

METODA PRO ANALÝZU ISOPROSTANŮ VE TKÁNI LOSOSA

MARTINA BOLECHOVÁ^{a,b},
JOSEF ČÁSLAVSKÝ^a, DANIELA MÁCOVÁ^a,
MILADA VÁVROVÁ^a a MARK TAGGART^c

^a Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ^b Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 2, 656 06 Brno, Česká republika, ^c Environmental Research Institute, North Highland College, University of Highlands and Islands, Thurso, Velká Británie
m.bolechova@centrum.cz

Došlo 6.1.14, přepracováno 17.2.14, přijato 23.5.14.

Klíčová slova: oxidativní stres, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, isoprostany

Úvod

Oxidanty jsou látky zahrnující reaktivní kyslíkové formy (např. $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2), reaktivní dusíkové formy (např. NO_2 , NO^{\bullet} , N_2O_3) a další radikálové částice. V organismu se vytvářejí některými přirozenými procesy, jako jsou např. buněčné dýchání nebo fagocytóza. Jejich množství může být zvýšeno působením vnějších faktorů, kterými jsou např. těžké kovy, UV záření, xenobiotika, průmyslové znečištění životního prostředí nebo kouření. Hladina oxidantů v organismu je udržována v přirozených mezích působením antioxidační ochrany. Za normálního stavu se v organismu nacházejí oxidanty a antioxidanty v rovnováze. Je-li tato rovnováha narušena a dojde ke zvýšení hladiny oxidantů, dochází k tzv. oxidativnímu stresu, který může způsobit až nevratné poškození biologicky důležitých molekul. Oxidanty mohou v organismu atakovat membránové lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, a proto je jejich působení spojováno s příčinou mnoha onemocnění vedoucích k rozvoji karcinogeneze nebo poškození nervového a kardiovaskulárního systému. U některých živočichů se dokonce projevují poškození, která jsou specifická pro přítomnost oxidativního stresu. Jedná se např. o blednutí korálů nebo úhyn raných vývojových stadií lososovitých ryb, uváděného v odborné literatuře pod názvem syndrom M74.

Oxidativní zatížení organismu lze monitorovat analytickými metodami, ve kterých jsou oxidanty sledovány přímo, nicméně existuje i řada metod, které využívají tzv. markery oxidativního stresu vznikající sekundárními reakcemi biomolekul napadených oxidanty. Přímá analýza oxidantů je komplikována jejich vysokou reaktivitou a nestabilitou, zatímco markery patří mezi stabilnější částice.

