



Zastosowanie LC/QTOF w analizach metabolomicznych – zalety, ograniczenia i wyzwania

Emilia Fornal, Anna Warpas, Grażyna Wójcicka, Jerzy Bełtowski*

Spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową (LC/MS) lub chromatografią gazową oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) są trzema technikami analitycznymi, które umożliwiają i w największym stopniu przyczyniają się obecnie do rozwoju badań metabolomicznych. Wśród technik LC/MS szczególną rolę odgrywają te zapewniające dokładny pomiar masy. W badaniach metabolomicznych najczęściej wykorzystywane są wysokorozdzielcze spektrometry mas (HRMS) typu kwadrupol-analizator czasu przelotu jonów (QTOF) oraz Orbitrap. W pracy przedstawiono przykłady zastosowań LC/QTOF w analizach metabolomicznych, krótko omówiono rolę optymalizacji metody analitycznej do badań metabolomicznych, wskazano zalety i ograniczenia techniki oraz wyzwania i perspektywy jej rozwoju w tym obszarze badawczym.

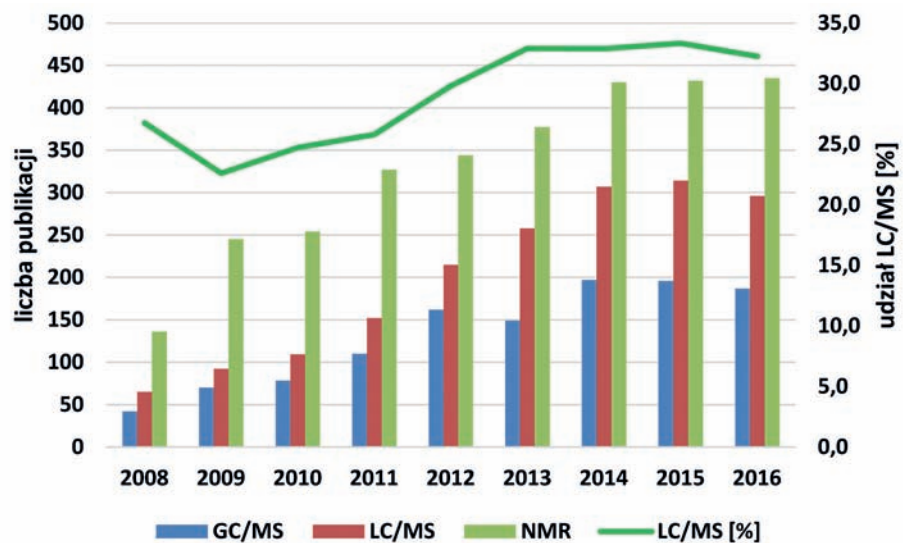
Wprowadzenie

Badania metabolomiczne, które obejmują analizę jakościową i ilościową endogennych i egzogennych metabolitów w komórkach, tkankach i płynach fizjologicznych prowadzone są obecnie głównie z wykorzystaniem trzech technik analitycznych: chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (rys. 1). Analiza danych literaturowych z ostatnich dziewięciu lat wskazuje, że około 30% analiz metabolomicznych wykonywanych jest przy pomocy LC/MS. Metabolomice opartej na pomiarach LC/MS poświęcono w obszerne prace przeglądowe [1-6], w których omówiono sposoby przygotowanie próbek do analiz, meto-

dy zbierania i analizy danych, procedury identyfikacji metabolitów i oznaczenia ilościowe, przedstawiono dostępne bazy metabolitów, ukierunkowane i nieukierunkowane sposoby pracy oraz wady i zalety metody LC/MS w ozna-

czeniu metabolomicznych. Badania metabolomiczne z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas znajdują zastosowania w różnych dziedzinach nauki m.in. w naukach medycznych, badaniach kli-

nicznych, analizie żywności, ochronie środowiska, biologii i naukach rolniczych. W każdym z tych obszarów badawczych szczególną rolę odgrywają oznaczenia, do których wykorzystywane są wysokorozdzielcze spektrometry



