

Program sekce plakátových sdělení

9. ročník konference Česká chromatografická škola – HPLC.cz 2023

14. - 17. 05. 2023
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.
Mgr. Taťána Gazárková
Jana Douša Hollová

pragolab
autorizovaný distributor

thermoscientific

Generální partner konference

Seznam prezentovaných plakátových sdělení

- Vazebná studie sérového albuminu s antiepileptiky pomocí kapilární elektroforézy*
Taťána Bržezická, Lenka Kohútová, Tereza Zapletalová, Zdeněk Glatz, Jan Juřica
- Pathophysiological processes associated with tumor regression may be mediated by specific autoantibodies*
Petra Chalova, Lenka Minichova, Barbora Jankovicova, Eliska Krocova, Veronika Dvorakova, Zuzana Bilkova, Jan Lakota, Ludovit Skultety
- HILIC-HRMS profiling of O-glycans in tear fluid as a diagnostic tool for ocular rosacea*
Hana Chmelařová, Kateřina Plachká, Simona Motešická, Lucie Nováková
- Cílená analýza metabolitů flavonoidů v potkaní plazmě*
Hana Kočová Vlčková, Jana Pourová, Přemysl Mladěnka, Lucie Nováková
- CE-ESI/MS enantioseparation of ketamine and its metabolites*
Renáta Konášová, Dušan Koval, Petr Tůma, Václav Kašička
- Kvantitativní analýza modifikovaných nukleosidů v RNA izolované ze semen rostlin*
Petra Krejčí, Jana Balarynová, Barbora Klčová, Petr Smýkal, Petr Bednář
- Analysis of carbohydrate storage in perennial herbs by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection*
Iveta Marešová, Jana Martínková, F. Curtis Lubbe, Martin Bitomský, Jitka Klimešová
- Potenciál kvantifikace vybraných antiepileptik pomocí LC-MS analýzy ve vzorku slin*
Marta Pelcová, Viktoria Ďurčová, Miriam Štolcová, Jan Juřica, Zdeněk Glatz
- Achiral and chiral separations of selected catecholamines by capillary electrophoresis*
Petra Sázelová, Jiří Jiráček, and Václav Kašička
- Green approaches for extraction of bioactive compounds from dried apple cultivars*
Hana Sklenářová, Marcela Hollá, Veronika Pilařová, František Švec
- Electrochemical remediation of perfluoroalkyl substances from water*
Agneša Szarka, Barbora Vidová, Svetlana Hrouzková
- Determination of effective charge of highly sulfated cyclodextrins by capillary isotachopheresis and zone electrophoresis*
Veronika Šolínová, Václav Kašička
- Acidity constants of cyclic diadenosine diphosphorothioate and its difluorinated derivatives determined by capillary electrophoresis*
Sille Štěpánová, Ondrej Gutten, Miloš Buděšínský, Petra Břehová, Lubomír Rulíšek, Václav Kašička

Pokyny pro prezentaci plakátových sdělení

Prosíme všechny prezentující, aby svá plakátová sdělení vyvěsili v průběhu nedělního večera nebo 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 dva vítěze, kteří budou oceněni. Vyhlášení nejlepších plakátových sdělení proběhne po ukončení poslední odborné sekce ve středu 17.05.2023.

Vazebná studie sérového albuminu s antiepileptiky pomocí

kapilární elektroforézy

Taťána Bržezická¹, Lenka Kohútová¹, Tereza Zapletalová¹, Zdeněk Glatz¹, Jan Juřica²

¹Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

²Farmakologický ústav, Lékařská fakulta a CEITEC, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

e-mail: t.brzezicka@mail.muni.cz

Klíčová slova: *Afinitní studie, sérový albumin, antiepileptika, vazebná konstanta, kapilární elektroforéza*

Jedna z nepostradatelných částí farmakologického výzkumu léčiv se zabývá vazebnou studií mezi léčivy a sérovými proteiny. Z teorie je známo, že sérové proteiny fungují jako transportní molekuly, ale v závislosti na vazebné afinitě i jako zásobníky léčiv, kdy pouze volná frakce léčiva je biologicky aktivní. Ze znalosti vazebných parametrů jednotlivých léčiv s plazmatickými proteiny vyplývá nastavení vhodné terapeutické dávky léčiva. Což je kritickým bodem i u podávání antiepileptik. Při epileptické léčbě se léčiva dokonce kombinují. Kvůli tomu může docházet k jejich vzájemnému vytěsňování z navázaného proteinu, navýšení aktivní koncentrace antiepileptika v séru a k následným nežádoucím účinkům. Vazebné studie a vývoj nových metod k získání co největšího množství informací o vazbě je proto velmi žádaným aspektem. Nejzastoupenějším proteinem v krvi je sérový albumin. Z toho důvodu je právě albumin nejhojněji zkoumaným a popisovaným sérovým proteinem ve vazebných studiích. Tato práce je zaměřena na studium sérového albuminu s antiepileptiky pomocí kapilární elektroforézy. Metoda umožňuje plnou automatizaci, miniaturizaci, měření analýzy v řádu jednotek minut a simulaci fyziologických parametrů bez značení a imobilizací analytů [1], [2].