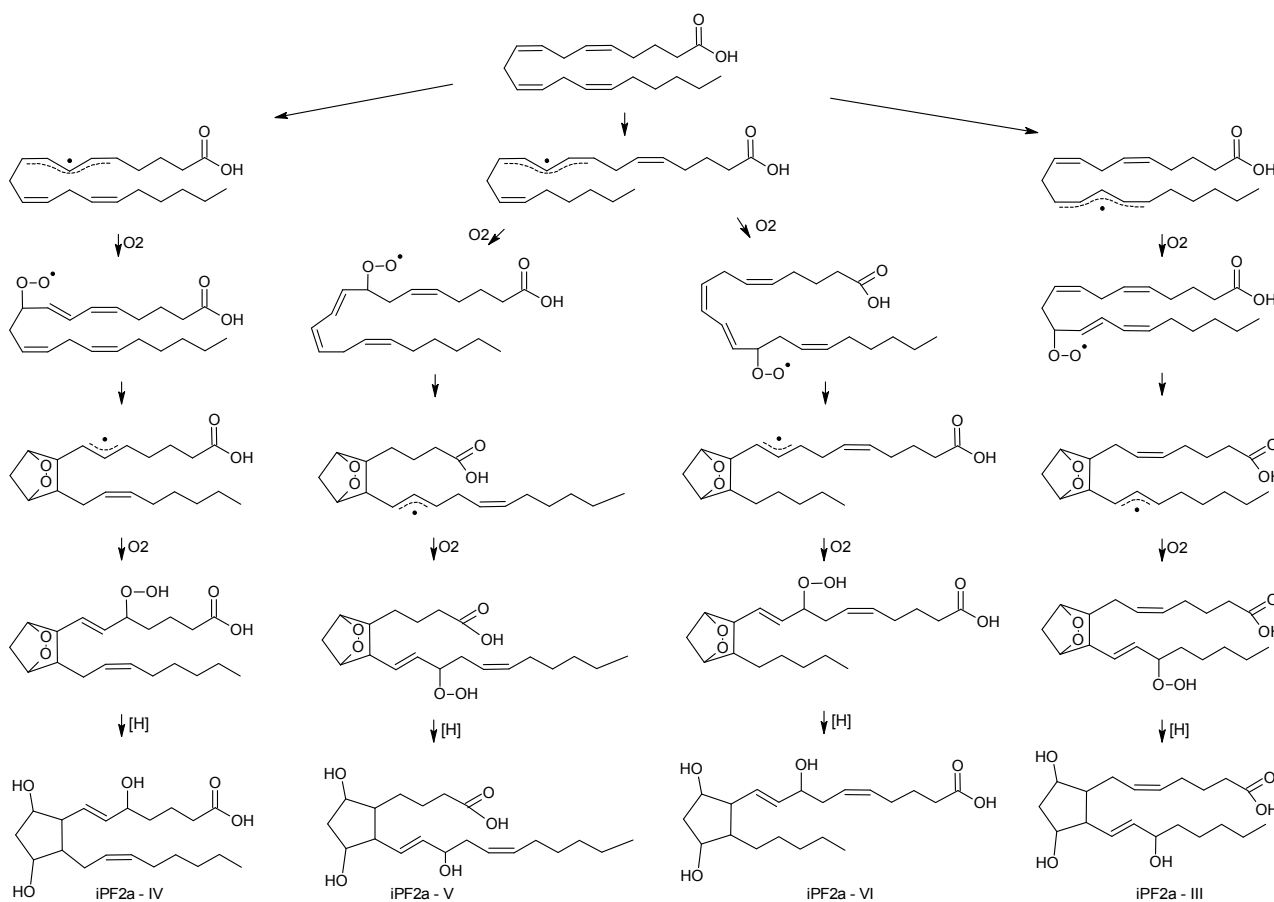
Pro účely hodnocení oxidativního stresu jsou často využívány metody sledující sekundární produkty zmiňované lipidní peroxidace. Těmito produkty jsou isoprostany, malondialdehyd a 4-hydroxy-2-nonenal. Protože se jedná o sloučeniny vyskytující se v organismu zcela přirozeně, srovnává se jejich hladina v organismu, kde je podezření na působení oxidativního stresu, s hladinou v organismu, který není oxidativním stresem zatížený. Čím větší je oxidativní stres, tím vyšší je hladina markerů v postiženém organismu.

Isoprostany jsou stabilní produkty neenzymatické oxidace polyneenasycených mastných kyselin obsahujících ve své struktuře více než tři dvojně vazby. Jedná se o významné biomarkery oxidativního stresu¹. Jejich koncentrace mohou být sledovány v biologických vzorcích moči^{2–6}, krevní plasmě^{2,5,6}, dechového kondenzátu^{1,7} nebo tkáni (mozek, játra, aj.)^{2–5,8}. Například z kyseliny arachidonové vzniká neenzymatickou oxidací 64 regio- a diastereoisomerních isoprostanových forem čtyř různých typů isoprostanů (obr. 1)⁹.

Pro analýzu isoprostanů lze využít např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s fluorimetrickou^{10–12} nebo UV¹³ detekcí. Nicméně je zde nezbytné zavést derivatizační krok, který umožní dostatečně citlivou detekci analytů. Po vhodném derivatizačním kroku, kterým se získá stabilní těkavý produkt, může být pro analýzu isoprostanů použita i plynová chromatografie (GC)¹⁴. Hladina isoprostanů se např. v medicíně často určuje i alternativními imunologickými metodami, a to radioimmunologickou (RIA)¹⁵ nebo imunoenzymatickou metodou (ELISA)^{16,17}. Takové techniky však nejsou obecně dostatečně citlivé a specifické v důsledku konkurenčních imunochemických reakcí. Jejich největší nevýhodou je stanovení pouze jedné formy analytu.

Vzhledem k rychlému vývoji na poli instrumentálních analytických technik byly zmíněné chromatografické metody postupně rozšiřovány o možnosti detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Výhodou této techniky je možnost sledování několika analytů v jedné analýze při současném zachování vysoké citlivosti detekce. Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí byla např. aplikována při sledování prostaglandinů, leukotrienů, tromboxanů a isoprostanů v lidské moči, plasmě a v jiných biologických vzorcích^{18–21}. Hmotnostní spektrometrie má v dané problematice své uplatnění zejména ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS)^{22–28}. V tomto uspořádání se často využívá tandemové hmotnostně spektrometrické detekce, která je vysoce citlivá a selektivní. Navíc zde odpadá nutnost derivatizace analytů, která je nezbytná při využití plynové chromatografie nebo kapalinové chromatografie s fluorescenční a UV detekcí.