Rys. 1. Liczba publikacji dotyczących badań metabolomicznych prowadzonych z wykorzystaniem technik analitycznych GC/MS, LC/MS i NMR w latach 2008-2016, na podstawie bazy Scopus

mas (HRMS), które zapewniają dokładny pomiar masy, obecnie na poziomie poniżej 1 ppm przy zastosowaniu korekcji wewnętrznej przy pomocy jonów referencyjnych lub wewnętrznej kalibracji. Najczęściej wykorzystywane są spektrometry mas typu kwadrupol - analizator czasu przelotu jonów, (QTOF) oraz Orbitrap. W tabeli 1 zestawiono podstawowe parametry charakterystyki tych dwóch analizatorów masy na przykładowych modelach o najlepszych osiągnięciach pracy. Bardziej szczegółowe porównanie tych dwóch spektrometrów opisano w pracy [3].

Spektrometry QTOF zapewniają dużą szybkość skanowania i są idealnymi analizatorami mas do sprzęgnięcia z ultra-wysoko sprawną chromatografią ciekłą (UHPLC). Zapewniają szybkość próbkowania odpowiednią dla wąskich, kilku-kilkunastosekundowych, pików chromatograficznych otrzymywanych na kolumnach UHPLC wypełnionych sorbentem o średnicy ziarna 1,7-2 μm oraz umożliwiają fragmentację koelujących związków bez potrzeby wydłużania czasu analizy w celu rozdzielenia analitów, aby zapewnić selekcję maksymalnie dużej ilości prekursorów. Wysoka czułość uzyskiwana bez dodatkowych elementów wyposażenia, bez potrzeby zmiany źródła zapewnia dużą przepustowość analiz w laboratorium oraz detekcję metabolitów występujących w niskich stężeniach bez potrzeby zateżnienia próbek przed analizą. Duża dokładność pomiaru masy pozwala ustalić z dużą pewnością wzór

Tabela 1. Parametry specyfikacyjne spektrometru QTOF i Orbitrap LC/MS

| Parametr | QTOF ^{a)} | Orbitrap ^{b)} |
|---------------------------------|---|---|
| Rozdzielczość | 40 000 | 500 000 |
| Dokładność pomiaru masy | < 1 ppm | < 1 ppm |
| Szybkość skanowania (spectra/s) | 50 | 18 |
| Czułość | 1000:1 RMS dla 1 pg rezerpiny dozowanej na kolumnę, przepływ 0,4 ml/min | czułość pułapki jonowej 100:1 test wykonany ze źródłem HESI (opcja wyposażenia) dla 0,1 pg rezerpiny, przepływ 0,5 ml/min |
| Cena | \$\$ | \$\$\$ |

^{a)} Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS,

^{b)} Thermo Fisher Scientific Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer

sumaryczny analitów, liczba generowanych wzorów jest nieduża, co ułatwia identyfikację metabolitów i skraca czas identyfikacji. Koszt zakupu spektrometru QTOF jest istotnie niższy, co jest istotnym parametrem decyzyjnym dla wielu laboratoriów. Mając na uwadze, że w przypadku badań metabolomicznych analizowane są związki niskocząsteczkowe dla większości aplikacji rozdzielczość rzędu 40 000 jest wystarczająca. Ponadto możliwość sprzęgnięcia QTOF z UHPLC sprawia, że rozdzielczość masowa jest uzupełniana rozdzielczością chromatograficzną. Niższy stopień koelucji związków wynikający z wyższej rozdzielczości chromatograficznej obniża wymagania co do koniecznej wielkości rozdzielczości mas. Liczba wykrytych metabolitów jest porównywalna dla obu spektrometrów. Spektrometry wysokich rozdzielczości charakteryzuje duża wszechstronność zastosowań. Mogą być one wykorzystywane zarówno do wykrywania, identyfikowania oraz ilościowego oznaczania metabolitów.