Zdroje

[1] S. Kaneko, 'Epilepsy, Pregnancy, and the Child', *Epilepsia*, vol. 41, no. s9, pp. 8–13, 2000, doi: 10.1111/j.1528-1157.2000.tb02211.x.

[2] H. Mlčochová, R. Ratih, L. Michalcová, H. Wätzig, Z. Glatz, and M. Stein, 'Comparison of mobility shift affinity capillary electrophoresis and capillary electrophoresis

frontal analysis for binding constant determination between human serum albumin and small drugs', *ELECTROPHORESIS*, vol. 43, no. 16–17, pp. 1724–1734, 2022, doi: 10.1002/elps.202100320.

Pathophysiological processes associated with tumor regression may be mediated by specific autoantibodies

Petra Chalova^{1,2}, Lenka Minichova¹, Barbora Jankovicova³, Eliska Krocova³, Veronika

Dvorakova³, Zuzana Bilkova³, Jan Lakota^{4,5}, Ludovit Skultety^{1,6}

1 Biomedical Research Center SAS, Bratislava, Slovakia, 2 Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovakia, 3 Department of Biological Sciences, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic, 4 Center of Experimental Medicine SAS, Bratislava, Slovakia, 5 Faculty of Management, Comenius University, Bratislava, Slovakia, 6 Institute of Microbiology CAS, Prague, Czech Republic

e-mail: chalova2@uniba.sk

Keywords: *carbonic anhydrase I, epitope identification, serological proteome analysis, autoantibodies*

Spontaneous tumor regression is widely accepted. We have observed this phenomenon in multiple myeloma patients who developed an aplastic anemia-like syndrome after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation. High titers of serum anti-CA I autoantibodies were observed in patients with Hodgkin's disease, multiple myeloma, and some other malignant diseases, who developed aplastic anemia syndrome and spontaneous tumor regression after the high dose therapy combined with the autologous stem cell transplantation. The health condition of patients strongly correlates with the level of these antibodies. When antibody levels decline, worsening the patient condition and relapse of the disease appear [1]. We developed mouse monoclonal IgG antibody (mAb 2B8) against human CA I. Using the epitope extraction, and the phage display library, we found that the sequence DFWTYP corresponding to amino acids 191-196 of CA I is essential for interacting with mAb 2B8. A serological proteome analysis revealed that immunoreactive spots occur in CA I (+/-) cell lines. Some of them belonged to the CA I and some to the enzyme called α -enolase 1 (Eno1). Identification of in gel-digested spots were determined by MALDI Orbitrap mass spectrometry analysis. In addition to anti-CA I autoantibodies, the patient's serum contained also a significantly higher titer of autoantibodies against α -enolase (anti-Eno1). No reactivity against this protein was observed in the control sera. Therefore, the quantity and the quality of these antibodies seem to be crucial in the described phenomena.

This study was supported by a grant from the Slovak Research and Development Agency APVV 18-0340 and FaF/16/2023.

References

[1] Lakota, J., Skultety, L., Dubrovčaková, M., & Altaner, C. (2008). Presence of serum carbonic anhydrase autoantibodies in patients relapsed after autologous stem cell transplantation indicates an improved prognosis. *Neoplasma*, 55(6), 488-492.

HILIC-HRMS profiling of *O*-glycans in tear fluid as a diagnostic tool for ocular rosacea

Hana Chmelařová¹, Kateřina Plachká¹, Simona Motešická², Lucie Nováková¹

¹ *Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova*

² *Oční oddělení Pardubické nemocnice, Nemocnice Pardubického kraje, a.s.*

e-mail: chmelarha@faf.cuni.cz

Keywords: *tears, glycans, UHPL-DIA-HRMS, HILIC, ocular rosacea*

Tear fluid contains a complex mixture of mucin-like proteins, which are highly *O*-glycosylated and are responsible for the wettability, lubrication, and barrier function of the ocular surface. The post-translational modifications may reflect the state of health and glycans can thus serve as potential biomarkers of ocular diseases. The objective of this study was to develop an analytical method for the determination of glycan profiles as a possible diagnostic tool for ocular rosacea disease.

In the first step of the analysis, *O*-glycans are released from glycopeptides by reductive β -elimination. The released glycans are then analyzed by UHPLC-HRMS (ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry) in HILIC (hydrophilic interaction chromatography) mode. The development of the method was focused on improving the peak shape and sensitivity. These parameters were improved by optimization of injection volume and sample solvent composition. Moreover, the initial composition of the mobile phase at the gradient start was found to be important. A fast initial ramp from 85% to 70% ACN used at the beginning of the gradient resulted in the further improvement of peak shape.