Tato studie se zabývá vývojem vhodné metodiky pro sledování isoprostanů jako markerů oxidativního stresu ve vzorku lososí tkáně. Zahrnuje jednak optimalizaci podmínek přípravy vzorku tkáně pro následnou analýzu isoprostanů a samotnou optimalizaci podmínek kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí. Předmětem studie byl vývoj metody pro ana-

Obr. 1. Radikálová oxidace kyseliny arachidonové za vzniku čtyř typů isoprostanů⁹

lýzu isoprostanů vznikajících radikálovou oxidací arachidonové kyseliny. Vzniklých 64 regio- a diastereo- isomerních isoprostanových forem je rozděleno na typy iPF₂α-III, iPF₂α-IV, iPF₂α-V a iPF₂α-VI. Vzhledem k dostupnosti standardů byla metodika optimalizována pro tři zástupce, a to iPF₂α-III, iPF₂α-IV, a iPF₂α-VI.

Experimentální část

Pro následující experimenty byla využita rybí svalovina lososa obecného (*Salmo salar*).

Hydrolyza tkáně

Postup přípravy vzorku tkáně zahrnoval alkalickou hydrolyzu, neboť bylo zapotřebí získat informaci o celkovém množství isoprostanů, tedy volných, ale i vázaných, které jsou součástí fosfolipidové dvojvrstvy buněčných membrán. Metoda pro hydrolyzu a následnou extrakci cílených analytů vycházela ze studií T. Sicilia, H. Li a M. Masoody^{4,5,8} a byla optimalizována pro podmínky

naší laboratoře. Tkáň lososa (350 ± 0,1 mg) byla hydrolyzována 1 ml 1 M KOH po dobu 50 min při 39 ± 2 °C s přídavkem 20 µl butylhydroxytoluenu (BHT), který zde plnil funkci antioxidantu. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 1 ml 1 M HCl a 2 ml 100 mM mravenčí kyseliny pro úpravu pH a vysrážení proteinů. Následovala centrifugace po dobu 10 min při 2400 g.

Extrakce tuhou fází

Ze 3,5 ml supernatantu po centrifugaci byly isoprostany izolovány extrakcí tuhou fází (SPE) pomocí kolonky Strata-X 33 µm s obrácenou fází na polymerním sorbentu (Phenomenex, USA) obsahující 200 mg sorbentu (pro 3 ml vzorku).

Kolonky byly kondicionovány 2 ml MeOH a následně promyty 2 ml vody. Po kvantitativním nanesení celkového objemu vzorku po centrifugaci byly kolonky promyty 2 ml vody a 2 ml směsí MeOH:voda (20:80; v/v). Isoprostany byly eluovány 3 ml methanolu, objem extraktu byl snížen na 0,2 ml pod proudem dusíku. Po filtraci byl vzorek připraven pro následnou LC-MS/MS analýzu.

LC-MS/MS analýza isoprostanů

Chromatografická separace probíhala na ultraúčinném kapalinovém chromatografu Acquity TM (Waters, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Xevo TQ MS (Waters, USA). Kvantitativní hmotnostní spektrometr pracoval v režimu sledování vícenásobných reakcí (MRM). Pro každý analyt byl sledován jeden MRM přechod, který byl specifický pro daný typ isoprostanu. Podmínky stanovení jsou uvedeny v tab. I. Naměřená data byla dále zpracována programem MassLynx V4.1.

Výsledky a diskuse

Optimalizace parametrů

V rámci vývoje metodiky byly optimalizovány následující parametry: (i) MRM přechody pro sledování vybraných isoprostanů, (ii) mobilní fáze, (iii) metoda přečištění vzorku pomocí SPE.

Pro sledování a následnou kvantifikaci analytů pomocí systému UPLC-MS/MS byla použita ionizace elektro-

sprejem se sledováním negativních iontů. Prekurzorem pro následnou aplikaci kolizně indukované disociace byl kvazimolekulární deprotonovaný ion m/z 353, který byl společný pro všechny tři typy sledovaných analytů. Každá skupina isoprostanů obsahuje ve svém produktovém spektru sekundární ionty, které jsou společné pro všechny typy isoprostanů, ale i ionty, které jsou charakteristické pro jeden daný typ isoprostanu. Pro sledování isoprostanů byly vybrány selektivní sekundární ionty pro aplikaci MRM modu hmotnostně spektrometrické detekce a byly optimalizovány podmínky kolizně indukované disociace. Závislost plochy píku isoprostanů na aplikované kolizní energii je znázorněna na obr. 2.