Celem niniejszych pracy było dokonanie oceny czy i w jakim zakresie należy prowadzić

optymalizację metody LC/QTOF, aby zapewnić wysokie czułości analiz oraz wykryć maksymalnie dużą ilość metabolitów osocza. Ponadto celem była ocena możliwości wykorzystania znanych i opisanych w literaturze biomarkerów dla danego schorzenia, jako parametru/ów walidujących procedurę profilowania metabolitów przy pomocy LC/MS.

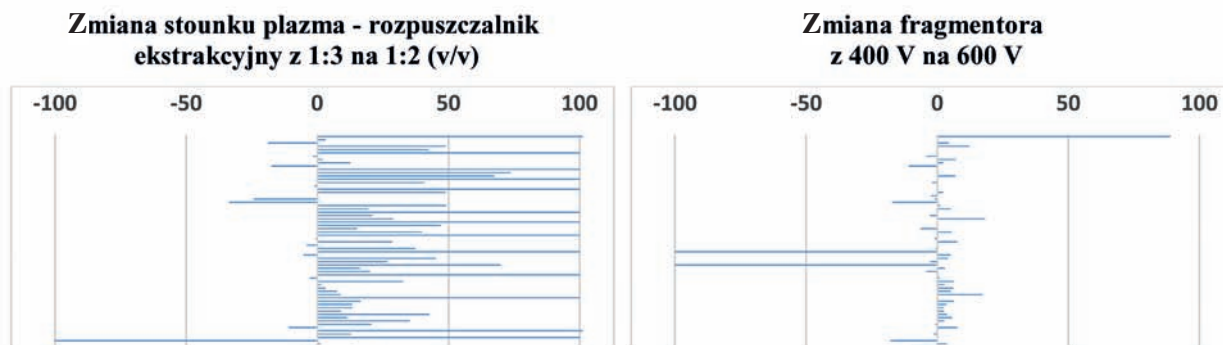
Część eksperymentalna

Ekstrakcję metabolitów i precipitację białek z osocza prowadzono na zimno wykorzystując mieszaninę metanolu i etanolu (1:1 v/v). Ekstrakt wrowano, supernatant filtrowano przez filtry 0,22 μm . Analizy metaboliczne wykonywano przy pomocy chromatografu ciekłego Agilent Technologies seria 1290 sprzężonego z wysoko rozdzielczym spektrometrem mas Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS, który był wyposażony w źródło jonów ESI Agilent Technologies JetStream. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie C18 2,1 x 10 mm, ziarno 1,7 μm . Jako fazę ruchomą stosowano 0,1% kwas mrówkowy w wodzie i w acetonitrylu (v/v),

wszystkie składniki fazy ruchomej o stopniu czystości LC-MS. Gradient liniowy od 5 do 95% w 30 min, przepływ fazy ruchomej 0,4 ml/min. Zbierano jony dodatnie oraz ujemne w zakresie m/z 100-1000. Analizy wykonywano w trybie skan MS oraz targeted MS/MS. Korekcję masy prowadzono z wykorzystaniem jonów referencyjnych, dokładność pomiaru masy <1 ppm. Analizę danych prowadzono przy pomocy oprogramowania Agilent Technologies MassHunter Qualitative, MassHunter Quantitative, Personal Database and Library Metlin PCDL oraz Mass Profiler Professional.

Wyniki

Jedną z podstawowych zalet stosowania LC/QTOF w badaniach metabolomicznych jest możliwość jednoczesnego wykrycia wielu metabolitów endo- i egzogennych różniących się właściwościami chemicznymi. Ponieważ metoda ma wykrywać związki o różnym składzie, budowie i właściwościach optymalizacja metody prowadzona jest zwykle w bardzo ograniczonym stopniu, co wynika z faktu, że zmiana jednego parametru może wpłynąć korzystnie na



Rys. 2. Zmiana wysokości pikę metabolitu na skutek zmiany stosunku plazma - rozpuszczalnik ekstrakcyjny oraz zmiany napięcia fragmentora spektrometru mas dla 65 metabolitów przedstawionych w tabeli 1.

