

Sborník abstraktů přednášek a plakátových sdělení

10. ročník konference Česká chromatografická škola – HPLC.cz 2025

18. – 21. 09. 2025
Vinařství U Kapličky, Zaječí



Organizační výbor

prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.
PharmDr. Kateřina Plachká, Ph.D.
PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.
Mgr. Michal Douša, Ph.D.
Ing. Kateřina Pražáková
Mgr. Taťána Gazárková
Mgr. Štefan Kosturko
Jana Douša Hollová

pragolab
autorizovaný distributor

thermoscientific

Generální sponzor konference

History of Czech Liquid Chromatography

Petr Česla

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

e-mail: *petr.cesla@upce.cz*

Keywords: *liquid chromatography; Czech pioneers; history*

The chromatographic technique developed by M.S. Tswett at the beginning of the twentieth century penetrated only slowly into the wider scientific community in the following decades. The realization that both natural and synthetic chemical substances are typically present in simple or complex mixtures, necessitating separation prior to analysis, became increasingly apparent in later years. Czech scientists (or Czechoslovak as both countries were united between 1918-1993 with short break period during World War II) recognized this need and began developing separation techniques as early as the 1940s. This led to the advancements in thin-layer chromatography, gas chromatography, and later, following the discoveries of Csaba Horváth and Sandy Lipsky [1], also high-performance liquid chromatography. The history of the Czech chromatographic achievements, impact of Czech scientists on national and international journals and conferences were thoroughly described by one of the pioneers of high-performance liquid chromatography Pavel Jandera from University of Pardubice [2][3]. This contribution reviews the pioneering history of Czech analytical chemists in the area of liquid chromatography, in relation to significant milestones in the global scientific community.

References

[1] C. Horváth, S.R. Lipsky, *Nature* 211 (1966) 748-749.

[2] P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 465-471.

[3] Jandera, P. 50 years of high-performance liquid chromatography: the contribution of the department of analytical chemistry in Pardubice. *Sci Papers Univ Pardubice*. 2020; 26: 5–66.

Jaký je přínos chromatografie v lipidomické analýze?

Michal Holčapek

*Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie,
Pardubice*

e-mail: *Michal.Holcapek@upce.cz*

Klíčová slova: *lipidomika; kapalinová chromatografie; superkritická fluidní chromatografie*

Lipidomika je dynamicky se rozvíjející oblast omických věd zaměřená na komplexní kvalitativní a kvantitativní analýzu lipidů v biologických systémech. Klíčovým nástrojem je spojení chromatografické separace s hmotnostní spektrometrií (MS), které umožňuje rozlišení a kvantifikaci stovek lipidových druhů. Chromatografie v kapalně fázi nebo s použitím superkritických tekutin nabízí celou řadu různých separačních módů, jejichž vhodnou volbou lze získat cílený typ selektivity a významně tak rozšířit informaci, kterou by poskytla samotná MS bez chromatografické separace. Z pohledu chromatografie můžeme rozlišit tři základní retenční mechanismy pro analýzu lipidů: 1/ separace lipidových tříd (lipid class), 2/ separace lipidových druhů (lipid species), 3/ speciální separační módy. Separace lipidových tříd lze docílit pomocí HILIC nebo s využitím UHPSFC [1] a je to nejlepší přístup pro spolehlivou kvantitativní analýzu a vysoký stupeň automatizace zpracování dat při analýze velkých sérií vzorků. UHPLC v systémech s obrácenými fázemi je typickým představitelem separace lipidových druhů a její hlavní předností je selektivita pro různé typy izomerií (cis/trans, poloha dvojně vazby, izomerie v acylových řetězcích včetně větvení) [2], ale náročnější je kvantitativní analýza, protože IS nebude koeluovat se všemi lipidy, což může někdy způsobit zhoršení kvantifikace. Mezi speciální módy separace lipidů lze zařadit argentaci chromatografii (velmi citlivou pro izomery lišící se počtem, polohou nebo geometrií dvojně vazby) [3], chirální chromatografii pro separaci enantiomerů (např. TG a DG) [4] nebo dvojrozměrné uspořádání LC×LC [5] či LC×SFC [6]. Kromě samotné chromatografie bude ukázán přínos dalších přístupů, jako je využití iontové mobility nebo chemické derivatizace za účelem zvýšení citlivosti či zlepšení chromatografických a/nebo extrakčních vlastností některých tříd lipidů [6]. Na závěr bude prezentována UHPSFC/MS metoda, která byla optimalizována a validována pro vysoce prostupnou lipidomickou analýzu plazmy nebo séra a lze ji použít pro včasný záchyt pacientů s karcinomem slinivky břišní [7] či dalších typů karcinomů [8]. V současné době je tato metoda základem lipidomického testu používaného ve spin-off firmě Lipidica v probíhající

klinické validaci pro screening osob s vysokým rizikem vzniku karcinomu slinivky. Prezentované výsledky byly získány s podporou ERC AdG 101095860 a několika grantů GAČR. Tato práce by nemohla vzniknout bez zásadního příspěvku velkého množství studentů, spolupracovníků a lékařů (poděkování bude v přednášce).

Reference

- [1] D. Wolrab et al., Anal. Bioanal. Chem. 412 (2020) 2375.
- [2] Z. Vaňková et al., Anal. Bioanal. Chem. 414 (2022) 319.
- [3] M. Holčápek et al., J. Chromatogr. A 1010 (2003) 195.
- [4] M. Lísa et al., J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7499.
- [5] M. Holčápek et al., Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 5033.
- [6] O. Peterka et al., Anal. Chem. 97 (2025) 7157.
- [7] D. Wolrab et al., Nat. Commun. 13 (2022) 124.
- [8] D. Wolrab et al., Sci. Rep. 11 (2021) 20322.

Entropie: Zlý pán i dobrý sluha

František Švec

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové

e-mail: svecfr@faf.cuni.cz

Klíčová slova: *entropie, kapalinová chromatografie, vylučovací chromatografie, historie, monolity*

Entropie je extenzivní termodynamická stavová veličina. Lze jí mimo jiné definovat jako míru neuspořádanosti systému a uplatňuje se od černých děr v kosmu, jak dokazuje Stephen Hawking, až po chromatografii, o níž bude pojednáno. Chromatografické dělení je většinou řízeno společnými příspěvky entalpie a entropie. Oba příspěvky jsou potřeba, neboť rozdíly v entalpii vedou k požadovanému dělení skrze interakce mezi analyty a funkcionalitami na povrchu stacionární fáze. Entropie pak jednoznačně umožňuje, aby se analyty prostřednictvím difúze vůbec k oněm funkcionalitám dostaly. Entropie má však dvojaký efekt a také škodí, protože např. její efekt nám cestou od nástřiku k detektoru opět prostřednictvím difúze rozmývá píky a snižuje účinnost separačního procesu. Existuje ale i separační mechanismus, v němž je entalpie zcela nežádoucí a retence je kontrolována pouze vkladem entropie. Je to vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography, SEC), která převratným způsobem změnila stanovení molárních hmotností polymerů. J. C. Moore, pracovník firmy Dow Chemical Company, zveřejnil před zhruba šedesáti lety metodu jím původně nazvanou gelovou permeační chromatografií (GPC) a dnes známou spíše jako SEC. Její princip spočíval v dělení makromolekul podle velikosti na základě jejich permeace do pevné stacionární fáze ve formě sférických částic, která obsahovala síť pórů různých velikostí. Dělené molekuly difundovaly pouze do pórů, které byly větší, než byla jejich velikost. Takže menší molekuly pronikaly do většího počtu pórů než molekuly velké, a tudíž se zdržely v koloně déle. Jednotlivé polymerní molekuly pak opouštěly kolonu v pořadí od největších po nejmenší. Aby se tato technika mohla rozšířit, bylo však potřeba nalézt výrobce odpovídajícího přístroje. Tím se tehdy stal téměř neznámý podnik vlastněný J. L. Watersem. Byl to důležitý počín pro jeho firmu, z níž se díky SEC stal dnes jeden z největších světových producentů zařízení pro kapalinovou chromatografii. Stacionární fáze pro SEC s kontrolovanou porozitou se neustále zdokonalují, jimi naplněné kolony se zmenšují, a hledají se i nové přístupy. Není tedy divu, že se pro SEC vyvíjejí i fáze na bázi monolitů jak bude také ukázáno.

From sample to result: Liquid chromatography and mass spectrometry in plant metabolomics

P. Bednář¹, P. Krejčí¹, M. Tesárek¹, M. Cechová-Zajacová¹, V. Zemek¹, R. Myjavcová¹, L. Kučera¹, O. Kurka¹, P. Barták¹, P. Smýkal², J. Balarynová²

¹ *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 77900 Olomouc, Czech Republic*

² *Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic*

e-mail: petr.bednar@upol.cz

Keywords: *liquid chromatography, mass spectrometry, plant, metabolomics, sample preparation, method optimization, data evaluation, micromanipulation*

Mass spectrometry is a gold standard analytical technique for investigating processes throughout the entire plant life cycle, as well as for utilization of plant material in the food industry, medicine, heritage science/archaeology and other branches. Metabolite profiling using direct mass spectrometry or its hyphenation with chromatographic separation techniques (i.e. LC/MS, CE/MS) enables the detection of a broad range of molecular features, particularly when biomarker discovery is the primary objective. This contribution demonstrates, through selected case studies, the workflow of metabolite analysis in plant material and related products — from standard and innovative sample preparation strategies, through the selection and optimization of analytical methods, their evaluation and application, to advanced approaches in data processing. The procedures used in the analysis of seed and pollen composition [1][2][3] and studies of (bio)chemical transformations of plant secondary metabolites in different samples [4][5] will be discussed. Attention will be placed on the relation between the complexity and required integrity of the investigated sample/object and the selectivity of the analytical procedure. New possibilities of sample micromanipulation and direct on-tissue chemistry will be addressed [6].

Acknowledgement: Czech Science Foundation: 24-10730S, MŠMT: INTER-ACTION-LUAUS24 (LUAUS24065), Palacký University Olomouc: IGA_PrF_2024_026; IGA_PrF_2025_027.

References

- [1] J. Balarynová, B. Klčová, J. Sekaninová, L. Kobrlová, M. Zajacová Cechová, P. Krejčí, T. Leonova, D. Gorbach, C. Ihling, L. Smržová, O. Trněný, A. Frolov, P. Bednář, P. Smýkal, The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication, *New Phytol.* 235, 1807 (2022).
- [2] L. Kučera, P. Bednář (Eds.) *Moderní chemická analýza v archeologii*, I. díl, Univerzita Palackého v Olomouci, 2021. (doi: 10.5507/prf.21.24459486, ISBN 978-80-244-5948-6).
- [3] P. Krejčí, Z. Žingor, J. Balarynová, A. Čevelová, M. Tesárek, P. Smýkal, P. Bednář, Modern Comprehensive Metabolomic Profiling of Pollen Using Various Analytical Techniques, *Molecules* 30, 1172 (2025).
- [4] O. Kurka, L. Kučera, H. Pelantová, M. Kuzma, V. Havlíček, P. Bednář, Semisynthesis and spectral characterization of 5-methylpyranopelargonidin and 4-methylfuropelargonidin and their separation and detection in strawberry fruit wine, *J. Chromatogr. A* 1510, 40 (2017).
- [5] R. Myjavcová, P. Bednář, A. Srovnalová, Z. Dvořák, B. Papoušková, Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Study of Metabolism of 5-Methylpyranopelargonidin, *Chromatographia* 78, 189 (2015).
- [6] P. Krejčí, J. Balarynová, J. Nádvorníková, L. Kučera, M. Tesárek, P. Smýkal, P. Bednář, Application of modified ASAP-MS technique for direct analysis of plant microsamples and its potential for single pollen grain chemical characterization, *Microchem J.* under rev (2025) (and citations given herein).

Vývoj a validace HPLC metod v kontextu SVP a současných regulačních požadavků

Jiří Kratochvíl, Ph.D.

Cayman Pharma s.r.o.

e-mail: jiri.kratochvil@caymanpharma.cz

Keywords: HPLC, SVP, ICH, ANVISA

Vývoj analytických metod a jejich validace jsou pro výrobu v režimu SVP kritické. Kontrolní strategii pro výrobu léčivých látek není totiž možné dobře zacílit bez správně „seřizené optiky.“ V kontextu zvyšujících se očekávání regulačních úřadů po celém světě, které zahrnují nečistotní profily API SM, intermediátů i surovin, je podstatné nejen umět správně zvolit vhodné analytické technologie, ale také efektivně komunikovat a evidovat firemní vědomosti. Vývoj analytické metody pak může fungovat jako platforma, kde komunikují specialisté vývoje syntézy, analytických metod, kvality a registrací pro dosažení optimálního výsledku. Destilát zjištěných skutečností je podkladem pro validaci příslušné metody dle požadavků směrnic ICH, lékopisu anebo například ANVISA a je stvrzením vhodnosti zvoleného „nástroje“ k zamýšlenému účelu.