After analysis of 120 samples of tear fluid, more than 80 *O*-glycans were identified. Their retention times were highly correlated with the number of saccharide units in the molecule. The detected *O*-glycans consisted of N-acetylhexoseamine, hexose, sialic acid, fucose, and sulfate. The glycans without bound sulfates were found to be more typical for rosacea patients, whereas sulfated glycans are more prevalent in healthy controls.

Acknowledgements

This work was supported by the project EFSA-CDN (No.CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by ERDF.

Cílená analýza metabolitů flavonoidů v potkaní plazmě

Hana Kočová Vlčková¹, Jana Pourová², Přemysl Mladěnka², Lucie Nováková¹

¹ *Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova*

² *Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova*

e-mail: vlckh3aa@faf.cuni.cz

Klíčová slova: ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, srážení proteinů, metabolity, flavonoidy

Chromatografická separace široké skupiny metabolitů flavonoidů a jejich selektivní stanovení představuje náročnou analytickou výzvu zejména z důvodu různorodosti fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých metabolitů. Navíc většina metabolitů poskytuje při disociaci v iontovém zdroji a při kolizi indukované disociaci podobné prekurzorové a produktové ionty, což vyžaduje dostatečnou chromatografickou separaci těchto metabolitů.

Cílem této studie je vyvinout metodu pro selektivní stanovení 4 flavonoidů, 6 nízkomolekulárních fenolických kyselin a fenolů, a jejich 5 konjugovaných forem v plazmě pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Pro dosažení dostatečné chromatografické separace izomerních a strukturně podobných sloučenin bylo provedeno testování různých druhů stacionárních a mobilních fází a také optimalizace gradientového profilu. Protože nebylo možné dostatečně chromatograficky separovat všechny strukturně podobné metabolity, například kvercetin sulfát a kvercetin glukuronid, velký důraz musel být kladen také na výběr vhodných SRM přechodů pro tyto metabolity. Pro selektivní a správné stanovení těchto metabolitů bylo nutné vybrat prekurzorové a produktové ionty, které nebyly poskytovány ostatními koelujícími metabolity. Dva SRM přechody byly vybrány pro každý analyt. Jako vhodný způsob přípravy vzorků bylo zvoleno srážení proteinů, které nesmělo zahrnovat krok odpaření a rekonstituce kvůli nízké stabilitě analytů a jejich různé rozpustnosti. Proto typ a objem srážecího rozpouštědla významně ovlivnil složení nastříkovaného rozpouštědla a citlivost metody. Metoda UHPLC-MS/MS byla validována a použita pro analýzu vzorků potkaní plazmy k určení farmakokinetických profilů analyzovaných metabolitů.

Studie byla podpořena projektem EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) spolufinancované EFRR a projektem AZV 02-00135.

CE-ESI/MS enantioseparation of ketamine and its metabolites

Renáta Konášová¹, Dušan Koval¹, Petr Tůma², Václav Kašička¹

¹ *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague 6, Czech Republic*

² *Department of Hygiene, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague 10, Czech Republic*

e-mail: konasova@uochb.cas.cz

Keywords: *CE-ESI/MS, enantioseparation, ketamine, ketamine derivatives, capillary coating*

Separation of enantiomers of anesthetic drug ketamine and its metabolites norketamine, dehydronorketamine, and hydroxynorketamine using CE-ESI/MS is presented. A dual chiral selector system consisting of ammonium salts of highly sulfated β - and γ -cyclodextrins injected in two consecutive zones (16 % of total capillary length for each of them) was used for the separation. In contrast to the previously published separation of racemic ketamine and its metabolites utilizing a fused silica capillary with positive PAMAPTAC coating [1], in this study, the chiral separation was performed in a fused silica capillary with negative PAMAMPS coating [2] of low charge density. The PAMAMPS coating minimized cyclodextrins-wall interactions and improved repeatability of the measurements. The achieved resolutions were higher than 4.5 for enantiomer pairs of all above compounds and the separation time was less than 12 min. Limits of detection of the developed method obtained without any preconcentration technique were in the range from 2.5×10^{-7} mol/L to 5.0×10^{-7} mol/L for all enantiomers.

References

- [1] P. Tuma, D. Koval, B. Sommerova, and S. Vaculin, Separation of anaesthetic ketamine and its derivatives in PAMAPTAC coated capillaries with tuneable counter-current electroosmotic flow, *Talanta* 217 (2020) 121094.
- [2] V. Solinova, P. Tuma, M. Butnariu, V. Kasicka, and D. Koval, Covalent anionic copolymer coatings with tunable electroosmotic flow for optimization of capillary electrophoretic separations, *Electrophoresis* 43 (2022) 1953-62.

Kvantitativní analýza modifikovaných nukleosidů v RNA izolované ze semen rostlin

Petra Krejčí¹, Jana Balarynová², Barbora Klčová², Petr Smýkal² a Petr Bednář¹

¹*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 17. listopadu 12, Olomouc, 771 46, Česká republika*

²*Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 27, Olomouc, 783 71, Česká republika*

e-mail: petra.v.krejci@gmail.com

Klíčová slova: nukleosidy, modifikované nukleosidy, reprodukce rostlin, RNA analýza, kvantifikace

Semena hrají klíčovou roli při reprodukci rostlin. Avšak mají omezenou životnost, která závisí na mnoha faktorech (např. druh rostliny nebo podmínky skladování). K postupné degradaci semen skladovaných v suchu vedoucích až k jejich zániku dochází v důsledku akumulace molekulárního poškození, a to zejména neenzymatickou oxidací proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Předpokládá se nárůst oxidačních modifikací nukleových kyselin během stárnutí semen, přičemž na základě struktury nukleových bází tomuto poškození nejnárodněji podléhá guanosin, kdy v důsledku oxidace vzniká 8-oxoguanosin. Methylační modifikace jsou jednou z nejčastějších epigenetických značek, jejichž přidání či odstranění je primárně zprostředkováno enzymaticky. Postupná degradace semen a v nich uložené RNA vede k nevratným změnám v přítomnosti epigenetických značek, což v končeném důsledku může mít vliv na kódování proteinů v biosyntetické dráze fytohormonů či jejich blokátorů [1]. Cílem studie bylo zavést metodiku vhodnou pro kvantitativní analýzu nukleosidů a jejich derivátů. Za tímto účelem bylo využito spojení hmotnostní spektrometrie s vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií (UPLC/MS). Využitím vysoko-rozlišujícího spektrometru s QqTOF analyzátozem a cyklickou iontovou mobilitní celou (Select Series Cyclic IMS, Waters) bylo dosaženo vysoké citlivosti stanovení, což umožnil kvantifikaci studovaných nukleosidů až v koncentraci ng/L.

Ze semen rostlin *Arabidopsis thaliana* byla nejprve vyizolována RNA a bylo stanoveno celkové množství RNA v připraveném vzorku. Následný proces zpracování vzorků spočíval v prvním kroku v rozštěpení řetězců RNA nukleasou na jednotlivé nukleotidy, které byly dále štěpeny rekombinantní alkalickou fosfatou za účelem odstranění fosfátových skupin. Přidané enzymy byly od nukleosidů odstraněny mikrofiltrací s využitím centrifugačních filtrů (10 kDa, Amicon Ultra, Sigma-Aldrich). Získaná směs nukleosidů pocházejících z vyizolované RNA byla následně separována na koloně s reverzní fází (Waters T3, 2.1 mm x 100 mm) s využitím gradientu tvořeného mobilními fázemi vodou (A) a methanolem (B) okyselených 0.1% kyselinou mravenčí. Struktury separovaných nukleosidů a jejich derivátů byly identifikovány na základě přítomnosti diagnostických fragmentů v kolizních spektrech vzniklých dle fragmentačních mechanismů uvedených v literatuře [2]. Kvantifikace byla zaměřena na modifikované nukleosidy N6-methyladenosin (N6-MA), 1-methyladenosin (1-MA), 8-oxoguanosin (8-OG) a 5-methylcytidin (5-MC) a jejich obsah byl stanoven na základě kalibračních závislostí jednotlivých analytů. Přičemž u zralých suchých semen byl pozorován nárůst obsahu 8-OG v průběhu jejich stárnutí, zatímco obsah všech methylových derivátů adenosinu a cytidinu poklesl oproti čerstvě sklizeným semenům. Změny v obsahu oxidovaných a methylových derivátů nukleosidů potvrzují předpoklad o postupné degradaci RNA v průběhu stárnutí semen. Současně byl pozorován nárůst methylového derivátu adenosinu N6-MA u zralých semen se zvyšujícím se imbibičním časem, což poukazuje na regulaci translace vedoucí k iniciaci klíčení semen. Výsledky dosažené v rámci výzkumu pomohou lépe pochopit degradační procesy v průběhu stárnutí semen a způsoby regulace translace ve vztahu k reprodukci rostlin.

Poděkování patří projektu GAČR: 21-15856S, “Translation regulation in plant dormant reproduction units - pollen and seeds”.

Reference:

- [1] M.B. Fleming, E.L. Patterson, P.A. Reeves, C.M. Richards, T.A. Gaines, C. Walters, Exploring the fate of mRNA in aging seeds: Protection, destruction, or slow decay?, *J. Exp. Bot.* 69 (2018) 4309–4321. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery215>.
- [2] R. Liu, Y. Ye, L. Qiang, X. Liao, Y. Zhao, The fragmentation pathway of the nucleosides under the electrospray ionization multi-stage mass spectrometry, *Life Sci. J.* 5 (2008) 37–40.

Analysis of carbohydrate storage in perennial herbs by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection

Iveta Marešová¹, Jana Martínková¹, F. Curtis Lubbe¹, Martin Bitomský¹, Jitka Klimešová^{1,2}

¹ *Department of Experimental and Functional Morphology, Institute of Botany of the Czech Academy of Sciences, Dukelská 135, 379 01 Třeboň, Czech Republic*

² *Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic*

e-mail: Iveta.Maresova@ibot.cas.cz

Keywords: *carbohydrate storage, belowground organs, HPAE-PAD, nonstructural carbohydrates, perennial herbs, plant extracts*

Carbohydrate storage in plants, particularly in perennial herbs, represent a diverse group of different types of nonstructural carbohydrates (NSCs). NSCs play a central role in plant metabolism and plant response to the environment (e.g. drought, cold, salt stress). Types of carbohydrates stored in belowground organs (e.g. roots, rhizomes, tubers, bulbs) differ among plant families and even genera. The levels of NSCs change during the season and the variability is also reflected in their multiple functions (e.g. transport, signaling, osmoregulation, symbiotic interactions, storage) [1,2]. Thus, the knowledge of certain NSC types and content in a broad spectrum of plant species help us to answer urgent questions concerning plant interactions with biotic and abiotic factors. In order to obtain good quality data for large set of species to test ecological hypotheses we have optimized and utilized a high-performance anion-exchange chromatography method coupled with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD) for determination of carbohydrates stored in belowground plant organs.

The method consisted of ethanol-water extraction and enabled chromatographic separation of total 20 free carbohydrates on a CarboPac PA1 column using the gradient elution of 16 and 200 mM NaOH as mobile phases. From the analyses of 46 herbaceous species, comprising 12 families and 28 genera, all samples contained simple sugars - glucose, fructose and sucrose. The highest content of sucrose 10.8 % (in dry weight - DW) was found in *Geum rivale* (Rosaceae family). This species contained even the highest level of glucose 2.6 % and cyclitol *myo*-inositol 5.9 %. The highest fructose concentration 5.1 % was found in *Betonica officinalis* (Lamiaceae). More than 10 % in DW comprised stachyose 15.5 % in *Betonica officinalis*, *Plantago media* 13.6 % and *P. maritima* 13.9 % (Plantaginaceae) and raffinose 10.8 % in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). Both stachyose and raffinose belong to a group of

raffinose family oligosaccharides (RFOs), which is specific to certain plant species (families) and unfortunately very often overlooked. In our study, species *Plantago media* has revealed to accumulate RFOs and was found to contain the highest amount of sugar alcohols – sorbitol 5.1 % and unknown compound with similar retention time as mannitol accounting 6.9 %. Other fructo-oligosaccharides, like kestose and nystose were detected in several species, which usually accumulate polysaccharides fructans. Starch as the main storage carbohydrate in plants and fructans, were determined by enzymatic and colorimetric methods. More than 45 % DW of starch contained *Aegopodium podagaria* (Apiaceae) and several *Geum rivale* samples. Fructans were the richest carbohydrate reserves found in *Senecio jacobaea* 68.5 % and *S. erraticus* 68.1 %, and more than 55 % of fructans, were quantified in *Achillea millefolium* and *Inula britannica* (all Asteraceae family). The results so far show high potential for ecological specialization of analysed species that will be further examined.

References

- [1] J. Klimešová, et al., Handbook of standardized protocols for collecting plant modularity traits, *Perspect. Plant Ecol., Evol. Syst.* 40 (2019) 125-485.
- [2] H. Hartmann, S. Trumbore, Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *N. Phytol.* 211 (2016) 386–403.

Acknowledgement

This work was supported by Premium Academiae awarded by the Czech Academy of Sciences, and long-term research project of the Czech Academy of Sciences [no. RVO 67985939].

Potenciál kvantifikace vybraných antiepileptik pomocí LC-MS analýzy ve vzorku slin

Pelcová Marta¹, Ďurčová Viktoria¹, Štolcová Miriam¹, Juřica Jan², Glatz Zdeněk¹

¹ Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

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

e-mail: 14045@mail.muni.cz

Keywords: *antiepileptika, lamotrigin, lakosamid, karbamazepin, sliny, LC-MS*

Sliny patří mezi alternativní biologický materiál. V oblasti stanovení a kvantifikace léčiv je v posledním desetiletí vidět zvýšený zájem o využití tohoto typu vzorku. Sliny by mohly být dobrou biologickou maticí pro stanovení léčiv, neboť bývají považovány za ultrafiltrát plasmy. Měly by tak odrážet volnou koncentraci léčiva (tj. účinnou, terapeuticky aktivní koncentraci). Navíc odběr slin je neinvazivní, bezbolestný, celkově snadný, bez stresu a nehrozí žádné komplikace či možnost infekce.

Při léčbě epilepsie bývají pacientům předepisována různá léčiva ze skupiny antikonvulziv, navíc často v kombinaci. Stanovení antiepileptik je využíváno pro personalizovanou léčbu, zvýšení efektivity a zlepšení tolerance této léčby. Z tohoto pohledu je vhodné mít dostupnou analytickou metodu, kterou je možno stanovit více léčiv v jedné analýze. K tomuto účelu byla vyvinuta a charakterizována LC-MS metoda. Do studie byla vybrána nejpoužívanější antikonvulziva – karbamazepin, eslikarbazepin, lakosamid, lamotrigin a levetiracetam. Ze vzorku slin, který byl obohacen deuterovanými analogy výše uvedených léčiv (s výjimkou eslikarbazepinu; jako interní standard sloužil d10-karbamazepin) byla tato léčiva extrahována nadbytkem ethylacetátu. Organická fáze byla odebrána do čisté zkumavky, vysušena v koncentrátoru a před analýzou byl odparek rozpuštěn v mobilní fázi o složení odpovídajícím počátku gradientu. Následovala LC-MS gradientová separace na koloně Kinetex C18 Polar (3 x 100 mm; 2,6 µm) a roztok A sestával z destilované vody s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. O tu byl obohacen také roztok B – acetonitril. Separace probíhala pomocí lineární gradientové eluce v rozsahu 5–70 % složky B. Následná detekce pomocí ESI-qTOF analýzy sloužila k jednoznačnému určení identity a následně i kvantity sledovaných léčiv. MS parametry byly nastaveny v programu otofControl, pro zajištění vzájemné komunikace byl

použit software Bruker Compass Hystar. Data byla zpracována softwarem QuantAnalysis (Bruker) a MS Office-Excel.

Výtěžnost extrakce byla pro sledovaná léčiva stanovena více jak 90 % s výjimkou levetiracetamu (74 %). Byly testovány matricové efekty a carry-over; ani jeden parametr neovlivňoval signál sledovaných léčiv. Kalibrační rozpětí pro jednotlivá léčiva ve slinách byla zvolena na základě literárních dat. LOQ se pohybovala kolem hodnoty 1 $\mu\text{g/ml}$, v případě levetiracetamu 7 $\mu\text{g/ml}$. Opakovatelnost metody byla do 7 % RSD, hodnoceno z poměru ploch analyt/interní standard. Také mezilehlá preciznost vyhovovala validačním kritériím.

Základní validační parametry LC-MS metody vykazují slibné parametry a splňují kritéria bioanalytické metody. Prezentovaná metoda je připravena pro kvantifikaci antiepileptik v klinických vzorcích slin.

Tato práce byla finančně podpořena Agenturou zdravotnického výzkumu Ministerstva zdravotnictví, č. projektu NU23-08-00229.

Achiral and chiral separations of selected catecholamines by capillary electrophoresis

Petra Sázelová, Jiří Jiráček, and Václav Kašička

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

Keywords: *dopamine, (nor)adrenaline, tyramine, L,D-DOPA, chiral separation, capillary electrophoresis, binding constant*

Catecholamines play an important role in carbohydrate and fat metabolism, cardiovascular system regulation, unstriated musculature function, blood coagulation, and the regulation of the acute adaptive reactions of the body. Analyses of the most important neurotransmitters such as dopamine, adrenaline and noradrenaline are of great significance for diagnostics and treatment of various brain diseases. The main path of formation of catecholamines in the body is: tyrosine-dihydroxyphenylalanine (DOPA)-dopamine-noradrenaline-adrenaline. L-DOPA (levodopa) is a chiral drug used in the treatment of Parkinson's disease, which is related to the depletion of the dopamine in the brain. Only this enantiomer is converted to dopamine while D-DOPA may cause side effects. Hence, control of enantiomeric purity of L-DOPA is necessary. Capillary electrophoresis (CE) using chiral selectors, among them especially cyclodextrins, is powerful tool for separation of enantiomers [1].

Tyramine, dopamine, noradrenaline, and adrenaline were separated as cations in several aqueous background electrolytes (BGEs), pH 2.00–8.10, in bare fused silica capillary using Beckman-Coulter MDQ analyzer equipped with diode array UV-absorption detector set at 200 nm. Best resolutions between tyramine and dopamine, dopamine and noradrenaline, and noradrenaline and adrenaline peaks were achieved in BGE composed of 44/70 mM NaOH/H₃PO₄, pH 2.50.

L-DOPA and D-DOPA enantiomers were separated in BGE composed of 22/35 mM NaOH/H₃PO₄, pH 2.50, containing 0–6 mM highly sulfated β -cyclodextrin (HS- β -CD) as chiral selector. From dependence of the effective electrophoretic mobilities of L-DOPA and D-DOPA enantiomers (determined by CE at 25°C) on the concentration of HS- β -CD in BGE, the apparent binding constants of L-DOPA and D-DOPA complexes with HS- β -CD were calculated. These complexes were found to be relatively weak with the binding constants equal to 292 L/mol and 276 L/mol, respectively.

References

- [1] P. Peluso, B. Chankvetadze. Native and substituted cyclodextrins as chiral selectors for capillary electrophoresis enantioseparations: Structures, features, application, and molecular modeling. *Electrophoresis* 2021, 42, 1676-1708.

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

Green approaches for extraction of bioactive compounds from dried apple cultivars

Hana Sklenářová, Marcela Hollá, Veronika Pilařová, František Švec

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

e-mail: *sklenarova@faf.cuni.cz*

Keywords: *apple cultivars; carbon dioxide; extraction approaches; greenness evaluation; polyphenols; gas-expanded liquid extraction; ultrasound extraction*

Optimized extraction protocols, based on gas-expanded liquid extraction (GXLE) and ultrasound extraction (UE), have been compared with the emphasis to use green solvents and to maximize extraction of 14 selected phenolic compounds, including flavonoid-based compounds and phenolic acids, from dried apples. Design of experiment was applied to optimize the main extraction parameters. Fine tuning included optimization of flow rate in GXLE and extraction time for GXLE and UE. GXLE was carried out with CO₂/ethanol/water (34/53.8/12.2; v/v/v) at a flow rate of 3 mL/min at a temperature of 75 °C and pressure 120 bar for 30 min. UE with ethanol/water 26/74 (v/v) lasted for 10 min at 70 °C. Both methods differing in solvent consumption and sample throughput, while providing comparable a total phenolic content of 2 442 µg/g with RSD < 10% and 2 226 µg/g with RSD < 6%, for GXLE and UE, respectively. Both methods were used in determination of phenolic compounds in five apple cultivars, ‘Angold’, ‘Artiga’, ‘Golden Delicious’, ‘Meteor’, and ‘Topaz’. Phenolic profiles were plotted with chlorogenic acid, catechin, epicatechin, hirsutrin, phloridzin, and guaiaverin as the main components. Statistical evaluation, including pair t-test, Bland-Altman test, and linear regression did not reveal any differences between UE and GXLE results. In terms of greenness evaluation UE provided higher value as more samples in short time can be processed using ethanolic solvent in reasonably low volume and thus connected with low waste production.

The work was supported by the EFSA-CDN project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by the European Union.

Electrochemical remediation of perfluoroalkyl substances from water

Agneša Szarka, Barbora Vidová, Svetlana Hrouzková

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

e-mail: agnesa.szarka@stuba.sk

Keywords: *PFAS, electrochemical treatment, HPLC-MS/MS*

Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFASs) are a group of synthetic fluorinated chemicals with a wide range of applications that have been used since the 1940s. PFAS are introduced into the environment through anthropogenic activities such as their use as surfactants, coatings, water repellents for leather and textiles, metal plating, and aqueous film-forming foam used in firefighting, among others. They are currently of concern to both human health and the environment due to their persistence, bioaccumulation potential, and adverse effects on living organisms (Buck et al., 2011).

Since the effects of toxic were a risk to human health and the environment, the existing water treatment was insufficient to remove the substances (Tabtong et al., 2015). Electrochemical treatment via anodic oxidation is among the most promising water treatment options (Viktoryová et al., 2022; Szarka et al. 2023). Electrochemical treatment has various benefits over the conventional process the technique of which has been the most studied degradation of PFAS (Merino et al., 2016). The PFAS decomposition is performed using the electrodes in which pollutants can be removed by direct and indirect oxidation.

In this study, an electrochemical treatment of more than 20 PFAS using a hybrid electro-thermochemical wastewater treatment technology was investigated. The proposed wastewater processing technology uses a proprietary approach to the electrochemical introduction of certain metal consumables into the wastewater and to capture (electrochemically transformed) organic pollutants of the water within a metal hydroxide matrix. Experiments focused on assessing the impacts of the type of electrode, the working electrical current, and the time of the treatment process on the PFASs removal, and the power of the removal was expressed by the removal efficiency factor (REF). The spiked and the treated water samples were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The results showed that proposed water treatment technology is a promising tool for the elimination of PFASs from water samples.

References

Buck R.C., Franklin J., Berger U., Conder J.M., Cousins I.T., De Voogt P., Jensen A. A., Kannan K., Mabury S.A., Van Leeuwen S.P. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 7 (2011) 513.

Merino N., Qu Y., Deeb RA., Hawley EL., Hoffmann MR., Mahendra S. Degradation and removal methods for perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in water. *Environ. Eng. Sci.*, 33 (9) (2016), 615.

Szarka A., Mihová V., Horváth G., Hrouzková S. Development of an advanced inspection of the degradation of volatile organic compounds in electrochemical water treatment of paint-industrial water effluents. *Appl. Sci.*, 13 (2023), 443.

Tabtong W., Boontanon SK., Boontanon N. Fate and risk assessment of perfluoroalkyl substances (PFASs) in water treatment plants and tap water in Bangkok, Thailand. *Procedia Environ. Sci.*, 28 (2015), 750.

Viktoryová N., Szarka A., Hrouzková S. Recent developments and emerging trends in paint industry wastewater treatment methods. *App. Sci.*, 12 (2022), 10678.

Acknowledgement

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under Contract No. APVV-19-0149 and by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic (VEGA project no. 1/0412/20).

Determination of effective charge of highly sulfated cyclodextrins by capillary isotachopheresis and zone electrophoresis

Veronika Šolínová, 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: *effective charge, sulfated cyclodextrins, capillary isotachopheresis, capillary zone electrophoresis*

Capillary isotachopheresis (CITP) and capillary zone electrophoresis (CZE) were applied for determination of effective charge of highly sulfated cyclodextrins (HS-CDs). The effective charges of single isomer and randomly sulfated α -, β -, and γ -HS-CDs were determined from their ITP zones lengths, ionic mobilities, and molar concentrations, and from the same parameters of the reference compounds (dichloroacetic acid or formic acid) [1]. All experiments were performed in Agilent 7100 apparatus with UV-absorption (200 nm, 210 nm) and contactless conductivity detection in HPC (hydroxypropyl cellulose) coated fused silica capillary (id/od 50/375 μm , total/effective length 424/339 (276) mm). The length of the ITP zones of HS-CDs and reference compounds were obtained from their CITP analyses in anionic mode using leading electrolyte (LE) composed of 10 mM HCl, 20 mM histidine, pH 6.2, and terminating electrolyte (TE) – 20 mM L-glutamic acid. Ionic mobilities of HS-CDs and singly charged reference compounds were determined by their CZE analyses in the background electrolyte (BGE) of the same composition as the LE. The effective charges numbers of single isomer HS-CDs (6.29; 6.81; 7.77) were found in good agreement with theoretical values (6; 7; 8). On the other hand, the effective charges of randomly HS-CDs (6.95; 9.16; 10.67) were found significantly reduced to the theoretical values (10.2; 13; 14.5). The reduction was in the range 26.4-31.9%. Ionic mobilities of single isomer HS-CDs and randomly HS-CDs were in the range $(37.5\text{-}35.5) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $(44.1\text{-}43.5) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively.

References

[1] T. Tůmová, L. Monincová, O. Nešuta, V. Čeřovský, V. Kašička, Determination of effective charges and ionic mobilities of polycationic antimicrobial peptides by capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 38 (2017) 2018-2024.

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

Acidity constants of cyclic diadenosine diphosphorothioate and its difluorinated derivatives determined by capillary electrophoresis

Sille Štěpánová, Ondrej Gutten, Miloš Buděšínský, Petra Břehová,

Lubomír Rulišek, Václav Kašička

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, The Czech Academy of Sciences,

Flemingovo nam. 2, 166 10 Prague 6, Czechia

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

Keywords: *acidity constant, capillary electrophoresis, cyclic dinucleotides diphosphorothioates*

Cyclic dinucleotides (CDNs) are important signaling molecules in bacteria and in eukaryotic cells [1]. They are being investigated as potential drugs for treatment of tumor and infectious diseases in immune-therapies. Determination of physico-chemical parameters, such as acidity constants, is important for better understanding of behavior of CDNs in biological systems. The acid-base properties of four CDNs, 2',3'-cyclic di-adenosine diphosphoro(thioate) and its three difluorinated derivatives (at both 2' positions) [2], were studied using capillary electrophoresis (CE). The mixed acidity constants, $pK_{a,mix}$, and the actual ionic mobilities of the above CDNs were determined by nonlinear regression analysis of the pH dependence of their effective electrophoretic mobilities [3]. The CE measurements of effective mobilities were carried out in aqueous background electrolytes in a wide pH range (1.55–11.20) at constant temperature (25°C) and ionic strength (25 mM). 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 first adenine base of the studied CDNs varied from 3.32 to 3.45, and of the second adenine base from 4.36 to 4.46. The actual ionic mobilities were in the range $(-10.8--12.6) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ for univalent anions, and reached the values $(-24.7--25.1) \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ for divalent anions.

References

-
- [1] O. Danilchanka and J.J. Mekalanos, *Cell* 154 (2013) 962–970.
[2] M.P. Polidarová, P. Břehová et al., *J.Med.Chem.* 64 (2021) 7596–7616.
[3] S. Ehala, J. Míšek, I.G. Stará, I. Starý, V. Kašička, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2686–2693.