně stabilní minimálně sedm dní při pokojové teplotě, což umožňuje spolehlivou analýzu i při zaslání DBS vzorků poštou. Metoda byla následně otestována na 20 vzorcích od pacientů s AM a 15 kontrolních vzorcích, přičemž výsledky jednoznačně odlišily obě skupiny.

Díky rychlosti, jednoduchosti a možnosti zaslání DBS vzorků poštou umožňuje vyvinutá FIA-MS/MS metoda včasnou diagnostiku AM, podporu rychlého terapeutického zásahu a diferenciaci od jiných onemocnění.

¹ van Galen G. a 24 spoluautorů: Equine Veterinary Journal 44, 614 (2012).

² Votion D.-M., Francois A.-C., Kruse C., Renaud B., Farinelle A., Bouquieaux M.-C., Marcillaud-Pitel C., Gustin P.: Animals (Basels) 10, 365 (2020).

³ 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).

NOVÁ DERIVATIZAČNÍ METODA VYUŽÍVAJÍCÍ KYSELINU 3-(CHLOROSULFONYL)BENZOVOU PRO ANALÝZU ACYLGLYCEROLŮ, STEROLŮ A PRENOLŮ METODOU RP-UHPLC/MS/MS V NEGATIVNÍM IONTOVÉM MÓDU

YASMIN KADYRBEKOVA¹, ONDŘEJ PETERKA¹, ROBERT JIRÁSKO¹, ZUZANA LÁSKO¹,
BOHUSLAV MELICHAR², MICHAL HOLČAPEK¹

¹ Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Česká republika

² Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní Nemocnice Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Česká republika

e-mail: yasmin.kadyrbekova@upce.cz

Spojení chromatografických technik a hmotnostní spektrometrie (MS) představuje klíčový přístup pro analýzu lipidů. Velmi selektivní a citlivou analýzu poskytuje zejména MS s nízkým rozlišením, která využívá specifické přechody analytů například multiple reaction monitoring (MRM). Přestože mohou být tyto přechody velmi selektivní, nelze jimi rozlišit některé izomery lipidů. Tento nedostatek lze překonat pomocí kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP-LC) a díky této kombinaci je možné spolehlivě identifikovat a kvantifikovat větší množství lipidů. Některé třídy lipidů však tímto přístupem nejsou dobře analyzovatelné, protože během ionizace fragmentují nebo netvoří dostatečně selektivní fragmenty. V těchto případech je možné využití derivatizačních metod, které mohou zlepšit chromatografické vlastnosti, ionizační účinnost, stabilitu analytu nebo selektivitu a citlivost stanovení.

V této práci jsme vyvinuli novou derivatizační metodu využívající 3-(chlorosulfonyl)benzovou kyselinu, která dosud nebyla pro derivatizaci použita. Cílem bylo umožnit analýzu sterolů, prenolů a neutrálních lipidů v negativním iontovém módu, čímž se minimalizuje fragmentace v iontovém zdroji v porovnání s běžnou ionizací v pozitivním módu, a výrazně se tak zvyšuje citlivost analýzy.

Metoda RP-UHPLC/MS/MS byla optimalizována na základě 30 derivatizovaných standardů ze čtyř lipidových tříd (steroly, prenoly, monoacylglyceroly a diacylglyceroly).

RP-UHPLC metoda umožnila separaci izomerů (např. 1,2-DG vs. 1,3-DG, cholesterol vs. lathosterol nebo desmosterol vs. 7-dehydrocholesterol) a v kombinaci s hmotnostní spektrometrií umožnila vysoce citlivou a selektivní analýzu. Derivatizační reakce byla optimalizována za použití lidské plazmy s přidavkem devíti vnitřních standardů ze čtyř různých tříd lipidů. Nejvyšší výtěžek reakce byl dosažen při molárním poměru pyridinu k derivatizačnímu činidlu 6:1, při 60 °C po 40 minut. Přebytek pyridinu a derivatizačního činidla byl odstraněn pomocí modifikované Folchovy extrakce z důvodu minimalizování kontaminace systému. Opakovatelnost a reprodukovatelnost metody byly ověřeny jedním, resp. dvěma operátory, s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) nižší než 15 %. Stabilita derivátů byla potvrzena jak při krátkodobém uchovávání v autosampleru při 4 °C (18 hodin), tak při dlouhodobém skladování při -80 °C (pět dnů), přičemž RSD nepřekročila 10 %. Metoda významně snížila limity detekce, zejména pro volné steroly až na 15-25 pmol/ml v plazmě. Plně optimalizovaná metoda byla aplikována pro identifikaci sterolů, prenolů, monoacylglycerolů a diacylglycerolů v lidské plazmě a celkem bylo anotováno 92 lipidů z uvedených tříd pomocí charakteristických skenů obsahujících derivatizační značku v kombinaci s retenčními závislostmi.

Tato práce byla podpořena grantem Evropské rady pro výzkum (ERC), projekt č. 101095860.

STUDIUM OXYSTEROLOVÉHO METABOLOMU: CÍLENÉ PROFILOVÁNÍ SÉROVÝCH OXYSTEROLŮ POMOCÍ UHPLC–MS/MS

MICHAL KALETA ^{1,2}, JANA OKLEŠŤKOVÁ ¹, IVAN PETŘÍK ¹, MIROSLAV KVASNICA ¹, ONDŘEJ NOVÁK¹

¹ Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Olomouc, Česká republika

² Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc & Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika

e-mail: michal.kaleta@upol.cz

Oxysteroly jsou bioaktivní kyslíkaté deriváty cholesterolu, které fungují jako endogenní modulátory buněčné signalizace a imunitních odpovědí¹⁻⁴. Podílejí se rovněž na dalších klíčových fyziologických procesech, včetně regulace homeostázy cholesterolu, syntézy steroidních hormonů a metabolismu mastných kyselin. Narušení metabolismu oxysterolů bývá v současné době spojováno s patogenezí celé řady různých onemocnění, jako je ateroskleróza, některá neurodegenerativní onemocnění a různé formy rakoviny, včetně nádorů prsu, plic a gastrointestinálního traktu^{2,4-7}. V lidských tkáních jsou oxysteroly přirozeně produkovány intracelulární enzymatickou oxidací cholesterolu, avšak na jejich vzniku se podílejí i neenzymatické mechanismy zahrnující autooxidaci^{2,8}.

Tato práce představuje vysoce výkonnou a citlivou analytickou metodu založenou na ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC–MS/MS), která umožňuje cílené profilování oxysterolů v lidském krevním séru. Vyvinutá metoda využívá účinnou separaci na reverzní fázi a umožňuje simultánní kvantifikaci deseti strukturálně i funkčně příbuzných oxysterolových metabolitů v pouhých několika mikrolitrech vzorku séra. Tento nově navržený přístup je vhodný pro sledování dynamiky oxysterolů za různých fyziologických i patologických podmínek. Získané výsledky mohou přispět k identifikaci nových biomarkerů a k hlubšímu porozumění biologickým procesům u onemocnění spojených s poruchami oxysterolového metabolismu, a tím rozšířit portfolio dosud dostupných diagnostických i terapeutických strategií.

¹ Borah K., Rickman O. J., Voutsina N., Ampong 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 vznikla za podpory projektu „Interdisciplinární přístupy pro vývoj a aplikace nových materiálů v medicínské praxi – Nové omické technologie“, reg.č.: CZ.02.01.01/00/23_021/0009224 spolufinancovaného z EU.

PYSPRESSO: PYTHON MODUL PRO JEDNODUCHÉ ZPRACOVÁNÍ MULTI-BATCH LCMS DAT

JAN MACHÁŇ¹, RICHARD MASAŘ¹, SÁRA FILIPOVÁ¹, LUKÁŠ NAIDEKR¹

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

e-mail: jan.machan@upol.cz

PySPRESSO je open-source Python modul, navržený pro zjednodušení a zefektivnění zpracování velkých „multi-batch“ LCMS dat následující po použití „peak-picking“ softwarů jako například Compound Discoverer. Modul zahrnuje různé funkce pro filtrování a transformace dat, funkce pro korekci batch-efektů a analytických chyb. Stejně jako nástroje pro statistickou analýzu a vizualizaci. Uživatel je schopen si velmi snadno vytvořit pipeline na procesování dat dle vlastních potřeb a nastavit si potřebné parametry funkcí. Pro uživatele, kteří neprogramují připravujeme rovněž grafické rozhraní, pro tvorbu a nastavení takovýchto workflow. Schopnost pracovat lokálně s velkými „multi-batch“ LCMS daty, včetně těch s mnoha chybějícími hodnotami, se především hodí pro případy důvěrných nebo příliš velkých souborů, které nejsou vhodné pro nahrávání do populárních online nástrojů. Celý postup je dokumentován do PDF report souboru, který umožňuje detailně sledovat a kontrolovat jednotlivé kroky procesování dat.

Kód na pozadí je celý napsaný v Pythonu, což zajišťuje přístupnost a snadnou implementaci nové funkčnosti a nástrojů. Díky Pythonu, jakožto jednomu z hlavních jazyků strojového učení, je modul rovněž připraven na integraci různých AI modelů pro predikci vlastností, klasifikaci dat, nebo například dalších metod korekce, jakou je například pySERRF. 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. Její použití bude demonstrováno na datasetech z našich nejnovějších studií.

Financováno z JG_2024_026 (UPOL) a IGA LF 2025_006 (UPOL).

AMBIENTNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S DIELEKTRICKÝM VÝBOJEM JAKO NÁSTROJ PRO RYCHLÝ SCREENING ZAKÁZANÝCH ANABOLIK

ALŽBĚTA NEMEŠKALOVÁ^{1,2}, JANA KNYTLOVÁ¹, JAN BUČEK³, PETRA DINISOVÁ⁴,
MICHAEL VOLNÝ^{1,2}

¹ Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

² Mikrobiologická ústav AV ČR v.v.i, Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4

³ Plasmion GmbH, Am Mittleren Moos 48, 86167, Augsburg

⁴ Pragolab s.r.o., Nad Krocínkou 285, 190 00 Praha 9

e-mail: alzbeta.nemeskalova@vscht.cz

Hmotnostní spektrometrie s ambientní ionizací umožňuje detekci za atmosférického tlaku, často s minimální přípravou vzorku, což z ní činí efektivní nástroj pro rychlý screening nelegálních látek. Mezi tyto látky patří mimo jiné i sloučeniny podporující růst svalové hmoty, jako jsou anabolické androgenní steroidy (AAS) a selektivní modulátory androgenního receptoru (SARM). Přestože jsou AAS a SARM klasifikovány jako látky s hormonálním účinkem a jejich distribuce je v České republice trestná podle § 288 trestního zákoníku, přípravky s jejich obsahem jsou nadále snadno dostupné, zejména prostřednictvím internetových prodejců zaměřených na sportovní výživu a suplementaci.

Tato práce se zaměřuje na vývoj rychlé kvalitativní a semikvantitativní metody pro analýzu těchto látek v nelegálních přípravcích dostupných ve formě tablet, kapslí a olejů. Využita byla ambientní ionizace pomocí dielektrického bariérového výboje se zdrojem Sicrit® ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris 120. Výsledky byly porovnány s referenčním měřením pomocí validované LC-MS/MS metody.

Vzorky reálných přípravků (n = 24) byly extrahovány methanolem a společně s kalibračními roztoky analyzovány pomocí opakovaného nástřiku do vyhřívaného modulu iontového zdroje, přičemž byl zaznamenán celkový iontový chromatogram. Zároveň byl všem vzorkům i kalibrantům přidán generický interní standard propranolol, který sloužil ke korekci instrumentálních odchylek a zvýšení reprodukovatelnosti měření. Ze získaných dat byly následně extrahovány záznamy patnácti vybraných cílových analytů, jejichž integrace umožnila semikvantitativní vyhodnocení. Mez detekce byla stanovena na základě kalibračních dat a odpovídala hodnotám nižším než typicky uváděné obsahy účinných látek v přípravcích. Analyt v přípravku byl následně považován za detekovaný, pokud integrovaný signál příslušného m/z překročil stanovený práh. Semikvantitativní výsledky byly následně porovnány s daty získanými pomocí referenční LC-MS/MS metody, přičemž byla zaznamenána vysoká míra shody (<4% falešně pozitivních či falešně negativních výsledků).

Významnou výhodou navržené metody je výrazně kratší doba analýzy (<2 min na vzorek) ve srovnání s referenční LC-MS/MS metodou (8–15 min na vzorek). I s pomocí semikvantitativního přístupu byla v mnoha analyzovaných přípravcích pozorována výrazná nesrovnalost mezi deklarovaným a skutečně zjištěným obsahem účinných látek, což podtrhuje význam analytické kontroly těchto produktů dostupných na nelegálním nebo neregulovaném trhu.

Práce byla finančně podpořena projektem GAČR č. 25-16715J.

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

Sdělení s lichými pořadovými čísly budou prezentována v úterý 9. září 2025, 13:30 - 14:30. Sdělení se sudými pořadovými čísly budou prezentována ve čtvrtek 11. září 2025, 13:30 – 14:30.

Tři nejlepší plakátová sdělení budou oceněna „Cenou za nejlepší plakátové sdělení“. Výherci získají hrazený registrační poplatek na 27. Školu hmotnostní spektrometrie v roce 2026. Sponzorem soutěže je společnost Pragolab s.r.o.

1. **Anna Bartáková, Dušan Holub, Tomáš Oždian, Petr Džubák, Zora Mělková, Pavel Martásek, Marián Hajdúch**: Stanovení hladiny HEP-25 v lidské plazmě pomocí metod cílené proteomiky u pacientů s HIV léčených lékem Normosang.
2. **Kateřina Cermanová, Petra Bublavá, Ondřej Novák, Michal Karady**: Komplexní profilování fytohormonů a polyaminů: nový LC-MS/MS přístup pro studium metabolismu rostlin.
3. **Kseniya Dryahina, Miroslav Polášek, Patrik Španěl**: Effect of humidity on ionisation and ion chemistry in dielectric barrier discharge ionisation (DBDI).
4. **Pavla Fialová, Mats Tysklind, Elena Golosovskaia, Kateřina Grabicová, Branislav Vrana, Roman Grabic**: Jakou část chemického prostoru zachytí pasivní vzorkovače v odpadní vodě – a jak se mění v čase?
5. **Tadeáš Grabic, Roman Grabic**: Aplikace DDA AcquireX DeepScan pro rozlišení obsahových sloučenin v rozdílných druzích kávy.
6. **Jana Gregorová, Robin Kotouček, Katarína Kostolanská, Eliška Bartečková, Jan Juřica, Libor Ustohal, Eva tábořská, Ondřej Peš, Tomáš Luffer, Pavel Šmak**: Segmentovaný vlasový kortisol jako nástroj pro dlouhodobé monitorování pacientů s psychiatrickými poruchami.
7. **Marie Hamplová, Minoo Partovi Nasr, Darina Čejková, Veronika Farková, Helena Zlámalová Gargošová**: Assessment of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes in Poultry Gut Microbiome.
8. **Martina Horejšová, Barbora Piskláková, Anna Ligasová, Karel Koberna, David Friedecký**: Simultánní stanovení aktivit cytidindeaminasy a deoxycytidin-5-monofosfátdeaminasy při léčbě hematologických malignit nukleosidovými analogy.
9. **Kateřina Hrabáková, Vladimír Vrkoslav, Josef Cvačka**: Characterization of linear and branched cuticular hydrocarbons in *Blaptica Dubia* using GC/Q-TOF and molecular sieve separation.