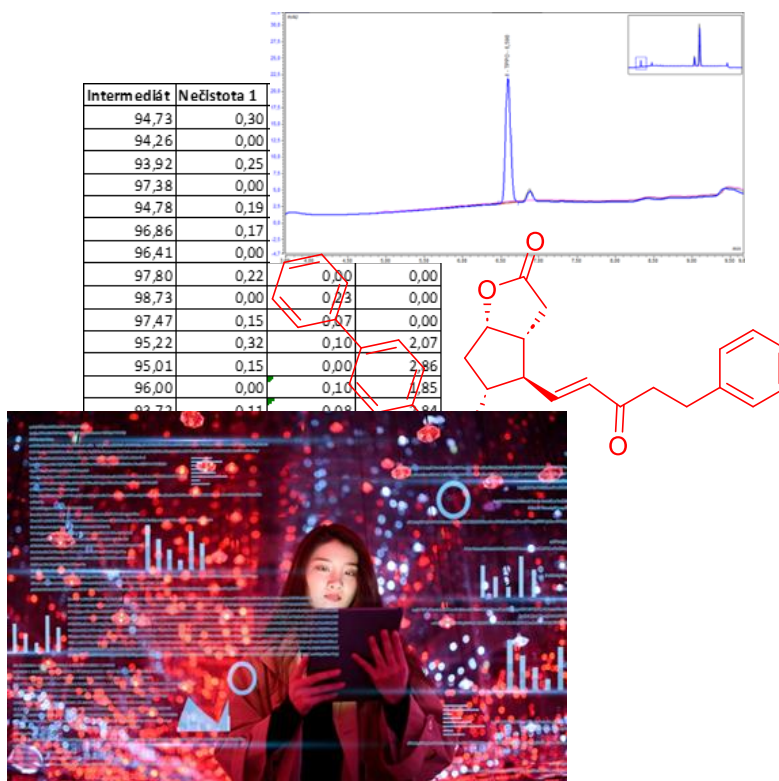


Figure 1. Vývoj a validace analytických metod a knowledge management

Využití kapalinové chromatografie v pivovarsko-sladařské praxi

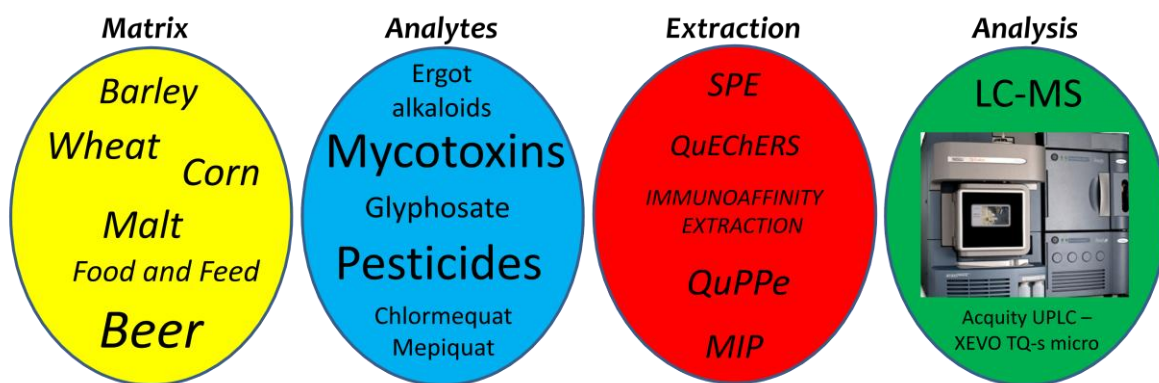
Marek Pernica

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. Mostecká 971/7, Brno 614 00, Česká Republika

e-mail: pernica@beerresearch.cz

Klíčová slova: *mykotoxiny, pesticidy, námelové alkaloidy, glyfosát, chlormekvát, mepikvat*

V pivovarsko-sladařské praxi je kapalinová chromatografie využívána jako účinný nástroj pro kontrolu kvality surovin i finálních produktů. Uplatnění nachází zejména při stanovení nežádoucích kontaminantů, jako jsou mykotoxiny, rezidua pesticidů, námelové alkaloidy a růstové regulátory typu chlormekvátu a mepikvátu. Tyto látky mohou ovlivnit zdravotní nezávadnost i výsledné senzorycké vlastnosti piva. Analytické metody založené na kapalinové chromatografii s různorodou detekcí jsou charakterizovány vysokou citlivostí, selektivitou a reprodukovatelností. Klíčovým krokem před samotnou analýzou je vhodná příprava vzorku, která výrazně ovlivňuje přesnost a správnost výsledků, zejména s ohledem na komplexní pivovarsko-sladařské matrice. Vzhledem k rostoucím požadavkům na bezpečnost potravin jsou techniky HPLC v laboratorní kontrole stále častěji implementovány jako standardní součást monitoringu v celém výrobním řetězci od ječmene až po hotové pivo [1-3].



Obrázek 1. Workflow

References

- [1] M. Pernica, J. Martiník, R. Boško, S. Černá, Z. Svoboda, K. Benešová, S. Běláková „Mycotoxins in brewing and malting: is every sample contaminated with mycotoxins." *Mycotoxin research* 41.3 (2025): 239-248.
- [2] R. Boško, J. Martiník, S. Wawroszová, K. Benešová, Z. Svoboda, S. Běláková, M. Čumová, M. Pernica "Ergot Alkaloids in Rye Flour Marketed in Czech Republic: Comparison Between ELISA and LC–MS Methodologies." *Food Analytical Methods* 17.5 (2024): 787-794.
- [3] J. Martiník, R.Boško, Z. Svoboda, S. Běláková, K. Benešová, M. Pernica "Determination of mycotoxins and their dietary exposure assessment in pale lager beers using immunoaffinity columns and UPLC-MS/MS." *Mycotoxin research* 39.3 (2023): 285-302.

Analýza PFAS pomocí LC-MS/MS

Jana Kováčová

Czech Republic, s.r.o.

e-mail: *jana.kovacova@alsglobal.com*

Klíčová slova: *PFAS, LC, MS, environmentální analýza*

Zkratka PFAS označuje skupinu per a polyfluoralkylovaných sloučenin. Tyto látky se začaly vyrábět v polovině minulého století a od té doby se jejich použití masivně rozšířilo v různých odvětví průmyslu. Dnes je problematika PFAS diskutována napříč celým světem, nejinak je tomu i v EU. PFAS představují významné riziko pro životní prostředí, ale i pro zdraví člověka. Hlavní důvody, proč tomu tak je jsou tyto vlastnosti: perzistence, bioakumulace a vysoká mobilita. PFAS se označují jako všudypřítomné nebo věčné kontaminanty („forever chemicals“) a jejich analýza v různých složkách životního prostředí je velmi aktuálním tématem.

Většina analytů, které se řadí mezi PFAS je stanovitelná kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Jedná se o širokou skupinu látek, v rámci příspěvku budou diskutovány možnosti jejich stanovení právě pomocí LC-MS/MS v environmentálních matricích, příklady problematiky tohoto stanovení: fakt, že se jedná o všudypřítomné sloučeniny mnohdy komplikuje jejich stanovení, což bude ukázáno na příkladech. Vedle toho bude diskutována možnost necílového stanovení PFAS. Tato skupina zahrnuje více než několik tisíc individuálních sloučenin, z čehož je zřejmé, že běžnou cílovou analýzou LC-MS/MS nelze toto množství analytů pokrýt. Proto bude představena možnost necílového stanovení pomocí metody TOPA (Total Oxidisable Precursor Assay) a její využití v praxi pro stanovení legislativních limitů.

Modifikace polymerních nanovláken pro efektivnější extrakci environmentálních vzorků

Kolichová Ivona, Kholová Aneta, Háková Martina, Šatínský Dalibor

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie

e-mail: lhotski@faf.cuni.cz

Klíčová slova: *nanomaterial, polymer, extraction sorbent, sample preparation, SPE, HPLC*

Pro většinu metod je nezbytná úprava vzorků před vlastní chromatografickou analýzou za účelem přečištění a zakoncentrování analytů. Nejpoužívanější technikou je extrakce na tuhou fázi (SPE), která v dnešní době nabízí široké portfolio i komerčně dostupných extrakčních sorbentů. Vhodný sorbent volíme z hlediska analyzovaného vzorku, potřebné kapacity a selektivity extrakce. Nabízí se také miniaturizované formáty umožňující minimalizovat spotřebu vzorku a rozpouštědel.

Nanovláknenné materiály představují moderní sorbenty na bázi polymerů [1]. Syntetické polymery jsou odolnější, nejčastěji bývá zvláknován polyamid (PA6, nylon) a polyakrylonitril, v poslední době se jejich řady rozšiřují také o biodegradabilní polymery (kyselina polymléčná, polykaprolakton). Posledním trendem jsou různě modifikovaná a kombinovaná vlákna, čímž se dosahuje změny jejich selektivity vnesením nových funkčních skupin nebo také změny fyzikálních vlastností – plochy povrchu, smáčivosti, odolnosti vláken aj.

Běžně využívané polymery poskytují zpravidla nespecifické hydrofobní interakce a selektivitu zejména k lipofilnějším analytům, vyšší hydrofobnost polymeru ale také může odpovídat horší smáčivosti vodným vzorkem. Modifikacemi polymerních nanovláknenných sorbentů, jako jsou nové techniky samotného zvláknování, inkorporace nanočástic, vnesení aditiv či povrchové modifikace vláken, můžeme získat nové extrakční sorbenty s vhodnější selektivitou a vyšší extrakční účinností. Jejich příklady budou prezentovány na konkrétních aplikacích využívajících různé extrakční formáty podle vlastností použitých nanovláken a typu vzorku.

References

[1] Švec, F. et al.: Polymerní nanovlákna a mikrovlákna: Nový formát materiálů používaných v chromatografii pro přípravu vzorků extrakcí tuhou fází, *Chem. Listy* 118 (2024) 658-667.

Pohled na hmotnostní spektrum

Karel Lemr

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

17. listopadu 12, 779 00 Olomouc, Česká republika

e-mail: karel.lemr@upol.cz

Klíčová slova: *hmotnostní spektrometrie, ionizace, fragmentace, isotopové píky*

Vzhled hmotnostního spektra je určován tvorbou iontů v procesech ionizace a fragmentace. K základním ionizačním mechanismům se řadí ztráta elektronu, záchyt elektronu, výměna náboje, přenos protonu, odebrání aniontu, tvorba aduktů a tvorba klastrů [1]. Ionizační technika musí být vhodná pro analyzované látky, její volbu ovlivňuje charakter vzorku, ale také její dostupnost v dané laboratoři. Příkladem dvou často využívaných ionizačních technik je elektronová ionizace [2] a ionizace elektrosprejem [3]. Zatímco první je vhodná pro těkavé látky a vede k tvorbě radikál-kationtu, druhá umožňuje ionizovat látky středně polární až iontové a typicky při ní vznikají ionty se sudým počtem elektronů. Mnohdy lze využít pro řešení téhož analytického úkolu různé ionizační techniky, např. elektrosprej nebo chemickou ionizaci za atmosférického tlaku.

Při základním pohledu na hmotnostní spektrum se hledá ion odpovídající celé molekule a hodnotí se isotopové píky s cílem potvrdit náboj iontu, zjistit molekulovou hmotnost analytu, získat sumární vzorec, pokud měříme poměr m/z s potřebnou přesností, nebo alespoň získat představu o zastoupení prvků v molekule. Vhodné je si všimnout typických diferencí ve spektru, např. hodnota 22 naznačuje souvislost dvou signálů - protonované molekuly a aduktu se sodným iontem. Poměr těchto signálů může být výrazně ovlivněn složením vzorku (obsahem sodných iontů). Objevit se mohou i jiné typy aduktů (např. s draselnými nebo amonnými ionty, ale také s anionty) a dále klastry ($[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$ aj.). K potlačení signálu aduktů lze využít přečištění vzorku. Jejich vznik však může být i žádoucí, a naopak do vzorku je přidáván patřičný ion s cílem podpořit jejich tvorbu. Kromě složení vzorku lze pozorovat vliv přístrojových parametrů a konstrukce iontového zdroje na poměr uvedených iontů. V důsledku se ve spektru může objevit řada signálů, které lze přiřadit nefragmentované molekule sledovaného analytu.