Pro následná měření byly použity hodnoty kolizní energie, které odpovídají maximu křivky na obr. 2. MRM podmínky jsou uvedeny v tab. II.

Na obr. 3 je uvedena ukázka chromatografických píků tří typů isoprostanů po optimalizaci podmínek MRM přechodů.

Součástí dalších optimalizací bylo testování vlivu složení mobilní fáze na odezvu analytů. Předpokládaný pozitivní vliv mobilní fáze obsahující octovou kyselinu na intenzitu iontů sledovaných v negativním modu byl ověřen

Tabulka I

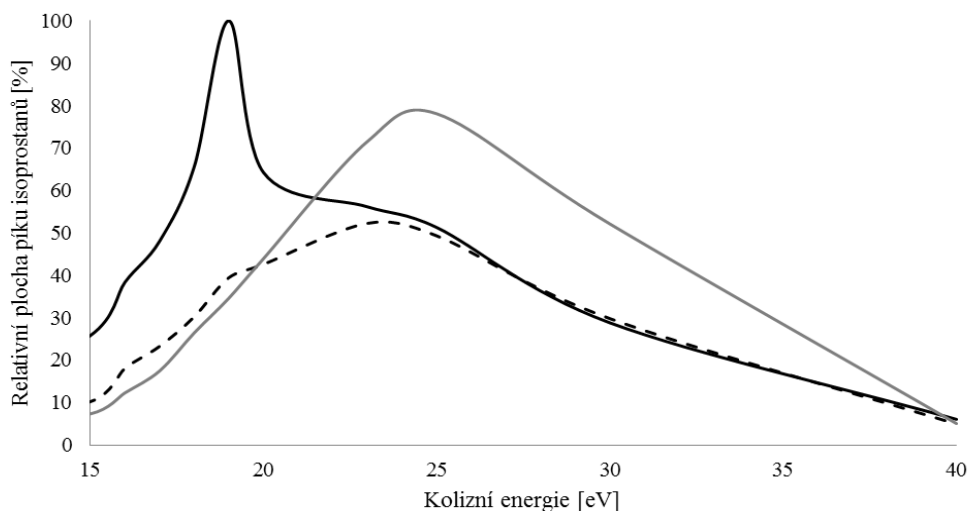
Podmínky stanovení isoprostanů pomocí UPLC-MS/MS

Parametr	Hodnota
<i>UPLC</i>	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters, USA)
Složení mobilní fáze	A: 0,1% kyselina octová ve vodě B: 0,1% kyselina octová v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml min ⁻¹
Gradient mobilní fáze	0 min 10 % B 0–4,5 min lineární změna z 10 na 99,5 % B 4,5–7 izokratický při 99,5 % B 7,1–10 změna zpět na počáteční podmínky, konec analýzy
Objem nástřiku	2,5 μl
Teplota kolony	40 °C
Teplota autosampleru	15 °C
<i>Iontový zdroj</i>	
Ionizace	ESI ⁻
Napětí na kapiláře	– 3,7 kV
Sušící plyn	N ₂ , průtok 650 dm ³ h ⁻¹
Zmlžovací plyn	N ₂ , průtok 50 dm ³ h ⁻¹
Teplota zdroje	150 °C
Teplota sušícího plynu	500 °C
<i>Hmotnostní analyzátor</i>	
Typ	tandemový hmotnostní analyzátor, trojitý kvadrupól
Detekční mod	MRM
Kolizní plyn	argon, průtok: 0,15 ml min ⁻¹

Tabulka II

Kolizně disociační reakce isoprostanů pro MRM mód hmotnostního spektrometru XEVO TQ MS

Isoprostan	MRM reakce [$m/z \rightarrow m/z$]	Napětí na vstupní čočce [V]	Kolizní energie [eV]
iPF ₂ α-III	353 → 193	40	25
iPF ₂ α-IV	353 → 127	40	23
iPF ₂ α-VI	353 → 115	40	19



Obr. 2. Optimalizace kolizní energie MRM analýzy pro sledování isoprostanů; — 353 > 115 (VI), - - - 353 > 127 (IV), — 353 > 155 (III)

srovnáním s mobilními fázemi obsahujícími mravenčí kyselinu a octan amonný. Plochy píků každého analytu zvláště byly pro srovnání normalizovány a graficky porovnány (obr. 4).