10. **Jakub Hrdlička, Ivan Petřík, Kristýna Floková, Ondřej Novák**: Unispray ionization in phytohormone analysis.
11. **Ján Hrouzek, Natália Grigová, Agneša Szarka, Svetlana Hrouzková**: Development of methods for monitoring pesticide residue levels in bees, bee pollen, and other apicultural products.
12. **Ivo Chamrád, Radim Simerský, Jakub Lemberk, Anežka Harastejová Vacková, René Lenobel, Ondřej Novák**: Porovnání výkonnosti metody FAMOS: vysokokapacitní alternativa k izolaci organel pomocí Percollu pro rostlinný výzkum.
13. **Hana Janečková, Dana Dobešová, Matúš Prídavok, Radana Brumarová, Aleš Kvasnička, Barbora Pisklaková, Eliška Ivanovová, Katarína Brennerová, Jana Šaligová, Ľudmila Potočňáková, Simona Drobnáková, Jana Potočňáková, David Friedecký**: Metabolomic and lipidomic characterization of patients with TMEM70, SCAD and combined deficiency.
14. **Anna Janovska, Alexandra Dvorakova, Eva Tloustova, Pavel Kraina**: Automation of ADME assays using Echo-MS and KNIME & CDD for enhanced throughput and data processing.
15. **Martina Kintlová, Marián Hajdúch, Petr Džubák**: ECHO MS: nový standard pro rychlý a robustní screening malých molekul.
16. **Jana Knytllová, Alžběta Nemeškalová, Jan Buček, Petra Dinisová, Michael Volný**: Ambientní hmotnostní spektrometrie pro analýzu SARM s využitím iontových zdrojů DAPPI a DBDI.
17. **Štefan Kosturko, Anna Hošťálková, Lucie Nováková, Michal Kořínek, Marcela Šafratová**: UHPLC-MS Exploration of isoquinoline alkaloids: can HRMS using Q-TOF even come close to triple quadrupole sensitivity?
18. **Alena Langová, Michal Holčápek, Robert Jirásko**: Toward robust and reproducible metabolomics: improving polar metabolite analysis via LC-MS.
19. **Zuzana Lásko, Ondřej Peterka, Robert Jirásko, Lenka Dubská, Anna Taylor, Beatrice Mohelníková Duchoňová, Martin Loveček, Bohuslav Melichar, Petr Karásek, Jan Trna, Ondřej Urban, Michal Holčápek**: Lipid Alterations Across six Pancreatic Ductal Adenocarcinoma-Related Cohorts Using RP-UHPLC/MS.
20. **Ivana Lemak, Peter Kotora, Matej Horváth, Svetlana Hrouzková**: Development of a method for efficient separation and detection of *n*-nitrosamines in cyclizine using APCI-HPLC-MS/MS.
21. **Jakub Lemberk, Pavel Hladík, Vladimír Skalický, René Lenobel, Ivan Petřík, Aleš Pěňčík, Radim Simerský, Ivo Chamrád, Ondřej Novák**: Buněčně specifické rozložení fytohormonů napříč organelami.
22. **Eva Czmorik Ludvíčková, Denisa Pařízková, Aneta Sýkorová, Jakub Tomáško, Vojtěch Hrbek, Jana Pulkrabová**: Vývoj metody pro stanovení chlorovaných parafinů v biologických vzorcích.

23. **Richard Masař, Jan Macháň, Lukáš Najdekr**: Metabolické (molekulární) profilování zelených a pražených kávových zrn s využitím LC-MS.
24. **Stanislav Musil, Ignacio Machado, Beatrice Campanella, Kseniya Dryahina, Patrik Španěl**: Identification of photochemically generated volatile species of ruthenium and osmium using selected ion flow tube mass spectrometry.
25. **Tereza Pavlíčková, Ivo Chamrád, Ivan Petřík, René Lenobel**: Přírodní rostlinné peptidy s biologickou aktivitou a moderní metody jejich analýzy.
26. **Aleš Pěňčík, Pavel Hladík, Asta Žukauskaitė, Federica Brunoni, Marek Zatloukal, Ondřej Novák**: Comparative metabolite profiling approach reveals the complexity of auxin metabolism across plant species.
27. **Ondřej Peš, Jana Gregorová, Pavel Šmak, Volodymir Porokh, Drahomíra Kyjovská, Zuzana Holubcová**: Využití biomarkerů pro predikci úspěšnosti IVF kultivace.
28. **Veronika Pilařová, Jana Fišerová, Kateřina Plachká, Veronika Drexel, Daniel Elleder, Bernd Kaspers, Lucie Nováková**: UHPSFC-MS/MS as a tool for metabolism study of vitamin D.
29. **Ondřej Pospíšil, Kateřina Šebelová, Jana Hajšlová**: Porovnání fragmentačních spekter vybraných analytů pomocí UHPLC-HRMS/MS s různými hmotnostními analyzátory.
30. **Kateřina Pražáková, Kateřina Plachká, Veronika Pilařová, Taťána Gazárková, Jean-Christophe Garrigues, Lucie Nováková**: Využití umělých neuronových sítí pro porovnání ESI iontových zdrojů u SFC-MS systémů s jednoduchým a trojitým kvadrupólem.
31. **Jaroslav Příkryl, Tomáš Vrzal**: Thermal transformation pathways of hop essential oils in model systems.
32. **Jakub Rozhon, Martina Kadláčková, Aleš Kvasnička, Markéta Camfrlová, Roman Dohnal, David Friedecký, David Karásek**: Lipidomická analýza pacientů po bariatrické operaci: změny krevního lipidového profilu v kontextu metabolických adaptací.
33. **Ondřej Rubáš, Ondřej Brabenec, Zbyněk Džuman, Alessandro Volkov, Jana Hajšlová**: Způsoby identifikace pyrrolizidinových alkaloidů a jejich metabolitů.
34. **Jakub Slačálek, Lukáš Kučera**: Characterization of new amber species using a multi-instrumental approach.
35. **Pavel Šmak, Viktória Ďurčová, Marta Pelcová, Martina Osičková, Jan Juřica**: Stanovení antiepileptik v alternativních matricích.

36. **Anatolii Spesyvyi, Marek Cebecauer, Ján Žabka, Agnieszka Olżyńska, Michaela Malečková, Miroslav Polášek, Ales Charvat, Bernd Abel:** Strategies for charged proteins desorption from lipid membrane in vacuo.
37. **Veronika Šubrtová, Huong Giang Vo, Robert Jirásko, Ondřej Petreka, Milan Vošmik, Laura Bindila, Michal Holčápek:** Cross-laboratory validation of glycosphingolipids profiling in PDAC using high-resolution ion mobility mass spectrometry.
38. **E. Kovářiková, M. Houška, J. Strohalm, M. Šulc:** Využití NADES a paskalizace pro šetrnou extrakci vanilinu: vývoj vanilkové pasty a její LC-MS/MS analýza.
39. **Lucie Oravová, Andrea Vernerová, Jan Snow, Ivana Barchánková, Pavel Kuráň:** Thermal conversion of waste flat-panel display plastics and polystyrene over zeolite catalysts in a tandem microreactor coupled with GC–MS.
40. **Natálie Zemánková, Ivo Chamrád, Ivan Petřík, Jitka Šíroká, René Lenobel, Ondřej Novák:** Analysis of the barley and its mutant chlorina *f2f2* chloroplast proteome.
41. **Nina Zemanová, Jana Gregorová, Pavel Šmak, Viktória Ďurčová, Marta Vyoralová, Ondřej Peš, Ondřej Zendulka, Martin Vereš, Libor Ustohal, Jan Juřica:** D-amino acids in the limelight: enantioseparation of amino acids using chiral stationary phase by LC-MS.
42. **Dominika Kaczorová, Chao Zhang, Tetiana Kalachova, Alena Kadlecová, Jitka Šíroká, Asta Zukauskaitė, Lenka Burketová, Karel Doležal, Ondřej Novák:** Mass Spectrometry Imaging: A High-Throughput Approach for Analyzing Pathogen-Induced Phytohormones.



thermoscientific

Sponzor Ceny za nejlepší plakátové sdělení

STANOVENÍ HLADINY HEP-25 V LIDSKÉ PLAZMĚ POMOCÍ METOD CÍLENÉ PROTEOMIKY

ANNA BARTÁKOVÁ¹, DUŠAN HOLUB¹, TOMÁŠ OŽDIAN¹, ZORA MĚLKOVÁ²,
PAVEL MARTÁSEK², MARIÁN HAJDÚCH¹, PETR DŽUBÁK¹

¹ Ústav molekulární a translační medicíny, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 1333/5, 779 00 Olomouc, Česká republika

² Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci, Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Česká republika

e-mail: anna.bartakova01@upol.cz

Hepcidin-25 (Hep-25) je peptidový hormon, klíčový pro regulaci metabolismu železa v těle. Hep-25 ovlivňuje vstřebávání železa ve střevě a jeho uvolňování z hepatocytů a makrofágů do krevního řečiště¹. Regulace hladiny železa je zde založena na vazbě Hep-25 na transportér železa ferroportin 1 v buněčné membráně. Ferroportin 1 s navázaným Hep-25 je následně internalizován a degradován, což vede ke snížení transportu železa z buněk do krve². Hep-25 je produkován zejména hepatocyty ve formě neaktivního 84 aminokyselin dlouhého preprohepcidinu, který je v organismu dále štěpen na aktivní formu Hep-25 o délce 25 aminokyselin^{3,4}. Ke zvýšení hladiny Hep-25 může docházet v důsledku vysoké hladiny železa v krvi a zánětlivých procesů². Naopak ke snížení hladiny Hep-25 může docházet v důsledku nízké hladiny železa v krvi, anémie, těhotenství, hypoxie nebo v důsledku jaterního onemocnění (např. cirhóza, hepatocelulární karcinom), případně jako efekt některých léků^{2,5,6,7}.

Imunoanalytické metody (např. ELISA) trpí zkříženou reaktivitou s kratšími izoformami a rozdílnou kalibrací napříč výrobci. Cílená hmotnostně – spektrometrická proteomika (LC-MS/MS) tyto limity řeší a umožňuje přímou absolutní kvantifikaci a široký lineární rozsah^{8,9}.

Cílem práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení hladiny Hep-25 v plazmě a následné stanovení hladiny Hep-25 v patientských vzorcích plazmy pomocí SPE LC-MS/MS metody^{10,11}. Díky definovaným MRM přechodům je metoda robustní, přenositelná a vhodná pro harmonizaci i mezi laboratořemi. Metoda byla validovaná a ověřená stran interference běžných preanalytických faktorů, jako je hemolýza a lipémie, přičemž citlivost pokrývá fyziologické i patologické rozmezí plazmatických koncentrací.

¹ Ganz, T.: Blood 17, 4425 (2011). doi: 10.1182/blood-2011-01-258467.

² Frazer, D. M., Anderson, G. J.: 2, 206 (2014). doi: 10.1002/biof.1148.

³ Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T.: J. Biol. Chem. 11, 7806 (2001). doi: 10.1074/jbc.M008922200.

⁴ Gagliardo, B., Faye, A., Jaouen, M., Deschemin, J. -C., Canonne-Hergaux, F., Vaulont, S., Sari, M. -A.: The FEBS J. 15, 3793 (2008). doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06525.x.

⁵ Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S.: J. Clin. Invest. 7, 1037 (2002). doi: 10.1172/JCI15686.

⁶ Kessler, S. M., Laggai, S., Kierner, A. K., Barghash, A., Helms, V.: J. Hepatol. 4, 977 (2015).

⁷ Mleczo-Sanecka, K., da Silva, A. R., Call, D., Neves, J., Schmeer, N., Damm, G., Seehofer, D., Muckenthaler, M. U.: Haematologica, 7, 1173 (2017). doi: 10.3324/haematol.2016.162917

⁸ Karlsson, T.: J. Inflammation, 21 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12950-017-0166-3>

⁹ Uijtershout, L., Swinkels, D. W., Domellöf, M., Lagerqvist, C., Hudig, C., Tjalsma, H., Vos, R., van Goudoever, J. B., Brus, F.: Pediatr. Res., 4, 409 (2014). <https://doi.org/10.1038/pr.2014.109>

¹⁰ Holub D., Houda J., Hajdúch M., Pospíšilová D., Džubák P.: Chemagazín 5, 8 (2016).

¹¹ Li, H., Rose, M. J., Tran, L., Zhang, J., Miranda, L. P., James, C. A., Sasu, B. J.: J. Pharmacol.Toxicol.I Methods 3, 171 (2009). doi: 10.1016/j.vascn.2009.02.004

Děkuji za podporu z těchto infrastrukturních grantů: CZ-OPENSREEN (LM2023052), EATRIS-CZ (LM2023053) a interní grantové agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_LF_2023_025 a IGA_LF_2024_038). Rovněž chci poděkovat za spolupráci kolegům, zejména Mgr. Dušanovi Holubovi, Ph. D., za spolupráci.

KOMPLEXNÍ PROFILOVÁNÍ FYTOHORMONŮ A POLYAMINŮ: NOVÝ LC-MS/MS PŘÍSTUP PRO STUDIUM METABOLISMU ROSTLIN

KATEŘINA CERMANOVÁ¹, PETRA BUBLAVÁ¹, ONDŘEJ NOVÁK¹, MICHAL KARADY¹

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

e-mail: katerina.cermanova01@upol.cz

Rostlinný hormon ethylen a polyaminy hrají klíčovou roli ve vývoji rostlin a reakcích na stres, přičemž jejich metabolické dráhy jsou úzce propojeny skrz Yangův cyklus. Navzdory významnosti těchto sloučenin zůstává jejich kvantifikace značnou analytickou výzvou, částečně kvůli jejich nízké retenci na kolonách s reverzní fází. Validované profilovací metody zahrnující nejen polyaminy a ethylen, ale i další fytohormony, dosud nejsou dostupné.

V této práci prezentujeme nový validovaný přístup využívající kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS), který umožňuje profilovat široké spektrum fytohormonů, ethylenových prekurzorů, polyaminů a příbuzných metabolitů z jediného biologického vzorku. Integrované propojení metod umožňuje stanovit 15 fytohormonálních sloučenin, včetně auxinů, cytokininů, kyseliny jasmonové, kyseliny abscisové, kyseliny salicylové a kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové, spolu se 14 klíčovými metabolity z polyaminových a aminokyselinových drah, jako jsou například putrescin, spermidin, spermin, thermospermin, L-arginin, L-citrulin a L-ornitin.

Metoda je optimalizována pro 10 mg čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu a zahrnuje minimální extrakční protokol. Tato nová metodika poskytuje komplexní nástroj pro objasnění metabolických interakcí, jak je ukázáno na příkladu analýzy mutantních linií *Arabidopsis thaliana*. Umožňuje nepřímé studium ethylenu a současně zkoumání vzájemně propojených rolí polyaminů a fytohormonů. Tento přístup může přispět k lepšímu studiu metabolické adaptace rostlin a regulačních mechanismů v různých podmínkách prostředí.

Tato práce byla realizována s podporou Grantové agentury ČR (juniorský projekt 20-25948Y), Interní grantové agentury UPOL (IGA_PrF_2025_019) a Technologické agentury ČR (Biorafinace a cirkulární ekonomika pro udržitelnost, TN02000044).

EFFECT OF HUMIDITY ON IONISATION AND ION CHEMISTRY IN DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE IONISATION (DBDI)

KSENIYA DRYAHINA¹, MIROSLAV POLÁŠEK¹, PATRIK ŠPANĚL¹

¹J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Praha, Czechia

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

The Dielectric Barrier Discharge Ionisation (DBDI) method is very effective for real-time, soft ionisation of vapourised and gaseous samples for mass spectrometric analyses. In DBDI, a high voltage applied across electrodes separated by a dielectric material creates a non-thermal plasma, which forms analyte ions. Although commercial use often prioritises numerical data processing, understanding the ion chemistry involved is crucial. Our research focuses on ionisation mechanisms in the presence of air constituents such as water vapour, offering insights into product ion formation. This understanding is essential for accurate mass spectral interpretation and responsible application of DBDI.

The present study covers a range of analytes, including ketones and acids, representing compounds relevant to the practical needs of VOC analyses. Gaseous samples containing variable concentrations of VOC vapours were introduced from a glass bottle with a permeation tube into the DBDI source through a PEEK capillary at a known flow rate.

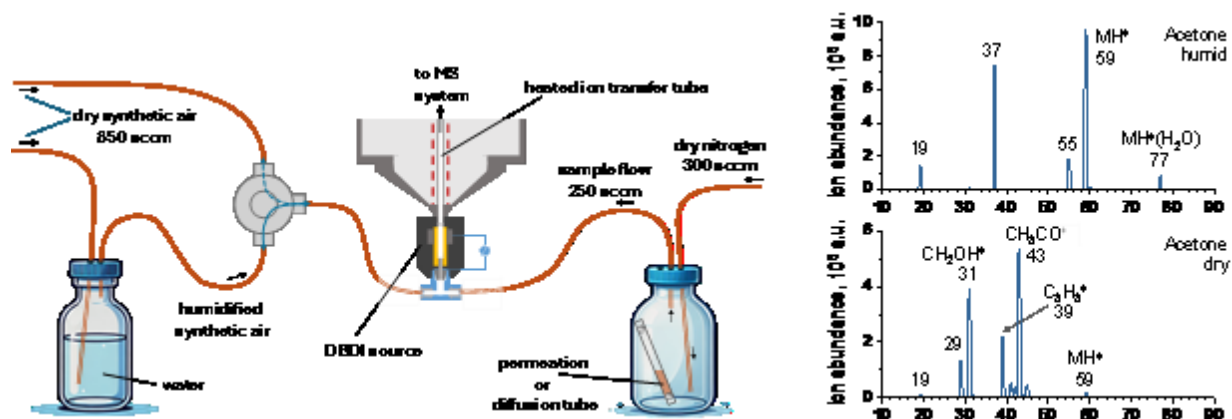


Figure 1. Experimental setup to study humidity effects in DBDI-MS and sample data for acetone.