Kromě vlastností primárních iontů vzniklých ionizací může výrazně ovlivnit jejich fragmentaci, a tedy vzhled spektra, nastavení hmotnostního spektrometru. K fragmentaci může

docházet ve zdroji, popř. po aktivaci při tandemové hmotnostní spektrometrii. Problematika fragmentace je značně rozsáhlá, ale je užitečné získat přehled alespoň přes základní fragmentační mechanismy, které zahrnují sigma štěpení, fragmentaci iniciovanou radikálovým nebo nábojovým centrem a přesmyky (např. McLaffertyho) [4]. Takovýto základní přehled spolu se znalostí ionizace a vlivu nastavení přístroje usnadňuje „čtení“ hmotnostních spekter.

Literatura

-
- [1] K. Lemr, L. Borovcová, Vznik iontů v hmotnostní spektrometrii: ionizace a fragmentace, Chem. Listy 114 (2020) 96-100.
- [2] K. Lemr, L. Borovcová, Elektronová ionizace, Chem. Listy 114 (2020) 101-105.
- [3] K. Lemr, L. Borovcová, Ionizace elektrosprejem, Chem. Listy 114 (2020) 169–178.
- [4] L. Škultéty, J. Novák, V. Havlíček, Základy interpretace hmotnostních spekter, Chem. Listy 114 (2020) 145-154.

Co byste měli vědět o UV detekci při HPLC analýze

Kateřina Pražáková, Lucie Nováková

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie

e-mail: prazakokat@faf.cuni.cz

Klíčová slova: *UV detekce, PDA detektor, absorpční spektrum, UV cut-off*

UV detekce patří díky své jednoduchosti a cenové dostupnosti mezi nejoblíbenější detekční techniky pro spojení s HPLC. Ačkoliv je její použití rutinní, přináší s sebou i některá úskalí, zejména při analýze směsí látek s různými absorpčními vlastnostmi nebo analýze látek bez významně absorbujících chromoforů. Správná volba experimentálních podmínek včetně nastavení parametrů detektoru je klíčová pro kvalitu a reprodukovatelnost získaných výsledků. V rámci příspěvku budou na modelové směsi přírodních látek s rozdílnými absorpčními vlastnostmi představeny nejdůležitější aspekty UV detekce. Nejprve bude na konkrétních příkladech ukázáno, jak ovlivňují podobu absorpčního spektra faktory jako struktura analytu, typ rozpouštědla nebo pH. Dále bude diskutován výběr detekční vlnové délky v situaci, kdy je potřeba zohlednit rozdílnou absorbanci jednotlivých látek. Pozornost bude věnována také důležitosti volby složek mobilní fáze a rozpouštědla pro ředění vzorku v souvislosti s jejich vlastní absorpcí záření a hodnotou UV cut-off. V neposlední řadě se zaměříme na nastavení volitelných parametrů detektoru, jako jsou časová konstanta a vzorkovací rychlost, a jejich vliv na tvar chromatografického píku a hodnotu poměru signál/šum.

Elektrochemická detekce v HPLC: tutoriál

Jan Hrbáč^a, David Jirovský^b

^a*Ústav Chemie PřF MU*

^b*Katedra analytické chemie PřF UP*

e-mail: jhrbac@mail.muni.cz

Klíčová slova: *elektrochemická detekce, limitní proud, hydrodynamický voltamogram, potenciostat, amperometrický detektor, coulometrický detektor, multielektrodová detekce neurotransmittery, antioxidanty*

Elektrochemická detekce v kapalinové chromatografii (ECD) je vysoce citlivá a selektivní metoda pro analýzu elektroaktivních látek. Její využití v praxi je v současnosti spíše na ústupu kvůli vyšším nárokům na teoretické znalosti i praktické zkušenosti uživatelů. Tutoriál představí základní principy ECD, včetně režimů detekce, typů elektrod, a redoxního chování analytů. Bude se věnovat i praktickým aspektům, jako je výběr mobilní fáze, údržba elektrod a řešení běžných problémů. Pomocí příkladů z oblasti farmacie, klinické analýzy, životního prostředí a potravinářství bude ukázán význam metody v praxi.

Reference

NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal; ČESLA, Petr. 2021. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha: Česká chromatografická škola. ISBN 978-80-270-8559-0.

Forensic Toxicological Hair Analysis

Vit Sestak, Martin Mzik

*Institute of clinical biochemistry and diagnostics, University hospital in Hradec Kralove,
Sokolska 581, 50005, Hradec Kralove, Czech Republic*

e-mail: vit.sestak@fnhk.cz

Keywords: forensic toxicology, rare matrices, hair analysis

Hair analysis represents a powerful tool in forensic toxicology, enabling retrospective detection of exposure to various chemical substances, including drugs and poisons. In many countries, hair is one of the most analyzed biological matrices in forensic investigations. Modern analytical techniques like UHPLC-HRMS allow us to detect the very low concentrations present in hair extracts. These methods enable both targeted and quasi-targeted detection at ppb to ppt levels, highlighting their value in today's forensic practice. Hair segmentation analysis allows for relatively precise timing of exposure, which is particularly beneficial in cases of delayed disclosure, such as in sexual assault investigations. The presentation covers the advantages and limitations of the method, sample preparation techniques, and potential uses.

Analýza kanabinoidů v Celně technické laboratoři

RNDr. Josef Reitmajer, Ph.D., Ing. Jaroslav Brynda

Generální ředitelství cel, Celně technická laboratoř, Budějovická 7, Praha 4

e-mail: josef.reitmajer@celnisprava.gov.cz

Klíčová slova: LC, MS, GC, THC, HHC, kanabinoidy

Príspevek popisuje postup a metody používané v Celně technické laboratoři (CTL) pro analýzu kanabinoidů. Vzhledem k zaměření laboratoře se pracovníci setkávají nejen se vzorky ropných, alkoholických a tabákových výrobků, ale též s konopnými výrobky a vzorky omamných a psychotropních látek včetně látek s velmi vysokou biologickou účinností.

V posledních letech došlo k širokému rozšíření užívání zejména přírodních a semisyntetických (odvozených od přírodních struktur) kanabinoidů. Ani syntetické kanabinoidy nejsou zcela mimo pozornost nelegálních uživatelů, ale rozšíření HHC (hexahydrokanabinol) a dalších látek odvozených od THC (tetrahydrokanabinol) zejména mezi mladší generací je alarmující. S tím souvisí nejen nabídka na nelegálním trhu, ale i změny legislativy. Zároveň dochází k velmi rychlému rozšiřování portfolia nabízených látek a CTL, jako odborný útvar Celní správy, musí na tuto situaci reagovat.

V prezentaci je popsán postup zpracování vzorků, opatření provedená k zajištění bezpečnosti pracovníků a analytické metody používané k identifikaci přírodních, semisyntetických a syntetických kanabinoidů. Pro kompletní analýzu je třeba kombinovat výsledky zejména separačních metod (LC-QQQ, LC-DAD, GC-FID, GC-QTOF) doplněných v případě potřeby o strukturní analýzu (NMR) a obrazovou analýzu (morfologie rostlin, homogenita částic atd.).

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-QQQ) je používána jako rychlá identifikační technika. Na několika příkladech z praxe je demonstrováno použití této instrumentace.

Komplexní chirální GC-MS/MS a LC-MS/MS metody pro identifikaci a stanovení N-acyl homoserin laktonů

Horáček, O.^{1,2}; Dhaubhadel, U.¹; Portillo, A.E.¹; Sung, Y.-S.¹; Armstrong, D.W.¹; Kučera, R.²

¹ Department of Chemistry & Biochemistry, The University of Texas at Arlington, Arlington, TX USA

² Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta v HK, Univerzita Karlova, ČR

e-mail: horaceko@faf.cuni.cz

Klíčová slova: homoserin laktony, chiralita, GC-MS/MS, LC-MS/MS

N-acylhomoserin laktony jsou signální molekuly syntetizované gramnegativními bakteriemi pro komunikaci v procesu zvaném „quorum sensing“ [1]. Nejčastější achirální separační metody pro analýzu N-acylhomoserin laktonů zahrnují biosenzory, tenkovrstvou chromatografii, kapalinovou chromatografii s UV detekcí, plynovou chromatografii nebo kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostním spektrometrem. Nedávno byla produkce L-, ale hlavně D-N-acylhomoserin laktonů objevena u *Vibrio fischeri* a *Burkholderia cepacia* [2]. Nalezené koncentrace D-N-acylhomoserin laktonů byly na hranici kvantifikace. Pro další studie D-N-acylhomoserin laktonů ve fyziologii gramnegativních bakterií jsou nezbytné citlivější, spolehlivější a selektivnější analytické metody.

Cílem naší práce bylo vyvinout komplexní chirální analytické metody pro identifikaci a stanovení enantiomerů 18 derivátů homoserin laktonů pomocí dvou analytických technik, tj. GC a LC spojených s trojitým kvadrupólem (GC-QqQ a LC-QqQ). Dříve používaná SPE metoda pro přípravu vzorku byla optimalizována pro 100násobné koncentrování analytů a zvýšení selektivity extrakce z bakteriálního média.

Výsledkem je dosažení chirálních separací všech 18 derivátů N-acylhomoserin laktonů pomocí komplementárních metod GC-QqQ a LC-QqQ [3]. Mez detekce pro LC-QqQ se pohybuje ve stovkách ppb. Mez detekce pro metodu GC-QqQ je o dva až tři řády vyšší než u metody LC-QqQ. Vysoká citlivost prezentovaných metod dále umožňuje rozvinout studium role D-N-acylhomoserin laktonů v procesu „quorum sensing“ gramnegativních bakterií [4].

Reference

- [1] Moreno-Gámez S., et al. *Nature Commun.* **2023**, 14(1): 3415.
- [2] Malik, A.K., et al. *Microchim. Acta* **2009**, 166:101-107.
- [3] Horáček, O., et al. *Talanta* **2022**, 253:123957.
- [4] Dhaubhadel U., et al. *PLoS ONE* **2023**, 18(3): e0283657.

„TRISTNÍ“ KVALITA POTRAVNÍCH DOPLŇKŮ NA TRHU V ČR

Šatínský D., Moravcová P., Sanderová M., Fibigr J., Lhotská I.

*Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, Ak.
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové*

e-mail: satinsky@faf.cuni.cz

Klíčová slova: *potravní doplňky, nutraceutika, rostlinné extrakty, antioxidanty, fenolické kyseliny, flavonoidy, chromatografie*

Doplňky stravy jsou koncentrované zdroje živin nebo jiných látek, které mají nutriční nebo fyziologický účinek a jejichž účelem je doplnit normální stravu kvůli předpokládaným přínosům pro zdraví [1]. Celosvětové prodeje potravinových doplňků zaznamenávají rychlý růst a zejména ty, které jsou založeny na rostlinných extraktech, patří k nejoblíbenějším, protože jsou považovány za bezpečnější a zdravější než syntetické látky. Panuje také předpoklad, že mají nižší nebo dokonce žádné vedlejší účinky. Tyto rostoucí tržby, které naznačují obrovskou popularitu doplňků stravy a obecný nedostatek odhodlání prosazovat účinnou legislativu (např. nedostatečná garance účinnosti a bezpečnosti) dělá trh s doplňky stravy zranitelnější vůči nečestným výrobcům. V EU jsou potravní doplňky regulovány stejně jako potraviny a současná legislativa je zaměřena pouze na vitamíny a minerály. Výrobci ve svých přípravcích deklarují obsah určitého množství např. rostlinného extraktu, ale tato informace neříká nic o obsahu bioaktivních látek. Složení a obsah bioaktivních látek v rostlinách se může lišit v závislosti na klimatu, teplotě, období, půdě a dalších faktorech. Rozpor mezi množstvím použitého extraktu a obsahem účinných látek v jedné dávce může mít podstatný vliv na dávkování a může vést k předávkování konzumenta nebo naopak k neúčinnému dávkování. Ačkoli je nezbytné zajistit bezpečí a neškodnost doplňků stravy, od jejich výrobců se nevyžadují žádná konkrétní posouzení. V EU bohužel zatím neexistují žádné kontroly výrobních standardů, které jsou přinejmenším podobné farmaceutické úrovni (GMP). V rámci příspěvku bude prezentován vývoj metod HPLC/UHPLC analýz a výsledky kontroly kvality obsahu vybraných potravních doplňků na bázi rostlinných extraktů s obsahem fenolických kyselin, anthokyanů, flavonoidů, fytoosterolů, whitanolidů, berberinů, kurkuminů, gingerolů apod.

References

[1] Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council, available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=EN>

Fairy Tales of a Thousand and One Impurity – Case Study of Ivabradine

Hedvika Moravcová

Department of Analytical Development, Zentiva, k.s., U Kabelovny 130, 102 37 Prague 10,
Czech Republic

e-mail: hedvika.moravcova@zentiva.com

Keywords: *impurities, HPLC, ivabradine*

Over the past years, there has been growing interest among regulatory authorities in impurity control in newly registered drug substances and drug products. As a supportive material, the International Committee for Harmonization (ICH) has formulated a guideline that describes analytical procedures and impurity control criteria. According to this document, three types of impurities are defined: residual solvents, inorganic, and organic ones. [1]

Organic impurities include starting material, by-products, intermediates, or degradation products and are mainly determined by chromatographic methods. Especially, liquid chromatography has become the method of choice in this field. Because of a need to determine various chemical moieties ideally within one sample run, the method development may be a challenging task. This is nicely represented by ivabradine and its related substances when many obstacles had to be overcome to ensure the method selectivity for ten different molecules.