sygnał jednej grupy związków i osłabić sygnał dla innych. Stosowane są warunki ekstrakcji, chromatografii i spektrometrii mas, które pozwalają izolować i wykrywać jak najszerszy wachlarz związków. Warunki prowadzenia analizy w istotnym stopniu wpływają na liczbę wykrywanych metabolitów oraz poziom detekcji tych związków. Wiele biomarkerów występuje w bardzo niskich stężeniach stąd też bardziej pożądane są metody i warunki zapewniające maksymalną czułość oznaczenia. Przy czym optymalizacja czułości w przypadku metod skriningowych ma charakter wyłącznie globalny i dobór parametrów metody jest

oparty obserwacji jak zmienia się intensywność sygnału dla większości metabolitów, a nie dla pojedynczego związku. Niesie to za sobą ryzyko, którego nie da się jednak uniknąć, że np. poszukiwany biomarker będzie w mniej licznej grupie związków, których sygnał uległ osłabieniu wraz ze zmianą parametru metody a tym samym w konsekwencji może nie zostać wykryty w prowadzonych badaniach metabolicznych. Przed rozpoczęciem badań metabolicznych nie powinno się jednak unikać etapu optymalizacji metody LC/QTOF mierzącej do jak największego pokrycia metabolomu. Wraz z większym pokryciem meta-

bolom zwiększa się prawdopodobieństwo identyfikacji szlaków metabolicznych, które zostały zakłócone. W dalszych etapach badań optymalizacja metody LC/QTOF może zostać ukierunkowana specyficznie już na związki z danego szlaku metabolicznego.

Celem doboru warunków metody ekstrakcji metabolitów z plazmy i oceny w jakim stopniu zmiana tych warunków wpływa na wielkość sygnału przeprowadzono ekstrakcję metabolitów stosując mieszaninę metanol-etanol (1:1 v/v) w stosunku plazma:MeOH/EtOH 1:3 oraz 1:2 v/v. W tabeli 2 wymieniono wykryte w ekstrakcie związki eluujące w czasie retencji 15,4 - 17,5 min.

W dwuminutowym oknie elucyjnym wykryto obecność 65 związków, dla celów niniejszej pracy i uproszczenia prezentowanych wyników zastosowano minimalną wysokość pikę 500000 jako kryterium wyszukiwania metabolitów. W celu lepszej wizualizacji wpływu zmiany stosunku plazma:MeOH/EtOH podczas ekstrakcji metabolitów z plazmy na wysokość pikę metabolitu zmiany wysokości pikę wyrażone w procentach przedstawiono na rysunku 2. Dla 43 związków zaobserwowano większą wysokość pikę (> 10%) w ekstrakcie uzyskanym w wyniku ekstrakcji prowadzonej dla stosunku plazma:MeOH/EtOH 1:2 v/v, co można powiązać

Tabela 2. Porównanie wielkości sygnału metabolitów dla różnych parametrów metody analitycznej dla 65 związków wykrytych w ekstrakcie z plazmy wymywanych z kolumny w czasie retencji 15,4 - 17,5 min. Warunki analizy: 1 – ekstrakcja stosunek plazma do rozpuszczalnik 1:3 (v/v), napięcie fragmentora 400V, 2 – ekstrakcja stosunek plazma do rozpuszczalnik 1:2 (v/v), napięcie fragmentora 400V, 3 – ekstrakcja stosunek plazma do rozpuszczalnik 1:3 (v/v), napięcie fragmentora 600V