The atmosphere plays a crucial role in ionisation processes occurring in the ion source. Understanding its influence is critical for interpreting the resulting spectra. The term "carrier gas" refers to a gas that is directly introduced into the DBDI source together with analytes from a sample. The DBDI source can operate with various carrier gases. Humidification of carrier gas can lead to the formation of hydronium clusters, which then facilitate ionisation through proton transfer, resulting in increased ionisation efficiency. In this study, we focused on ionic chemistry in the presence of dry and humidified carrier gas.

1. Dryahina K., Polášek M., Jašík J., Sovová K., Španěl P.; Mass Spectrom. Rev., 21914 (2025).

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).

JAKOU ČÁST CHEMICKÉHO PROSTORU ZACHYTÍ PASIVNÍ VZORKOVAČE V ODPADNÍ VODĚ – A JAK SE MĚNÍ V ČASE?

PAVLA FIALOVÁ¹, MATS TYSKLIND², ELENA GOLOSOVSKAIA², KATEŘINA GRABICOVÁ¹,
BRANISLAV VRANA³, ROMAN GRABIC¹

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum
akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, Česká republika

² Department of Chemistry, Umeå University, Linnaeus väg 6, SE-901 87, Umeå, Sweden

³ RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

e-mail: fialovap@frov.jcu.cz

Pasivní vzorkovače jsou jednoduchá vzorkovací zařízení, které umožňují dlouhodobé sledování znečišťujících látek ve vodě a poskytují časově váženou průměrnou koncentraci za vzorkované období. Jelikož nevyžadují žádný externí zdroj energie, mohou být použity prakticky po celém světě a představují tak důležitý nástroj pro globální monitoring chemických látek ve vodním prostředí. Pasivní vzorkovače používají různé sorbenty, podle cílové skupiny sledovaných chemických látek a různé difúzní vrstvy, které ovlivňují rychlost příjmu látek do vzorkovače v kinetickém (časově-integrativním) režimu vzorkování. V předchozích studiích jsme zjistili, že tři pasivní vzorkovače určené pro polární organické polutanty pokrývají v kinetickém režimu stejnou část chemického prostoru bez ohledu na rozdíl v konstrukci, typu použitého sorbentu a difúzní vrstvu.^{1,2} Avšak v rovnovážném režimu vzorkování, kdy příjem chemických látek do vzorkovače závisí na kapacitě sorbentu, je možné, že rozdíly použitých sorbentů budou mít vliv na část vzorkovaného chemického prostoru. V této studii jsme se zaměřili na vývoj vzorkovaného chemického prostoru v čase pomocí dvou různých typů pasivních vzorkovačů, abychom pokryli jak kinetický, tak rovnovážný režim vzorkování. Ve vyčištěné odpadní vodě z komunální čistírny odpadních vod v Brně (Modřicích) byly tyto vzorkovače ponechány vzorkovat po různě dlouhé časové úseky v rozmezí od 1 do 16 týdnů. Pro chemickou analýzu jsem byla použita kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (HPLC-HRMS) v režimu nezávislého získávání MS/MS dat (DIA). Data byla zpracována v softwaru Compound Discoverer 3.3 s využitím interní suspect knihovny obsahující přes 1700 sloučenin ze skupin léčiv, pesticidů, biocidů, per- a polyfluoroalkylových sloučenin (PFAS) a surfaktantů. Úroveň jistoty identifikace byla určena podle škály Schymanski.³ Sloučeniny identifikované na úrovni 3 a vyšší byly použity pro modelování chemického prostoru pomocí vícerozměrné analýzy. Pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) z necílené analýzy jsme pozorovali rozdíly jak mezi typy vzorkovačů, tak mezi jednotlivými dobami expozice. Zároveň se ukázalo, že látky identifikované na Schymanski úrovni 3 a vyšší dobře reprezentují celé spektrum detekovaných signálů. Při porovnání počtu identifikovaných sloučenin mezi vzorkovači a různými časy expozice však nebyly pozorovány výrazné rozdíly. Oba testované pasivní vzorkovače tedy pravděpodobně vzorkují podobnou část chemického prostoru bez ohledu na jejich konstrukci a režim vzorkování.

¹ Fialová P., Šveclová K., Grabicová K., Grabic R., Švecová H., Nováková P., Vrana B.: Sci. Total Environ. 908, 168153 (2024).

² Fialová, P. Tysklind M, Glosowskaia E., Grabicová K., Vrana B., Grabic R.: Submitted to ACS ES&T Water

³ Schymanski E. L., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H. P., Hollender J.: Environ. Sci. Technol. 48, 2097 (2014).

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentury České republiky (projekt č. 20-04676X) a Švédské radě pro výzkum v oblasti udržitelného rozvoje (Formas) v rámci mezinárodního konsorcia BIOCIDE financovaného z výzvy ERA-NET Aquatic Pollutants Joint Transnational Call (GA č. 869178).

APLIKACE DDA AcquireX DeepScan PRO ROZLIŠENÍ OBSAHOVÝCH SLOUČENIN V ROZDÍLNÝCH DRUZÍCH KÁVY

TADEÁŠ GRABIC¹, ROMAN GRABIC²

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

² Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (CENAKVA), Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

e-mail: grabict@natur.cuni.cz

Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že subjektivní vnímání chuťových rozdílů v kávě odlišného druhu, pražení a metody přípravy může být objektivně sledováno pomocí kapalinové chromatografie s vysokorozlišující hmotnostně-spektrometrickou detekcí.

V předběžném experimentu bylo porovnáno pět druhů káv. Všechny druhy zrnkových káv byly připraveny stejným postupem – namletí stejného množství kávy na stejnou hrubost a následná příprava pomocí Aeropressu. Jeden druh instantní kávy byl připraven podle návodu k přípravě uvedeném na obalu. Dva ml z takto připravené kávy byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr (regenerovaná celulóza, 0,20 µm póry). 2 µl takto připraveného vzorku byly nastříknuty na kolonu Arion C18 Polar (Chromservis) a separovány gradientem methanolu ve vodě (obojí pufováno 10 mmol octanem amonným).

Pro analýzu byla použita sestava kvartérní čerpadlo Vanquish (Thermo Scientific) s autosamplerem TriPlus RSH (Thermo Scientific), detekce byla prováděna hybridním hmotnostním spektrometrem Exploris 240 (Thermo Scientific). Pro analýzu byl použit kombinovaný MS¹ a MS² sběr dat pomocí módu AcquireX, subrutina DeepScan. Tento mód umožňuje získat kvalitních MS² spekter i sloučenin s malým zastoupením v plném scanu. Měření bylo provedeno pouze v pozitivním módu elektrosprejové ionizace.

Vyhodnocení dat proběhlo pomocí softwaru Compound Discoverer 3.4. Pomocí analýzy hlavních komponent byly zjištěny významné rozdíly mezi sloučeninami obsaženými v silněji a slaběji pražených vzorcích, přičemž vzorek instantní kávy byl výrazně odlišný od všech ostatních vzorků. Pomocí shody MS² spekter s databází mzCloud se podařilo na Schymanski úrovni 2¹ identifikovat sloučeniny, které mohou být zodpovědné za určité chuťové vjemy.

V následném podrobnějším experimentu bylo zahrnuto větší množství káv, které byly připraveny dvěma různými způsoby – Aeropress a Espresso. Tyto vzorky byly analyzovány stejnou metodou, ale navíc také v negativním módu elektrosprejové ionizace.

¹ Schymanski E. L., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H. P., Hollender J.: Environ. Sci. Technol. 48, 2097 (2014).

Poděkování: Tato studie byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy v rámci projektu CENAKVA (LM2018099).

SEGMENTOVANÝ VLASOVÝ KORTISOL JAKO NÁSTROJ PRO DLOUHODOBÉ MONITOROVÁNÍ PACIENTŮ S PSYCHIATRICKÝMI PORUCHAMI

JANA GREGOROVÁ¹, ROBIN KOTOUČEK¹, KATARÍNA KOSTOLANSKÁ^{1,2}, ELIŠKA BARTEČKOVÁ³, JAN JUŘICA², LIBOR USTOHAL³, EVA TÁBORSKÁ¹, ONDŘEJ PEŠ¹, TOMÁŠ LUFFER¹, PAVEL ŠMAK¹

¹Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Biochemický ústav, Kamenice 5, Brno, 625 00

²Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Farmakologický ústav, Kamenice 5, Brno, 625 00

³Fakultní nemocnice Brno, Psychiatrická klinika Jihlavská 20, Brno, 625 00

e-mail: suchomel@med.muni.cz

Osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA) patří mezi primární systém reakce těla na stres, a zároveň je zapojena do různých endokrinních a psychiatrických poruch. Mezi hormony spojenými s aktivitou HPA osy patří glukokortikoid kortizol, zejména ve spojení s depresivní poruchou, hraniční poruchou osobnosti, úzkostnými poruchami či schizofrenií. Zatímco tradiční metody, jako je stanovení hladiny kortizolu v plazmě, slinách nebo moči, poskytují pouze momentální stav hladin kortizolu, analýza kortizolu ve vlasech nabízí jedinečný pohled na dlouhodobou expozici.

Koncentrace kortizolu ve vlasech (HCC) je relativně nová metoda pro odhad akumulace kortizolu ve vlasové matrici v průběhu měsíců, která umožňuje posouzení chronické expozice a longitudinálních trendů. Longitudinální analýza kumulativní expozice je umožněna segmentální analýzou vlasů, což je technika, která zkoumá po sobě jdoucí části vlasového pramene za účelem rekonstrukce retrospektivní časové osy expozice hormonům nebo jiným látkám, které se hromadí ve vlasové matrici. Při průměrné rychlosti růstu vlasů 1 cm za měsíc může segmentální analýza odhalit hladiny hormonů nebo látek sahající až půl roku nazpět.

Užitečnost této metody je však limitována nedostatečným pochopením toho, jak se koncentrace látek mění podél vlasového stvolu. Zejména interpretace dat z distálních segmentů zůstává náročná. Procesy vymývání nebo podélné difuze mohou vést k systematicky nižším absolutním hodnotám v distálních segmentech. Tento jev ovlivňuje nejen kortizol, ale i další sloučeniny měřené pomocí segmentální analýzy. Stanovení HCC bylo prováděno pomocí online extrakce na pevnou fázi ve spojení s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (SPE LC MS) s využitím náhradního analytu v autentické matrici¹. Kvantifikace HCC v překrývajících se opakovaného odběru dobrovolníka předpokládající pokles koncentrací směrem k distálním segmentům podle kinetiky prvního řádu umožnila stanovit a následně aplikovat konstantu poklesu na vybrané pacienty Psychiatrické kliniky FN Brno. Trend korigovaného segmentovaného vlasového kortizolu byl poté hodnocen jako možný rozlišující element při diagnostice a monitorování terapie výše zmiňovaných poruch souvisejících s dysregulací HPA osy.

¹Kostolanska K, Novotna L, Taborska E, Pes O. Online solid-phase extraction liquid chromatography–mass spectrometry of hair cortisol using a surrogate analyte. *Chemical Papers*. 2019;73(1):151-158. doi:10.1007/s11696-018-0560-1

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

Assessment of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes in Poultry Gut Microbiome

MARIE HAMPLOVÁ ¹, MINOO PARTOVI NASR ², DARINA ČEJKOVÁ ², VERONIKA FARKOVÁ ¹,
HELENA ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ ¹

¹Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

²Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technická 3058/10,
616 00 Brno

e-mail: Marie.Hamplova@vutbr.cz

Livestock farming is a major contributor to the environmental release of antibiotics. Manure containing antibiotic residues is applied to fields as fertilizer, leading to the contamination of soil. The presence of antibiotics and their metabolites in the environment contributes to the development of antimicrobial resistance of bacteria (AMR), which poses a serious risk to human health. Moreover, the gut microbiome of livestock by itself—especially chickens—serves as a major reservoir enabling the transmission of antibiotic resistance genes (ARGs) between animals and humans.

This study analysed fecal samples from chickens at a commercial farm in the Czech Republic, where antibiotic treatment was applied. Antibiotic residues were quantified using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Metagenomic sequencing and high-throughput quantitative polymerase chain reaction (HT-qPCR) were used to identify genes associated with antibiotic resistance (ARGs).

As a consequence of antibiotic treatment, enrofloxacin (ENR) was detected in the samples (up to tens of mg/kg), along with its known metabolite and degradation product, ciprofloxacin (CIP), which was present in all samples (up to units of mg/kg). The concentration of ENR in fecal samples decreased exponentially over time following antibiotic administration, with the trend being statistically significant. A simultaneous decrease in CIP concentration was also observed. DNA from 40-day-old chickens was sequenced using shotgun metagenomics, subsequently ARGs were identified in the fecal samples, revealing that the most abundant resistance genes belonged to aminoglycosides, MLSB (Macrolide–Lincosamide–Streptogramin B) and tetracyclines classes.

The obtained results reveal a high presence of ARGs and antibiotic residues in the poultry gut microbiome, highlighting the need for continuous monitoring. This complementary approach provides a solid foundation for tracking the spread of antimicrobial resistance in agricultural environments.

Funded by project of specific research: FCH/FEKT-J-25-8816.

SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ AKTIVIT CYTIDINDEAMINASY A DEOXYCYTIDIN-5-MONOFOSFÁTDEAMINASY PŘI LÉČBĚ HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT NUKLEOSIDOVÝMI ANALOGY

MARTINA HOREJŠOVÁ¹, BARBORA PISKLÁKOVÁ¹, ANNA LIGASOVÁ³, KAREL KOBERNA³, DAVID FRIEDECKÝ^{1,2}

¹ Laboratoř dědičných metabolických poruch, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

² Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Česká republika

³ Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

e-mail: martina.horejsova@upol.cz

Úvod: Nukleosidová analoga (NA) jsou molekuly vyznačující se podobnými strukturními rysy, avšak odlišnými mechanismy účinku¹. Díky své rozmanité škále účinků našla uplatnění především v medicíně jako léčiva používaná v chemoterapii hematologických malignit². NA jsou do buněk transportována specializovanými nukleosidovými transportéry, v cytoplasmě fosforylována a následně jako trifosfáty začleňována do nově syntetizované DNA během S fáze buněčného cyklu, což blokuje syntézu DNA³. Tento mechanismus protinádorové léčby může být narušen enzymy jako je cytidindeaminasa (CDA) či deoxycytidin-5-monofosfátdeaminasa (DCTD), které přeměňují NA na jejich neaktivní uridinové protějšky.

Cíl: Tato práce je zaměřena na optimalizaci LC-MS/MS metody pro současné stanovení CDA a DCTD a následné využití metody pro analýzu reálných vzorků.

Metody: Pro stanovení aktivity CDA a DCTD byly využity lyzáty rozdílných typů buněčných linií a PDX (patient-derived xenograft-bearing mice) modely vzorků myšího tumoru a plazmy. Buněčné lyzáty a plazma byly inkubovány s cytarabinem, 5-bromo-2'-deoxycytidin-5'-monofosfátem a 5-fluorocytidinem (FC) za optimalizovaných podmínek pro sledování přeměny na jejich uridinové produkty. LC-MS/MS analýza byla provedena pomocí Exion LC (Sciex) a HILIC 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 přídatku produktu byla vypočtena aktivita CDA a DCTD.

Výsledky: Byla provedena optimalizace MS parametrů pro jednotlivé standardy, které byly využity pro vytvoření finální metody. Dále byla provedena optimalizace podmínek pro inkubaci vzorků se substráty. Kvantifikace byla provedena pomocí desetibodové kalibrační přímky, koncentrační rozmezí bylo určeno dle očekávané koncentrace analytů ve vzorcích. Byla současně zkoumána aktivita CDA a DCTD v PDX modelech myších vzorků tumoru a plazmy. V případě všech vzorků různých PDX modelů byla v případě CDA naměřena aktivita ve vzorcích plazmy, v případě vzorků tumoru byla aktivita nulová. Opačně tomu tak bylo při měření aktivity DCTD, kdy ve vzorcích tumoru byla aktivita DCTD naměřena, ve vzorcích plazmy nebyla detekována. Pomocí této metody byla rovněž porovnávána aktivita CDA v buněčných lyzátech nádorových buněčných linií, liniích tvořených diploidními buňkami a v linii immortalizovaných diploidních buněk. Vysoká aktivita CDA byla pozorovatelná v rámci nádorových buněčných linií po ošetření FC, ve zbylých případech byla zaznamenána nízká až nulová aktivita enzymu.

Závěr: Stanovení enzymatické aktivity CDA a DCTD vyvolalo zájem klinických studií, a to zejména v souvislosti s přeměnou léčiv pacientům podávaných při chemoterapii na neaktivní látky, které již postrádají terapeutický účinek a léčba se takto stává nefunkční.