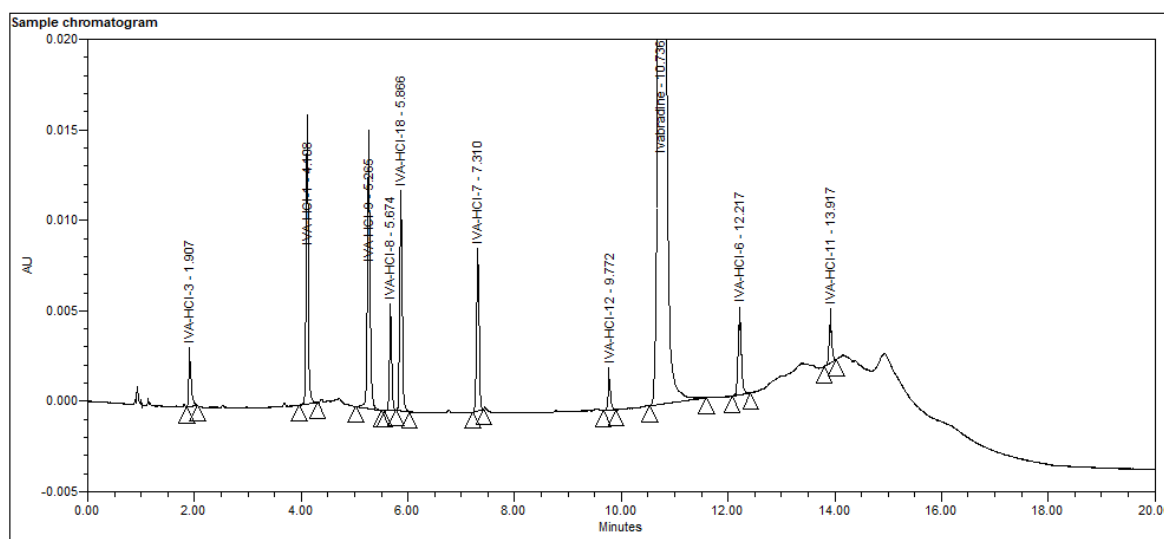


Figure 1. Chromatogram of ivabradine and its impurities.

References

- [1] S. V. Saibaba, S. K. M. a R. B., „Pharmaceutical Impurities and Their Characterization - A Review,“ *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, pp. 190-196, 07 04 2016.

Význam GC při kontrole a charakterizaci esenciálních olejů a rostlinných drog

Kosturko Štefan^{1,2}, Jenčo Jaroslav¹, Nováková Lucie², Šafratová Marcela¹

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

¹*Katedra farmakognosie a farmaceutické botaniky;* ²*Katedra analytické chemie*

e-mail: kosturks@faf.cuni.cz

Klíčová slova: *etheroleum, GC-MS, GC-FID, Mentha spp., Foeniculum spp.*

Silice představují komplexní směsi těkavých látek s významnými biologickými účinky a širokým uplatněním ve farmacii, potravinářství i kosmetickém průmyslu. Vzhledem k jejich rostoucí komerční hodnotě se zvyšuje i riziko falšování a kolísání jakosti surovin pro jejich výrobu. Cílem studie je představit analytický přístup ke kontrole silic, založený na kombinaci kvalitativní a kvantitativní analýzy pomocí plynové chromatografie s hmotnostní (GC-MS) a plamenoionizační detekcí (GC-FID).

GC metoda byla aplikována na typické vzorky komerčně dostupných i experimentálně destilovaných silic máty peprné (*Mentha × piperita* L.) a fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare* L.), přičemž byla zaměřena na kvalitativní i kvantitativní hodnocení sedmnácti těkavých sloučenin patřících do skupin monoterpenů a fenylypropanoidů. Mezi sledované látky patřily zejména menthol, menthofuran, pulegon, (*E*)-anetol, fenchon a estragol, z důvodu jejich terapeutického nebo toxického působení na lidský organismus. Chromatografická separace byla provedena na koloně HP-5MS (30 m × 250 μm × 0,25 μm) za použití teplotního gradientu s počáteční teplotou 60 °C a konečnou teplotou 140 °C, během 16 minut.

Získané výsledky ukazují, že kombinace GC-MS a GC-FID představuje robustní nástroj pro rutinní kontrolu pravosti a jakosti silic, a zároveň umožňuje efektivní detekci potenciální kontaminace nebo falsifikátu. Prezentovaná metodika může sloužit jako základ pro standardizaci a validaci analytických postupů v oblasti kontroly přírodních produktů.

Vývoj multidimenzionální LC-MS metody pro separaci a citlivé stanovení inzulínu a jeho strukturních analogů

Pavel Šišťík^{1,2,3}, Dominika Krestová⁴, Lucie Nováková⁴, Romana Uřínovská^{1,2}, Klára Handlosová^{5,6}, Petr Handlos^{5,6}, David Stejskal^{2,7}

¹*Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česká republika*

²*Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava, Česká republika*

³*Katedra klinické farmakologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava, Česká republika*

⁴*Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika*

⁵*Klinika soudního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česká republika*

⁶*Klinika soudního lékařství, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava, Česká republika*

⁷*Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česká republika*

e-mail: pavel.sistik@fno.cz

Klíčová slova: lidská plasma, inzulíny, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace metody, studie stability

Inzulin a jeho strukturní analoga (lispro, aspart, glulisin, glargin, detemir a degludek) hrají významnou roli nejen v léčbě diabetu mellitu, ale také v soudním lékařství při objasňování případů nevyjasněných úmrtí způsobených předávkováním. Cílem této práce byl vývoj a optimalizace citlivé metody stanovení těchto látek v plazmě, především s důrazem na multidimenzionální kapalinovou chromatografii spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (2D-UHPLC-MS/MS).

Pro zajištění vysoké citlivosti a selektivity byly optimalizovány parametry hmotnostně-spektrometrické detekce (SRM přechody), a současně byly detailně zkoumány separační podmínky v 1D i 2D chromatografickém uspořádání. Byly testovány různé stacionární fáze (např. Cortecs C18+, Luna Omega C18, Kinetex C18) a složení mobilní fáze (kombinace vody, acetonitrilu, methanolu a kyseliny mravenčí), aby bylo dosaženo optimálního chromatografického rozlišení, zejména pro kritické páry inzulínů s velmi podobnou strukturou, jako je humánní inzulin a inzulin lispro.

Byly provedeny také preanalytické experimenty zaměřené na minimalizaci adsorpce inzulínů na povrchy laboratorního skla a plastů. Dříve publikované experimenty stabilitních testů potvrdily, že zkumavky s K2EDTA jsou nejvhodnější volbou pro odběr a uchování vzorků

krve z hlediska stability inzulinů při pokojové teplotě [1]. Pro validaci metody byla zvolena syntetická plazma BZ273, jejíž standardizované složení minimalizuje interferenci endogenního inzulinu a zvyšuje reprodukovatelnost výsledků.

Z hlediska stability byly testovány různé podmínky (krátkodobá, dlouhodobá a freeze-thaw stabilita) s a bez použití proteázového inhibitoru (PIC). Bylo zjištěno, že použití PIC nepřináší výrazné zlepšení stability inzulinů, a v některých případech dokonce snižuje citlivost metody.

Nově vyvinutá metoda byla validována podle EMA kritérií pro validaci bioanalytických metod [2] a poskytuje dostatečnou citlivost (LLOQ 50 pg/mL) pro forenzní a klinické aplikace. Metoda již byla úspěšně implementována do rutinního provozu v Ústavu soudního lékařství Fakultní nemocnice Ostrava, kde významně přispívá k objasňování případů nevyjasněných úmrtí.

Reference

- [1] O. Baykan, A. Yaman, F. Gerin, O. Sirikci, G. Haklar, The effect of different protease inhibitors on stability of parathyroid hormone, insulin, and prolactin levels under different lag times and storage conditions until analysis, *J. Clin. Lab. Anal.* 31 (2017).
- [2] European Medicines Agency, ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation—Step 5, EMA, 2022.

Analysis and physicochemical characterization of peptides and proteins by capillary electromigration methods

Václav Kašička, Veronika Šolínová, Adéla Křížková, Petra Sázelová, Sille Štěpánová,
Renáta Konášová, Dušan Koval

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences
Flemingovo náměstí 542/2, 160 00 Praha 6, Czechia
e-mail: kasicka@uochb.cas.cz

Keywords: capillary electrophoresis, capillary isotachophoresis, peptides, proteins

Capillary zone electrophoresis (CZE) and capillary isotachophoresis (CITP) will be presented as high-performance separation methods with a wide applicability for analysis and physicochemical characterization of peptides and proteins [1, 2]. Purity degree of synthetic peptides, e.g. prolactin-releasing peptide, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide, and ghrelin, and their lipidized analogs with covalently attached fatty acids (octanoic, palmitic and myristic) was determined by CZE with UV-absorption detection in acidic background electrolytes (BGEs) composed of formic and acetic acids. Microheterogeneity of proteins (monoclonal antibodies) was evaluated by CZE with ESI-MS detection using the same BGEs. The content of anionic counterions (fluorides, acetates, trifluoroacetates) in basic peptides was estimated by CITP.

Acid-base and electromigration properties of the above (lipo)peptides were investigated by combination of CZE and CITP. Acidity constants (pK_a) of ionogenic groups of (lipo)peptides and actual ionic mobilities of their ionic forms were obtained by nonlinear regression analysis of pH dependence of their effective mobilities measured by CZE in BGEs within a wide pH range (2.0–12.0). From this dependence, also the isoelectric point (pI) of (lipo)peptides was estimated. The effective charge of these (lipo)peptides was determined from their cationic CITP analysis. The method is based on a linear relationship between the length of the ITP zone of the analyte and its effective charge and the injected substance amount [3].

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

References

- [1] V. Kašička, Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2021 – mid 2023), *Electrophoresis* 45 (2024) 165-198.

- [2] S. Štěpánová, V. Kašička, Applications of capillary electromigration methods for separation and analysis of proteins (2017–mid 2021), *Anal. Chim. Acta* 2022, 1209, 339447.
- [3] S. Štěpánová, V. Kašička: Determination of physicochemical parameters of (bio)molecules and (bio)particles by capillary electromigration methods, *J. Sep. Sci.* 47 (2024) 2400174.

On-line spojení elektromembránové extrakce s kapilární elektroforézou pro stanovení léčiv v lidské moči

Petr Tůma¹ a František Opekar²

¹ Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav hygieny, Ruská 87, 10000 Praha 10, ČR,

² Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2, ČR

e-mail: petr.tuma@lf3.cuni.cz

Elektromembránová extrakce (EME) představuje selektivní techniku pro úpravu klinických vzorků, kterou lze provádět v mikroměřítku s minimální spotřebou klinického materiálu a ostatních činidel [1]. V přednášce budou představeny konstrukce miniaturních EME sond [2, 3] a možnosti jejich on-line kombinace s kapilární elektroforézou [4]. Diskutovány budou zejména otázky zaměřené na spojení EME s kapilární elektroforézou prostřednictvím různých verzí flow gating interface [5], elektroforetická separace v krátkých kapilárách [6] v kombinaci s bezkontaktní vodivostní detekcí [7], využití 3D tisku pro konstrukci mikrofluidních zařízení a automatizace celého analytického procesu. Aplikační část se bude věnovat stanovení bazických aminokyselin [2], anestetika ketaminu [8] a syntetického opioidu metadonu [3] v lidské moči.

Reference

- [1] N. Drouin, P. Kubáň, S. Rudaz, S. Pedersen-Bjergaard, J. Schappler, Electromembrane extraction: Overview of the last decade, *Trac-Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.024>.
- [2] F. Opekar, P. Tůma, A new electromembrane extraction probe for on-line connection with capillary electrophoresis for determination of substances in biological matrices, *Talanta* 254 (2023) 124149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124149>.
- [3] F. Opekar, P. Tůma, A new coaxial flow-through probe for electromembrane extraction of methadone from clinical samples on-line coupled to capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 1300 (2024) 342461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342461>.
- [4] P. Tůma, Progress in on-line, at-line, and in-line coupling of sample treatment with capillary and microchip electrophoresis over the past 10 years: A review, *Anal. Chim. Acta* 1261 (2023) 341249. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341249>.