| Lp. | R _T [min] | m/z | 1 | | 2 | | 3 | |
|-----|----------------------|----------|---------------|---------------|------------|---------------|------------|--|
| | | | wysokość pikę | wysokość pikę | zmiana [%] | wysokość pikę | zmiana [%] | |
| 1. | 15,46 | 163,1118 | 521707 | 2402840 | 361 | 985197 | 89 | |
| 2. | 15,47 | 192,1384 | 2653127 | 2736526 | 3 | 2653145 | 0 | |
| 3. | 15,48 | 318,3004 | 4522510 | 3676373 | -19 | 4720110 | 4 | |
| 4. | 15,72 | 518,3241 | 1150224 | 1711227 | 49 | 1291272 | 12 | |
| 5. | 15,72 | 536,3345 | 2342618 | 3332419 | 42 | 2348194 | 0 | |
| 6. | 15,74 | 343,2959 | - | 519269 | 100* | - | - | |
| 7. | 15,76 | 301,0756 | 817361 | 803493 | -2 | 783916 | -4 | |

| | | | | | | | |
|-----|-------|----------|----------|----------|-------|----------|-------|
| 8. | 15,76 | 279,0935 | 5103697 | 5199297 | 2 | 5458185 | 7 |
| 9. | 15,88 | 274,2740 | 21249620 | 23910132 | 13 | 21735132 | 2 |
| 10. | 15,90 | 304,2489 | 776547 | 640517 | -18 | 692782 | -11 |
| 11. | 15,92 | 584,3348 | - | 630225 | 100 | - | - |
| 12. | 16,00 | 230,2480 | 1474521 | 2560270 | 74 | 1477165 | 0 |
| 13. | 16,01 | 318,3002 | 2097474 | 3510484 | 67 | 2241774 | 7 |
| 14. | 16,04 | 542,3240 | - | 641959 | 100* | 525740 | - |
| 15. | 16,04 | 560,3343 | 1161817 | 1636513 | 41 | 1139878 | -2 |
| 16. | 16,07 | 288,2891 | 4065767 | 4021580 | -1 | 4052059 | 0 |
| 17. | 16,06 | 518,3237 | - | 663996 | 100* | 560038 | - |
| 18. | 16,06 | 536,3339 | 1326451 | 1973031 | 49 | 1356114 | 2 |
| 19. | 16,11 | 158,1517 | 2286266 | 2279270 | 0 | 2230286 | -2 |
| 20. | 16,11 | 409,1604 | 767844 | 581710 | -24 | 760718 | -1 |
| 21. | 16,11 | 387,1784 | 769832 | 510501 | -34 | 637099 | -17 |
| 22. | 16,12 | 290,2671 | 1367701 | 2037634 | 49 | 1383272 | 1 |
| 23. | 16,20 | 355,2613 | 9690320 | 11547733 | 19 | 10193342 | 5 |
| 24. | 16,19 | 223,0639 | - | 623490 | 100* | - | - |
| 25. | 16,21 | 373,2722 | 6054168 | 7322055 | 21 | 5889548 | -3 |
| 26. | 16,20 | 431,2768 | 652879 | 841244 | 29 | 771881 | 18 |
| 27. | 16,21 | 443,2374 | - | 500246 | 100 | - | - |
| 28. | 16,21 | 817,5824 | 3459927 | 5083188 | 47 | 3470375 | 0 |
| 29. | 16,21 | 834,6094 | 1095591 | 1260741 | 15 | 1026620 | -6 |
| 30. | 16,21 | 839,5638 | 1132341 | 1582506 | 40 | 1194086 | 5 |