¹ Ewald B., Sampath D., Plunkett W.: *Oncogene* 27, 6522 (2008). <https://doi.org/10.1038/onc.2008.316>

² 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). <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00581.x>

³ Manska S., Octaviano R., Rossetto C. C.: *J. Biol. Chem.* 295, 5871 (2020). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012378>

CHARACTERIZATION OF LINEAR AND BRANCHED CUTICULAR HYDROCARBONS IN *BLAPTICA DUBIA* USING GC/Q-TOF AND MOLECULAR SIEVE SEPARATION

KATEŘINA HRABÁKOVÁ^{1,2}, VLADIMÍR VRKOSLAV¹, JOSEF CVAČKA^{1,2}

¹ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030/8, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

e-mail: katerina.hrabakova@uochb.cas.cz

Cuticular hydrocarbons (CHCs) play essential roles in insect physiology and communication. CHCs typically consist of complex mixtures of linear alkanes and alkenes, and methyl-branched hydrocarbons¹.

In this study, CHCs were extracted from the cockroach *Blaptica dubia* using chloroform and purified via two thin-layer chromatography steps to isolate saturated hydrocarbons. Molecular sieve zeolite 5A enabled selective and complete removal of linear hydrocarbons from the sample; 50 mg of molecular sieve was sufficient to treat 300 µg of the saturated hydrocarbon mixture. Qualitative analysis before and after molecular sieve separation was conducted using gas chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (GC/Q-TOF), providing high-resolution analysis.

This approach allowed novel identification of seven linear and fourteen branched CHCs in *Blaptica dubia*, including nonacosane, 3-methylnonacosane, triacontane, 3-methyltriacontane, hentriacontane, 3-methylhentriacontane, tritriacontane, and various dimethyl hydrocarbons. These results are consistent with previously described CHC profiles of other cockroach species in the genera *Blattella*, *Periplaneta*, and *Blaberus*, where long-chain alkanes with more than 23 carbon atoms and their 3-methyl-branched isomers are typically abundant²⁻⁴. Characterization of the CHC profile of *Blaptica dubia* provides new insights into the chemical ecology of this species.

¹ Blomquist G. J., Ginzl M. D.: Annu. Rev. Entomol. 66, 45 (2021).

² Pei X. J., Schal C., Fan Y. L.: J. Chem. Ecol. 50, 955 (2024).

³ Bello J. E., McElfresh J. S., Millar J. G.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 1077 (2015).

⁴ Said I., Costagliola G., Leoncini I., Rivault C.: J. Insect Physiol. 51, 995 (2005).

This project was funded by the Charles University Grant Agency (Project No. 471425).

UNISPRAY IONIZATION IN PHYTOHORMONE ANALYSIS

JAKUB HRDLIČKA¹, IVAN PETŘÍK¹, KRISTÝNA FLOKOVÁ², ONDŘEJ NOVÁK¹

¹Laboratory of Growth Regulators, Palacký University in Olomouc & IEB ASCR, Šlechtitelů 27, 77900 Olomouc, Czech Republic

²University of Amsterdam, Swammerdam Inst Life Sci, Plant Hormone Biol Grp, Green Life Sci Cluster, NL-1098 XH Amsterdam, Netherland

e-mail: jakub.hrdlicka01@upol.cz

Typically, electrospray ionization (ESI) is the analytical tool of choice for the most phytohormone LC-MS analysis. Novel ionization mechanism, commercialized as UniSpray (Waters, Manchester, UK), promises improvement in ionization efficiency. In the UniSpray model, a high flow of an analyte from the grounded sprayer is nebulized onto the cylindrical metal rod with the high voltage, which is located between the sprayer and the ion inlet of the mass spectrometer. This unique geometry promises to produce smaller droplets and better desolvation. Combining these techniques should produce a greater number of ions from the same amount of sample. In our study, using an Acquity UPLC I-class system (Waters, Milford, USA) coupled with XEVO TQ-XS triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) we evaluate the performance of the UniSpray ion source within existing validated LC-MS methods for phytohormone analysis, with the aim of improving their sensitivity and overall analytical performance.

DEVELOPMENT OF METHODS FOR MONITORING PESTICIDE RESIDUE LEVELS IN BEES, BEE POLLEN, AND OTHER APICULTURAL PRODUCTS

JÁN HROUZEK ¹, NATÁLIA GRIGOVÁ ¹, AGNEŠA SZARKA ¹, SVETLANA HROUZKOVÁ ¹

¹ Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovakia

e-mail: jan.hrouzek@stuba.sk

The use of pesticides has brought many benefits to farmers and agricultural companies. Their use in practice has brought many positive effects in the fight against pests, diseases, increased food quality or accelerated fruit ripening. However, their positive properties also bring with them undesirable negative effects. Over time, it has been shown that pesticides cause pollution of soil, water, air, but they can also contaminate animals that consume these plants. Agricultural fields on which pesticides are widely used represent a large part of the food for honey bees. Honey bees are a source of many products that are irreplaceable in the food, health and cosmetic industries. In addition to products, bees are also an important type of pollinator thanks to which plants reproduce. Contamination of apicultural samples may indicate contamination of the environment and agricultural crops. The occurrence of pesticides in honey bees and other apicultural samples is usually at ultratrace concentration levels¹. Therefore, the procedures for their determination require highly sensitive and precise analytical procedures. A multi-step sample preparation is usually necessary, including the extraction itself and, due to the nature of the sample, the step of extract purification². This is followed by the separation of substances contained in the extract, since the extract is still a multicomponent mixture. For the separation and detection of substances, advanced analytical instrumentation providing low detection limits, a wide linear range and high repeatability of measurement are indispensable, such as liquid or gas chromatographs working in connection with powerful detection. Adequate detection is provided, for example, by a mass spectrometer with various analyzers³.

The samples were prepared according to the QuEChERS extraction procedure, which is based on liquid extraction and purification of the obtained extract with various sorbents. Several modifications are made with recycled and upcycled materials bringing a green aspect to the analytical method. The volumes and weights of samples, extraction reagents and reagents used in the sample preparation process were minimized with respect of green analytical chemistry recommendations. Difficulties of matrix effects and consequences in the form of special cleaning of the extract will be discussed.

¹Blažková I., Hrouzek J., Szarka A., Pócsová T., Hrouzková S.: Acta Chim. Slovaca 15, 103 (2022).

²Hrouzek J., Grigová N., Pócsová T., Szarka A., Hrouzková S.: Chem. Listy 117, 433 (2023).

³Rusnáková M., Hrouzek J., Hrouzková S.: J. Apic. Res. 62, 76 (2023).

This work was supported by the Program for Supporting Young Researchers at STU (APIGREEN project) and by the Program for Supporting Excellent Teams of Young Researchers (ENVIGREEN project).

POROVNÁNÍ VÝKONNOSTI METODY FAMOS: VYSOKOKAPACITNÍ ALTERNATIVA K IZOLACI ORGANEL POMOCÍ PERCOLLU PRO ROSTLINNÝ VÝZKUM

IVO CHAMRÁD¹, RADIM SIMERSKÝ², JAKUB LEMBERK¹, ANEŽKA HARASTEJOVÁ VACKOVÁ^{1,@},
RENÉ LENOBEL¹, ONDŘEJ NOVÁK¹

¹Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky AV ČR,
Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Česká republika

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

@ Současná adresa: Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská Univerzita, Chittussiho 983/10,
CZ-710 00, Ostrava, Česká republika

e-mail: ivo.chamrad@upol.cz

Mezibuněčná komunikace a regulační vztahy mezi různými typy buněk a jejich organelami jsou zásadní pro správný vývoj, růst, plasticitu a fyziologické odpovědi rostlin. Tyto interakce umožňují rostlinám dynamicky reagovat na vnitřní signály (např. hormonální regulace) i vnější podněty (např. stresové faktory prostředí). Pro hlubší porozumění těmto složitým, buněčně specifickým mechanismům jsme nedávno vyvinuli metodu Fluorescence-Activated multi-Organelle Sorting (FAmOS), inovativní frakcionační techniku založenou na pokročilé průtokové cytometrii¹. Díky sekvenčnímu třídění, které využívá individuálních optických vlastností tříděných částic a fluorescence vybraných vitálních barviv, umožňuje FAmOS separaci několika typů organel z jediného vzorku. V pilotní studii zaměřené na buněčné rozdělení dvou antagonistických skupin fytohormonů (auxinů a cytokininů) pak tato metoda prokázala značný potenciál pro prohloubení poznatků o roli organel v procesech nezbytných pro život rostlin.

V této práci porovnáváme výkonnost metody FAmOS se zlatým standardem izolace organel – centrifugací v hustotním gradientu Percollu – a testujeme její využitelnost pro proteomické analýzy. S využitím chloroplastů jako modelové organely byly obě metody hodnoceny z hlediska výtěžnosti, životaschopnosti a čistoty izolátů, stejně jako časové a pracovní náročnosti. Získané výsledky naznačují, že metoda FAmOS je snadno adaptovatelná pro moderní -omické přístupy a umožňuje detailní vhled do organelového proteomu i z omezeného množství vzorku. Tato technologie tak může otevřít nové možnosti pro studium fyziologie rostlin v přirozeném prostorovém kontextu na (sub)celulární úrovni.

¹SKALICKÝ, V., ANTONIADI, I., PĚNČÍK, A., CHAMRÁD, I., LENOBEL, R., KUBEŠ, M. F., ZATLOUKAL, M., ŽUKAUSKAITĖ, A., STRNAD, M., LJUNG, K., NOVÁK, O. Fluorescence-activated multi-organelle mapping of subcellular plant hormone distribution. *Plant J.*, roč. 116, č. 6, s. 1825–1841. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/tpj.16456>

METABOLOMIC AND LIPIDOMIC CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH TMEM70, SCAD AND COMBINED DEFICIENCY

HANA JANEČKOVÁ¹, DANA DOBEŠOVÁ¹, MATÚŠ PRÍDAVOK¹, RADANA BRUMAROVÁ¹, ALEŠ KVASNIČKA¹, BARBORA PISKLAKOVÁ¹, ELIŠKA IVANOVOVÁ¹, KATARÍNA BRENNEROVÁ², JANA ŠALIGOVÁ³, ĽUDMILA POTOČNAKOVÁ³, SIMONA DROBNAKOVÁ³, JANA POTOČNAKOVÁ³, DAVID FRIEDECKÝ¹

¹ Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic

² Department of Pediatrics, Centre for Inherited Metabolic Disorders, National Institute of Children's Diseases, Bratislava, Slovak Republic

³ Metabolic Outpatient Clinic, Children's Faculty Hospital, Košice, Slovak Republic

e-mail: hana.janeckova@fnol.cz

This study provides a comprehensive metabolomic and lipidomic analysis of patients with mitochondrial disorders: TMEM70 deficiency (TMEM70d), short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD), and their combination (TMEM70d-SCADD). Targeted metabolomics, organic acid analysis, and lipidomics were performed on serum and urine samples using LC-MS/MS, followed by multivariate and univariate statistical analyses and ROC evaluation.

Distinct metabolic and lipidomic patterns were identified in all patient groups. Urinary analysis revealed elevated butyrylcarnitine and its metabolites in SCADD and TMEM70d-SCADD patients, while TMEM70d and TMEM70d-SCADD patients showed accumulation of pyruvate metabolism intermediates, citric acid cycle metabolites, and branched-chain amino acid degradation products. In serum, elevated lactate, alanine, hydroxylated acylcarnitines, and decreased arginine-related metabolites were observed in TMEM70d and TMEM70d-SCADD. Lipidomic analysis revealed reduced levels of plasmalogens and phosphatidylserines and increased triacylglycerols, suggesting oxidative stress and disturbed mitochondrial lipid regulation. Synergistic changes were pronounced in TMEM70d-SCADD patients, confirming enhanced impairment of β -oxidation, energy metabolism, and redox balance.

Patients with TMEM70d, SCADD, and TMEM70d-SCADD exhibit distinct metabolic signatures characterized by disturbances in energy metabolism, amino acid degradation, and lipid homeostasis. Known markers (e.g., ethylmalonate, butyrylglycine) were confirmed, while novel ones (e.g., 3-methylglutaconate) were identified. ROC analysis showed excellent diagnostic power in TMEM70d-SCADD patients. The combination of TMEM70d and SCADD leads to synergistic metabolic effects, emphasizing the importance of comprehensive metabolic profiling in understanding complex mitochondrial disorders and identifying potential biomarkers for diagnosis and treatment monitoring.

This work was supported by the Agency for Medical Research of the Czech Republic (NU20-08-00367), Ministry of Health of the Czech Republic (MH CZ - DRO FNOL, 00098892) and European Regional Development Fund-Project "Interdisciplinary Approaches for the Development and Application of New Materials in Medical Practice - New Omic Technologies" (No. CZ.02.01.01/00/23_021/0009224).

AUTOMATION OF ADME ASSAYS USING ECHO-MS AND KNIME & CDD FOR ENHANCED THROUGHPUT AND DATA PROCESSING

ANNA JANOVSKA¹, ALEXANDRA DVORAKOVA¹, EVA TLOUSTOVA¹, PAVEL KRAINA¹

¹ IOCB Prague, Flemingovo nám. 542/2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

e-mail: anna.janovska@uochb.cas.cz

High-throughput screening (HTS) of ADME properties is a critical step in early drug discovery, yet it often presents challenges in terms of time, scalability, and data traceability. In this work, we present an automated workflow integrating Echo-MS technology with KNIME¹ (Data analytics platform) and CDD Vault² (Scientific Data Management & ELN) to streamline sample transfer, data acquisition, and processing for key in vitro ADME assays, including solubility, plasma and microsomal stability, and plasma protein binding.

A key advantage of Echo-MS is its ability to perform direct, label-free detection without the need for chromatographic separation, offering significant time and resource savings compared to conventional LC-MS workflows.

A crucial aspect of our workflow optimization was the careful design of assay conditions to ensure compatibility with Echo-MS measurements. Selecting appropriate assay composition and experimental settings was essential for achieving reproducible and reliable results across different ADME studies.

We developed a modular KNIME workflow (MOLD) that facilitates the preparation of optimized plate layouts for acoustic liquid handling using Echo. The layout files generated by MOLD can be directly imported into the Echo system, enabling fast and error-free compound transfers. In parallel, additional KNIME workflows are used to process raw data acquired via Sciex OS (Echo-MS SW), with final results transferred into CDD Vault to enable structured access, cross-experiment comparison, and efficient retrieval of historical data.

This integrated solution significantly reduces manual effort, accelerates data turnaround, and enhances consistency and traceability. It enables smaller teams to manage high volumes of ADME profiling with improved reliability and transparency.

¹ Berthold M. R., Cebron N., Dill F., Gabriel T. R., Kötter T., Meinl T., Ohl P., Sieb C., Thiel K., Wiswedel B.: KNIME: The Konstanz Information Miner. In: Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization (GfKL 2007). Springer, 2007. ISBN 978-3-540-78239-1.

² Bunin B. A., Muskal S. M., Scheiber J., Sirota M., Nguyen D.-T., Yee A., Southall N. T., Jadhav A., Wang Y., Austin C. P., Simeonov A.: Collaborative Drug Discovery Vault: A Web-Based Platform for Secure Data Management and Collaboration in Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 2015, 55, 2089–2097. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00472

³ <https://github.com/PavelKraina>

This work was supported by the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences (RVO:61388963)

ECHO MS: NOVÝ STANDARD PRO RYCHLÝ A ROBUSTNÍ SCREENING MALÝCH MOLEKUL

MARTINA KINTLOVÁ¹, MARIÁN HAJDÚCH¹, PETR DŽUBÁK¹

¹Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci,
Hněvotínská 1333/5, 77900 Olomouc, Česká republika

e-mail: martina.kintlova@upol.cz

Kinázy se podílejí na celé řadě klíčových biologických procesů, a proto představují častý cíl při vývoji nových terapií, zejména v oblasti nádorových a neurodegenerativních onemocnění.

Původně jsme pro screening nových sloučenin využívali technologii MALDI-TOF, avšak za účelem zrychlení a zefektivnění rané fáze identifikace inhibitorů kináz jsme do laboratorního workflow zařadili platformu Echo MS. Tato hmotnostně spektrometrická technologie využívá akustický přenos vzorku namísto kapalinové chromatografie a umožňuje jeho přímé zavedení z mikrotitrační destičky do elektrospreje, čímž výrazně zvyšuje rychlost a robustnost analýzy.

Systém 6500+ Triple Quad detekuje sloučeniny v rozmezí 5–2000 Da i ve složitých matricích, což z něj činí výkonný nástroj pro kvantitativní analýzy ve vysokokapacitním screeningu.

Díky těmto vlastnostem představuje Echo MS silnou technologii pro rychlou identifikaci inhibitorů s potenciálem pro další preklinický vývoj.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu Národní infrastruktura chemické biologie – CZ-OPENSREEN (identifikační kód LM2023052) a Interním grantem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_LF_2024_038).

AMBIENTNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PRO ANALÝZU SARM S VYUŽITÍM IONTOVÝCH ZDROJŮ DAPPI A DBDI

JANA KNYTLOVÁ ¹, ALŽBĚTA NEMEŠKALOVÁ ^{1,2}, JAN BUČEK ³, PETRA DINISOVÁ ⁴, MICHAEL VOLNÝ ^{1,2}

¹ Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika

² Mikrobiologická ústav AV ČR v. v. i., Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4, Česká republika

³ Plasmion GmbH, Am Mittleren Moos 48, 86167, Augsburg, Německo

⁴ Pragolab s.r.o., Nad Krocínkou 285, 190 00 Praha 9, Česká republika

e-mail: knytlovj@vscht.cz

Ambientní hmotnostní spektrometrie umožňuje analýzu vzorků za atmosférického tlaku v jejich přirozeném stavu s žádnou nebo jen minimální úpravou¹. V práci je prezentována aplikace komerčního ambientního iontového zdroje Sicrit na bázi dielektrického bariérového výboje (DBDI, Dielectric Barrier Discharge Ionization) pro analýzu selektivních modulátorů androgenního receptoru (SARM, selective androgen receptor modulators). SARM spadají do skupiny látek s anabolickým účinkem stejně jako anabolické androgenní steroidy². Tyto látky nebyly doposud registrovány u regulačních agentur jako EMA nebo FDA, a proto jejich výroba i distribuce v ČR nezákonná. Přesto bývají SARM zneužívány sportovci pro nárůst svalové hmoty a je tedy vhodné mít k dispozici metodu pro rychlý screening přípravků potenciálně obsahujících SARM. Pro analýzu za pomoci zdroje Sicrit byly vzorky tablet a tobolek rozpuštěny v methanolu. Dávkování probíhalo pomocí mikrostříkačky do GC/SPME modulu iontového zdroje Sicrit, který byl zahříván. Vnitřní část zdroje byla proplachována dusíkem, aby byl systém izolován od vnějšího prostředí. Iontový zdroj Sicrit byl připojen na hmotnostní spektrometr Orbitrap Exploris 120 pracující v pozitivním modu. Pro ověření výsledků byly vzorky analyzovány také metodou LC-MS/MS na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity II spojeném s hmotnostním spektrometrem Agilent 6470 typu trojitého kvadrupólu, který pracoval v režimu MRM. Ačkoliv v kvantitativním měřítku LCMS/MS předčilo ambientní hmotnostní spektrometrii, výsledky kvalitativní analýzy obou technik byly v dobré shodě, což naznačuje možné použití ambientních technik pro screening potravinových doplňků na přítomnost nelegálních látek s anabolickým účinkem. V rámci práce byl také sestaven ambientní iontový zdroj na bázi desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku (DAPPI, desorption atmospheric pressure photoionization) a jeho funkce byla ověřena na pevném vzorku naftalenu a CBD, plynném vzorku alicinu a nakonec byl použit k analýze SARM.

¹Huang M.-Z., Yuan C.-H., Cheng S.-C., Cho Y.-T., Shiea J.: Annual Review of Analytical Chemistry 3, 43 (2010).

²Narayanan R., Coss C. C., Dalton J. T.: Molecular and Cellular Endocrinology 465, 134 (2018).

Tato práce vznikla spoluprací s doc. Martinem Kuchařem z Ústavu chemie přírodních látek, VŠCHT a byla finančně podpořena grantem Ministerstva vnitra České republiky (VJ01010043) a projektem GAČR č. 25-16715J

UHPLC-MS EXPLORATION OF ISOQUINOLINE ALKALOIDS: CAN HRMS USING Q-TOF EVEN COME CLOSE TO TRIPLE QUADRUPOLE SENSITIVITY?"

ŠTEFAN KOSTURKO^{1,2}, ANNA HOŠŤÁLKOVÁ¹, LUCIE NOVÁKOVÁ², MICHAL KOŘÍNEK³,
MARCELA ŠAFRATOVÁ¹

¹ Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 500 03, Hradec Králové, Czech Republic

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 500 03, Hradec Králové

³ Graduate Institute of Natural Products, College of Pharmacy, Kaohsiung Medical University, Shih-Chuan 1st Rd., 807 08, Kaohsiung, Taiwan

e-mail: kosturks@faf.cuni.cz

Several isoquinoline alkaloids have been identified as antiviral agents with broad-spectrum activity against animal and human coronaviruses. Indeed, some of these alkaloids have shown promising efficiency against the SARS-CoV-2 spike protein in pseudovirus neutralization assays. Based on this, our study is focused on evaluating the phytochemical profiles of isoquinoline alkaloids, emphasizing the diversity of their structures and quantitative variations within the genus *Berberis* L. (Berberidaceae).

We developed an analytical approach for the high-throughput comprehensive analysis of more than 29 isoquinoline alkaloids using UHPLC-ESI-HRMS with a Q-TOF analyzer. We evaluated multiple stationary phases during the method optimization process, including BEH C18, ACE Excel C18, CSH C18, Cortecs C18, BEH Shield RP18, BEH Phenyl, ACE C18-AR, Biphenyl, Diphenyl, CSH Fluro-Phenyl, CSH Phenyl-Hexyl, F5, 5PBr, and ACE C18-PFP using different mobile phase compositions. These included variations in organic components (ACN, MeOH) and water components such as 10 mM ammonium formate at pH 3, 4, 5, 9 and 10, along with concentrations of formic and acetic acid (0.02%, 0.1%, 0.5%) and ammonium hydroxide (0.02%, 0.1%, 0.5%).

The post-column infusion of ammonium hydroxide was optimized to maximize MS response of all alkaloids. Full scan, MS/MS, data-independent acquisition, and TOF-MRM experiments were optimized and used for calibration curve measurements in resolution ($\geq 20,000$ FWHM) and sensitivity ($\geq 10,000$ FWHM) acquisition modes. Calibration curves obtained from the QqQ with optimized SRM method using an ESI ion source was used as a reference for comparing the sensitivity of the HRMS dataset.

Finally, we optimized a solid-phase extraction procedure for sample preparation utilizing a mixed-mode polymeric sorbent with weak cation and reverse-phase properties. This purification method effectively removes undesirable acidic and neutral secondary metabolites, leading to improved performance of UHPLC-MS analysis. The new method was employed for targeted and non-targeted UHPLC-MS screening of various barberry species.

TOWARD ROBUST AND REPRODUCIBLE METABOLOMICS: IMPROVING POLAR METABOLITE ANALYSIS VIA LC-MS

ALENA LANGOVÁ¹, MICHAL HOLČAPEK¹, ROBERT JIRÁSKO¹

¹ Univerzita Pardubice, Studentská 95, Česká republika

e-mail: alena.langova@upce.cz

The reliable detection and quantification of polar and ionic metabolites remains a significant analytical challenge in the field of metabolomics, primarily due to their high polarity, low retention, and susceptibility to ion suppression. To overcome these limitations, we developed and validated a novel hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry methodology utilising a bioinert ultra-high pressure liquid chromatography system and polarity optimised mobile phases.

The study systematically evaluated the effects of mobile phase composition (ammonium acetate vs. ammonium formate), pH, and gradient slope on chromatographic performance and mass spectrometric signal. A key innovation was a dual polarity HILIC-MS workflow, which combines optimized conditions for both positive and negative electrospray ionization. This approach allowed for the selective enhancement of various metabolite classes including amino acids, nucleotides, sugar phosphates, and carboxylic acids.

The bioinert liquid chromatography (LC) configuration significantly reduced peak tailing and signal suppression, particularly for highly polar and ionic analytes¹. Comparative analysis with conventional LC setups demonstrated the critical effect of system configuration and column choice on sensitivity and peak shape.

Several sample preparation approaches were compared, revealing notable differences in signal quality and method reproducibility. Proper selection and optimization of these steps proved essential for achieving robust metabolomic performance.

Comprehensive method validation was performed to confirm linearity across dynamic concentration ranges, determine limits of detection and quantification, assess intra-day precision, and evaluate matrix effects from biological samples. Metabolite detection and identification was achieved using high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry, retention time alignment with reference standards, and tandem mass spectrometry fragmentation patterns.

This workflow establishes a robust and reproducible platform for untargeted metabolomics of polar compounds. Strategic harmonization of chromatographic conditions (pH, ionic strength) with the inherent polarity of ionization is essential to improve analytical performance and expand metabolome coverage. The method's successful application to complex mouse tissues (plasma, liver, and pancreas) confirms the effectiveness of this tailored approach for reliable metabolomic studies in diverse biological systems.

¹ Peterka O., Langová A., Jirásko R., Holčápek M. JCA 1740 (2025).

LIPID ALTERATIONS ACROSS SIX PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA-RELATED COHORTS USING RP-UHPLC/MS

ZUZANA LÁSKO¹, ONDŘEJ PETERKA¹, ROBERT JIRÁSKO¹, LENKA DUBSKÁ¹, ANNA TAYLOR¹,
BEATRICE MOHELNÍKOVÁ DUCHOŇOVÁ², MARTIN LOVEČEK², BOHUSLAV MELICHAR², PETR
KARÁSEK³, JAN TRNA³, ONDŘEJ URBAN⁴, MICHAL HOLČAPEK¹

¹ Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic

² Department of Oncology, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

³ Clinic of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

⁴ 2nd Department of Internal Medicine - Gastroenterology and Geriatrics, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

e-mail: zuzana.lasko@upce.cz

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is among the most aggressive tumors, characterized by the lowest five-year survival rate of all cancers (13% and only 3% for metastatic stage). This is primarily due to the frequent late diagnosis at advanced stage reflecting the failure of early detection strategies. Current diagnostic options, including magnetic resonance imaging, computer tomography, endoscopic ultrasound, and CA 19-9 are limited by low sensitivity for early-stage disease or impose a significant burden on the patient. Alterations in lipid profiles have been reported in various cancers, suggesting that the monitoring of their dysregulation can play a crucial role in the earlier diagnosis of PDAC.

The aim of our study was to apply RP-UHPLC/MS for lipidomic profiling of over 450 human plasma or serum samples, focusing on six groups: (a) healthy controls without cancer history, (b) patients after total pancreatectomy for non-malignant disorders, (c) high-risk individuals, (d) patients with precancerous lesions, (e) PDAC patients, and (f) long-term PDAC survivors (at least 5 years without recurrence).

For this purpose, a reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography method was developed, allowing detailed differentiation of lipid molecules based on polarity, fatty acyl chain length, and number of double bonds. This approach enhances the resolution of isomeric lipids, leading to a greater number of identified species and a more comprehensive characterization of the human lipidome. The chromatographic system was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, where lipid species were quantified using multiple reaction monitoring allowing for the quantification of over 640 lipid species across 30 lipid subclasses.

Statistical analysis and data visualization revealed significant lipidomic alterations in PDAC samples. The most downregulated lipid classes included sphingolipids with very long acyl chains, consistent with previously published data. OPLS-DA analysis demonstrated distinct clustering of PDAC samples and healthy controls, with long-term survivors clearly clustering within the PDAC cohort. These findings indicate that metabolic alternations in the lipidome persist even during long-term complete remission, suggesting that this method may not be suitable for monitoring PDAC treatment response or detection of recurrence. No lipidomic changes associated with PDAC were observed in high-risk individuals, whereas patients with precancerous lesions showed clear positivity. These results highlight the potential of lipidomic profiling for the early detection of PDAC and its possible application in cancer screening.

This work was supported by projects No. 101095860 (ERC) and OPJAK JA344644 (Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BUNĚČNĚ SPECIFICKÉ ROZLOŽENÍ FYTOHORMONŮ NAPŘÍČ ORGANELAMI

JAKUB LEMBERK¹, PAVEL HLADÍK¹, VLADIMÍR SKALICKÝ², RENÉ LENOBEL¹, IVAN PETŘÍK¹, ALEŠ PĚNČÍK¹, RADIM SIMERSKÝ¹, IVO CHAMRÁD¹, 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 mění 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 umožnily 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. Kurčení 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 Johannes Amos Comenius: TowArds Next GENeration Crops, reg. číslo CZ.02.01.01/00/22_008/0004581 a Interní grantové agentury Univerzity Palackého (projekt IGA_PrF_2025_013)

VÝVOJ METODY PRO STANOVENÍ CHLOROVANÝCH PARAFINŮ V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

EVA CZMORIK LUDVÍČKOVÁ¹, DENISA PAŘÍZKOVÁ¹, ANETA SÝKOROVÁ¹, JAKUB TOMÁŠKO¹,
VOJTĚCH HRBEK¹, JANA PULKRABOVÁ¹

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 160 00 Praha 6-Dejvice, Česká republika

e-mail: Eva.Czmorik.Ludvickova@vscht.cz

Chlorované parafíny jsou využívány v řadě průmyslových aplikací (jako změkčovadla, maziva a zpomalovače hoření, při výrobě barev, tmelů a lepidel aj.). Díky širokému použití může docházet různými způsoby k přenosu těchto látek a člověk může být exponován těmito látkami v mnoha různých směrech. Chlorované parafíny se obecně vyznačují teplotní a tlakovou odolností a značnou chemickou stabilitou¹. Vykazují nepříznivé účinky na lidský organismus (potenciální karcinogenita, hormonální aktivita). Jsou vysoce perzistentní a mají bioakumulační potenciál v životním prostředí². Chlorované parafíny představují analyticky náročnou skupinu perzistentních organických polutantů. Jejich stanovení v biologických matricích je limitováno nedostatečnou dostupností referenčních standardů, vysokou komplexitou směsí a interferencí lipidových složek¹.

Cílem projektu bylo vyvinout analytickou metodu pro stanovení chlorovaných parafinů s dlouhým řetězcem v biologických vzorcích (mateřské mléko a krevní sérum) pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (kapalinový chromatograf Vanquish Horizon ve spojení s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem Exploris 240). Metoda byla optimalizována tak, aby umožňovala současné stanovení chlorovaných parafinů s krátkým (SCCP), středně dlouhým (MCCP) a dlouhým (LCCP) řetězcem.

Vývoj metody zahrnoval výběr chromatografické kolony. Byly porovnávány zejména kolony Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) a Acquity UPLC BEH C18 (150 × 2,1 mm, 1,7 μm). Testovány byly různé mobilní fáze: A – voda:acetonitril (aditivum, v/v); B – isopropanol:acetonitril (aditivum, v/v). Jako aditivum byl testován: octan amonný, chlorid amonný, dichlormethan. Byla provedena optimalizace metody s cílem dosáhnout nižších mezí kvantifikace, než jaké uvádí literatura, a které jsou nedostačující pro biomonitoringové aplikace. Optimalizovány byly zejména podmínky hmotnostní spektrometrie – napětí na zdroji (4500; 5000; 5500 V), rozlišení (120 000, 60 000), teplota vaporizace (300; 400; 500; 550 °C), RF lens (80, 90, 100 %), seath gas a další parametry. Jako ionizační mód byl použit H-ESI v negativním módu. Metoda byla aplikována na soubor biologických vzorků v rámci pilotní biomonitoringové studie. Výsledky představují první data o přítomnosti LCCP v biologických vzorcích lidské populace v České republice.

¹ van Mourik L. M., Leonards P. E. G., Gaus C., de Boer J.: Chemosphere 136, 259 (2015).

² Chen C., Chen A., Li L., Peng W., Weber R., Liu J.: Environmental Science & Technology 55, 7335 (2021).

METABOLICKÉ (MOLEKULÁRNÍ) PROFILOVÁNÍ ZELENÝCH A PRAŽENÝCH KÁVOVÝCH ZRN S VYUŽITÍM LC-MS

RICHARD MASAR¹, JAN MACHÁŇ¹, LUKÁŠ NAJDEKR¹

¹ Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc, Česká Republika

e-mail: richard.masar01@upol.cz

Kávovník (*Coffea*) je důležitou ekonomickou rostlinou v zemích Afriky, Jižní a Střední Ameriky a jihovýchodní Asie. Nejoblíbenější odrůdou je *Coffea arabica* (kávovník arabský), která za období říjen 2024–duben 2025 představovala 63,9 % produkce. Zbylých 36,1 % připadlo na odrůdu *Coffea canephora* (kávovník statný), známou také jako robusta¹. Kávová zrna obsahují široké spektrum sloučenin, kde jsou zahrnuty organické kyseliny, aminokyseliny, sacharidy, antioxidanty, alkaloidy, vitamíny a fenolické sloučeniny². Metabolický profil a obsah bioaktivních látek se mění v kávových zrnech rovněž v závislosti na odrůdě kávy, zrání, procesu zpracování nebo způsobu pražení kávových zrn³.

V práci bylo cílem anotovat a následně identifikovat co největší počet metabolitů v kávových zrnech necíleným metabolickým přístupem. Pro vytvoření metabolických profilů 16 pražených, šesti zelených kávových zrn a jednoho espressa byla použita hydrofilní interakční chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HILIC-MS). Procesování dat („peak picking“, „alignment“ a anotace) bylo provedeno pomocí softwaru Compound Discoverer 3.3 (Thermo Fisher Scientific, USA). Korekce, transformace, statistická analýza a vizualizace dat byla provedena v programovacím jazyku Python s využitím PySPRESSO pipeline (<https://github.com/Najlaron/PySPRESSO>).

Necíleným metabolickým přístupem bylo získáno 1632 anotovaných sloučenin v pozitivním, respektive 1422 v negativním ionizačním módu. Nejvíce diskriminující sloučeniny mezi kávovými zrny byly určeny na základě „loadings“ z analýzy hlavních komponent, VIP skóre z diskriminační analýzy pomocí parciálních nejmenších čtverců a vulkánového grafu (limitní hodnoty byly použity: logaritmus změny ($\log_2 FC$) = 3, phodnota = 5×10^{-7}). Počet diskriminujících sloučenin činil 47 v pozitivním a 27 v negativním módu. Jednalo se především o aminokyseliny, sacharidy a organické kyseliny. Relativní koncentrace jednotlivých sloučenin byly vyneseny v houslových grafech.

Strategie necíleného metabolického profilování s využitím daných metod se ukázala být vhodným nástrojem k charakterizaci metabolomu kávových zrn a jejich vzájemného porovnání.

¹ <https://www.ico.org/>, staženo 30. 6. 2025.

² Murai T., Matsuda S.: *Molecules* 5, 2381 (2023).

³ Król K., Gantner M., Tatarak A., Hallmann E.: *European Food Research and Technology* 1, 33 (2020)

Financováno z JG_2024_026 a IGA LF 2025_006.

IDENTIFICATION OF PHOTOCHEMICALLY GENERATED VOLATILE SPECIES OF RUTHENIUM AND OSMIUM USING SELECTED ION FLOW TUBE MASS SPECTROMETRY

STANISLAV MUSIL ¹, IGNACIO MACHADO ², BEATRICE CAMPANELLA ³, KSENIYA DRYAHINA ⁴, PATRIK ŠPANĚL ⁴

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

² Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay; ³ National Research Council, Institute of Chemistry of Organometallic Compounds, via Giuseppe Moruzzi 13, 56124 Pisa, Italy; ⁴ J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 2155/3, 182 00, Prague 8, Czech Republic

e-mail: stanomusil@biomed.cas.cz

Photochemical vapor generation (PVG) is an alternative sample introduction technique for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Compared to conventional pneumatic nebulization of liquid samples, it improves analyte introduction efficiency and eliminates liquid matrix components¹. The analyte is converted into a volatile species during UV irradiation of the liquid photochemical medium containing the low-molecular-weight organic acid, such as HCOOH. PVG can be applied to a wide variety of elements, including hydride-forming elements, nonmetals, and many transition metals. To thoroughly understand the individual reaction pathways, it is crucial to identify the final volatile products. The majority of volatile species have been identified using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). However, despite the high PVG efficiencies^{2,3}, this approach has not been successful in identifying the volatile species of Ru and Os, which are presumably less stable metal carbonyls.

In this study, the identification of volatile species of Ru and Os was attempted using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). They were generated using a thin-film flow-through photoreactor from the photochemical media that contained either diluted or concentrated HCOOH, spiked with Co²⁺, and/or Cd²⁺ as mediators^{2,3}. The sampling of the gas phase exiting the photochemical generator was realized by a passivated needle that was inserted into the PTFE tube exiting the chilled gas-liquid separator. The SIFT-MS measurements were performed primarily using H₃O⁺ and NO⁺ as the reagent ions. Identification was based on the observation of ions with the characteristic isotopic patterns of Ru or Os during PVG of their analytical standards, as well as supposed gas-phase reactions with the individual reagent ions. The most abundant ions (100%) detected using H₃O⁺ and NO⁺ were [Ru(CO)₅+H]⁺ and [Ru(CO)₅]⁺, respectively, which is evidence that the volatile species is Ru(CO)₅. In addition to these, the fragment ions, i.e., [Ru(CO)₄+H]⁺ (49%) and [Ru(CO)₄]⁺ (86%), were detected using H₃O⁺ and NO⁺, respectively, as well as several hydrated fragment ions, likely due to the presence of water vapor in the gas phase exiting the PVG generator. Similar experiments with PVG of Os revealed the presence of both Os(CO)₅ and Os(CO)₄H₂ in the gas phase.

¹ Sturgeon R. E.: J. Anal. At. Spectrom. 32, 2319 (2017).

² Musil S., Vyhnánek J., Sturgeon R. E.: Anal. Chem. 93, 16543 (2021).

³ Yang Q., Chen H., Hu J., Huang K., Hou X.: Anal. Chem. 94, 593 (2022).

The work was supported by the Czech Science Foundation (Project 23-06530S) and the Czech Academy of Sciences (Institutional Research Plan RVO: 68081715).

PŘÍRODNÍ ROSTLINNÉ PEPTIDY S BIOLOGICKOU AKTIVITOU A MODERNÍ METODY JEJICH ANALÝZY

TEREZA PAVLÍČKOVÁ¹, IVO CHAMRÁD¹, IVAN PETŘÍK¹, RENÉ LENOBEL¹

¹ Laboratoř růstových regulátorů Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky AV ČR,
Šlechtitelů 27, 779 00 Olomouc, Česká republika

e-mail: pavlickova.t@email.cz

Rostlinné peptidové hormony představují skupinu signálních molekul, které regulují široké spektrum fyziologických procesů, jako je klíčení, růst, vývoj, reprodukce či reakce na stres a působení patogenů. Ačkoli byl jejich význam po dlouhou dobu přehlížen, v posledních letech se tato oblast dostává do popředí vědeckého zájmu. Jedním z dobře charakterizovaných zástupců rostlinných peptidových hormonů je PSK α , pentapeptid odvozený z větší prekurzorové bílkoviny, který obsahuje charakteristické sulfátované tyrosiny. PSK α ovlivňuje buněčný růst, udržuje rovnováhu při vývoji tkání a je zapojen do imunitních odpovědí rostliny. Tento peptid se také podílí na regulaci stresových reakcí, a to především při adaptaci na sucho a osmotický stres.

Práce se zaměřuje na optimalizaci podmínek hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS) pro analýzu peptidu PSK α . Pro tyto účely byl využit přístup Faktoriální design experimentu, který umožňuje systematicky testovat a vyhodnocovat více parametrů současně a tím zefektivnit proces optimalizace. Pro experimenty byl použit syntetický standard PSK α bez sulfátovaných tyrosinů. Sledováno bylo 13 parametrů s možným vlivem na analytickou odezvu, přičemž nejdříve byly identifikovány klíčové faktory ovlivňující intenzitu signálu pro jednu a dvakrát nabitě ionty. Ty následně byly optimalizovány. Optimalizace podmínek vedla k výraznému zlepšení citlivosti a stability měření.

COMPARATIVE METABOLITE PROFILING APPROACH REVEALS THE COMPLEXITY OF AUXIN METABOLISM ACROSS PLANT SPECIES

ALEŠ PĚNČÍK¹, PAVEL HLADÍK¹, ASTA ŽUKAUSKAITĖ², FEDERICA BRUNONI¹, MAREK ZATLOUKAL², ONDŘEJ NOVÁK¹

¹ Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany, The Czech Academy of Sciences & Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

² Department of Chemical Biology, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

e-mail: ales.pencik@upol.cz

Auxin plays a pivotal role in plant growth and development, with its metabolism tightly regulated to ensure precise spatial and temporal regulation of signaling. While the canonical pathways of auxin biosynthesis, transport, and degradation - particularly those involving indole-3-acetic acid (IAA) - are well established in *Arabidopsis*, emerging evidence points to a much greater complexity and evolutionary diversity in auxin metabolism.

To investigate this, we developed novel approach combining micro-scale extraction with ultra-sensitive liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS), enabling detailed profiling of auxin metabolites across diverse plant species. Applying this method to *Arabidopsis thaliana* and selected crop plants, we identified novel endogenous auxin metabolites and observed species-specific and tissue-specific variations in metabolite profiles. Notably, auxin metabolite levels were found to be strongly dependent on developmental stage, underscoring the dynamic regulation of IAA metabolism during seedling growth. Furthermore, an in-depth analysis of phenylacetic acid (PAA) metabolism revealed that IAA and PAA share a conserved core metabolic framework, indicating a broader and more integrated network of auxin regulation than previously appreciated. These findings enhance our understanding of auxin metabolic networks and underscore the intricate regulatory mechanisms that underpin plant hormonal balance.

The work was supported by the ERC Synergy project STARMORPH (No. 101166880) under the European Union's Horizon Europe research and innovation program.

VYUŽITÍ BIOMARKERŮ PRO PREDIKCI ÚSPĚŠNOSTI IVF KULTIVACE

ONDŘEJ PEŠ¹, JANA GREGOROVÁ¹, PAVEL ŠMAK¹, VOLODYMYR POROKH², DRAHOMÍRA KYJOVSKÁ³, ZUZANA HOLUBCOVÁ²

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

² Ústav histologie a embryologie, Lékařská Fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, Brno, Česká republika

³ Reprofit International, Klinika reprodukční medicíny, Brno, Česká republika

e-mail: opes@med.muni.cz

V rámci cyklu asistované reprodukce je nutné před embryotransferem vybrat embryo s co možná nejvyšším implantačním potenciálem. Pro posouzení vhodnosti embrya k přenosu se nejčastěji využívá hodnocení morfologie a genetické testování. Jedním z cílů výzkumu v tomto oboru proto je nalezení spolehlivých neinvazivních biomarkerů, které by mohly doplnit současně využívané metody hodnocení. V literatuře byla s využitím různých analytických metod identifikována řada potenciálních biomarkerů úspěšnosti kultivace. Různé studie využívaly různě velké soubory vzorků, měly různě definovaná kritéria pro úspěšnost či neúspěšnost. V rámci projektu byly analyzovány vzorky kultivačních médií po individuálních i skupinových kultivacích embryí s využitím cílené LC-MS/MS metody pro sledování vybraných biomarkerů z literatury. Dále byly vzorky kultivačních médií po skupinových kultivacích embryí studovány s využitím necílené LC-MS metody. Data byla zpracována s využitím metod vícerozměrné analýzy a zabývali jsme se možnostmi využití dat z necílených analýz pro predikci úspěšnosti kultivace.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU22-08-00543. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

UHPSFC-MS/MS AS A TOOL FOR METABOLISM STUDY OF VITAMIN D

VERONIKA PILAŘOVÁ¹, JANA FIŠEROVÁ¹, KATEŘINA PLACHKÁ¹, VERONIKA DREXEL², DANIEL ELLEDER³, BERND KASPERS², LUCIE NOVÁKOVÁ¹

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

²Department for Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität München, 82152 Planegg, Germany

³Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, 14200 Prague, Czechia

e-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

Vitamin D₃ plays an essential role in calcium homeostasis and skeletal health. Its deficiency, associated with various diseases, is prevalent worldwide. Vitamin D₃ is determined as a concentration of 25-hydroxyvitamin D₃, assumed as a vitamin D biomarker due to its long half-life in plasma, stability, and relatively high abundance in the body. 25-hydroxyvitamin D₃ is converted from vitamin D₃ in the liver by hydroxylase enzymes, typically CYP2R1 and CYP27A1. The second activation step follows in the kidney, where the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, is created by the CYP27B1. However, there is still limited knowledge about the metabolic pathways in humans and animal species^{1,2}.

Hence, in our study, we focused on the optimization of a high-throughput sample preparation and ultra-high performance supercritical fluid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPSFC-MS/MS) for fast and selective determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃, which would enable the confirmation of enzymatic activity in vitamin D₃ activation steps.

During the method development, eight different stationary phases were tested using gradient elution from 10 to 40% of organic modifier, methanol (MeOH), MeOH with 10 mmol/L formic acid, MeOH with 10 mmol/L NH₃, and MeOH with 2% H₂O, in CO₂. According to the number of eluted compounds, peak shape symmetry, and resolution, high-strength silica C18 and 1-aminoanthracene stationary phases and MeOH as an organic modifier were used for fine-tuning. These experiments included the optimization of column temperature and pressure on the back pressure regulator. Three ionization sources, i.e., electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization, and UniSpray, were tuned via the design of experiments to find optimal conditions of ionization source parameters. The make-up solvent composition was examined to increase the method sensitivity. All ionization sources provided comparable limits of quantification (LOQ), 5 ng/mL, for both compounds. Supported liquid extraction was optimized for the selective extraction of target vitamin D metabolites from culture cell medium. Matrix effects, recovery, and LOQ were determined for UHPSFC-MS/MS using three ionization sources. The optimized method will be used for the analysis of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to prove the enzymatic activity of CYP27B1 and elucidate the metabolism of vitamin D.

¹Hurst E. A., Homer N. Z., Mellanby R. J.: *Metabolites* 10, 371 (2020).

²Janoušek J. a spoluautorů: *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 59, 517 (2022).

The study was supported by the project New Technologies for Translational Research in Pharmaceutical Sciences /NETPHARM, project ID CZ.02.01.01/00/22_008/0004607, is co-funded by the European Union.

POROVNÁNÍ FRAGMENTAČNÍCH SPEKTER VYBRANÝCH ANALYTŮ POMOCÍ UHPLC-HRMS/MS S RŮZNÝMI HMOTNOSTNÍMI ANALYZÁTORY

ONDŘEJ POSPÍŠIL¹, KATEŘINA ŠEBELOVÁ¹, JANA HAJŠLOVÁ¹

¹VŠCHT v Praze, Ústav analýzy potravin a výživy, Česká republika

e-mail: ondrej1.pospisil@vscht.cz

Hmotnostní spektrometrie (MS) představuje díky vysoké citlivosti, rozlišovací schopnosti a schopnosti charakterizovat širokou škálu analytů velmi účinný analytický nástroj pro necílené analytické metody, jako je například metabolomika. Pro účely necílené metabolomické analýzy, zaměřené na identifikaci malých molekul v biologických systémech, je výběr vhodného HRMS/MS systému zcela klíčový. Pro správné určení struktury molekul má zásadní význam kvalita naměřených fragmentačních spekter, jejichž shoda s referenčními spektry uvedených databázích (např. HMDB, MassBank, mzCloud) umožní spolehlivé potvrzení struktury^{1,2}.

Cílem této práce bylo (i) zhodnotit rozdíly fragmentačních (MS^2) spekter vybraných molekul, které byly v přechodných studiích identifikovány jako markery jednotlivých druhů hmyzu či způsobů jejich usmrcení, při použití dvou rozdílných HRMS/MS systémů za srovnatelných experimentálních podmínek (stejně složení mobilní fáze a gradient, podobná kolizní energie), a (ii) porovnání identifikace těchto molekul pomocí MS-DIAL 4.9.2 (CompMS, Japonsko) a Compound Discoverer 3.3 (Thermo Fisher Scientific, USA). První HRMS/MS systém (TripleTOF 6600; Sciex, USA) disponoval hybridním hmotnostním analyzátelem typu kvadrupól-analyzátor doby letu (Q-TOF), zatímco druhý (Exploris 240; Thermo Fisher Scientific, USA) analyzátelem typu kvadrupól-orbitrap (Q-orbitrap).

Vzájemné porovnání fragmentačních (MS^2) spekter pak ukázalo, že naměřená spektra se lišila jak v zastoupení, tak v intenzitě fragmentačních iontů. V některých případech byla u přístroje Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific, USA) zaznamenána vyšší intenzita prekurzorových iontů. Naopak některé markery, které byly dříve identifikované pomocí systému TripleTOF 6600 (Sciex, USA), nebyly na přístroji Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific, USA) detekovány vůbec.

¹ Hajnaji K., Iqbal M. A.: *Proteome Science* 23, 5 (2025).

² Dlugas H., Zhang X., Kim S.: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 263, 105417 (2025).

Tato práce byla podpořena Národní agenturou pro zemědělský výzkum (projekt č. QK23020101), výzkumným projektem METROFOOD-CZ (grant MŠMT č. LM2023064) a speciálním univerzitním projektem A1_FPBT_2024_006.