- [5] F. Opekar, P. Tůma, An air-assisted flow-gating interface for capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 40 (2019) 587-590. <https://doi.org/doi:10.1002/elps.201800421>.
- [6] F. Opekar, P. Coufal, K. Štulík, Rapid capillary zone electrophoresis along short separation pathways and its use in some hyphenated systems: A critical review, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4487-4499. <https://doi.org/10.1021/cr900018r>.
- [7] P. Tůma, Advances in the design and application of contactless conductivity detectors for separation, flow-through, microfluidic and sensing techniques: A review, *Anal. Chim. Acta* 1337 (2025) 343325. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343325>.
- [8] F. Opekar, P. Tůma, Electromembrane extraction of anesthetic ketamine on-line coupled to capillary electrophoresis, *Microchem. J.* 191 (2023) 108886. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108886>.

Charakterizace nanoobjektů kapilární elektroforézou

Daniel Baron, Elena Kučerová, Klára Kopřivová, Tomáš Pluháček, Jan Petr

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci,
17. listopadu 12, 77146 Olomouc*

e-mail: jan.petr@upol.cz

Klíčová slova: *kapilární elektroforéza, nanočástice, Taylorova disperzní analýza, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*

Kapilární elektroforéza (CE) představuje vysoce účinnou separační techniku, která našla své uplatnění i v oblasti charakterizace nanoobjektů. Nanoobjekty mají typicky velikost mezi 1 a 100 nm, někdy např. v případě nanotrubiček i do 500 nm v jedné dimenzi. Vlastnosti těchto útvarů (nanočástic, 2D materiálů, nanotrubiček) jsou silně závislé právě na velikosti a výrazně se liší od vlastností makroskopických materiálů.

V rámci tomto příspěvku bude zmíněn teoretický úvod do elektroforézy nanoobjektů – zejména pohled na strukturu, náboj a velikost nanomateriálů, dále teoretický popis elektromigrace a vlastní příklady aplikovatelnosti CE v analýze nanoobjektů. Budou zmíněny možnosti kontroly kvality syntézy nanočástic [1] a využití Taylorovi disperzní analýzy (TDA) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) pro určení velikosti nanoobjektů ve směsích [2]. Jako poslední pak bude diskutována možnost použití elektroforetického separačního kroku před TDA-ICP-MS analýzou pro přesné určování velikostí a koncentrací nanočástic v prostředí svých vlastních iontů.

Autoři děkují za podporu výzkumu Grantové agentuře ČR (projekt 25-17563S).

Reference

-
- [1] J. Petr, B. Teste, S. Descroix, J.-M. Siaugue, P. Gareil, A. Varenne, Separation of α -lactalbumin grafted- and non-grafted maghemite core/silica shell nanoparticles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 31 (2010) 2754–2761.
 - [2] D. Baron, T. Pluháček, J. Petr, Characterization of nanoparticles in mixtures by Taylor dispersion analysis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 96 (2024) 5658–5663.

Jak na HILIC – tutoriál

Nováková Lucie

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie

e-mail: novakoval@faf.cuni.cz

Klíčová slova: *HILIC, princip, stacionární fáze, mobilní fáze, rozpouštědlo vzorku*

Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) je důležitou technikou pro separaci polárních sloučenin, které jsou často špatně zadržovány v systému reverzních fází. HILIC metoda využívá polární stacionární fázi a mobilní fázi s vysokým obsahem organického rozpouštědla, obvykle acetonitrilu, čímž umožňuje efektivní retenci a separaci širokého spektra polárních analytů. Separační mechanismus HILIC zahrnuje kombinaci několika interakcí, přičemž tou hlavní je rozdělování mezi mobilní fázi a hydrofilní vodnou vrstvou, která se vytváří na povrchu stacionární fáze, a dále elektrostatické interakce, vodíkové vazby a dipólové interakce.

Tento komplexní mechanismus je silně ovlivněn složením mobilní fáze, pH, iontovou silou a typem stacionární fáze, což vyžaduje pečlivou optimalizaci těchto parametrů. Optimalizace HILIC metody tedy zahrnuje výběr vhodné stacionární fáze, složení mobilní fáze, nastavení pH a koncentrace solí, správné nastavení gradientové eluce, zejména pak přístupu ekvilibrace mobilní fáze. Podobně jako v jiných chromatografických metodách, faktorem změny selektivity může být i teplota. Ve srovnání s jinými chromatografickými módy hraje výraznější roli rozpouštědlo vzorku a dávkovaný objem.

Historie HILIC sahá až do 70. let, kdy byla poprvé popsána jako technika zaměřená na separaci sacharidů. V posledních desetiletích se však stala jednou z nejvíce používaných technik pro analýzu polárních látek v oblastech, jako jsou metabolomika, farmaceutická analýza, klinická chemie a environmentální vědy. Vývoj nových stacionárních fází, včetně chemicky modifikovaného silikagelu, polymerních matric a hybridních materiálů, výrazně rozšířil možnosti použití této techniky.

Navzdory mnoha výhodám přináší HILIC několik výzev, včetně problémů s reprodukovatelností, komplexních retenčních mechanismů a interakcí mezi maticí vzorku a stacionární fází. Přesné pochopení těchto faktorů a správná volba chromatografických podmínek jsou klíčem k úspěšné aplikaci této techniky.

HILIC in Practice: Solving the Challenges of Pharmaceutical Development

Michal Douša, Petr Gibala¹

¹Zentiva k.s. U Kabelovny 130, 10237 Praha, Česká republika

e-mail: *michal,.dousa@zentiva.com*

Keywords: *HILIC, pharmaceutical formulation, analysis*

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) has inherent advantages in the separation of hydrophilic or strongly polar substances due to strong hydrophilic interactions, which represents an attractive complementary approach to the reversed phase [1]. HILIC separations can be easily combined with a large number of spectrometric detection techniques such as UV/Vis, fluorescence, and mass spectrometry as well as nonspecific detection techniques such as RI, ELSD, and Corona CAD [2]. HILIC in conjunction with MS detection then allows for the direct determination of very hydrophilic or polar molecules that do not contain a chromophore in their molecule, such as dimethylamine, lysine or Bis(2-chloroethyl)amine in various pharmaceutical preparations. Several case studies were presented, one example being the determination of dimethylamine in metformin.

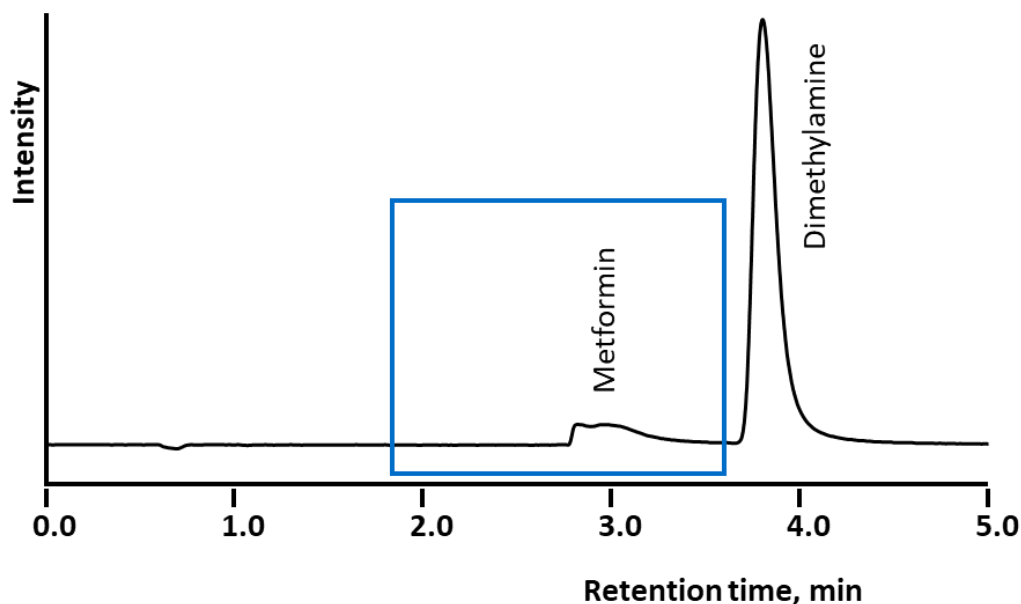


Fig. 1 Chromatographic conditions: Cortecs HILIC 3.0 × 150 mm; 2.7 μm (Waters), 20 mM ammonium formate pH 4.8 : acetonitrile (ACN); 25:75 (v/v) at a flow rate of 0.8 ml/min. Column temperature: 45 °C. The QDa MS detector set-up: positive ion mode with ESI capillary voltage: 0.5 kV. Cone voltage: 10 V, Desolvation temperature: 300 °C [3].

References

1. Q. Sheng, M. Liu, M. Lan, G. Qing, Hydrophilic interaction liquid chromatography promotes the development of bio-separation and bio-analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 165 (2023) 117148.
2. J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)* ISBN:9783527329281.
3. M. Douša, J. Jireš, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 191 (2020) 113573.

Aplikace HILIC separací v bioanalýze

Miroslav Kubát, Petr Česla

*Katedra analytické chemie, Fakulta Chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Pardubice, Česká republika*

e-mail: miroslav.kubat@student.upce.cz

Klíčová slova: *hydrofilní interakční chromatografie, metabolity, glutathion*

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je výbornou technikou kapalinové chromatografie (LC) pro separaci polárních a hydrofilních či ionizovatelných sloučenin, které obecně nejsou dobře zadržovány na reverzních fázích (RP). Může se jednat například o biogenní látky, jako jsou aminokyseliny a peptidy, cukry a oligosacharidy, nukleotidy a oligonukleotidy, nebo také polární metabolity různých farmak s glutathionem, cysteinem či kyselinou glukuronovou. Technika HILIC je tedy vhodnou alternativou k RP pro separaci takto polárních látek, které by jinak musely být derivatizovány, ať už za účelem snížení jejich polaritity či zavedení chromoforu pro umožnění UV detekce. Ze své podstaty je HILIC ideální technikou pro přímé spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Navíc mnoho polárních látek, jako jsou aminokyseliny, neobsahují žádný chromofor, a tedy velmi špatně absorbují UV záření, naopak přítomnost ionizovatelných funkčních skupin usnadňuje jejich detekci pomocí MS. Komerčně je dostupná široká škála stacionárních fází pro HILIC od holých silikagelových kolon, přes různé modifikace silikagelu a zwitteriony až po hybridní silikagel a polymerní modifikace zvyšující chemickou stabilitu [1]. Jednoduchou aplikací HILIC separace spojené s MS bylo například selektivní stanovení aminokyselin v zrnkách kávy bez nutnosti derivatizace, kdy jsme sledovali vliv doby pražení na obsah jednotlivých aminokyselin. HILIC technika najde své uplatnění také v cílené metabolomice glutathionu a jeho metabolických cyklů. Glutathion je hlavní intracelulární antioxidant, slouží tedy jako indikátor oxidačního stresu a také je biomarkerem mnoha chronických onemocnění, jako jsou diabetes mellitus, cystická fibróza, osteoartritida, onemocnění ledvin a jater, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění. Dále je indikátorem také akutních otrav např. paracetamolem či těžkými kovy, jelikož se podílí na jejich detoxifikaci [2]. Technika HILIC – MS/MS nám umožňuje monitorovat nejen glutathion, ale také celý jeho metabolismus v buněčných kulturách, které byly vystaveny působení toxinů či těžkých kovů. Hlubší porozumění metabolismu glutathionu může vést k efektivnější terapii při intoxikacích a teoreticky také ke zmírnění symptomů zmíněných chronických onemocnění.

The work was financially supported by the Czech Science Foundation, project No. 22-09556S.

REFERENCES

- [1] Nováková L., Douša M., Česla P., Urban J, 2024. Modern HPLC separations in theory and practice, Czech Chromatographic School, Brno.
- [2] Kubát M., Roušarová E., Roušar T., Česla P., 2024. Recent advances in separation methods for characterization of glutathione metabolism and dietary supplementation, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 176, 117751.