Ze srovnání lze usoudit, že použité mobilní fáze měla velmi podobný efekt na každý ze tří analytů. Plocha píků isoprostanů je téměř dvojnásobně větší při použití mobilní fáze obsahující pouze octovou kyselinu, ve srovnání s plochou píků, získanou při aplikaci mobilní fáze obsahující pouze mravenčí kyselinu. Použití octanu amonného

pro modifikaci mobilní fáze zde mělo významný vliv na snížení intenzity píků sledovaných analytů. V souvislosti s tímto experimentem byl při každé použité mobilní fázi určován i limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ), které byly určeny jako trojnásobek resp. desetinásobek poměru odezvy vůči šumu nulové linie. Výsledné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tab. III.

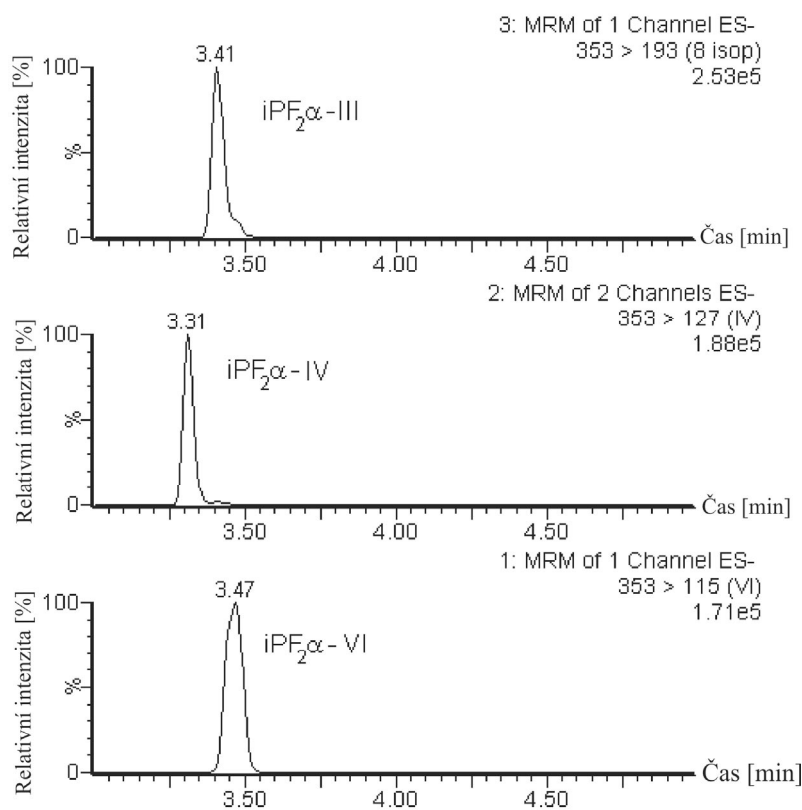
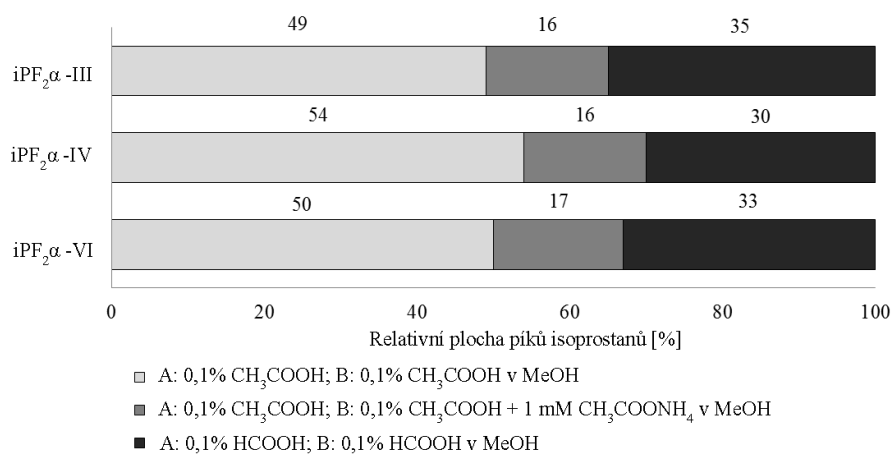
Nejnižšího limitu kvantifikace bylo dosaženo chromatografií s mobilní fází obsahující pouze octovou kyselinu (I). Testované mobilní fáze neměly výrazný vliv na tvar

Tabulka III

Vliv použité mobilní fáze na limity detekce a kvantifikace UPLC-MS/MS metody pro analýzu isoprostanů