VYUŽITÍ UMĚLÝCH NEURONOVÝCH SÍTÍ PRO POROVNÁNÍ ESI IONTOVÝCH ZDROJŮ U SFC-MS SYSTÉMŮ S JEDNODUCHÝM A TROJITÝM KVADRUPÓLEM

KATEŘINA PRAŽÁKOVÁ ¹, KATEŘINA PLACHKÁ ¹, VERONIKA PILAŘOVÁ ¹, TAŽÁNA GAZÁRKOVÁ ¹,
JEAN-CHRISTOPHE GARRIGUES ², LUCIE NOVÁKOVÁ ¹

¹ Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Hradec Králové, Česká republika

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

e-mail: prazakokat@faf.cuni.cz

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) se v posledních desetiletích stále více uplatňuje jako environmentálně šetrnější alternativa tradičních metod pro separaci chirálních i achirálních látek. Využití nalézá v oblasti omických disciplín, farmaceutické analýzy, analýzy biologického materiálu, vzorků životního prostředí či potravin. Vzhledem k rostoucím požadavkům na citlivost a selektivitu analýz se dominantní detekční technikou stává hmotnostní spektrometrie (MS), přičemž nejvíce využívaná je ionizace pomocí elektrospreje (ESI). Konstrukce ESI zdroje prošla v průběhu let mnoha modifikacemi. V současné době jsou na trhu dostupné různé geometrie ESI, které se liší i v rámci jednotlivých přístrojů od stejného výrobce. I malé rozdíly v konstrukci mohou mít zásadní vliv na pozorovanou odezvu. Vzhledem k přítomnosti CO₂ v mobilní fázi je pro spojení SFC-MS potřeba specifické rozhraní, které většinou zahrnuje čerpadlo dodávající přídatnou kapalinu. Tato kapalina zabraňuje nežádoucímu vysrážení analytů po odpaření CO₂ a významně ovlivňuje účinnost ionizace.

MS odezvu v SFC-MS ovlivňuje mnoho parametrů, např. fyzikálně-chemické vlastnosti analytu, objem rozpouštědla vstupujícího do iontového zdroje, složení mobilní fáze a přídatné kapaliny a typ, geometrie a nastavení iontového zdroje. Cílem této práce bylo s využitím umělých neuronových sítí (ANN) systematicky zhodnotit účinnost ionizace v závislosti na zmíněných parametrech u dvou SFC-ESI-MS platform. Porovnávány byly ESI iontové zdroje u systémů s jednoduchým a trojitým kvadrupólem od stejného výrobce. Za generických podmínek bylo analyzováno více než 100 analytů. Využita byla gradientová eluce s mobilní fází skládající se z CO₂ a organického modifikátoru, kterým byl methanol nebo 10 mM roztok amoniaku v methanolu. Testováno bylo 24 různých složení přídatné kapaliny zahrnujících alkoholy bez aditiv a methanol s přídatkem těkavých aditiv v různých koncentracích. Pro charakterizaci analytů z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností bylo vypočteno 226 molekulových deskriptorů. Tyto deskriptory byly použity při vyhodnocení pomocí ANN, jehož cílem bylo rozklíčovat závislost mezi MS odezvou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu za různých definovaných experimentálních podmínek.

Bylo prokázáno, že existuje rozdíl mezi účinností ionizace u dvou ESI iontových zdrojů v SFC-MS systémech s jednoduchým a trojitým kvadrupólem. Pozorovány byly výrazné rozdíly v intenzitě ionizace v závislosti na použitém MS systému a typu organického modifikátoru. Vyhodnocení s využitím ANN umožnilo identifikovat nejvýznamnější molekulové deskriptory ovlivňující MS odezvu při různém složení přídatné kapaliny. Dosažené výsledky rozšiřují znalosti fundamentálních aspektů ESI ionizace v SFC-MS. Do budoucna poskytují základ pro tvorbu predikčních modelů, které by usnadnily a urychlily proces vývoje nových SFC-ESI-MS metod.

THERMAL TRANSFORMATION PATHWAYS OF HOP ESSENTIAL OILS IN MODEL SYSTEMS

JAROSLAV PŘIKRYL^{1,2}, TOMÁŠ VRZAL¹

¹ Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 511/15, 120 00 Prague, Czech Republic

² Charles University, Faculty of Science, Departement of Analytical chemistry, Albertov 6

e-mail: prikryl@beerresearch.cz

This work explores the impact of thermal stress on the chemical composition of 27 hop essential oils, using simplified aqueous model systems. The samples were subjected to a controlled heating process (90 minutes in a water bath), followed by analysis via headspace gas chromatography–mass spectrometry (HS-GC–MS). The majority of esters and ketones displayed considerable thermal stability, with 2-dodecanone being a notable exception. Distinct compositional shifts were detected in key compounds such as α -pinene, β -pinene, myrcene, β -caryophyllene oxide, farnesol, and irone. The study identified three transformation mechanisms: (i) generation of a new product from a single precursor, (ii) formation of the same product from structurally similar volatiles, and (iii) convergence of several different compounds into a common product. Remarkably, α -terpineol emerged as a transformation product in samples where it was initially absent. Newly formed compounds—currently assigned by retention time—are scheduled for structural elucidation in the next stage of research. These insights improve the current understanding of hop volatile reactivity under brewing-relevant thermal conditions.

LIPIDOMICKÁ ANALÝZA PACIENTŮ PO BARIATRICKÉ OPERACI: ZMĚNY KREVNÍHO LIPIDOVÉHO PROFILU V KONTEXTU METABOLICKÝCH ADAPTACÍ

JAKUB ROZHON¹, MARTINA KADLÁČKOVÁ¹, ALEŠ KVASNIČKA³, MARKÉTA CAMFRLOVÁ¹,
ROMAN DOHNAL², DAVID FRIEDECKÝ¹, DAVID KARÁSEK²

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

²III. Interní klinika nefrologická, revmatologická a endokrinologická, Fakultní nemocnice Olomouc, ČR

³Ústav lékařské biochemie – sekce pro metabolomiku a lipidomiku, Fakultní nemocnice Oslo, Norsko

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

Úvod: Obezita je závažné civilizační onemocnění asociované s řadou metabolických dysfunkcí včetně inzulinové rezistence, kardiovaskulárních onemocnění a dyslipidémie. Bariatrická chirurgie představuje efektivní nástroj v léčbě obezity, vedoucí nejen ke snížení tělesné hmotnosti, ale i k úpravě hormonálního a metabolického profilu pacienta. Cílem této studie bylo detailně analyzovat změny lipidového profilu krevního séra pacientů po bariatrickém zákroku pomocí cílené lipidomické analýzy.

Materiál a metody: Studie zahrnovala 410 vzorků krevního séra získaných od 81 pacientů před a po bariatrickém zákroku. Těchto 410 vzorků bylo chronologicky rozděleno celkem do šesti skupin: vzorky odebrané před operací (PreOP), 0-2 měsíce po operaci (PostOP_A), 2-5 měsíců po operaci (PostOP_B), 5-10 měsíců po operaci (PostOP_D), 10-15 měsíců po operaci (PostOP_E) a 15 a více měsíců po operaci (PostOP_F). Cílená lipidomická analýza byla provedena pomocí spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reverzní fázi s tandemovou hmotnostní spektrometrií (RPLC-MS/MS; Sciex ExionLC™ a QTrap™ 6500+). Separace více než 500 lipidů z 20 různých lipidových tříd proběhla na koloně BEH C8 (2.1 mm, 100 mm, 1.7 μm, Waters). Lipidomická data byla zpracována pomocí softwaru SciexOS™ a byla podrobena univariantní i multivariantní statistické analýze, včetně korelace s klinickými parametry.

Výsledky: Byly zaznamenány signifikantní změny koncentrací většiny analyzovaných lipidových tříd po bariatrické operaci. Změny se týkaly zejména ceramidů (Cer), sfingomyelinů (SM), fosfatidylethanolaminů (PE), fosfatidylcholinů (PC), fosfatidylinositolů (PI), plasmalogenů typu PEO a PCO. Multivariantní analýza odhalila odlišnosti v lipidovém profilu mezi skupinami před a po zákroku, přičemž u několika lipidových molekul byl prokázán potenciální diagnostický a prediktivní význam. Korelační analýza dále ukázala vztah mezi omega-6 mastnými kyselinami a parametry inzulinové rezistence.

Závěr: Cílená lipidomická analýza odhalila hluboké metabolické změny v lipidovém profilu pacientů po bariatrickém zákroku, a podpořila tak význam lipidů jako molekul s diagnostickým významem v odpovědi organismu na chirurgickou léčbu obezity. Výsledky této práce mohou přispět k lepšímu pochopení patobiochemických mechanismů souvisejících s obezitou a poskytují důležitý základ pro budoucí klinické využití lipidomiky v personalizované medicíně.

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

ZPŮSOBY IDENTIFIKACE PYRROLIZIDINOVÝCH ALKALOIDŮ A JEJICH METABOLITŮ

ONDŘEJ RUBÁŠ¹, ONDŘEJ BRABENEC¹, ZBYNĚK DŽUMAN¹, ALESSANDRO VOLKOV¹,
JANA HAJŠLOVÁ¹

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

e-mail: rubaso@vscht.cz

Pyrrolizidinové alkaloidy (PA) jsou sekundární metabolity vyskytující se v rostlinách čeledí *Boraginaceae*, *Asteraceae* a *Fabaceae*¹. Molekuly PA obsahují charakteristickou chemickou strukturu aminoalkohol necinovou bázi esterifikovanou různými necinovými kyselinami². Vzhledem k jejich hepatotoxickým, genotoxickým a potenciálně karcinogenním účinkům byly pro 35 PA stanoveny maximální limity v některých potravinových komoditách Nařízením Evropské komise 2023/915³. K průniku do potravního řetězce může dojít buď přímo při kontaminaci částmi toxických rostlin (plevelů), nebo nepřímo, např. pylem, případně kontaminovanými krmivy.

V současné době je známo přes 600 PA, nicméně jen pro omezené množství z nich jsou komerčně dostupné analytické standardy¹. V rámci této studie byla pozornost zaměřena na PA a jejich případné metabolity, pro které nejsou k dispozici standardy, analyzovány byly vybrané kontaminované matrice, například med či siláže. Při detekci „neznámých“ PA se vycházelo z podobnosti fragmentačních spekter látek s podobnou chemickou strukturou s využitím cíleného screeningu charakteristických iontů pomocí techniky ultraúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (UHPLC-HRMS/MS). Potvrzení struktury detekovaného PA je ilustrováno na příkladu sloučeniny s identickým fragmentačním spektrem jako echimidin, která byla dodatečně identifikována jako heliosupin poté, co se podařilo získat jeho standard. Dalším přístupem k identifikaci byla aplikace molekulového networkingu, který rovněž využívá principu podobnosti fragmentačních spekter k identifikaci dalších pyrrolizidinových alkaloidů, případně jejich metabolitů. Tento přístup se ukazuje jako perspektivní nástroj pro rozšiřování znalostí o pyrrolizidinových alkaloidech v různých matricích.

¹ Tamariz J., Burgueño-Tapia E., Vázquez M. A., Delgado F.: *Alkaloids Chem. Biol.*, 80, 1 (2018). doi: 10.1016/bs.alkal.2018.03.001

² Casado N., Morante-Zarero S., Sierra I.: *Trends Food Sci. Technol.*, 120, 123 (2022). doi: 10.1016/j.tifs.2022.01.007

³ Nařízení Komise (EU) 2023/915 ze dne 25. dubna 2023 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách a o zrušení nařízení (ES) č. 1881/2006

Práce používá [data/nástroje/slужby/zařízení], které poskytuje výzkumná infrastruktura METROFOOD-CZ (<https://metrofood.cz>) podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. LM2023064).

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A1_FPBT_2025_004.

CHARACTERIZATION OF NEW AMBER SPECIES USING A MULTI-INSTRUMENTAL APPROACH

JAKUB SLAČÁLEK¹, LUKÁŠ KUČERA¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University,
17. listopadu 12, 779 00 Olomouc, Czech Republic

e-mail: jakub.slacalek@upol.cz

To clarify the chemical variability and origins of the various types of amber, advanced analytical techniques are necessary. Spectroscopic and chromatographic methods facilitate precise molecular characterization that transcends broad macroscopic observations and geographic assumptions. The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), particularly in its Attenuated Total Reflectance (ATR) form, Raman spectroscopy, and pyrolysis-GC/MS have become standard tools. Historically, FTIR was the pioneering rapid technique capable of “fingerprinting” amber. For example, Baltic (succinite) amber is characterized by a distinctive absorption band related to succinic acid¹. Importantly, ATR-FTIR yields high-quality spectra with minimal sample preparation, effectively differentiating amber from copal (immature resin) and distinguishing Baltic from non-Baltic sources. Raman spectroscopy similarly offers a non-destructive “molecular fingerprint” of amber, typically revealing pronounced exomethylene (C=C) and methylene (CH₂) vibrational bands around ~1645–1650 and ~1450 cm⁻¹. Pyrolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry (py-GC/MS) represents a powerful approach for the molecular-level characterization of fossil resins. In this study, amber samples were analyzed from six distinct localities: the Dominican Republic, the Baltic region (Sambia Peninsula), Myanmar (Burmite), Hungary (Ajkaite and Iharkút), and Romania (Teleajen region, Telegolite), to investigate their botanical origin, geologic age, and diagenetic maturity. Each sample (approx. 0.2 mg) was pyrolyzed at 550 °C using a multi-shot EGA/PY-3030D system and analysed by a chromatographic system Agilent 8890 coupled to a mass detector Agilent 5977B. Compound identification was based on retention times and NIST20 library matches, supplemented by reference spectra from published amber studies. The results revealed distinct molecular fingerprints among amber types. Baltic amber showed abundant succinic acid and abietane-type diterpenes, consistent with previous studies^{2,3}. In contrast, Burmite and the Hungarian samples yielded unique profiles dominated by sesquiterpenoids and tricyclic hydrocarbons, suggesting different botanical precursors and advanced thermal maturity⁴.

These findings highlight the capability of Py-GC/MS to discriminate fossil resins based on geochemical and chemotaxonomic markers. While FTIR and Raman spectroscopy were used to support preliminary classification^{1,5}, the py-GC/MS data provided the most specific and conclusive evidence for resin provenance and diagenetic history.

¹Guiliano M., Asia L., Onoratini G., Mille G.: Spectrochim. Acta A **67**, 1407 (2007).

²Colombini M. P., Ribechini E., Rocchi M., Sella P.: Herit. Sci. **1**, 1 (2013).

³Park J. et al.: Spectrochim. Acta A **165**, 114 (2016).

⁴Sonibare O. O. et al.: Aust. J. Earth Sci. **61**, 979 (2014).

⁵Shashoua Y., Berthelsen M.-B. L. D., Nielsen O. F.: J. Raman Spectrosc. **37**, 1221 (2006).

The research was financially supported by the Grant Agency of the Czech Republic [23-07284K].

STANOVENÍ ANTIEPILEPTIK V ALTERNATIVNÍCH MATRICÍCH

PAVEL ŠMAK¹, VIKTÓRIA ĎURČOVÁ², MARTA PELCOVÁ², MARTINA OSIČKOVÁ², JAN JUŘICA³

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

² Ústav biochemie, Přírodovědecká Fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, Brno, Česká republika

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

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

Epilepsie patří mezi nejčastější chronická neurologická onemocnění. Standardní léčbou je systémová terapie antiepileptiky. Jelikož léčba je profylaktická a epileptické záchvaty se vyskytují v nepravidelných intervalech, může být obtížné vhodně nastavit terapeutický režim. Kromě výběru vhodného antiepileptika je nezbytné pro jednotlivé pacienty stanovit individuálně účinnou dávku jednoho či více antiepileptik tak, aby bylo dosaženo optimální kontroly onemocnění při minimalizaci nežádoucích účinků léčby. Jedním z nástrojů, které jsou za tímto účelem využívány v rámci pravidelných kontrol u neurologa, je terapeutické monitorování léčiv (TDM). Standardem je stanovení plazmatické koncentrace léčiv.¹ Celková koncentrace ale nemusí – zejména u léčiv s vysokou vazbou na plazmatické proteiny – nejlépe korelovat s klinickým efektem. Lze se tak setkat i se stanovením volné (farmakologicky aktivní) frakce léčiva.²

Jedním z trendů je snaha o co nejmenší invazivitu vyšetření. Za tímto účelem lze využít stanovení antiepileptik z alternativních matric, například suché kapky krve (DBS) nebo slin. U některých antiepileptik je v případě stanovení ze slin výhodou, že koncentrace léčiva odráží jeho volnou frakci.³

Byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení vybraných antiepileptik ze slin, suché kapky krve (DBS) a suché kapky slin (DSS). Na kohortě pacientů byla studována korelace mezi hladinami těchto antiepileptik stanovenými s využitím alternativních matric a plazmatickými koncentracemi stanovenými v nemocniční laboratoři. Tyto výsledky budou prezentovány v kontextu současného stavu literatury.

¹Patsalos PN, Spencer EP, Berry DJ. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsy: A 2018 Update. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2018;40(5):526. doi:10.1097/FTD.0000000000000546

²Patrick M, Parmiter S, Mahmoud SH. Feasibility of Using Oral Fluid for Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2021;46(2):205-223. doi:10.1007/s13318-020-00661-1

³Patsalos PN, Berry DJ. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs by Use of Saliva. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2013;35(1):4. doi:10.1097/FTD.0b013e31827c11e7

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU23-08-00229. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

STRATEGIES FOR CHARGED PROTEINS DESORPTION FROM LIPID MEMBRANE IN VACUO

ANATOLII SPESYVYI ^{1,2}, MAREK CEBECAUER ¹, JÁN ŽABKA ¹, AGNIESZKA OLŽYŇSKA ¹, MICHAELA
MALEČKOVÁ ¹, MIROSLAV POLÁŠEK ¹, ALES CHARVAT ², BERND ABEL ^{1,2}

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

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

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

With the recent advances in mass spectrometry (MS), especially the introduction of the charged detection mass spectrometry (CD-MS) capable of analyzing m/z , charge, and mass of a single ion, there is an increasing interest in analyses of biological samples with the concentrations as small as a single cell or even a single bio-particle (exosome, lipoprotein, agglomerate, etc). The specific demand of the bio-particle analyses is governed by their role in intracellular transport and communication¹, where on-surface or embedded proteins play the main role. Currently, MS detection of these proteins is provided by separated and digested bulk material, which usually leads to difficulties in clear association between detected proteins and parent particle². We have recently shown that lipid nanovesicles with sizes 100-400 nm can be charged in nano-electrospray and transferred in a vacuum for subsequent characterization and manipulation in electrodynamic fields using the SELINA apparatus³. The logical next step is to directly analyze their composition by means of MS. In the presented poster we will summarize different possible methods for protein desorption from lipid membranes, particularly approaches involving laser- and surface collision-induced desorption. The applicability of the existing techniques already published by other groups⁴ will be presented and discussed together with the approaches we plan to introduce and test in our experimental setup.

¹Meldolesi J.: Curr Biol 28, R435 (2018).

²Askeland A., Borup A., Ostergaard O., Olsen J. V., Lund S. M., Christiansen G., Kristensen S. R., Heegaard N. H. H., Pedersen S.: Biomedicines 8, (2020).

³Spesyvyi A., Cebecauer M., Žabka J., Olžyňska A., Malečková M., Johanovská Z., Polášek M., Charvat A., Abel B.: Anal Chem 97, 9131 (2025).

⁴Hellwig N., Martin J., Morgner N.: Biochem Soc T 50, 1057 (2022).

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

CROSS-LABORATORY VALIDATION OF GLYCOSPHINGOLIPIDS PROFILING IN PDAC USING HIGH-RESOLUTION ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY

VERONIKA ŠUBRTOVÁ ¹, HUONG GIANG VO ², ROBERT JIRÁSKO ¹, ONDŘEJ PETREKA ^{1,3},
MILAN VOŠMIK ⁴, LAURA BINDILA ², MICHAL HOLČAPEK ¹

¹ University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry,
Pardubice, Czech Republic;

² University Medical Center, Institute of Physiological Chemistry, Clinical Lipidomics Unit,
Mainz, Germany;

³ Lipidica, a.s., Pardubice, Czech Republic;

⁴ Charles University Prague, Charles University Faculty of Medicine in Hradec Kralove,
Hradec Králové, Czech Republic

e-mail: veronika.subrtova@upce.cz

Glycosphingolipids (GSLs) are membrane-bound molecules involved in cell signaling, immune responses, and host–pathogen interactions. Their structural alterations are linked to various diseases, such as lysosomal disorders, neurodegeneration, and cancer. Accurate structural characterization and quantification of GSLs are essential for understanding their biological functions, but their amphiphilic nature and low abundance in complex biological matrices pose comprehensive analysis technically demanding. Mass spectrometry has significantly advanced GSL analysis by improving sensitivity and structural elucidation, but untargeted lipidomics often fails to detect low-abundance species due to insufficient enrichment and complex sample preparation. Recent developments, including ion mobility spectrometry (IMS-MS) and multidimensional techniques like LC-TIMS-PASEF, have shown promise in resolving structural isomers and improving throughput. However, GSL profiling still requires optimized extraction protocols and high-resolution methods to achieve comprehensive coverage, particularly in clinical samples. This approach, developed by Huong Giang Vo *et al.*¹, has been applied in clinical studies of Parkinson's disease.

The aim of this work was to apply this workflow to analyze glycosphingolipids in serum samples from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and to perform a cross-laboratory comparison between two research groups. Initial sample preparation and measurements were conducted in the laboratory of Dr. Laura Bindila (Germany) using reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) coupled with high-resolution trapped ion mobility mass spectrometry (timsTOF *Pro*, Bruker) in negative ion mode. Identical extracts were subsequently analyzed in the laboratory of Prof. Michal Holčápek (Czech Republic) using a newer TIMS instrument (timsTOF *Ultra*, Bruker). A total of 100 serum samples were examined, including 50 PDAC cases and 50 controls (25 females and 25 males in each group). Data processing was performed using Bruker software tools (DataAnalysis and MetaboScape), and statistical evaluation included PCA, OPLS-DA, S-plots, VIP scoring, and box plot visualizations to identify significant GSL alterations associated with PDAC.

¹ Vo H. G., Gonzalez-Escamilla G., Mirzac D., Rotaru L., Herz D., Groppa S., and Bindila L. *Nat Commun* 16, 4567 (2025).

This work was supported by the ERC Advanced grant No. 101095860 sponsored by the European Research Council.

VYUŽITÍ NADES A PASKALIZACE PRO ŠETRNOU EXTRAKCI VANILINU: VÝVOJ VANILKOVÉ PASTY A JEJÍ LC-MS/MS ANALÝZA

E. KOVÁŘÍKOVÁ ¹, M. HOUŠKA ¹, J. STROHALM ¹, M. ŠULC ¹

¹Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu (CARC), odd. potravinářství, Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 - Hostivař

e-mail: miloslav.sulc@carc.cz

V rámci vývoje inovativního potravinářského produktu – vanilkové pasty – byla testována série extrakčních směsí na bázi tzv. natural deep eutectic solvents (NADES), zejména s využitím polyolů (xylitol, maltitol) a glycerolu v kombinaci s paskalizačním (vysokotlakým) ošetřením. Cílem bylo připravit pastu bez obsahu etanolu a sacharózy, vhodnou pro diabetické aplikace a současně stabilní při skladování. Klíčovým parametrem bylo nejen senzorické hodnocení a mikrobiální stabilita produktu (měřená aktivitou vody – aw), ale především efektivita extrakce vanilinu (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehydu) jako hlavní aromatické složky a jeho prekursoru glukovanilinu (vanillin-4-O-β-D-glucosid). Obsah vanilinu a glukovanilinu byl stanoven pomocí LC-MS/MS na přístroji Agilent 6460 s trojitým kvadrupólem. Binární mobilní fáze 0.25% kyseliny mravenčí v acetonitrilu (A) a 0.25% kyseliny mravenčí ve vodě (B). Nástřikový objem 1 µL, teplota kolony 30 °C, kolona Agilent Poroshell EC-C18 column 3x150 mm (2.7µm) s guard column (3x5 mm), průtok mobilní fáze 0.5 mL/min a gradientová eluce, run time 30 min. Poster přináší výsledky obsahu vanilinu a glukovanilinu ve vzorcích připravených různými NADES formulacemi (např. poměry 1:4:1 xylitol+maltitol:glycerol:voda) a po aplikaci vysokého hydrostatického tlaku (400 MPa, 10 min). Nejvyšší extrakční účinnost byla zaznamenána u vzorku maltitolu, xylitolu, glycerolu a vody, přičemž tlakové ošetření nevedlo k významnému zvýšení extrahovatelnosti vanilinu. V závislosti na produktu a výchozím materiálu obsah vanilinu byl 1,27-18,25 mg/g. Získané výsledky ukazují, že NADES směsi na bázi potravinářských polyolů představují šetrnou, ekologicky příznivou a efektivní alternativu klasických rozpouštědel. Metoda LC-MS/MS se ukázala jako citlivý nástroj pro optimalizaci receptur a hodnocení jejich aromatického profilu. Výsledná technologie má potenciál pro komerční využití v potravinářství jako prémiová alternativa tradičních vanilkových extraktů.

Studie byla financována v rámci projektu NAZV QL24010019.

THERMAL CONVERSION OF WASTE FLAT-PANEL DISPLAY PLASTICS AND POLYSTYRENE OVER ZEOLITE CATALYSTS IN A TANDEM MICROREACTOR COUPLED WITH GC–MS

LUCIE ORAVOVÁ ¹, ANDREA VERNEROVÁ ¹, JAN SNOW ¹, IVANA BARCHÁNKOVÁ ¹, PAVEL KURÁŇ ¹

¹ Department of Environmental Chemistry and Technology, Faculty of Environment, Jan Evangelista Purkyně University in Ústí nad Labem, Pasteurova 3632/15, 400 96, Ústí nad Labem, Czech Republic

e-mail: andrea.vernerova@ujep.cz

Flat-panel display plastics, or casings in general, represent a significant portion of electrical and electronic waste. The importance of this waste is increasing worldwide and its recycling poses a number of challenges due to the potential content of toxic additives and metals that can be introduced into products where their content is unacceptable ¹.

Pyrolysis and the use of the resulting hydrocarbons in petrochemical industry offers sustainable resolution. In most cases, however, it is necessary to remove unwanted heteroatoms and substances such as styrene, which interfere with the process of applications in a number of ways².

In this study, zeolite catalysts HZSM-5, H β , Na-Y and HY were evaluated in a tandem microreactor setup. The setup included an ex-situ catalyst bed and was directly coupled with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) for product analysis. Micro-pyrolysis of flat-panel display plastic waste revealed the formation of nitrogen- and oxygen-containing compounds, along with a dominant presence of styrene.

Catalytic treatment significantly reduced these undesired compounds. For catalysts HZSM-5, H β and HY, an increased formation of the BTEX fraction was observed (H β enhanced benzene formation, while HY favored ethylbenzene). Additionally, an increase in polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was noted. These results are comparable to the catalytic pyrolysis of pure polystyrene, the major polymer found in the electronic plastic waste, suggesting that the catalytic process is not strongly affected by the presence of additives in the waste matrix ^{2,3}.

¹ Shittu O.S., Williams I.D., Shaw P.J., Waste Manage. 2021, 120, 549–563.

² Williams P.T., Bagri R., Int. J. Energy Res. 2004, 28, 31.

³ Ma C., Yu J., Wang B., Song Z., Xiang J., Hu S., Su S., Sun L., Fuel Process. Technol. 2017, 155, 32.

This study was created with the state support of the Technology Agency of the Czech Republic under the National Centres of Competence Programme (registration no. TN02000051/006).

ANALYSIS OF THE BARLEY AND ITS MUTANT *CHLORINA F2^{F2}* CHLOROPLAST PROTEOME

NATÁLIE ZEMÁNKOVÁ ¹, IVO CHAMRÁD ¹, IVAN PETŘÍK ¹, JITKA ŠIROKÁ ¹, RENÉ LENOBEL ¹,
ONDŘEJ NOVÁK ¹

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

e-mail: natalie.zemankova@upol.cz

Barley (*Hordeum vulgare*) is not only one of the most important cereal crops, but also an important model organism for studying chloroplasts and their substructures. Its suitability for this research is further enhanced by the availability of numerous mutant lines. One of the most widely used mutants is *chlorina f2^{f2}*, which is characterized by a strongly reduced content, or complete absence, of chlorophyll b. *chlorina f2^{f2}* has played a crucial role in numerous studies investigating the importance of chlorophyll and the effects of its deficiency on the function of photosynthetic complexes, thylakoid organization, chloroplast structure, and overall plant physiology. Interestingly, no complex proteomic study on *chlorina f2^{f2}* has yet been published despite this fact. In this study, we isolated chloroplasts from seven-day-old wild-type barley cultivar Morex leaves and the *chlorina f2^{f2}* mutant. Thylakoid membranes were subsequently extracted from these chloroplasts, and comprehensive proteomic analyses of both compartments were performed. Our results revealed a significant downregulation of proteins involved not only in photosynthesis, chlorophyll biosynthesis, and thylakoid organization, findings that are consistent with previously reported physiological and biochemical characteristics of the *chlorina f2^{f2}*, but also in several hormone biosynthetic pathways. Follow-up analyses of phytohormone levels and key metabolites further supported these findings. Taken together, our data significantly expand the current understanding of *chlorina f2^{f2}* physiology. Rather than merely a model for chlorophyll b deficiency, *chlorina f2^{f2}* should be considered a more complex system that also reflects alterations in plant hormonal homeostasis and stress-related signalling pathways. From this point of view, it represents a valuable resource for future studies focused on the interplay between pigment biosynthesis, photosynthetic efficiency, and hormonal regulation in plants.

D-AMINO ACIDS IN THE LIMELIGHT: ENANTIOSEPARATION OF AMINO ACIDS USING CHIRAL STATIONARY PHASE BY LC-MS

NINA ZEMANOVÁ¹, JANA GREGOROVÁ², PAVEL ŠMAK², VIKTÓRIA ĎURČOVÁ³, MARTA VYORALOVÁ¹, ONDŘEJ PEŠ², ONDŘEJ ZENDULKA¹, MARTIN VEREŠ⁴, LIBOR USTOHAL⁴, JAN JUŘICA¹

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

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic

⁴Department of Psychiatry, University Hospital Brno, Jihlavská 20, Brno

e-mail: nina.zemanova@med.muni.cz

In the past, D-amino acids, enantiomeric counterparts of proteinogenic L-amino acids, were deemed as unnatural and even non-functional. However, studies in the last decades indicate their role as a novel class of signaling molecules in many organs. Free D-amino acids, namely D-Serine, D-Aspartate, and D-Cysteine play vital roles in brain physiology, therefore alterations in their levels appear to be linked to numerous neurological, neurodegenerative, and psychiatric disorders.

Our project aims to develop robust LC-MS platform for the quantification of D- and L- amino acids in biological fluids, i.e., blood plasma. For the method development, we used CROWN PAC CR-I(-) column with a chiral crown ether-bonded stationary phase, and mobile phase with a high percentage of organic solvent.

Precise and accurate analytical platform is crucial for a better understanding of the role of D-amino acids in the neurobiology of disorders such as schizophrenia, major depressive disorders, bipolar disorder, autism spectrum disorders or amyotrophic lateral sclerosis. In addition, it may offer the identification of novel biomarkers and/or monitoring of the progression of disease.

This work has been supported by Masaryk University, MUNI/LF-SUP/1367/2024y. All rights reserved.

MASS SPECTROMETRY IMAGING: A HIGH-THROUGHPUT APPROACH FOR ANALYZING PATHOGEN-INDUCED PHYTOHORMONES

DOMINIKA KACZOROVÁ¹, CHAO ZHANG¹, TETIANA KALACHOVA², ALENA KADLECOVÁ³, JITKA ŠIROKÁ¹, ASTA ZUKAUSKAITE⁴, LENKA BURKETOVÁ², KAREL DOLEŽAL^{1,4}, ONDŘEJ NOVÁK¹

¹ Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences & Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Czech Republic

² Laboratory of Pathological Plant Physiology, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

³ Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Czech Republic

⁴ Department of Chemical Biology, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Czech Republic

e-mail: dominika.kaczorova@upol.cz

Phytohormones and their metabolites are key modulators of plant immune responses, regulating defense gene expression against a broad spectrum of phytopathogens such as fungi, bacteria, and nematodes. However, due to their low abundance and chemical diversity, these molecules remain analytically challenging. While conventional methods such as liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) and reporter gene assays are commonly employed in hormonomics, these approaches either lack spatial resolution or sufficient throughput for detailed metabolite profiling. In contrast, mass spectrometry imaging (MSI) has emerged as a transformative analytical platform, offering untargeted, label-free, in situ detection of a wide range of biomolecules with high molecular specificity and spatial resolution. Unlike traditional techniques, MSI enables direct visualization of metabolite distribution across tissue structures, making it exceptionally suited for exploring hormone localization and plant-pathogen interactions. Following the successful application of desorption electrospray ionization (DESI)-MSI to visualize multiple phytohormone classes and synthetic analogs in *Arabidopsis*^{1,2}, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) was adopted to further enhance spatial resolution (<50 µm), revealing spatial correlations between different phytohormone species and small metabolites in infected plant tissues. These findings underscore MSI's power to map both host and pathogen metabolites, advancing our understanding of metabolomic and hormonomic dynamics under biotic stress.

¹ Zhang C., Žukauskaitė A., Petřík I., Pěničák A., Hömig M., Grúz J., Šíroková J., Novák O., Doležal K. 2021. *Analyst* 146: 2653-2663.

² Zhang C., Bielešková K., Žukauskaitė A., Hladík P., Grúz J., Novák O., Doležal K. 2024. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 416: 125-139.

26. 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, Pavel Hladík

Tisk: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno

Fotografie na obálce: Jitka Kopková

Vydání první

ISBN: **978-80-88195-68-9**



**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