Seznam prezentovaných plakátových sdělení

- 1. Optimalizace metody přímého nástřiku pro stanovení auxinů v rostlinném materiálu pomocí HPLC-MS**
Hana Bendová, Ivan Petřík, Aleš Pěnčík
- 2. Study of salicylic acid metabolism in plants using mass spectrometry**
Beata Budíková, Jitka Šíroková, Asta Žukauskaitė, Ondřej Novák
- 3. From Drops to Data: An LC-MS Method for Monitoring of Anti-Seizure Medication in Saliva and Dried Blood Spot**
Viktória Ďurčová, Martina Osičková, Pavel Šmak, Ondřej Peš, Zdeněk Glatz, Marta Pelcová, Jan Juřica
- 4. Targeted Metabolomics in Spontaneous Tumor Regression**
Petra Chařová, Dominika Olesova, Petra Majerova, Andrej Kovac, Zuzana Bilkova, Ludovit Skultety, Juraj Piestansky
- 5. Development and optimization of UHPLC-MS/MS method for analysis of neurotransmitters**
Hana Chmelařová, Kristina Bohušová, Štefan Kosturko, Lucie Nováková
- 6. Vliv podmínek sušení na obsah zdraví prospěšných látek v listech ovocných stromů**
Aneta Bílková, Dáša Jiroušová, Lucie Šepsová
- 7. Targeted UHPLC–MS/MS-based profiling of oxysterols in blood serum**
Michal Kaleta, Jana Oklešťková, Miroslav Kvasnica, Ivan Petřík, Ondřej Novák
- 8. Removing contaminating ions in Q0 region to increase robustness of MS analyzer**
Tomáš Korba
- 9. Dilute and Shoot: A novel approach for determination of chlormequat and mepiquat in beer**
Jan Martiník, Marek Pernica, Simona Černá, Zdeněk Svoboda, Sylvie Běláková
- 10. HPLC-MS/MS study of new promising tacrine derivatives biotransformation**
Martin Novák, Ondřej Soukup
- 11. Extrakce klozapinu a jeho metabolitů ze suché kapky krve**
Marta Pelcová, Juraj Szilagyi, Viktória Ďurčová, Zdeněk Glatz, Jan Juřica
- 12. Achiral and chiral separations of brefeldin A and its derivatives by capillary micellar electrokinetic chromatography**
Petra Sázelová, Mikhail Klychnikov, Ullrich Jahn, and Václav Kašička
- 13. Problematika stanovení TFA ve vodě**
Marie Suchanová, Jana Ondřejková, Jana Kováčová

Seznam prezentovaných plakátových sdělení

14. Determination of Acidity Constants and Ionic Mobilities of (Lipo)Peptides Regulating Food Intake by Capillary Electrophoresis

Veronika Šolínová, Adéla Křížková, Lenka Maletínská, Václav Kašička

15. Assessment of acid-base properties of chloro-nitrobenzoic acids involved in salt/cocrystal systems with quinoline by capillary electrophoresis

Sille Štěpánová, Sille Štěpánová, Jakub Radek Štoček, Jan Blahut, Simona Chalupná, Jan Čejka, Michal Hušák, Martin Dračínský, Václav Kašička

Pokyny pro prezentaci plakátových sdělení

*Prosíme všechny prezentující, aby svá plakátová sdělení **vyvěsili v průběhu pondělního dopoledne**. Diskuse u plakátových sdělení budou probíhat volně v průběhu přestávek na kávu, případně po ukončení odborného programu.*

Hodnocení plakátových sdělení provedou členové nezávislé hodnotící komise a vyberou tři vítěze, kteří budou oceněni.

Vyhlášení nejlepších plakátových sdělení proběhne po ukončení poslední odborné sekce ve středu 21. 05. 2025.

Optimalizace metody přímého nástřiku pro stanovení auxinů v rostlinném materiálu pomocí HPLC-MS

Hana Bendová, Ivan Petřík, Aleš Pěnčík

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

e-mail: hana.bendova01@upol.cz

Klíčová slova: auxiny, fytohormony, extrakce, HPLC-MS

Auxiny představují skupinu fytohormonů, které se podílejí na regulaci vývojových a růstových procesů rostlin. Mají například vliv na růst a diferenciaci buněk, tropické reakce i celkovou morfogenezi rostlin. Jejich účinky jsou silně závislé na koncentraci, lokalizaci a vývojovém stadiu pletiva.

Analytické stanovení auxinů je vzhledem k jejich nízkým koncentracím a komplexním rostlinným maticím náročná a klade vysoké nároky na citlivost použité metody. Standardní přístupy obvykle využívají složitý protokol zahrnující purifikaci vzorku, nejčastěji pomocí SPE, která slouží ke snížení obsahu maticích látek a omezení maticích efektů. Tento krok má své opodstatnění, ale zároveň nese nevýhody v podobě možné ztráty analytu, časové náročnosti a rizika ztráty volatilních sloučenin během odpařování.

Metoda přímého nástřiku je založena na aplikaci extraktu bez předchozího přečištění. Výhodou je eliminace kroků, při kterých může docházet ke ztrátám analytu, a zjednodušení celého pracovního postupu. Na druhou stranu se tím zvyšují nároky na výkon a robustnost analytického přístroje, zejména kvůli maticím efektům. Tyto metody jsou běžně využívány v humánní metabolomice, kde je matrice (např. plazma) výrazně jednodušší než u rostlinných vzorků. Rozhodli jsme se proto prozkoumat možnosti využití této strategie i pro analýzu fytohormonů.

Ukázalo se, že 10% methanol je vhodným rozpouštědlem pro extrakci auxinů, který je zároveň kompatibilní se zavedenými chromatografickými metodami. To eliminuje nutnost měnit rozpouštědla a umožňuje provést extrakci i analýzu ve stejném prostředí. Celkový signál v hmotnostní spektrometrii však může být ovlivněn nejen volbou solventu, ale také extrakčním objemem, hmotností vzorku nebo objemem nástřiku. Cílem této studie je proto nalézt nejvhodnější kombinaci těchto tří parametrů. Vzhledem k tomu, že výsledné hodnoty jsou ovlivněny maticovými efekty a extrakční kapacitou, není postupná změna jednotlivých parametrů vždy spolehlivou cestou k nalezení pravého optima. Z tohoto důvodu jsme zvolili přístup faktoriálního návrhu experimentu, který umožňuje optimalizaci všech parametrů současně pomocí mnohonásobné lineární regrese.

Předběžné výsledky naznačují, že po důkladné optimalizaci může být metoda přímého nástřiku účinně využitelná i v rostlinné metabolomice a při analýze fytohormonů.

Tato práce byla podpořena prostřednictvím ERC Synergy projektu STARMORPH (č. 101166880) v rámci výzkumného a inovačního programu Evropské unie Horizon Europe.

Study of salicylic acid metabolism in plants using mass spectrometry

Beata Budíková¹, Jitka Šíroková¹, Asta Žukauskaitė², Ondřej Novák¹

¹*Laboratory of Growth Regulators*

*Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences & Palacký University,
Šlechtitelů 27, 77900 Olomouc, Czech Republic*

²*Department of Chemical Biology*

*Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-77900 Olomouc, Czech
Republic*

e-mail: beata.budikova@upol.cz

Keywords: *salicylic acid, plant immunity, metabolism, mass spectrometry, LC-MS/MS*

Plant immunity is defined as the capacity of plants to prevent or ward off biological attacks by pathogens. It involves the recognition of the pathogen by specific receptors and the triggering of signalling pathways leading to processes that help plants defend themselves. The defence signalling is mediated by the cross-communication of groups of plant hormones. Salicylic acid (SA) is one of the most pronounced plant hormones involved in control of immunity and defence mechanisms in plants. Defence related SA accumulation comes from its biosynthesis, transport and possible release from some of its metabolites. The involvement of SA biosynthetic pathways as well as extend of SA metabolism in various plant species are still under investigation. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is one of the most commonly used analytical techniques in plant hormone quantification. The selectivity and high sensitivity enable to track typically low concentrations of phytohormones. The comprehensive multiclass phytohormone LC-MS/MS profiling methods usually include only SA (as the active compound) from the group of SAs. LC-MS/MS methods for determination of defence related phytohormones focus on SA, or some on its biosynthetic precursors or metabolites. In this study, we focus on identification of new SA metabolites and development of liquid chromatography-mass spectrometry methods.

From Drops to Data: An LC-MS Method for Monitoring of Anti-Seizure Medication in Saliva and Dried Blood Spot

Viktória Ďurčová¹, Martina Osičková¹, Pavel Šmak², Ondřej Peš², Zdeněk Glatz¹, Marta Pelcová¹, Jan Juřica^{3,4}

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

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

³*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Masaryk University Brno, Czech Republic*

⁴*Hospital Pharmacy, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic*

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

Keywords: saliva, ASM, DBS, LC-MS

An optimized LC-MS method was developed for the simultaneous quantification of seven antiseizure medication (ASM) in alternative biological matrices—saliva and dried blood spots (DBS). Reasoning is based on growing interest in the assessment of ASM in non-traditional matrices and their potential application in therapeutic drug monitoring and personalized treatment. Saliva provides a non-invasive and easily accessible alternative to venous blood sampling, while DBS enables minimally invasive collection of capillary blood, making both matrices suitable for clinical and pharmacokinetic studies or for routine therapeutic drug monitoring on outpatient settings.

Method's applicability is demonstrated by the low-volume sampling of 20 µL of saliva and 45 µL of capillary blood. An extraction based on organic solvent-induced protein precipitation was employed for both matrices, using a methanol, acetonitrile, and water mixture (7:2:1, v/v/v) to efficiently extract all seven analytes. Our data indicated that an extraction solvent mixture is suitable for both matrices and overall workflow including LC-MS leads to accurate and precise results. The simple sample preparation approach enabled reliable analysis from small volumes documented by linear calibration lines in the range from 1 to 100 µg/mL for most of drugs in the study and 10-150 µg/mL for valproic acid in DBS. Concentration range in saliva was derived from free fraction concentration, the part of drug which is not bound to plasma proteins. To generalize, the range in saliva was mostly 0.5-50 µg/mL, only for levetiracetam it was the same range as in DBS due to its low protein binding.

Further, all ASM were successfully quantified in positive ionization mode—including valproic acid, which is commonly determined in negative mode. Additionally, samples from the selected group of patients were analysed and the resulting concentrations were compared with plasma levels determined by the hospital's established clinical method. The results are promising for future clinical validation and prospective studies with vulnerable patient populations or home sampling scenarios.

This work was financially secured by Czech Health Research Council, project No. NU23-08-00229.

Targeted Metabolomics in Spontaneous Tumor Regression

Petra Chalova^{1,2}, Dominika Olesova³, Petra Majerova¹, Andrej Kovac^{1,4}, Zuzana Bilkova⁵,

Ludovit Skultety², Juraj Piestansky^{1,4}

1 Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

2 Institute of Virology, Biomedical Research Center of SAS, Bratislava, Slovakia

3 Turku Bioscience Centre, University of Turku, Turku, Finland

4 Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovakia

5 Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czechia

e-mail: petra.chalova@savba.sk

Keywords: *Amino acids, Lipidomics, Metabolomics, Cancer*

Metabolomic profiling enables comprehensive characterization of small-molecule metabolites in biological samples and offers critical insights into disease progression, therapeutic response, and physiological stress. Metabolomics plays a pivotal role due to the functional relevance of metabolites in core cellular processes and their sensitivity to pathological alterations.

In this study, we investigated metabolic changes in cancer patients with and without spontaneous tumor regression, focusing on amino acid and lipid metabolism. Quantitative analysis of 20 proteinogenic amino acids revealed that levels of glutamine (Gln), glycine (Gly), serine (Ser), and proline (Pro), closely linked to oncological processes, varied significantly with disease stage, and were distinctly altered in patients exhibiting spontaneous tumor regression. These findings suggest that their metabolic flux is closely associated with anabolic pathways driving tumor progression or regression. Further investigation revealed alterations in isoleucine (Ile), arginine (Arg), tryptophan (Trp), and lysine (Lys), amino acids known to support cancer cell proliferation, immune evasion, and apoptotic resistance, underscoring their involvement in cancer-specific metabolic reprogramming. In addition to amino acid dysregulation, substantial differences in lipid metabolism were observed between patients with active disease and those in remission. Notably, the levels of sphingomyelins (SMs), triglycerides (TGs), and phosphatidylethanolamines (PEs) differed significantly, potentially reflecting a shift from tumor-associated lipid remodeling to lipid profiles characteristic of metabolic stabilization and cellular homeostasis in non-cancerous states.

These findings support the hypothesis that distinct metabolic signatures, particularly in amino acid and lipid metabolism, are linked to tumor behavior and may serve as potential biomarkers for disease monitoring and therapeutic outcomes.

This work was supported by grants APVV-22-0313, APVV-21-0321, and VEGA 2/0075/24.

Development and optimization of UHPLC-MS/MS method for analysis of neurotransmitters

Hana Chmelařová, Kristina Bohušová, Štefan Kosturko, Lucie Nováková

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

e-mail: chmelarha@faf.cuni.cz

Keywords: *neurotransmitters, method development, UHPLC-MS/MS*

Neurotransmitters are crucial chemical messengers involved in the regulation of numerous physiological and neurological processes, including mood, cognition, and motor control. Accurate analysis of these compounds in biological matrices is essential for clinical diagnostics and neuroscience research. However, the analysis of neurotransmitters presents significant analytical challenges due to their low endogenous concentrations, diverse physicochemical properties, and inherent instability.