| 31. | 16,24 | 584,3350 | - | 703594 | 100* | - | - |
| 32. | 16,28 | 225,1961 | 9926956 | 9862168 | -1 | 9836916 | -1 |
| 33. | 16,28 | 288,2900 | 2448620 | 3145414 | 28 | 2636028 | 8 |
| 34. | 16,31 | 271,1882 | 2846009 | 2728742 | -4 | 2843155 | 0 |
| 35. | 16,37 | 244,2638 | 593944 | 815664 | 37 | 590620 | -1 |
| 36. | 16,52 | 214,0880 | 503818 | - | -100* | - | -100* |
| 37. | 16,64 | 391,2098 | 930711 | 881404 | -5 | 977703 | 5 |
| 38. | 16,64 | 560,3350 | 1054453 | 1531947 | 45 | 1099279 | 4 |
| 39. | 16,65 | 357,2791 | 5330066 | 6745456 | 27 | 5193734 | -3 |
| 40. | 16,65 | 785,5933 | 506538 | 860180 | 70 | - | -100* |
| 41. | 16,69 | 288,2894 | 11328531 | 13163428 | 16 | 11657809 | 3 |
| 42. | 16,72 | 244,2634 | 4868203 | 5845257 | 20 | 4670011 | -4 |
| 43. | 16,87 | 272,2581 | - | 1157075 | 100* | - | - |
| 44. | 16,88 | 299,1833 | 1089488 | 1058494 | -3 | 1100702 | 1 |
| 45. | 16,93 | 304,2849 | 1013702 | 1345072 | 33 | 1077176 | 6 |
| 46. | 17,04 | 404,2073 | 1216036 | 1232985 | 1 | 1250684 | 3 |
| 47. | 17,04 | 425,1366 | 1152883 | 1188429 | 3 | 1222673 | 6 |
| 48. | 17,04 | 790,3805 | 782968 | 841015 | 7 | 822574 | 5 |
| 49. | 17,04 | 409,1625 | 4437048 | 4824084 | 9 | 5196731 | 17 |
| 50. | 17,04 | 406,1550 | - | 521371 | 100* | - | - |
| 51. | 17,04 | 795,3355 | 1300708 | 1514074 | 16 | 1384532 | 6 |
| 52. | 17,05 | 105,0703 | 1895094 | 2146266 | 13 | 1960592 | 3 |
| 53. | 17,05 | 387,1808 | 10129838 | 11461993 | 13 | 10391660 | 3 |
| 54. | 17,05 | 121,0654 | 863444 | 939488 | 9 | 885940 | 3 |
| 55. | 17,05 | 489,2277 | 994936 | 1418065 | 43 | 1031440 | 4 |
| 56. | 17,08 | 288,2898 | 22035198 | 24518036 | 11 | 23283406 | 6 |
| 57. | 17,21 | 332,3156 | 555156 | 750066 | 35 | 570375 | 3 |
| 58. | 17,21 | 244,2632 | 10658959 | 12846986 | 21 | 10585108 | -1 |
| 59. | 17,07 | 560,3355 | 691465 | 616494 | -11 | 744230 | 8 |
| 60. | 17,26 | 230,2469 | 891812 | 3037391 | 241 | 888681 | 0 |
| 61. | 17,30 | 304,2849 | 17006092 | 19164836 | 13 | 16779342 | -1 |
| 62. | 17,22 | 560,3344 | - | 1041278 | 100* | - | - |
| 63. | 17,44 | 443,2320 | 895195 | - | -100* | 735498 | -18 |
| 64. | 17,47 | 409,1624 | 792532 | 801774 | 1 | 821019 | 4 |
| 65. | 17,47 | 387,1808 | 1038025 | 992312 | -4 | 931644 | -10 |

*) Wartość przypisana dla wizualizacji: 100 dla nowego związku, który się pojawił w skanie MS; -100 dla związku, który zniknął w skanie MS



z wyższym stężeniem związku w ekstrakcie (niższe rozcieńczenie próbek). Dla 6 związków stwierdzono spadek wysokości pików ($< -10\%$), gdy stosunek plazma:MeOH/EtOH został zmieniony z 1:3 v/v na 1:2 v/v. Osłabienia sygnału można wyjaśnić większym efektem matrycowym i efektem tłumienia sygnału metabolitu wynikającym z wyższych stężeń koeluujących związków. Dla 16 związków wielkość sygnału się nie zmieniła, zmiana nie przekraczała 10%. Zwiększenie sygnału nastąpiło dla 66% związków, osłabienie dla 10%. Proporcja niniejsza wskazuje, że prowadzenie ekstrakcji plazma:MeOH/EtOH w stosunku 1:2 v/v zapewni niższe limity detekcji i z dużym prawdopodobieństwem wyższe pokrycie metabolomu.

Obok warunków ekstrakcji również parametry pracy spektrometru mas mają istotny wpływ na wielkość sygnału MS metabolitów. W celu doboru napięcia fragmentora i oceny w jakim stopniu zmiana tego napięcia wpłynie na wielkość sygnału przeprowadzono analizę dla napięcia fragmentora 400 i 600 V. Należy zwrócić uwagę, że zakresy wartości napięcia pracy fragmentora są bardzo różne dla różnych modeli spektrometrów mas, co wynika z różnic konstrukcyjnych. Nie mogą być bezpośrednio przenoszone z modelu na model spektrometru. Mogą być również porównywane tylko w ramach jednego modelu lub generacji spektrometrów. Wysokość pików metabolitów eluujących w czasie retencji

15,4 - 17,5 min zmierzone przy ustawieniu fragmentora 400 i 600 V przedstawiono w tabeli 2, zmiany wysokości pików zobrazowano na rysunku 2. W ujęciu globalnym zmiany fragmentora z 400 V na 600 V w niewielkim stopniu wpłynęły na wielkość sygnału. Dla 45 związków zmiana sygnału była mniejsza niż 10%. Dla 6 związków sygnał się obniżył, dla 4 uległ podwyższeniu. Optymalizacja fragmentora w przypadku modelu LC/QTOF 6550 może być pomijana, gdyż nie wpłynie najprawdopodobniej istotnie na zwiększenie pokrycia metabolomu.

Z uwagi na fakt, że badania metabolomiczne z wykorzystaniem LC/QTOF, z powodu ich dużej czułości oraz selektywności, pozwalają na duże pokrycie metabolomu wydaje się, że mogą być one również skuteczne w wykrywaniu biomarkerów metabolomicznych dobrze znanych i opisanych w literaturze, które mogą posłużyć jako element walidujący zastosowaną dla celów metabolomicznych procedurę analityczną, której ogólny schemat przedstawiono na rysunku 3.

Obejmuje ona etap ekstrakcji metabolitów, analizy LC/QTOF, obróbki danych – generowania związków z wykorzystaniem algorytmów grupujących wszystkie jony przynależące do jednego potencjalnego związku oraz identyfikacji metabolitów, statystycznego profilowania związków z wykorzystaniem np. oprogramowania typu Mass Profiler Professional oraz identyfikacji szlaków metabo-

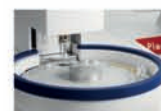


Pomiary w laboratorium chemicznym

Rozwiązania METTLER TOLEDO do laboratorium obejmują automatyczne pomiary analityczne, wydajne opracowywanie procesów chemicznych oraz automatyzację pomiarów laboratoryjnych i procesów produkcyjnych. Dodatkowe usługi gwarantują zgodność z oficjalnymi normami oraz spójne i dokładne dane pomiarowe.

Produkty i rozwiązania

Automatyzacja badań chemicznych
Wagi, ważenie laboratoryjne
Instrumenty analityczne
Pipety i końcówki
Analiza termiczna

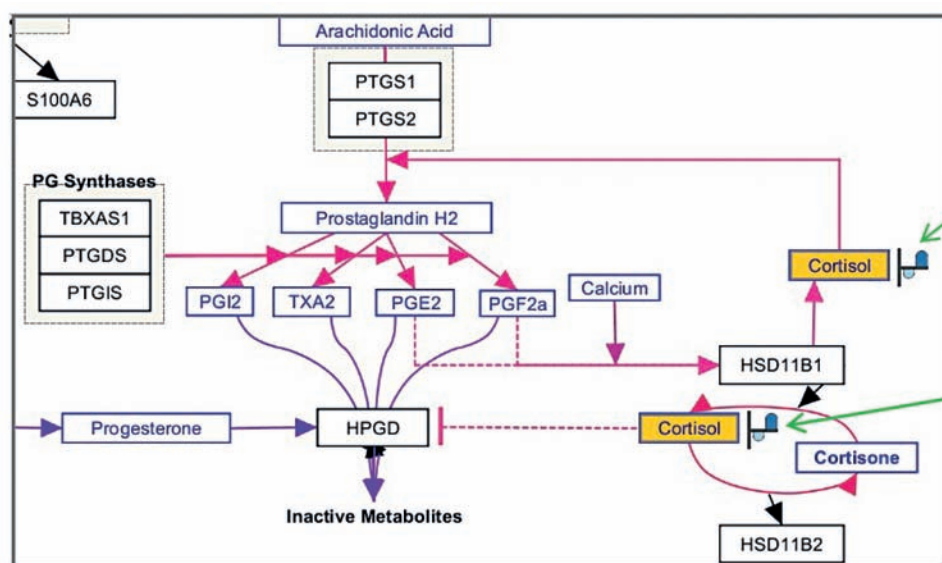


www.mt.com

METTLER TOLEDO



Rys. 3. Schemat procedury analizy metabolomicznej



Rys. 4. Wykrycie podwyższonego poziomu kortyzolu w plazmie grupy badanej w porównaniu z grupą kontrolną, identyfikacja szlaku metabolicznego, który będzie zakłócony w wyniku zmiany ilości kortyzolu w plazmie – szlak syntezy i regulacji prostaglandyny

licznych, które mogą zostać zakłócone na skutek zmiany stężenia metabolitu.

W celu oceny możliwości wykorzystania znanych biomarkerów jako metabolitów walidujących procedurę metabolomiczną przeprowadzono profilowanie metabolitów pomiędzy grupami różniącymi się funkcjonowaniem nerek. Zgodnie z oczekiwaniami dla badanego schorzenia stwierdzono podwyższony

poziom kortyzolu w plazmie w porównaniu do grupy kontrolnej (rys. 4).

Wnioski

Jedną z podstawowych zalet stosowania LC/QTOF w badaniach metabolomicznych jest możliwość jednoczesnego wykrycia wielu metabolitów endo- i egzogennych różniących się znacznie właściwościami chemicznymi. Pociąga to za sobą jednak ograniczenie

zakresu prowadzenia optymalizacji metody do globalnego traktowania związków i doboru parametrów na podstawie zmian odpowiedzi dla większości związków, gdy dla innych sygnał może ulec osłabieniu. W przypadku zmiany stosunku objętości plazmy i rozpuszczalnika ekstrakcyjnego dla 66% metabolitów wielkość sygnału wzrosła, gdy zmieniono stosunek z 1:3 na 1:2 v/v, zmalała dla 10%

związków. Poprawność zastosowanej procedury profilowania metabolomicznego może być walidowana znanymi biomarkerami.

Literatura

[1] I. Artez, D. Meierhofer, International Journal of Molecular Sciences, 17 (2016) 632.
 [2] S. Velghe, S. Capiau, C.P. Stove, Trends in Analytical Chemistry, 84 (2016) 61.
 [3] B. Rochat, Trends in Analytical Chemistry, 84 (2016) 151.
 [4] K. Ortmayr, T.J. Causon, S. Hann, G. Koellensperger, Trends in Analytical Chemistry, 82 (2016) 358.
 [5] E. Gorrochategui, J. Jaumont, S. Lacorte, R. Tauler, Trends in Analytical Chemistry, 82 (2016) 425.
 [6] M. Vinaixa, E.L. Schymanowski, S. Neumann, M. Navarro, R.M. Salek, O. Yanes, Trends in Analytical Chemistry, 78 (2016) 23.

Praca została przedstawiona w postaci wykładu na X Ogólnopolskim Sympozjum „Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości”, 20-23 czerwca 2017, Lublin oraz w monografii „Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości” pod red. Z. Hubickiego, Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2017.

* Emilia Fornal, Anna Warpas, Grażyna Wójcicka, Jerzy Bełtowski – Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Katedra i Zakład Patofizjologii, e-mail: efornal@poczta.onet.pl