Isoprostan	iPF ₂ α -III			iPF ₂ α -IV			iPF ₂ α -VI		
	I ^a	II ^b	III ^c	I ^a	II ^b	III ^c	I ^a	II ^b	III ^c
LOD, ng ml ⁻¹	0,013	0,089	0,060	0,039	0,114	0,051	0,021	0,080	0,051
LOQ, ng ml ⁻¹	0,042	0,297	0,201	0,129	0,381	0,171	0,069	0,265	0,171

^a Složení mobilních fází: I, A: 0,1% CH₃COOH, B: 0,1% CH₃COOH v MeOH; ^b II, A: 0,1% CH₃COOH, B: 0,1% CH₃COOH a 1mM CH₃COONH₄ v MeOH; ^c III, A: 0,1% HCOOH, B: 0,1% HCOOH v MeOH

Obr. 3. Záznam z analýzy standardní směsi isoprostanů o koncentraci 100 ng ml⁻¹

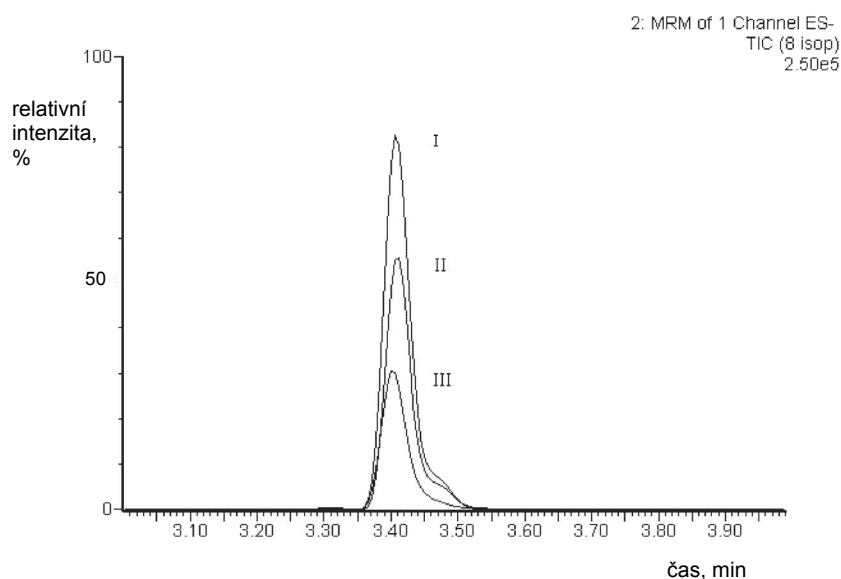
Obr. 4. Závislost normalizované plochy píků isoprostanů na použité mobilní fázi

píku. Na obr. 5 je uvedena ukázka ovlivnění chromatogramu iPF₂α-III použitou mobilní fází.

Pro následující chromatografické experimenty na UPLC-MS/MS byla použita mobilní fáze tvořená složkou

A (0,1% CH₃COOH ve vodě) a B (0,1% CH₃COOH v methanolu).

Nedílnou součástí přípravy vzorku tkáně pro hodnocení oxidačního stresu je optimalizace podmínek pro



Obr. 5. Chromatogram $iPF_2\alpha$ -III s použitou mobilní fází I, A: 0,1% CH_3COOH a B: 0,1% CH_3COOH + 1 mM CH_3COONH_4 ; II, A: 0,1% $HCOOH$ a B: 0,1% $HCOOH$ v MeOH; III, A: 0,1% CH_3COOH a B: 0,1% CH_3COOH v MeOH

Tabulka IV

Porovnání výtěžností isoprostanů na SPE kolonkách použitých pro přečištění a zkoncentrování analytů

Isoprostan	Výtěžnost [%]	
	Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge, 360 mg Sorbent per Cartridge, (Waters)	Strata™-X 33 μ m Polymeric Reversed Phase, 200 mg/3 ml, (Phenomenex)
$iPF_2\alpha$ -III	76,95 \pm 1,9 %	99,85 \pm 1,4 %
$iPF_2\alpha$ -IV	80,53 \pm 1,4 %	98,85 \pm 1,1 %
$iPF_2\alpha$ -VI	89,70 \pm 2,3 %	99,40 \pm 2,1 %

extrakci isoprostanů. Vzhledem k obecně nízkým hodnotám koncentrace isoprostanů v biologické tkáni je zapotřebí vzorek zkoncentrovat a přečistit pro odstranění potenciálních interferentů. Pro tento účel lze použít extrakci na tuhé fázi (SPE). Během optimalizace byly porovnávány dvě SPE kolony lišící se použitou stacionární fází. První obsahovala reverzní fázi C-18 (Waters) a druhá polymerní reverzní fázi (Phenomenex). Výtěžností na obou kolonkách pro jednotlivé isoprostanů jsou shrnuty v tab. IV.

Z výsledků jednoznačně vyplývá vhodnost použití kolony obsahující polymerní stacionární fázi.

Validace metody

K posouzení a dokumentaci kvality analytického postupu byla určena kritéria metody jako je opakovatelnost, linearita, mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ). Pro tři sledované typy isoprostanů byla sestrojena kalibrační závislost plochy píku na koncentraci. Získané kalibrační body v rozmezí od 0,1 do 100 $ng\ ml^{-1}$ (což odpovídá 0,066 a 66 $ng\ g^{-1}$) byly zpracovány metodou lineární regrese s koeficientem determinace více než 0,999 pro všechny tři typy isoprostanů. Tímto byla prokázána linearita v daném

Tabulka V

Validované parametry UPLC-MS/MS metody pro analýzu isoprostanů ve tkáni lososa

Isoprostan	t_R [min]	LOD [$ng\ g^{-1}$]	LOQ [$ng\ g^{-1}$]	Koeficient determinace R^2	Opakovatelnost RSD ($n=6$) [%]
$iPF_2\alpha$ -III	3,41	0,009	0,028	0,9993	14,6
$iPF_2\alpha$ -IV	3,31	0,026	0,085	0,9992	9,9
$iPF_2\alpha$ -VI	3,47	0,014	0,045	0,9997	14,7

koncentračním rozsahu. Limity detekce (LOD, S/N ~ 3) a kvantifikace (LOQ, S/N ~ 10) byly odvozeny z poměru signálu k šumu. Validace probíhala analýzou obohacených vzorků tkání lososa v šesti opakováních. Validované parametry jsou shrnuty v tab. V.

Závěr

Byla vypracována a validována metoda pro stanovení tří vázaných i nevázaných forem isoprostanů jako potenciálních markerů přítomnosti oxidativního stresu v lososích tkáních. Metoda je charakterizována nízkými hladinami kvantifikace a vysokou přesností.

Princip vyvinuté metody spočívá v kombinaci vhodné extrakční techniky s vysoce selektivní a přesnou detekční metodou. Pro uvolnění vázaných isoprostanů z fosfolipidové dvojvrstvy byla použita alkalická hydrolyza s následným přečištěním vzorku na SPE kolonkách. Isoprostanů byly dále analyzovány ultraúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem a detekcí negativních iontů.

Navrhovaný postup byl validován v matici tkáně lososa obecného (*Salmo salar*). Důležitým krokem celého postupu je uvolnění vázaných forem isoprostanů hydrolyzou, který lze aplikovat i na další tkáňové vzorky. Z tohoto důvodu lze konstatovat, že vyvinutá metoda je obecně vhodná pro sledování markerů oxidativního stresu v biologických tkáních.

Seznam použitých zkratk

BHT	butylhydroxytoluen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí
LOD	mez detekce, limit detekce
LOQ	mez stanovitelnosti, limit kvantifikace
MRM	sledování vícenásobných reakcí
RIA	radioimmunoassay
SPE	extrakce tuhou fází
UPLC-MS/MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí

Tato studie byla podporována MŠMT ČR, grant č. FCH-S-13-2087.

LITERATURA

- Hegedüs A., Erdei S., Janda T., Tóth E., Horváth G., Dudits D.: *Plant Sci.* 5, 1329 (2004).
- Chiabrando C., Valagussa A., Rivalta C., Durand T., Guy A., Zuccato E., Villa P., Rossi J.-C., Fenalli R.: *J. Biol. Chem.* 3, 313 (1999).
- Gao L., Zackert W. E., Hasford J. J., Danekis M. E., Milne G. L., Remmert C., Reese J., Yin H., Tai H.-H., Dey S. K., Porter N. A., Morrow J. D.: *J. Biol. Chem.* 31, 28479 (2003).
- Sicilia T., Mally A., Schauer U., Pähler A., Völkel W.: *J. Chromatogr. B.* 861, 48 (2008).
- Li H., Lawson J. A., Reilly M., Adiyaman M., Hwang S., Rokach J., FitzGerald G. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 6, 13381 (1999).
- Sircar D., Subbaiah P. V.: *Clin. Chem.* 2, 251 (2007).
- Montuschi P., Ragazzoni E., Valente S., Corbo G., Mondino C., Ciappi G., Ciabattoni G.: *Inflamm. Res.* 12, 502 (2003).
- Masoodi M., Nicolaou A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3023 (2006).
- Morrow J. D., Hill K. E., Burk R. F., Nammour T. M., Badr K. F., Roberts L. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 23, 9383 (1990).
- Toyooka T., Ishibashi M., Terao T., Imai K.: *Biomed. Chromatogr.* 6, 143 (1992).
- Ritov V. B., Kelley D. E., Kagan V. E.: *Anal. Biochem.* 311, 10 (2002).
- Korotchenko O. D., Alekseev S. M., Evstigneeva R. P., Karpova G. V., Isai S. V.: *Chem. Nat. Compd.* 6, 612 (1999).
- Eberhard J., Jepsen S., Albers H. K., Açil Y.: *Anal. Biochem.* 280, 258 (2000).
- Goswami S., Mai J., Bruckner G., Kinsella J. E.: *Prostaglandins* 5, 693 (1981).
- Montuschi P., Barnes P. J., Ciabattoni G.: *Methods Mol. Biol.* 594, 73 (2010).
- Wang Z., Ciabattoni G., Créminon C., Lawson J., Fitzgerald G. A., Patrono C., Maclouf J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 94 (1995).
- Carpagnano G. E., Kharitonov S. A., Resta O., Fochino-Barbaro M. P., Gramiccioni E., Barnes P. J.: *Chest J.* 124, 1386 (2003).
- Tsikas, D.: *J. Chromatogr. B.* 717, 201 (1998).
- Lee C.-Y. J., Jenner A. M., Halliwell B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 696 (2004).
- Signorini C., Comporti M., Giorgi G.: *J. Mass Spectrom.* 38, 1067 (2003).
- Nourooz-Zadeh J., Gopaulb N. K., Barrowc S., Mallett A. I., Anggrad E. E.: *J. Chromatogr. B.* 667, 199 (1995).
- Taylor A. W., Bruno R. S.: *Lipids* 43, 925 (2008).
- Harman S. M., Liang L., Tsitouras P. D., Gucciardo F., Heward C. B., Reaven P. D., Ping W., Ahmed A., Cutler R. G.: *Free Radical Biol. Med.* 10, 1301 (2003).
- Yin H., Porter N. A., Morrow J. D.: *J. Chromatogr. B.* 827, 157 (2005).
- Ohashi N., Yoshikawa M.: *J. Chromatogr. B.* 746, 17 (2000).
- Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Najmanová V., Fenclová Z., Vlčková Š., Lebedová J., Pelclová D.: *J. Chromatogr. B.* 877, 2477 (2009).
- Sircar D., Subbaiah P. V.: *Clin. Chem.* 53, 251 (2007).

28. Liang Y., Wei P., Duke R. W., Reaven P. D., Harman S. M., Culter R. G., Heward C. B.: *Free Radical Biol. Med.* 34, 409 (2003).

M. Bolechová^{a,b}, J. Čáslavský^a, D. Mácová^a, M. Vávrová^a, and M. Taggart^c (^a*Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Technical University, Brno.* ^b*Central Inspectional and Testing Institute in Agriculture, Brno, Czech Republic.* ^c*Environmental Research Institute, North Highland College, Thurso, UK*): **A Method of Analysis of Isoprostanes in Salmon Tissue**

A sensitive and reliable method is proposed allowing quantification of isoprostanes in salmon tissue using ultra-HPLC coupled to tandem MS. Solid phase extraction is used for sample concentration and purification. Repeatability, linearity, limits of detection and quantification were assessed by validation.

Odborná skupina termické analýzy České společnosti chemické

pořádá

TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ

18. červen 2015

Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

www.thermal-analysis.cz



TAS 2015

TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ

18. ČERVEN 2015
PARDUBICE

Cílem semináře je umožnit studentům, mladým i zkušeným vědcům výměnu poznatků a zkušeností s využíváním termoanalytických technik v různých oblastech výzkumu. Příspěvky bude možné na semináři prezentovat formou krátkých přednášek nebo posterů. Všechny prezentované příspěvky budou uveřejněny ve sborníku s ISBN.

Závazné přihlášky: 30. duben 2015

Plné texty příspěvků: 15. květen 2015

Konferenční poplatky:

1000,- Kč (studenti: 500,- Kč)

Kontakt: petra.sulcova@upce.cz

Další informace: www.thermal-analysis.cz