The objective of this study was to develop and optimize a method for the analysis of ten selected neurotransmitters using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). During method development, various stationary phases were evaluated in both reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) modes. In the reversed-phase mode, different types of C18 stationary phases were tested, along with a pentafluorophenyl (PFP) stationary phase. Similarly, several HILIC stationary phases were evaluated, such as those modified with amide groups or charged functionalities. Various mobile phase compositions were also tested: aqueous components with different pH and methanol and acetonitrile as organic modifiers. Methanol, when used as an organic modifier in the reversed phases mode, did not significantly improve separation performance compared to acetonitrile; however, it enhanced sensitivity for certain analytes. The solvent used for the standard mixture also had a notable impact on peak shape and MS/MS detection sensitivity. Additionally, the stability of selected analytes was evaluated in different solvents (water, acetonitrile, and a mixture of water/acetonitrile 1/1 (v/v)) and in the presence of additives regulating pH (0.1% formic acid, 1% formic acid, or 3% NH₃). Some analytes exhibited very poor stability under basic pH conditions, which should be carefully considered during method development for sample preparation.

This work was supported by the project NETPHARM, ID CZ.02.01.01/00/22_008/0004607.

Vliv podmínek sušení na obsah zdraví prospěšných látek v listech ovocných stromů

BÍLKOVÁ A., JIROUŠOVÁ D., ŠEPSOVÁ L.

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

e-mail: jirousova@vsuo.cz

Keywords: *fenolické látky, jabloňové a hrušňové listí, technologie sušení*

Fenolické sloučeniny představují různorodou skupinu látek, která obsahuje minimálně jednu hydroxylovou funkční skupinu vázanou na benzenový kruh. Mezi rostlinné fenoly řadíme fenolové kyseliny a jejich deriváty, třísloviny, flavonoidy a další. Jsou to látky vykazující redukční a antioxidační účinky. Bohatým zdrojem těchto zdraví prospěšných látek je ovoce. Existují rozdíly v obsahu fenolických látek v rámci různých odrůd, ale i částí ovocných stromů [1]. Právě listy, jakožto zdroj polyfenolických látek, mohou být v rámci recyklace zemědělského materiálu využity jako potencionální surovina pro další zpracování. Náš výzkum se zabýval selekcí vhodného hrušňového a jabloňového listí s vysokým obsahem vybraných fenolických látek (floridzin, kyselina chlorogenová, rutin a kvercitrin u jabloně, arbutin u hrušně) během vegetačního období. K testování byly vybrány běžně pěstované komerční odrůdy jabloně: 'Gala', 'Golden Del.', 'Idared' a hrušně: 'Konference', 'Thirriotova' 'Williamsova'. Dále výzkumem vlivu sušení na obsah těchto látek. Byly porovnány následující techniky sušení: laboratorní teplota 21 °C, lyofilizace, sušárna 35 °C a velkokapacitní sušárna 35 °C. Vzorky byly analyzovány pomocí optimalizované a validované metody HPLC-DAD.

Vzhledem k tomu, že se jedná o využití odpadní biomasy po sklizni plodů, jeví se jako ideální pro odběr listí s vysokým obsahem floridzinu měsíc září. V následujících měsících již docházelo většinou k poklesu jeho obsahu. Technologie sušení vhodná pro zachování floridzinu v listech se jeví sušení při teplotě 35 °C. Obdobné výsledky byly pozorovány i u arbutinu v hrušňovém listí. Odrůda hrušně s nejvyšším obsahem arbutinu byla pozdní odrůda 'Thirriotova'.

References

-
- [1] A. Wojdylo, P. Nowicka, P. I. Turkiewicz, K. Ktacz, F. Hernandezm, Comparison of bioactive compounds and health promoting properties of fruits and leaves of apple, pear and quince, Sci Rep 11 (2021) 20253.

Targeted UHPLC–MS/MS-based profiling of oxysterols in blood serum

Michal Kaleta^{1,2}, Jana Oklešťková¹, Miroslav Kvasnica¹, Ivan Petřík¹, Ondřej Novák¹

¹ *Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, 779 00 Olomouc, Czech Republic*

² *Department of Neurology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, 779 00 Olomouc, Czech Republic*

e-mail: michal.kaleta@upol.cz

Keywords: *oxysterols, serum, ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*

Oxysterols represent an important group of oxygenated cholesterol derivatives that are considered natural regulators of cellular signalling [1–4]. They exhibit immunomodulatory properties and are physiologically involved in various processes, such as the biosynthesis of steroid hormones and fatty acids, as well as the maintenance of cholesterol homeostasis. They are also believed to play a role in the pathogenesis of a wide range of diseases, including cardiovascular (e.g. atherosclerosis), neurodegenerative (e.g. Alzheimer's disease), oncological (e.g. breast, lung, or gastric cancer), and other disorders [2, 4–7]. In the human body, oxysterols are primarily formed through intracellular enzymatic oxidation of cholesterol, although their production can also result from non-enzymatic autooxidation. A prerequisite for the comprehensive study of oxysterol metabolism is the availability of reliable analytical tools.

This study presents a high-performance analytical method based on time-efficient sample preparation and sensitive detection using ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS), enabling metabolic profiling of selected oxysterols in human blood serum. Highly efficient chromatographic separation on a reversed-phase column enables the simultaneous profiling of ten metabolically related oxysterol compounds in a single experiment, even from serum samples of only a few microlitres. The developed and validated method is suitable for targeted metabolomic studies aimed at monitoring changes in oxysterol metabolic pathways under various physiological and pathological conditions. The results obtained may contribute to the identification of potential biomarkers for disease prevention, diagnosis, or progression monitoring, and support the development of improved therapeutic strategies.

This work was supported by the project "Interdisciplinární přístupy pro vývoj a aplikace nových materiálů v medicínské praxi – Nové omické technologie" (CZ.02.01.01/00/23_021/0009224).

References

- [1] K. Borah, O. J. Rickman, N. Voutsina, I. Ampong, D. Gao, E. L. Baple, I. H. Dias, A. H. Crosby, H. R. Griffiths, A quantitative LC-MS/MS method for analysis of mitochondrial-specific oxysterol metabolism. *Redox Biol.* 36 (2020) 101595.
- [2] L. Chen, R. Xiu, H. Wang, L. X. Wang, G. M. Wu, J. Liang, X. F. Han, Simultaneous quantification of ten oxysterols based on LC–MS/MS and its application in atherosclerosis human serum samples. *Chromatographia.* 82 (2019) 553–564.
- [3] F. A. de Freitas, D. Levy, C. O. Reichert, E. Cunha-Neto, J. Kalil, S. P. Bydlowski, Effects of oxysterols on immune cells and related diseases. *Cells.* 11 (2022) 1251.
- [4] A. Kloudova-Spalenkova, P. Holy, P. Soucek, Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *Br. J. Pharmacol.* 178 (2021) 3235–3247.
- [5] I. H. K. Dias, H. Shokr, F. Shephard, L. Chakrabarti, Oxysterols and oxysterol sulfates in Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid. *J. Alzheimers Dis.* 87 (2022) 1527–1536.
- [6] A. Papassotiropoulos, D. Lütjohann, M. Bagli, S. Locatelli, F. Jessen, M. L. Rao, W. Maier, I. Björkhem, K. von Bergmann, R. Heun, Plasma 24S-hydroxycholesterol: A peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 11 (2000) 1959–1962.
- [7] A. Kloudova-Spalenkova, Y. F. Ueng, S. Wei, K. Kopeckova, F. Peter Guengerich, P. Soucek, Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 197 (2020) 105566.

Removing contaminating ions in Q0 region to increase robustness of MS analyzer

Tomáš Korba

AMEDIS, Praha

e-mail: korba@amedis.cz

Keywords: *LC/MS/MS, Mass Guard, contamination, robustness*

The role of the interface in mass spectrometer with atmospheric ionization is to remove neutral particles and focus as many ions as possible into mass analyzer. Beside ions of interest, also ions of background are focused. In triple quadrupole analyzer (QQQ) quadrupole 1 (Q1) selects ions that continue to collision cell (Q2) and quadrupole 3 (Q3). Unused ions are discharged by collisions with Q1 causing a deposit of contamination. This leads to the decrease of performance, especially the sensitivity.

Novel bandpass filter, Mass Guard, in SCIEX Triple Quad 7500+, allows to remove unwanted ions already in the interface region, namely quadrupole 0 (Q0). T shape electrodes are inserted between rods of Q0. Applied voltage adds octapole component to the radial trapping field leading to the destabilization of bands of ions outside of the range of interest.

The outcome is improved robustness when working with complex matrices. Cleaning of analyzer parts is less frequent.

Dilute and Shoot: A novel approach for determination of chlormequat and mepiquat in beer

Jan MARTINÍK^{1,2*}, Marek PERNICA¹, Simona ČERNÁ¹, Zdeněk SVOBODA^{1,3},

Sylvie BĚLÁKOVÁ¹

¹*Research Institute of Brewing and Malting, Mostecká 917/7, 61400 Brno*

²*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 160 00 Praha*

³*Institute of Food Science and Biotechnology, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno*

e-mail: martinik@beerresearch.cz

Keywords: *Dilute and Shoot, Chlormequat, Mepiquat, Liquid Chromatography, Mass spectrometry*

The extensive use of pesticides in agriculture has led to the presence of their residues in soil, water sources, and crops. Among these, the herbicides chlormequat and mepiquat are commonly employed to regulate plant growth. Both function by inhibiting gibberellin biosynthesis: chlormequat limits cell elongation, resulting in shorter, sturdier stems, while also influencing the plant's developmental cycle, promoting flowering and increasing yield. Mepiquat exhibits similar effects due to its comparable mode of action.

The European Union has established maximum residue limits (MRLs) in barley at 7 mg/kg for chlormequat and 4 mg/kg for mepiquat. However, the extent to which these compounds are transferred from raw brewing materials into beer remains poorly understood, and no regulatory limits currently exist for their concentrations in beer.

This study aimed to develop and validate a rapid, cost-effective, and straightforward analytical method for the simultaneous determination of chlormequat and mepiquat in beer. A Dilute and Shoot strategy was evaluated: degassed beer samples were diluted with acetonitrile and analysed using a Waters Acquity UPLC system coupled with a XEVO TQ-S micro mass spectrometer with electrospray ionization (ESI). Chromatographic separation was achieved using an isocratic elution on a Kinetex® 1.7 µm (100 × 2.1 mm) HILIC column. Method performance was assessed in terms of linearity, detection and quantification limits, precision, and accuracy. Recoveries were 89% for chlormequat and 84% for mepiquat, with relative standard deviations (RSDs) not exceeding 4%. A total of 86 beer samples were analysed, revealing contamination in 77% of samples, with concentrations ranging from 0.1 to 45.3 µg/L.

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic institutional support MZE-RO1923 and by the Specific University Research Project – A1_FPBT_2025_005.

HPLC-MS/MS study of new promising tacrine derivatives biotransformation

Novak, M., Soukup, O.

Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

e-mail: martin.novak@fnhk.cz

Keywords: *tacrine, Alzheimer's Disease, biotransformation*

Current symptomatic pharmacotherapy of Alzheimer's disease primarily focuses on acetylcholinesterase inhibitors and NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor blocking. Tacrine, a molecule with both of the above mechanisms of action was withdrawn from the market in 2013 due to the hepatotoxicity of its metabolite 7-OH-tacrine.¹ The introduction of phenoxy-group to position 7 or chlorine into position 6 led to 7-phenoxy-, and 6-chloro-tacrine. These substitutions may potentially hinder the formation of toxic species.

The main aim of our work was to develop a very selective UHPLC-Orbitrap method to reveal whether the tacrine substitution reduces the formation of 7-OH-tacrine. Our newly developed UHPLC-MS/MS method enabled the separation and identification of sixteen tacrine, fifteen 7-phenoxy-, and fourteen 6-chloro-tacrine structurally very similar metabolites.¹ The main biotransformation pathway of these compounds is their mono- and di-hydroxylation. Moreover, in MS spectra some newly discovered unpublished tacrine metabolites were found. Based on the relative amount of individual metabolites, it was revealed that 7-phenoxy- and 6-chloro- substitution of the tacrine moiety significantly reduced the formation of the toxic precursor 7-OH-tacrine. In addition, some of the identified metabolites proved promising acetylcholinesterase inhibition in combination with NMDA receptor blocking and could be therefore considered as potentially useful drugs in Alzheimer's disease therapy.

References

[1] M. Novak, B. Svobodova, J. Konecny, A. Kuratkova, L. Nevosadova, L. Prchal, J. Korabecny, V.M. Lauschke, O. Soukup, R. Kucera. UHPLC-Orbitrap study of the first phase tacrine in vitro metabolites and related Alzheimer's drug candidates using human liver microsomes. JPBA. 224 (2023), 115154.

Extrakce klopazinu a jeho metabolitů ze suché kapky krve

Marta Pelcová¹, Juraj Szilagyí¹, Viktória Ďurčová¹, Zdeněk Glatz¹, Jan Juřica^{2,3}

¹Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika,

²Farmakologický ústav a Ústav biochemie, Lékařská fakulta a Ústav farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika,

³Ústavní lékárna, Masarykův onkologický ústav, Brno, Česká republika.

e-mail: 14045@mail.muni.cz

Keywords: *suchá kapka krve, extrakce, odběrová karta, LC-MS*

Suchá kapka krve je alternativní biologická matrice, která je dobře zavedená v novorozeneckém screeningu závažných a vzácných onemocnění. V posledním desetiletí je tento typ vzorku kapilární krve intenzivně studován pro využití při terapeutickém monitorování léčby a personalizované medicíně. Stanovení analytu pak probíhá ideálně z celé skvrny známého objemu (10-50 µl), což zajišťuje správnost analýzy s ohledem na možnou variabilitu hematokritu.

Klozapin je atypické antipsychotikum, které bývá nejčastěji indikováno při léčbě rezistentní schizofrenie. Jeho dávka je nastavována postupně tak, aby byly minimalizovány nežádoucí účinky. Plazmatické koncentrace klopazinu vykazují poměrně značnou interindividuální, ale i intraindividuální variabilitu. Dodržování léčby je pak kritickým aspektem managementu schizofrenie, protože nízká adherence vede k nízké efektivitě. Terapeutické monitorování léčby je také doporučeno z důvodu úzkého terapeutického rozmezí a omezení toxických účinků léčiva. V současnosti se provádí z plazmy, jež vyžaduje odběr zhruba 5 ml plné krve.

Důležitou součástí analytického procesu je zpracování vzorku před samotnou analýzou (dnes nejčastěji LC-MS). V případě suché kapky krve jde o uvolnění analytu z matrice, extrakci a případné další přečištění/zjednodušení matrice vzorku před separací. Cílem tohoto projektu bylo stanovit vliv nosiče suché kapky (dva typy odběrových karet a jedna polymerní matrice), vliv zvlhčení, složení extrakční směsi a doby extrakce/eluce na extrakční účinnost klopazinu a jeho metabolitů – N-desmethyloklopazinu a klopazin-N-oxidu. Pro analýzu byly využity LC-MS metoda pomocí gradientové eluce na Kinetex C18 koloně (Phenomenex, Německo). LC eluát byl přes ESI zdroj zaveden do hmotnostního spektrometru (Ion Trap 6320, Agilent Technologies, Německo). Identifikace byla provedena na základě retenčního času a m/z ($[M+H]^+$). Po optimalizaci podmínek byla metoda validována v základních parametrech. Prospektivně budou korelovány koncentrace klopazinu a jeho metabolitů stanovené v DBS připravených různými způsoby s koncentracemi stanovenými v plazmě u reálných pacientů.

Tato práce byla finančně podpořena projektem MUNI/A/1684/2024.

Achiral and chiral separations of brefeldin A and its derivatives by capillary micellar electrokinetic chromatography

Petra Sázelová, Mikhail Klychnikov, Ullrich Jahn, and Václav Kašíčka

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences,
Flemingovo nám. 542/2, Prague 6, Czech Republic
e-mail: sazelova@uochb.cas.cz*

Keywords: *brefeldins, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, chiral separation, capillary micellar electrokinetic chromatography*

Brefeldin A (BFA) is a 13-carbon macrolide lactone antibiotic possessing antitumor, antiviral, and antifungal activities. It was first isolated (with the original name decumbin) from *Penicillium decumbens* by Singleton et al. [1]. During past years, BFA has been totally synthesized by several methods. Although BFA exhibits strong cytostatic activity accompanied by low toxicity, it could not be established as an anticancer agent because of its low bioavailability and poor pharmacokinetics. Therefore, it was necessary to prepare its analogs and derivatives with cytostatic activity similar to that of BFA but with improved *in vivo* stability and solubility in aqueous systems.

In this contribution, achiral and chiral separations of BFA and its several derivatives including their diastereomers will be presented. All compounds were analyzed by a special method—capillary micellar electrokinetic chromatography (MEKC). MEKC is able to separate and analyze neutral compounds based on their different interactions with micellar pseudostationary phase. The analyses were performed in Beckman-Coulter MDQ analyzer equipped with diode array UV-absorption detector set at 200 nm, and bare fused silica capillary, ID/OD 50/375 μm , total/effective length 399/297 mm.

For the purity analyses, the background electrolyte (BGE) consisted of 20 mM Tris, 5 mM H_3PO_4 , 50 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 8.1, where SDS formed micellar pseudostationary phase. The sample purity varied from 32.9 % to 92.3 %.

Diastereomers were separated in the above BGE containing 10–60 mg/mL of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2-HP- β -CD) as a chiral selector. All pairs of diastereomers were baseline separated with resolutions higher than 1.5. The effective electrophoretic mobilities of all analytes in the dependence on the concentration of 2-HP- β -CD in BGE were calculated from the MEKC data. They varied in the range from -36.9 to -34.9 [$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$] in BGE free of chiral selector and in the range from -18.9 to -5.2 [$10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$] in the BGE containing 60 mg/mL of 2-HP- β -CD.

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

References

[1] V.L. Singleton, N. Bohonos, A.J. Ullstrup. Decumbin, a new compound from a species of *Penicillium*. *Nature* 1958, 181, 1072–1073.

Problematika stanovení TFA ve vodě

Marie Suchanová, Jana Ondřejková, Jana Kováčová

ALS Czech Republic, s. r. o.

e-mail: *marie.suchanova@alsglobal.com*

Klíčová slova: *TFA, PFAS, LC/MS-MS*

Trifluorooctová kyselina (TFA) se řadí mezi tzv. per- a polyfluorované alkylové látky (PFAS) s ultrakrátkým řetězcem (USC-PFAS) obsahujícím tři a méně atomů uhlíku. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem USC-PFAS volně disociují ve vodním prostředí a jsou méně náchylné k sorpci na přírodní pevné látky. V důsledku vysoké mobility ve vodním prostředí se mohou šířit daleko od zdrojů kontaminace. TFA je v životním prostředí nacházena v atmosféře, vodě i v půdě a její kumulativní uvolňování z četných zdrojů vyvolává obavy z potenciálních dlouhodobých rizik.

Navzdory zjištěnému výskytu a potenciálním rizikům TFA zatím není v mnoha zemích specificky regulována. Na úrovni Evropské unie ani v mnoha členských státech neexistují specifické právně závazné limity pro pitnou vodu nebo v životní prostředí. Některé členské státy jako Dánsko, Německo, Holandsko a Švédsko mají nastaveny vlastní prahové hodnoty pro pitnou vodu. Sledování TFA je zahrnuto také v rámci Směrnice EU 2020/2184 o jakosti vod určené k lidské spotřebě v rámci parametru „celkové (total) PFAS“. Směrnice bude od roku 2026 závazná pro členské státy EU. Probíhají také diskuse a připravují se návrhy na omezení nebo zákaz používání látek, ze kterých TFA vzniká (PFAS s delším řetězcem, některé pesticidy, chladiwa atd).

Tento příspěvek se zaměřuje na problematiku stanovení TFA ve vodách pomocí techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), kdy je vzorek analyzován bez výrazné předchozí úpravy, či zakoncentrování, metodou přímého nástřiku. Diskutovány budou jednotlivé kroky optimalizace metody, jako výběr vhodných rozpouštědel (z pohledu čistoty), složení mobilní fáze, výběr vhodné analytické kolony, objem nástřiku vzorku. Výsledky budou hodnoceny především z pohledu matričních efektů a dosažitelnosti limitů kvantifikace metody na úrovni 0,03 µg/L.

Reference:

1. Brendel, S., Fetter, É., Staude, C. *et al.* Short-chain perfluoroalkyl acids: environmental concerns and a regulatory strategy under REACH. *Environ Sci Eur* 30, 9 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0134-4>
2. Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepracované znění) (Text s významem pro EHP); Směrnice - 2020/2184 - CS - EUR-Lex
3. ALS internal document: EnviroMail_158_Australia and New Zealand: Out from the shadows - Lifting the veil on ultrashort per- and polyfluoralkyl substances (USD-PFAS) - analysis, occurrence, remediation, and emerging regulations, dostupné na <https://www.alsglobal.com/en/News-and-publications/2025/03/USC-PFAS-analysis-occurrence-remediation-and-emerging-regulations>

Determination of Acidity Constants and Ionic Mobilities of (Lipo)Peptides Regulating Food Intake by Capillary Electrophoresis

Veronika Šolínová, Adéla Křížková, Lenka Maletínská, Václav Kašička

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo náměstí 542/2, 160 00 Praha 6, Czech Republic

e-mail: veronika.solinova@uochb.cas.cz

Keywords: peptides, acidity constant, capillary zone electrophoresis

New lipidized analogs of peptides (ghrelin, prolactin-releasing peptide (PrRP) and cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CARTP)) are studied for regulation of food intake [1]. Prior to their application, nine newly synthesized (lipo)peptides (3.3-4.7 kDa) have to be analyzed and characterized. Hence, the aim of this work was to characterize their acid-base and electromigration properties by capillary zone electrophoresis (CZE). CZE was employed for the determination of thermodynamic acidity constants (pK_a) and actual ionic mobilities of the above nine (lipo)peptides. Their effective electrophoretic mobilities were measured by CZE in a series of the BGEs within a wide pH range (2.0-12.0), at constant ionic strength (25 mM) and constant temperature (25°C) [2]. Thermodynamic pK_a of acidic groups such as α -COOH was in the range 1.69-2.98, pK_a of carboxyl group of Asp was in the range 2.01-3.59, pK_a of carboxyl group of Glu was in the range 3.23-4.76, hydroxyl group of Tyr was in the range 9.74-9.97, and pK_a of basic groups, such as imidazolium group of histidine residues was in the range 5.83-7.20, pK_a of α -NH₃⁺ group was in the range 7.24-7.90, and pK_a of ϵ -NH₃⁺ group of lysine spanned the interval 10.01-10.34, and pK_a of guanidinium group of Arg was in the range 10.64-11.24, depending on the particular amino acid sequence of the peptides and fatty acid attached to peptide chain.

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

References

- [1] J. Zemenová, D. Sýkora, H. Adámková, L. Maletínská, T. Elbert, A. Marek, M. Blechová, Novel approach to determine ghrelin analogs by liquid chromatography with mass spectrometry using a monolithic column, *J. Sep.Sci.*, 40 (2017) 1032-1039.
- [2] V. Šolínová, J. Brynda, V. Šícha, J. Holub, B. Gruner, V. Kašička, Determination of acidity constants, ionic mobilities, and hydrodynamic radii of carbene-based inhibitors of carbonic anhydrases by CZE, *Electrophoresis*, 42 (2021) 910-919.

Assessment of acid-base properties of chloro-nitrobenzoic acids involved in salt/cocrystal systems with quinoline by capillary electrophoresis

Sille Štěpánová^a, Jakub Radek Štoček^{a,b}, Jan Blahut^a, Simona Chalupná^c, Jan Čejka^c,
Michal Hušák^c, Martin Dračínský^a, Václav Kašička^a

^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences
Flemingovo nam. 2, 160 00 Prague 6, Czechia*

^b*Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague*

^c*Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology*

e-mail: sille.stepanova@uochb.cas.cz

Keywords: acidity constant, capillary electrophoresis, chloro-nitrobenzoic acids

Cocrystal-based drugs are of ongoing interest for pharmaceutical industry as this technology allows to improve the stability, solubility, and bioavailability of drugs without changing their structure. In this work, the acidity constants of five chloro-nitrobenzoic acids that were part of salt/cocrystal systems composed of chloro-nitrobenzoic acid positional isomers and quinoline were determined by capillary electrophoresis (CE). The mixed acidity constants, $pK_{a,mix}$, and the actual ionic mobilities of the chloro-nitrobenzoic acids were determined by the nonlinear regression analysis of the pH dependence of their effective electrophoretic mobilities [1]. The CE measurements of effective mobilities were performed in aqueous background electrolytes in pH range 0.95–6.00 at constant temperature (25°C) and ionic strength (25 mM; except for two lowest pH values). The $pK_{a,mix}$ values were recalculated to the thermodynamic acidity constant, $pK_{a,th}$, using the Debye-Hückel theory. The $pK_{a,th}$ values of the chloro-nitrobenzoic acids were in the range of 1.62–2.05 [2]. Their actual ionic mobilities were in the range $(-25.6--27.1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

References

-
- [1] S. Štěpánová, E. Andris, O. Gutten, M. Buděšínský, M. Dejmek, P. Břehová, L. Rulíšek, V. Kašička, *Electrophoresis* 45 (2024) 687–705.
- [2] J.R. Štoček, J. Blahut, S. Chalupná, J. Čejka, S. Štěpánová, V. Kašička, M. Hušák, M. Dračínský, *Chem. Eur. J.* e202402946 (2024) 1–11.

Partneři a sponzoři konference

Generální partner:



Hlavní partneři:



Partneři:



Mediální partner:

