

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Guba Andrea

**Metabolomikai vizsgálatok egészséges és patológias
állapotokban**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Metabolomikai vizsgálatok egészséges és patológiás állapotokban

Guba Andrea

Témavezető: Dr. Kalló Gergő



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	6
2. Bevezetés	8
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1. Metabolomikai analízisek endogén molekulák vizsgálatára	9
3.1.1. Aminosavak szerkezete és élettani funkciói.....	9
3.1.2. Biogén aminok szerkezete és élettani funkciója	11
3.1.3. Aminosavak és biogén aminok vizsgálati lehetőségei	13
3.1.3.1. Az AccQ-Tag derivatizációs technika	14
3.2. Metabolomikai analízisek xenobiotikumok vizsgálatára	15
3.2.1. Az autoimmun hepatitisz és kezelése	15
3.2.2. Az azatioprin metabolizmusa	16
3.2.3. Az azatioprin terápia felhasználása.....	17
3.3. Folyadékkromatográfia-tömegspektrometria	19
3.3.1. Ionizációs technikák	19
3.3.2. Tömeganalizátorok	20
3.3.3. Tandem tömegspektrometria	20
4. Célkitűzések.....	22
5. Anyagok és módszerek	23
5.1. Felhasznált anyagok.....	23
5.2. Mintagyűjtés	23
5.3. Standardok és minőségi kontroll (QC) minták készítése	24
5.4. AccQ-Tag reagensel történő származékképzés	24
5.5. Kromatográfiás és tömegspektrometriás paraméterek	24

5.5.1. Aminosavak és biogén aminok vizsgálata.....	25
5.5.2. AZA metabolitok vizsgálata.....	26
5.6. LC-MS módszerek validálása.....	27
5.6.1. Aminosavak és biogén aminok vizsgálatára szolgáló módszer validálása	27
5.6.2. AZA metabolitok vizsgálatára szolgáló módszer validálása	28
5.7. Szérum és könny minták aminosav és biogén amin tartalmának analízise	30
5.8. AZA metabolitok vizsgálata AIH-s betegek vérmintáiban	30
6. Eredmények	32
6.1. UHPLC-MS módszerfejlesztés aminosavak és biogén aminok vizsgálatára	32
6.1.1. Tömegsektrometriás paraméterek meghatározása	32
6.1.2. UHPLC-UV-MS módszerfejlesztés	35
6.1.3. UHPLC-UV-MS módszer validáció	37
6.3.1. Szérum és könny minták aninosav és biogén amin tartalmának meghatározása	39
6.2. UHPLC-MS módszerfejlesztés Azatioprin metabolitok vizsgálatára ...	45
6.2.1. Tömegsektrometriás paraméterek meghatározása	46
6.2.2. UHPLC-MS módszerfejlesztés	46
6.2.3. UHPLC-MS módszer validáció.....	47

6.2.3.1. A módszer érzékenysége és kalibrációs tartománya.....	47
6.2.3.2. Szelektivitás, specificitás és átmosódás vizsgálata	48
6.2.3.3. Pontosság, precizitás és visszanyerés.....	48
6.2.3.4. Mátrixhatás vizsgálata.....	49
6.2.3.5. Stabilitás vizsgálatok.....	50
6.2.4. AZA metabolitok koncentrációjának meghatározása AIH-ban szenvető betegek vérmintáiban.....	52
7. Diszkusszió	53
7.1. Aminosavak és biogén aminok meghatározása.....	53
7.2. Azatioprin metabolitok meghatározása	55
7.3 A vizsgálatok korlátai	57
8. Összefoglalás	58
9. Summary	59
10. Tárgyszavak/keywords	60
11. Köszönetnyilvánítás.....	61
12. Mellékletek	62
13. Irodalomjegyzék	76
14. Publikációs lista	82

1. Rövidítések jegyzéke

A proteinogén aminosavak estében az általánosan alkalmazott egy és hárombetűs jelölésket használtam.

6-MeTIMP	6-metil-tioinozin-monofoszfát
6-MeTITP	6-metil-tioinozin-trifoszfát
6-MMP	6-metil-merkaptopurin
6-MMP _r	6-metil-merkaptopurin ribozid
6-MP	6-merkaptopurin
6-TA	6-tiuronsav
6-TG	6-tioguanin
6-TGDP	6-tioguanin-difoszfát
6-TGMP	6-tioguanin-monofoszfát
6-TGN	6-tioguanin-nukleotid
6-TGTP	6-tioguanin-trifoszfát
6-TIMP	6-tioinzin-monofoszfát
6-TITP	6-tioinozin-trifoszfát
6-TXMP	6-tioxantozin-monofoszfát
ACQ	6-aminokinolil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamát
AIH	autoimmun hepatitis
ALL	akut limfoblasztos leukémia
AMQ	6-aminokinolin
APCI	atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
APPI	atmoszférikus nyomású fotoionizáció
AUC	görbe alatti terület
AZA	azatioprin
Cad	Kadaverin
CE	ütközési energia
Cit	Citrullin
CV	variációs együttható
DnsCl	Danzil-klorid
DP	deklaszter potenciál
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMA	Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)
ESI	elektroporlasztásos ionizációt
Eta	Etil-amin
Eth	Etanolamin
FDA	Food and Drug Administration
FMOC-Cl	9-fluorenil-metil-klórformiát-klorid
GC	gázkromatográfia
GMPS	guanidin-5-monofoszfát-szintetáz
GST	glutathion-S-transzferáz
HGPRT	hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz

Hsn	Hisztamin
IBD	gyulladásos bélbetegségek
ICR	ion ciklotron rezonancia analizátor
IM	ion mobilitási cella
IMPDH	inozin-5-monofoszfát-dehidrogenáz
IT	ioncsapda analizátor
ITPA	inozin-trifoszfát-pirofoszfátáz
Komp.	komponens
Konc.	koncentráció
LC	folyadékkromatográfia
LLOQ	alsó kvantitálási határ
LOD	kimutatási határ
LOQ	kvantitálási határ
ME	mátrixhatás
Mea	Metil-amin
MRM	Multiple Reaction Monitoring mód
MS	tömegspektrometria
N.D.	nem detektálható
NMR	mágneses magrezonancia
OPA	Oftálaldehid
Orn	Ornitin
OT	Orbitrap analizátor
PDA	fotodiódasoros detektor
Pha	2-Fenetil-amin
Put	Putreszcin
Q	kvadrupol analizátor
SD	standard deviáció
SIL	stabil izotóppal jelzett vegyület
SRM	Selected Reaction Monitoring mód
Stn	Szerotonin
Tau	Taurin
TDM	terápiás gyógyszerszint monitorozás
TNF	tumor nekrosis faktor
TOF	repülési idő analizátor
Tpa	Triptamin
TPMT	tiopurin-S-metiltranszefáz
Tra	Tiramin
UHPLC	Ultrahagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
ULOQ	felső kvantitálási határ
UV	ultraibolya
VVT	vörösvértest
XO	xantin-oxidáz

2. Bevezetés

A tudományos kutatás számos területén egyre nagyobb szerepet kapnak az omikai technikák, amelyek lehetővé teszik a komplex biológiai minták rendszerszintű vizsgálatát. A proteomika, genomika és transzkriptomika mellett, egyre többször alkalmaznak metabolomikai megközelítéseket, mivel a különböző metabolitok mennyiségi változása indikatív lehet egyes patológiás elváltozások esetében, mint például az elhízás, vagy a cukorbetegség. A metabolit profilban bekövetkező eltérések segíthetnek azonosítani egyes betegségek korai jeleit, ezáltal diagnosztikai jelentőséggel bírnak. Ezen felül hozzájárulhatnak a kórlefolyás nyomon követéséhez, valamint értékes információkat nyújthatnak a személyre szabott kezelések tervezéséhez. Ennek következtében a biomarker kutatások során is gyakran előtérbe kerülnek bizonyos kis molekulák vagy molekulacsoportok mennyiségi változásának vizsgálata. Cukorbetegség esetén a vér glükóz szintjének vizsgálata a rutin diagnosztika szerves része, emellett más metabolitok, például egyes zsírsavak mennyisége is fontos információval bír a terápia szempontjából. A tumoros elváltozások esetén szintén fontosak lehetnek egyes metabolitok, például a 2-hidroxi-glutarát mennyisége, amely segítheti a tumor azonosítását. A szervezet saját metabolitjainak analízise mellett a metabolomika a gyógyszerhatóanyagok és gyógyszermetabolizmus vizsgálatában is alapvető szerepet játszik, mivel lehetővé teszi a gyógyszerek és azok metabolitjainak komplex biológiai reakciók során bekövetkező változásainak átfogó elemzését. E megközelítés révén a kutatók képesek feltárni a gyógyszerek farmakokinetikai és farmakodinamiai jellemzőit, beleértve a felszívódást, szöveti eloszlást, metabolizmust és kiürülést. A metabolomikai elemzések segíthetnek az egyéni variabilitás megértésében is, azaz hogy a különböző genotípusok hogyan befolyásolják a gyógyszerek hatását és a mellékhatások kockázatát. Ezen túlmenően a metabolomika alkalmazása hozzájárulhat új gyógyszerek felfedezéséhez és a meglévő terápiák optimalizálásához, így a személyre szabott orvoslás fejlődéséhez is jelentős mértékben hozzájárul.

Kutatásunk során különböző testfolyadék minták metabolit profilját vizsgáltuk meg, egészséges és patológiás állapotokban kromatográfiás elválasztással kapcsolt tömegspektrometriás technikák használatával. Munkánk során aminosavak, biogén aminok, valamint gyógyszer metabolitok vizsgálatát végeztük el, mely magába foglalta a szükséges kromatográfiás és tömegspektrometriás módszerek fejlesztését, az elérhető módszerek módosítását és optimalizálást.

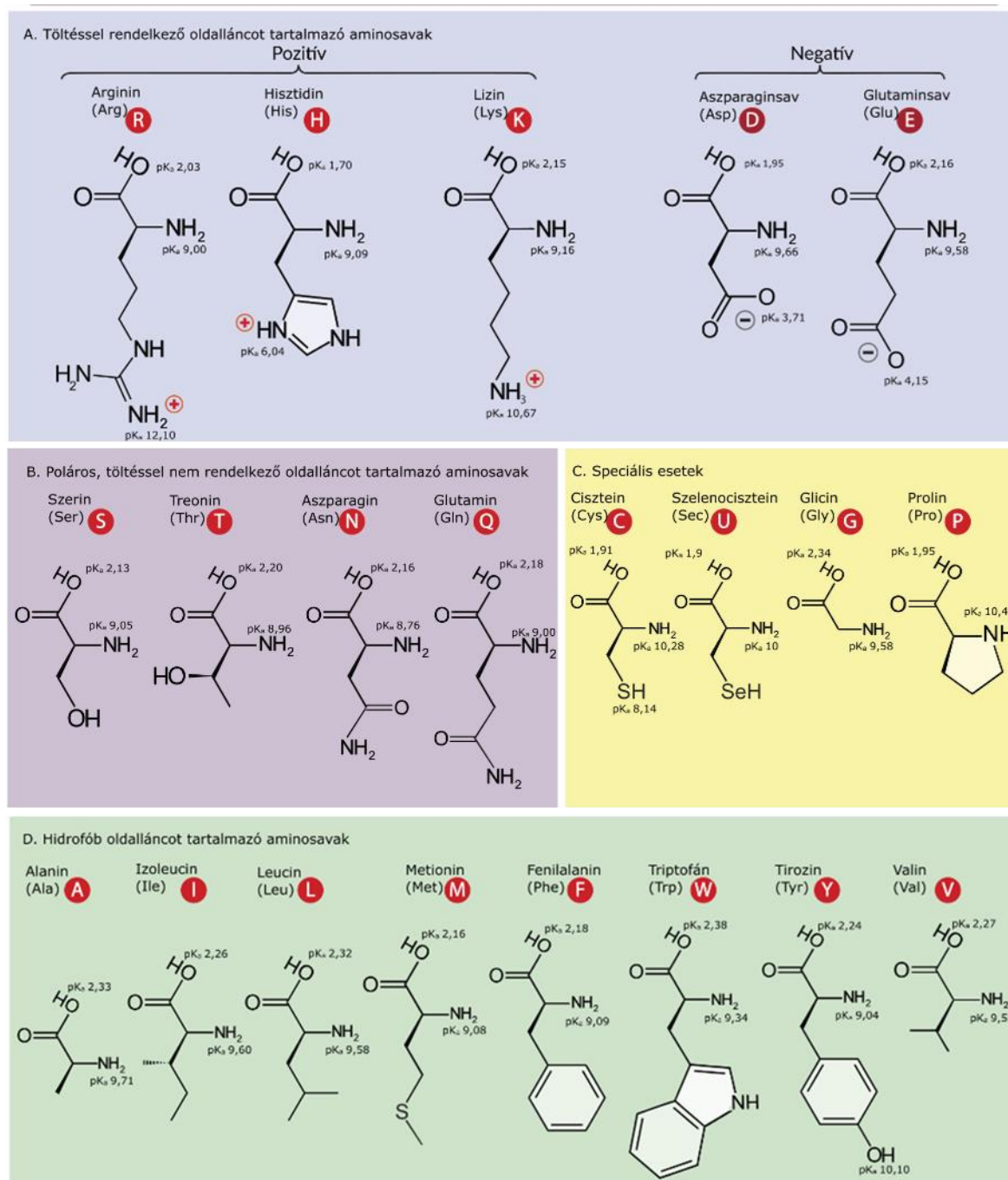
3. Irodalmi áttekintés

3.1. Metabolomikai analízisek endogén molekulák vizsgálatára

A metabolomikai analízis a biológiai rendszerekben zajló metabolikus folyamatok átfogó vizsgálatát jelenti, amely során az endogén molekulák, például lipidek, aminosavak és szénhidrátok koncentrációját és dinamikáját vizsgálják. Az endogén molekulák olyan anyagok, amelyek a szervezetben természetes úton keletkeznek, és fontos szerepet játszanak az élő rendszerek biokémiai folyamataiban. A metabolomikai kutatások során ezeknek a molekuláknak az azonosítása és mennyiségi meghatározása történik, valamint ezen adatokból a molekuláris interakciókra és az adott metabolitokra adott biológiai válaszokra következtethetünk. Emiatt a szervezet endogén molekuláinak, mint például a nitrogéntartalmú szerves molekulák vizsgálata kiemelten fontos az élő szervezetek működésének megértése szempontjából.

3.1.1. Aminosavak szerkezete és élettani funkciói

Az aminosavak a fehérjék elemi építőkövei, melyekből az emberi szervezetben 20 α -aminosav és az iminosav prolin használódik fel a fehérjék szintézisére [1]. Mint a nevükből is kiderül ezek a vegyületek olyan karbonsavak melyekben az α -helyzetű szénatomhoz egy aminocsoport kapcsolódik. Az egyes aminosavak az α -szénatomhoz kapcsolódó oldallácaikban különböznek egymástól és a glicin kivételével legalább egy kiralitáscentrumot tartalmaznak [2]. A proteinogén aminosavak L-aminosavak, az emberi szervezetben jellemzően csak kis mennyiségű D-aminosav található. Az aminosavak csoportosítása több féle képen történhet, az egyik gyakori csoportosítás az oldallánc kémiai karakterisztikája alapján történik, melyet az **1. ábra** szemléltet.



1. ábra A 21 fehérje építő aminosav csoportosítás az oldallánc karakterisztikája alapján. Az aminosavak hárombetűs és egybetűs rövidítései és savi disszociációs állandói is feltüntetésre kerültek. Az ábrán látható töltéssel rendelkező oldalláncok esetében a fiziológiás 7,4-es pH-n előforduló töltési állapotot reprezentálja. (<https://www.technologynetworks.com/applied-sciences/articles/essential-amino-acids-chart-abbreviations-and-structure-324357>)

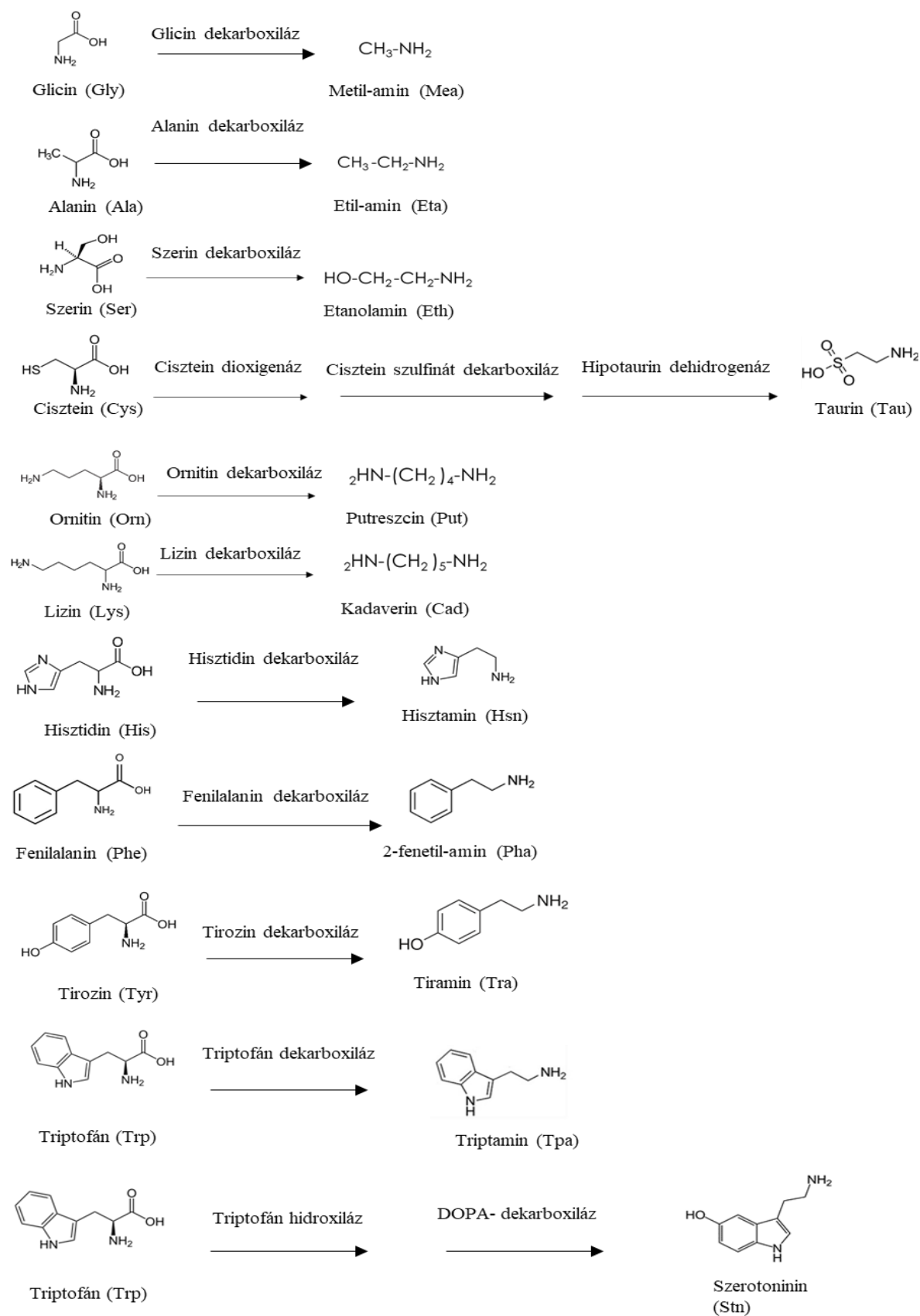
Az oldallánc, amely egyetlen hidrogén atomtól - mint a glicin esetében - egészen az összetett aromás gyűrűkig terjedhet - mint a triptofán esetében - egyedi kémiai és fizikai tulajdonságokkal ruházza fel az egyes aminosavakat. Ezen oldalláncok változatossága okozza az egyes aminosavak sajátos kémiai viselkedését és funkcióit [3].

Egy másik csoportosítási lehetőség az aminosavak esszencialitája alapján történik. Definíció szerint azokat az aminosavakat, amelyeket a szervezet nem tud saját maga szintetizálni, és a táplálékkal kell felvenni, esszenciális aminosavaknak nevezzük. Ide tartozik többek között a fenilalanin, a valin, a triptofán, a treonin, az izoleucin, a metionin, a hisztidin, a leucin és a lizin. Ezzel szemben a nem esszenciális aminosavak a szervezetben más molekulákból szintetizálhatók, és nem szükséges a táplálékkal történő bevitelük. Továbbá, léteznek olyan aminosavak is, amelyek normál körülmények között nem esszenciálisak, de bizonyos helyzetekben esszenciálissá válhatnak, ezek a feltételesen esszenciális aminosavak [1,3].

A fehérjeszintézisben betöltött szerepük mellett az aminosavak képesek az anyagcsere útvonalak szabályzására is. Bizonyos aminosavakat különféle patológias állapotokban potenciális biomarkerként azonosítottak. Depressziós és egyéb mentális zavarokban szenvedő egyéneknél csökkent szérumszintű triptofán szintet figyeltek meg [4], míg tüdő-, gyomor-, vastagbél-, emlő- és prosztata daganatos betegek esetében több aminosav szintjének változását is kimutatták [5]. Bár a különféle tumorok esetében más-más aminosav szintje bizonyult indikatívnak, a glutamin minden daganatos elváltozás esetében esszenciális a tumorsejtek osztódása szempontjából [6]. A mentális zavarok és daganatos elváltozások mellett az aminosavak a cukorbetegség patomechanizmusában is szerepet játszanak [5]. Az inzulin gátolja a fehérjék lebontását, miközben fokozza az aminosavak felvételét a sejtekbe [5]. Ezenkívül a lizin, aszpartát, treonin, metionin és alanin a 2-es típusú cukorbetegség potenciális biomarkereinek bizonyultak [7].

3.1.2. Biogén aminok szerkezete és élettani funkciója

A biogén aminok a nitrogéntartalmú szerves vegyületek csoportjába tartoznak. A legtöbb biogén amin előállítására több különböző sejt típus is képes, míg bizonyos biogén aminok, például a szerotonin előállítására csak bizonyos dedikált sejt típusok, például a neuronok képesek [1]. A kutatásaink során vizsgált biogén aminok képződését a **2. ábra** szemlélteti.



2. ábra Az általunk vizsgált biogén aminok képződése.

A biogén aminok változatos élettani funkciókkal rendelkeznek. A hisztamin fontos szerepet tölt be a sejtproliferációban, és differenciációban, a regenerációban és a sebgyógyulásban, az érrendszer permeabilizációjában, neurotranszmissziós folyamatokban; valamint a gyulladásos reakciókban is [8]. A triptamin, a tiramin és a 2-fenetil-amin neuromodulátorként és vaszkuláris regulátorokként szerepet játszanak az idegrendszeri és érrendszeri funkciókban [9], míg a kadaverin és a putreszcin a sejtosztódás fontos molekulái [10]. Élettani szerepük mellett a biogén aminok számos betegség patomechanizmusában, mint például a magas vérnyomás [11], a skizofrénia [12] és a rák kialakulásában [13] is szerepet játszanak. Egy japán populáción végzett vizsgálat során negatív korrelációt mutattak ki az etilamin és a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának kockázata között [14]. A metil-amin az egyik legegyszerűbb alifás amin az emberi szervezetben, melyet számos szövetben és testfolyadékban azonosítottak [15]. A metil-amin szerepét megfigyelték központi idegrendszeri zavarok esetén [15], valamint igazolták, hogy terhességi toxémia esetén a metil-amin koncentrációja szülés után hosszabb ideig magasabb marad, mint normál terhesség esetén [16]. Az etanolamin az emberi test minden sejtjében jelen van a foszfolipidek alkotórészeként, valamint szabad formában a testfolyadékokban is megtalálható. A foszfatidil-etanolamin fő alkotórészeként az etanolamin szerepet játszik a neurodegeneratív rendellenességek, mint például a Parkinson-kór progressziójában, a tumorfejlődésben és a ferroptózis folyamataiban [17]. A szerotonin mint a központi idegrendszer fontos neurotranszmittere kulcsszerepet játszik a depresszió kialakulásában [18], valamint összefüggésbe hozható az elhízással és a cukorbetegséggel is [19].

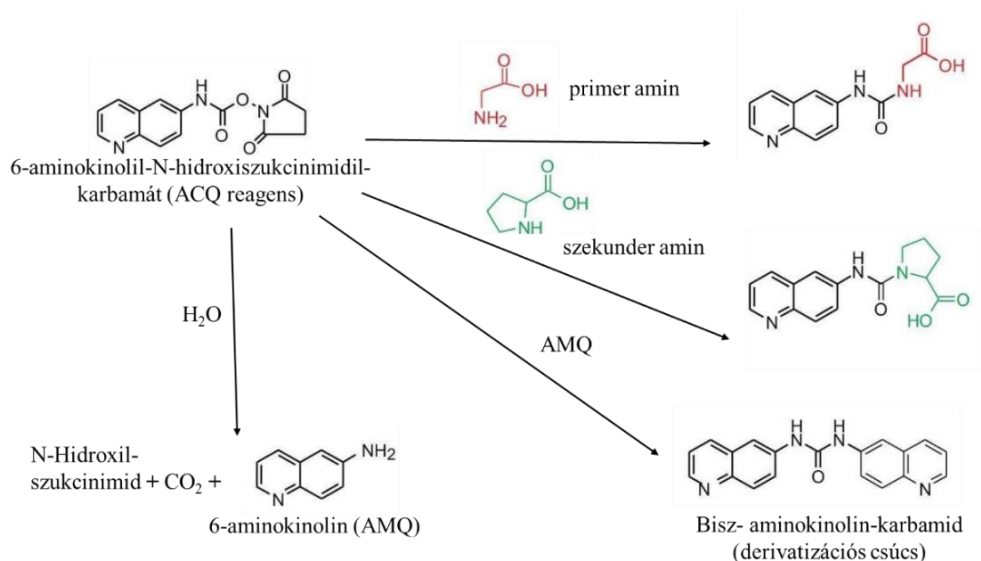
3.1.3. Aminosavak és biogén aminok vizsgálati lehetőségei

Az aminosavak és biogén aminok vizsgálata számos biokémiai és analitikai módszerrel lehetséges, mint például a gázkromatográfia (GC), folyadékkromatográfia (LC), mágneses magrazonancia (NMR) és tömegspektrometria (MS). A nagy érzékenységű LC-MS rendszerek segítségével az alacsony koncentrációban jelen levő molekulák is vizsgálhatók komplex biológiai mintákban. LC és LC-MS analízisek esetében mégis gyakran szükség van a célvegyületek módosítására a detektálási és kvantitálási határ javítása érdekében. Ha származékképzésre van szükség, az történhet a mintaelőkészítés során, valamint az oszlop után (post-column) is elvégezhető [20–22]. A származékképzés a vizsgálandó molekula és egy reagens közötti kémiai reakciót jelent, amely megváltoztatja a molekula kémiai és fizikai tulajdonságait, javítva a detektálást, az elválasztási

hatékonyságot és az illékonyságot, valamint stabilizálja a molekulákat, ami jobb kromatográfiás analízist tesz lehetővé [22–25]. Az aminosavak és biogén aminok származékképzésére számos reagens használható, mint például danzil-klorid (DnsCl), ftálaldehid (OPA), 9-fluorenil-metil-klórformiát-klorid (FMOC-Cl) vagy az AccQ-Tag [20–22]. Az MS sok esetben a kromatográfiás analízisek kiegészítőjeként használható az elemzések szelektivitásának és érzékenységének növelésére, valamint az ultraibolya (UV) vagy fluoreszcens detektálással azonosított komponensek megerősítésére [26,27].

3.1.3.1. Az AccQ-Tag derivatizációs technika

Az AccQ-Tag derivatizációs technika (Waters), egyfajta származékképzés, ami a 6-aminokinolil-N-hidroxiszekcinimidil-karbamátot (ACQ) használja a primer és szekunder aminok rendkívül stabil fluoreszcens származékokká történő átalakítására (**3. ábra**) [28]. A reakció első lépésében a primer és szekunder aminok reakcióba lépnek az ACQ reagenssel. A második lépés egy lassabb reakció, ahol a fennmaradt reagens vízzel reagál, és 6-aminokinolin (AMQ), N-hidroxiszekcinimid és CO_2 melléktermékek képződnek. A derivatizálás utolsó lépése során a fő melléktermék, az AMQ és a fennmaradt reagens egymással egy rendkívül stabil bisz-aminokinolin-karbamidot képez. Ezek a melléktermékek nem befolyásolják az aminosavak azonosítását vagy mennyiségi meghatározását [29], viszont a kromatográfiás analízis során minőségi kontrollként szolgálhatnak a derivatizálási reakció sikerességének és hatékonyságának bizonyítására. A módosított molekulák folyadékkromatográfiával elválaszthatók, a fluoreszcens származékok pedig 260 nm hullámhosszon detektálhatók.



3. ábra Az AccQ-Tag Ultra reagenssel (ACQ) végzet származékképzési reakciók primer és szekunder aminok estében.

3.2. Metabolomikai analízisek xenobiotikumok vizsgálatára

A xenobiotikumok olyan anyagok, melyek nem természetes részei az élő szervezetek anyagcseréjének, azonban bejuthatnak a szervezetbe. Xenobiotikumok lehetnek például a gyógyszerek, vegyi anyagok, ipari szennyezők, peszticidek vagy egyéb környezeti toxikus anyagok. A metabolomikai elemzések lehetőséget biztosítanak ezen anyagok biológiai rendszerekre gyakorolt hatásának vizsgálatára, ezáltal információt nyerhetünk arról, hogy ezek a xenobiotikumok hogyan változtatják meg az élő szervezetek anyagcserefolyamatait. A xenobiotikumok a szervezetben komplex és dinamikus folyamatokat, például biotranszformációs reakciókat indítanak el, melyek során a szervezet megpróbálja a vegyületeket inaktiválni és/vagy eltávolítani. E folyamatok során az anyagok új metabolitok formájában jelennek meg, melyek változatos módon hatnak a biológiai rendszerekre.

A xenobiotikumokkal kapcsolatos metabolomikai analízisek rendkívül fontosak a toxikológiai kutatásokban, mivel segítenek az ipari és gyógyszeripari termékek biztonságának és hatékonyságának felmérésében. Továbbá, az egyes vegyületek biotranszformációs profiljának elemzése segíthet a személyre szabott orvoslásban is, mivel az emberek között előforduló genetikai különbségek befolyásolhatják a xenobiotikumok metabolizmusát, így a kezelés optimalizálható.

A metabolomikának kulcsfontosságú szerepe van a terápiás gyógyszerszint-monitorozásban (therapeutic drug monitoring, TDM) is, mivel lehetővé teszi a gyógyszerek hatásainak, metabolizmusának és kiválasztódásának részletes és átfogó vizsgálatát a szervezetben. A TDM célja, hogy biztosítsa a gyógyszer hatékony, ugyanakkor biztonságos alkalmazását, azáltal, hogy figyelemmel kíséri a gyógyszerek és azok metabolitjainak koncentrációját a vérplazmában vagy egyéb biológiai mintákban, és ez alapján meghatározza az optimális dózist. Ez legfőképpen a szűk terápiás tartománnyal és toxikus mellékhatásokkal rendelkező gyógyszereket érinti, valamint azon terápiás készítményeket, melyek biotranszformációja során inaktív vagy toxikus metabolitok képződhetnek.

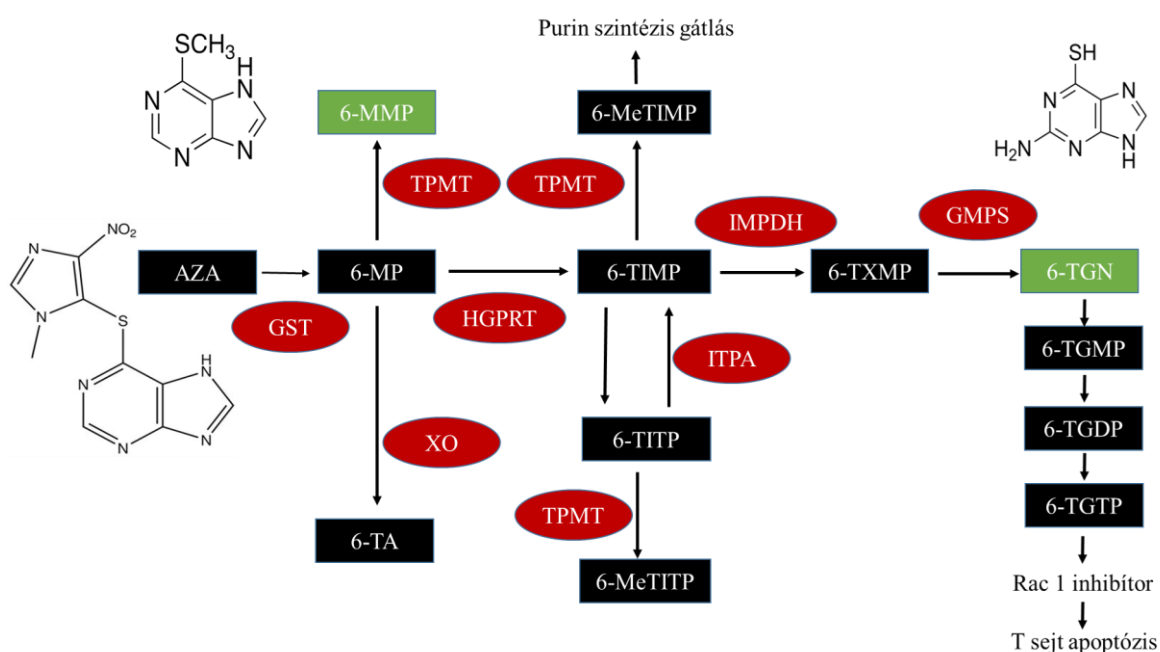
3.2.1. Az autoimmun hepatitisz és kezelése

Az autoimmun hepatitisz (AIH) egy ritka krónikus gyulladásos májbetegség, amely elsősorban nőket érint, de minden nemnél bármely életkorban előfordulhat. Az AIH-t a szérum immunglobulin G és a keringő autoantitestek emelkedett szintje, a transzaminázok fokozott aktivitása és májgyulladás jellemzi [30]. A visszatérő májbetegségek, mint a

cirrózis, akut hepatitis és végstádiumú májbetegség kialakulásának megelőzése érdekében az AIH kezelése a legtöbb esetben élethosszig tartó terápiát igényel [30]. Kezelése az esetek többségében szteroid-monoterápiával kezdődik, amelyet az azatioprinnal (AZA) végzett fenntartó kezelés követ [31,32]. Bár a hosszú távú szteroidterápia számos mellékhatást, például cukorbetegséget, hipertóniát és súlygyarapodást okozhat, ezek előfordulása csökkenthető az AZA és szteroidok kombinált alkalmazásával. [30–32].

3.2.2. Az azatioprin metabolizmusa

Az AZA metabolizmusa összetett, és több enzimatiszus útvonalat foglal magában, amelyek aktív, inaktív és potenciálisan toxikus metabolitokat eredményeznek. A 4. ábra a főbb metabolikus útvonalakat ábrázolja.



4. ábra Az AZA metabolitok főbb metabolikus útvonalai [33]. A zöld szín a bioaktív míg a fekete szín az inaktív metabolitokat jelöli. Piros színnel az átalakítást végző enzimek láthatók. AZA: azatioprin; 6-MP: 6-merkaptopurin; 6-TA: 6-tiuronsav; 6-MeTIMP: 6-metil-tioinozin-monofoszfát; 6-TIMP: 6-tioinozin-monofoszfát; 6-TITP: 6-tioinozin-trifoszfát; 6-MeTITP: 6-metil-tioinozin-trifoszfát; 6-TXMP: 6-tioxantozin-monofoszfát; 6-TGMP: 6-tioguanin-monofoszfát; 6-TGDP: 6-tioguanin-difoszfát; 6-TGTP: 6-tioguanin-trifoszfát; TPMT: tiopurin-S-metiltranszferáz; XO: xantin-oxidáz; ITPA: inozin-trifoszfát-pirofoszfátáz; IMPDH: inozin-5-monofoszfát-dehidrogenáz; GMPS: guanidin-5-monofoszfát-szintetáz; 6TGN: 6-tioguanin-nukleotid; 6-MMP: 6-metil-merkaptopurin; GST: glutatione-S-transzferáz; HGPRT: hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz.

Az AZA körülbelül 88%-a a gyomor-bél traktusból történő felszívódást követően a vörösvértestekben (VVT) a glutathione-S-transzferáz (GST) segítségével 6-merkaptopurinná (6-MP) és metilnitro-tioimidazollá alakul át. A 6-MP a továbbiakban több útvonalon keresztül metabolizálódhat. A tiopurin-metiltranszferáz (TPMT) enzim katalizálta reakcióban metilálódhat 6-metil-merkaptopurin riboziddá (6MMP_r), ami potenciális hepatotoxikus vegyület. A xantin-oxidáz (XO) által inaktív 6-tiuronsavvá (6-TA) alakulhat; illetve a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) révén 6-tiozin-monofoszfáttá (6-TIMP) konvertálódhat [34]. A TPMT képes a 6-TIMP S-metilációját is katalizálni, így 6-metiltioinozin-monofoszfát (6-MeTIMP) keletkezik. Mind a 6-TIMP, mind a 6-MeTIMP gátolja a foszforibozil-pirofoszfát-amidotranszferáz enzimet, ezáltal csökkentve a *de novo* purin bioszintézis mértékét. Ezt követően a 6-TIMP egy kétlépcsős reakcióban 6-tioguanin-nukleotidokká (6-TGN) alakul át. Első lépésként az inozin-5-monofoszfát-dehidrogenáz (IMPDH) által katalizált reakcióban 6-tioxantozin-monofoszfáttá (6-TXMP) alakul, amelyet a guanidin-5-monofoszfát-szintetáz (GMPS) alakít át 6-TGN-é. A 6-TGN-ek tekinthetők az AZA fő terápiás metabolitjainak. A 6-TGN-ek sorozatos foszforilációs lépésekben átalakulnak 6-tioguanin-monofoszfáttá (6-TGMP) majd 6-tioguanin-difoszfáttá (6-TGDP) és végül 6-tioguanin-trifoszfáttá (6-TGTP) [33]. Bár a 6-TGN-eket tekintik a fő terápiás metabolitoknak, magas szintjük azonban életveszélyes mieloszuppressziót okozhat [33,34].

3.2.3. Az azatioprin terápiás felhasználása

Az AIH kezelésén kívül az AZA és metabolitjainak alkalmazása kiterjed a krónikus gyulladásos betegségek, gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) és gyulladásos bélbetegségek (IBD) kezelésére is [35–37]. Az AZA-t eredetileg a gyermekkori leukémia kezelésére fejlesztették ki, azonban a T-sejtekre gyakorolt antiproliferatív hatásának felismerése következtében sikeresen alkalmazzák autoimmun betegségek kezelésében és szervátültetést követő kilökődés megelőzésére. Azonban a tiopurinok immunszuppresszív hatásának pontos molekuláris mechanizmusa még nem teljesen tisztázott [33], ám ismeretes, hogy az endogén purinokkal szembeni antagonisták hatásuk révén beavatkozhatnak a DNS-szintézisbe [33]. A tiopurin gyógyszerek hatékonyak a betegség kiújulásának megelőzésében, de nem alkalmasak a remisszió indukálására [33]. Biológiai gyógyszerekkel, például tumor nekrosisz faktor (TNF) elleni szerekkel kombinálva kedvező hatás érhető el, mivel javítják a klinikai remissziót és a nyálkahártya gyógyulását [38].

Azonban azon betegek körében, akiknél antitestek képződnek egy anti-TNF készítménnyel szemben, jelentősen nagyobb a valószínűsége annak, hogy egy következő anti-TNF terápia során is antitestek keletkeznek. Ilyen esetekben a kombinált anti-TNF és tiopurin terápia során a TDM alkalmazása elősegítheti az immunogenitás megelőzését a második anti-TNF kezelés esetén. A TDM alkalmazása az anti-TNF és tiopurin kombinációs terápiában nemcsak a biológiai hatóanyag szintjének monitorozását, hanem a 6-TG szintjének ellenőrzését és a tiopurin koncentrációjának optimalizálását is magában kell foglalja a biológiai hatások maximalizálása érdekében [39]. A tiopurin szintjének dózismódosítással vagy farmakológiai manipulációval történő optimalizálása költséghatékonyabb lehet, mint a biológiai hatóanyag dózisének növelése [39].

Az AZA szint stabilizálódásához 2-4 hetes kezelésre van szükség, ami más immunszuppresszáns kezeléshez képest hosszabb idő [34]. Az AZA kezelés laboratóriumi monitorozása magában foglalja a teljes vérkép elemzést és a májfunkciós tesztek elvégzését, különös figyelmet fordítva a hepatitis és a leukopénia előjeleinek megjelenésére. A kezelés során az első két hónapban kéthetente, ezt követően pedig háromhavonta javasolt a laboratóriumi ellenőrzés. A Brit Gasztroenterológiai Társaság nemrégiben egy olyan ajánlást fogalmazott meg, hogy az IBD AZA kezelése során a tiopurin metabolitokat is ellenőrizni kell a toxicitás és a dozírozási hibák megelőzése érdekében [34]. A rendelkezésre álló adatok többsége IBD-betegekre vonatkozó vizsgálatokból származik, és az autoimmun AIH kezelésében alkalmazott AZA-ra vonatkozó specifikus ajánlások még nem kerültek kidolgozásra. A tiopurin-metabolitok nyomon követése a 6-TGN és 6-MMP koncentrációjának mérésével történhet az eritrocitákban, ezt követően pedig az AZA dózisa úgy módosítható, hogy a 6-TGN és 6-MMP koncentrációk a normális terápiás tartományban maradjanak. Ez különösen fontos azoknál a betegeknél, akik nem mutatnak megfelelő választ a kezelésre, vagy akiknél toxikus metabolitok halmozódnak fel. A tiopurin-metabolitok monitorozása azonban csupán a standard laboratóriumi mérések kiegészítő elemzését jelenti [34].

3.3. Folyadékkromatográfia-tömegspektrometria

Biológiai minták, mint például a vér vagy más testfolyadékok analitikai vizsgálata során nagyon fontos a minták komplexitásának csökkentése annak érdekében, hogy minél több információ legyen kinyerhető egy mintából. A különféle elválasztástechnikai eljárások egyik legszélesebb körben használt formája a folyadékkromatográfia, azon belül is a nagyhatékonyságú- vagy ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC és UHPLC). A nagy felbontóképesség, jó reprodukálhatóság, az elválasztást biztosító kölcsönhatási típusok széles választéka és a tömegspektrometriás analízissel való kompatibilitás miatt a folyadékkromatográfia széles körben alkalmazott a különféle omikai, például proteomikai és metabolomikai kutatások során. A kromatográfban a vizsgálandó vegyületek elválasztása a fizikai kémia tulajdonságokon alapul, míg a tömegspektrométerben a kromatográfiás oszlopról eluálódó komponensek, az ionizációt követő tömeg/töltés (m/z) viszony alapján kerülnek elválasztásra [40]. Komplex biológiai minták esetében mindkét elválasztási mód előnyei kihasználhatók. Megfelelő kromatográfiás elválasztás segítségével csökkenthető a mátrix hatás, az ionszuppresszió, valamint lehetőséget biztosít izobár vegyületek elválasztására és vizsgálatára is.

A tömegspektrométer működése során semleges részecskékből gáz fázisú ionokat állít elő, majd az ionok elválasztását végzi tömeg/töltés (m/z) arányuk alapján. Az egyes tömegspektrométerek különféle ionforrásokat és tömeganalizátorokat tartalmaznak, melyek eltérő fizikai/kémiai tulajdonságokat használnak ki az ionizációhoz és az ionok elválasztásához.

3.3.1. Ionizációs technikák

Különböző ionizációs technikák ismertek melyek feladata a vizsgálandó minták ionizációja és gázhalmazállapotba alakítása. Kromatográfiás elválasztással kapcsolt analízis során a leggyakrabban három ionizációs technikát alkalmaznak, az elektroporlasztásos ionizációt (Electrospray Ionization, ESI), atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) és az atmoszférikus nyomású fotoionizáció (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Az alkalmazott ionizációs technika kiválasztása nagymértékben függ a komponensek méretétől és polaritásától [40]. Ezen ionizációs technikák az úgynevezett lágy ionizációs technikák csoportjába tartoznak, amely azt jelenti, hogy az ionizáció során a molekulák nem fragmentálódnak. Az ESI során a kromatográfiás oszlopról eluálódó mintát egy nagyfeszültségre kapcsolt kapillárison

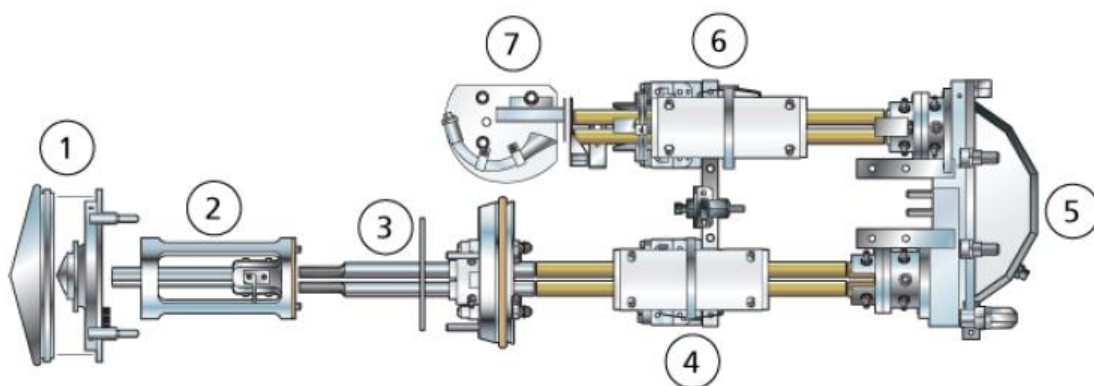
keresztül áramoltatják át, majd egy hőmérséklet gradiens és szárítógáz alkalmazásával az oldószer elpárolgása után az ionizált célmolekulák bejutnak a tömegspektrométerbe, ahol megtörténik az ionok m/z alapú elválasztása.

3.3.2. Tömeganalizátorok

Az analizátorok feladata az ionforrásból érkező ionok tömeg/töltés (m/z) arányuk szerinti elválasztása. Az elválasztás történhet elektromos áram vagy mágneses mező segítségével. Az analizátorok csoportosítása működési elvük és csoportosításuk általában felbontás alapján történhet így megkülönböztethetünk kis, közepes és nagyfelbontású tömeganalizátorokat. A leggyakoribb analizátorok a kvadrupól analizátor (Q), repülési idő analizátor (TOF), ioncsapda (IT), ion ciklotron rezonancia analizátor (ICR), Orbitrap (OT) és ion mobilitási cella (IM) [40].

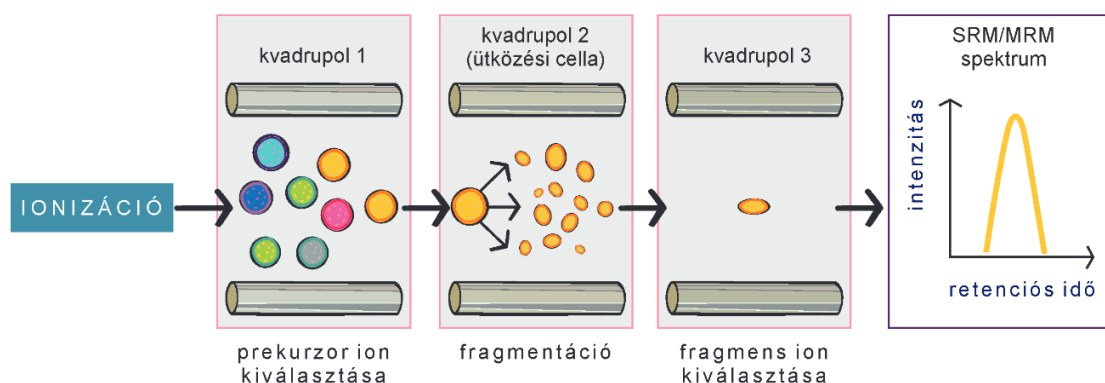
3.3.3. Tandem tömegspektrometria

Az egyszerű tömegspektrométerek használata mellett igen elterjedt az úgynevezett tandem tömegspektrométerek használata. A tandem tömegspektrométerek több analizátort is tartalmaznak és használatukkal lehetőség van a célmolekulák fragmetálására, ezáltal fontos szerkezeti információk nyerhetők a tandem tömegspektrumokból (MS/MS). A tandem tömegspektrométerek tartalmazhatnak több ugyanazon az elven működő analizátort, például a három kvadrupóllal felszerelt készülékeket, de lehetnek úgynevezett hibrid készülékek, amelyek több különböző elven működő analizátort tartalmaznak. Az **5. ábra** a QTRAP hibrid tandem tömegspektrométer (Sciex) felépítését szemlélteti, amely kvadrupól és ioncsapda analizátorokat tartalmaz.



5. ábra Sciex 5500 Qtrap tömegspektrométer felépítése. 1. takarólemez és orifisz, 2. Qjet ion vezető, 3. Q0-ás régió, 4. Q1 kvadrupól, 5. Q2 ütköző cella, 6. Q3 kvadrupól/lineáris ioncsapda, 7. detektor

A rendszer különlegessége, hogy beállítástól függően a harmadik kvadrupol képes lineáris ioncsapda üzemmódban is működni. A hibrid felépítésnek köszönhetően a készülékkel különféle analízis formák érhetőek el, mint például a fragmens ion analízis, prekursor ion analízis, semleges vesztes vizsgálat vagy az úgynevezett Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM, MRM). SRM módban működve a készülék csak egy előre meghatározott prekursor iont enged bejutni az ütközési cellába, majd a képződött fragmens ionok közül a harmadik kvadrupol csak egy előre meghatározott fragmenst enged tovább a detektorba (6. ábra).



6. ábra Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM) elve [41].

Így a tömegspektrométer csak a kiválasztott prekursor ion és a hozzá tartozó kiválasztott fragmens ion együttes jelenléte esetén regisztrál jelet [41]. A prekursor ion-fragmens ion párhoz tartozó m/z értékek, úgynevezett SRM átmenetek, beállítása biztosítja a módszer szelektivitását és specifikusságát. A görbe alatti terület (AUC) arányos a tömegspektrométerbe bejutott anyag mennyiségével, így a módszer kvantitatív vizsgálatokra is kiválóan alkalmazható. Szemi-quantitatív módban az SRM módszer jól alkalmazható relatív kvantitálásra, azonban megfelelő beállításokkal abszolút kvantitálás is lehetséges. Mind relatív, mind abszolút kvantitálásnál szükség van stabil izotóppal jelzett (SIL) referencia molekulák használatára, melyek belső standardként funkcionálnak az analízisek során. SRM analízis során a tömegspektrométer több száz átmenet egyidejű vizsgálatára képes, ezáltal több célmolekula vizsgálatára is alkalmas ugyanazon mintából. Az SRM módszerek érzékenysége tovább javítható, ha a célmolekulákat egy megadott retenciós idő ablakban monitorozzuk, ez az úgynevezett „scheduled” SRM módszer, melynek segítségével több száz komponens megfelelő érzékenységgű vizsgálata is lehetséges relatíve rövid kromatográfiás elválasztás mellett is.

4. Célkitűzések

Munkám során célzott tömegspektrometriás módszerek fejlesztését és alkalmazását tűztem ki célul metabolomikai kérdések megválaszolásához. A kutatás során az alábbi specifikus célokat tűztem ki:

1. UHPLC-SRM módszer fejlesztése aminosavak és biogén aminok vizsgálatára
2. A kifejlesztett módszer validálása és alkalmazása komplex biológiai minták vizsgálatára
3. UHPLC-SRM módszer fejlesztése Azatioprin metabolitok vizsgálatára
4. A kifejlesztett módszer validálása és alkalmazása klinikai minták vizsgálatára

5. Anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált anyagok

Az aminosav és biogén aminosav analízis során vizsgált aminosav standardokat a Waters Kft.-től (alanin, arginin, aszparaginsav, glicin, glutaminsav, hisztamin, cisztein, lizin, szerin, prolin, treonin, tirozin, metionin, valin, leucin, izoleucin és fenilalanin) és a Merck Kft.-től (aszparagin, glutamin, taurin, hisztamin, etanolamin, metil-amin, etil-amin, citrullin, ornitin, putreszcin, kadaverin, tiramin, triptamin, 2-fenetil-amin) vásároltuk. A stabil izotóppal jelzett triptofánt a Cambridge Isotope Laboratories-től szereztük be. A derivatizációs reakciókhoz használt AccQ-Tag Ultra derivatizáló kitet, valamint a kromatográfiás elválasztáshoz használt AccQ-Tag Ultra A és B eluent a Waters Kft. szállította, míg az LC minőségű metanolt és vizet, valamint a mintaelőkészítéshez használt 3kDa-os Nanosept oszlopot a VWR Kft.-től szereztük be.

Az azatioprin (AZA) metabolitok vizsgálata során használt LC minőségű acetonitrilt, metanolt és vizet a VWR Kft.-től, a HPLC minőségű trifluor-ecetsavat, 6-tioguanint (6-TG), 5-bromouracilt és DL-ditiotreitolt (DTT) a Merck Kft.-től szereztük be. A 6-metil-merkaptopurint (6-MMP) és a stabil izotóppal jelölt 6-tioguanin- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ (izotóp tisztaság 98 atom % ^{13}C , 98 atom % ^{15}N) és 6-metil-merkaptopurin-D₃ (izotóp tisztaság 98 atom % D₃) a Toronto Research Chemicals Inc.-től vásároltuk.

5.2. Mintagyűjtés

Az aminosavak és biogén aminosavak meghatározását szérumból és könnyűmintákban végeztük el. A kutatás során 5 egészséges donortól gyűjtöttünk szérumból és könnyűmintákat. A mintagyűjtés a Helsinki deklaráció elvei szerint történt a Debreceni Egyetem által kiállított etikai engedély alapján (DEOEC RKEB/IKEB 4701A-2016). A könnyűminták gyűjtését üvegkapilláris segítségével végeztük, (VWR Kft.) stimuláció és érzéstelenítés nélkül [42], korábbi munkánkhoz hasonlóan [43]. Minden donor mindkét szeméből gyűjtöttünk könnyűmintákat.

Az AZA-tartalmú Imurannal (Aspen Pharma Trading Ltd.) kezelt AIH betegek vérmintáit a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Gasztroenterológiai Osztályának munkatársai bocsájtották rendelkezésünkre. A mintagyűjtés a Helsinki deklaráció elvei szerint történt a Debreceni Egyetem által kiállított etikai engedély alapján (12759-6/2019/EÜIG).

5.3. Standardok és minőségi kontroll (QC) minták készítése

A vizsgálandó aminosavakból és biogén aminokból egy 2,5 mmol/L-es koncentrációjú törzsoldatot készítettünk (minden egyes vizsgált molekula koncentrációja 2,5 mmol/L volt), amint -20°C-on tároltunk. A minőségi ellenőrzésre (QC) szolgáló minták három különböző koncentrációban (2,5 µmol/L, 7,5 µmol/L és 15 µmol/L) készültek három különböző mátrixban (MilliQ víz, szérum és könny), amiket a későbbiekben a validációs kísérletekhez használtunk fel.

Az AZA metabolitok (6-TG és 6-MMP) standard oldatát a 6-TG és 6-TG_SIL esetében metanol-2M NaOH-ban (3:7), míg a 6-MMP és 6-MMP_SIL esetében tiszta metanolban készítettük el 1 mg/ml végkoncentrációban. Az egyedi oldatokat -20 °C-on tároltuk. A kalibrációs görbék elkészítése során az egyedi standard oldatok sorozathígításánál metanol-víz (3:7) oldószert használtunk. A QC mintákat egészséges önkéntesektől nyert szérum felhasználásával készítettük, az egyes analitokat 5 ng/ml, 20 ng/ml, 625 ng/ml és 1250 ng/ml végkoncentrációban tartalmzták, melyeket a későbbi validációs kísérletekhez használtunk fel.

5.4. AccQ-Tag reagensel történő származékképzés

Az aminosav és biogén amin analízishez használt standardok és biológiai minták derivatizálását AccQ-Tag Ultra derivatizációs kit (Waters) segítségével végeztük el a gyártó utasításaink megfelelően. 10 µl mintához 70 µl borát puffert (pH=8,8), majd 20 µl AccQ-Tag Ultra derivatizációs reagenst adtunk, majd a komponensek összekeverése után a mintát 1 percreg inkubáltuk szobahőmérsékleten, amit egy 10 perces inkubálás követett 55 °C-on, amíg a 3.1.3.1 fejezetben tárgyalt reakciók lezajlottak.

5.5. Kromatográfiás és tömegspektrometriás paraméterek

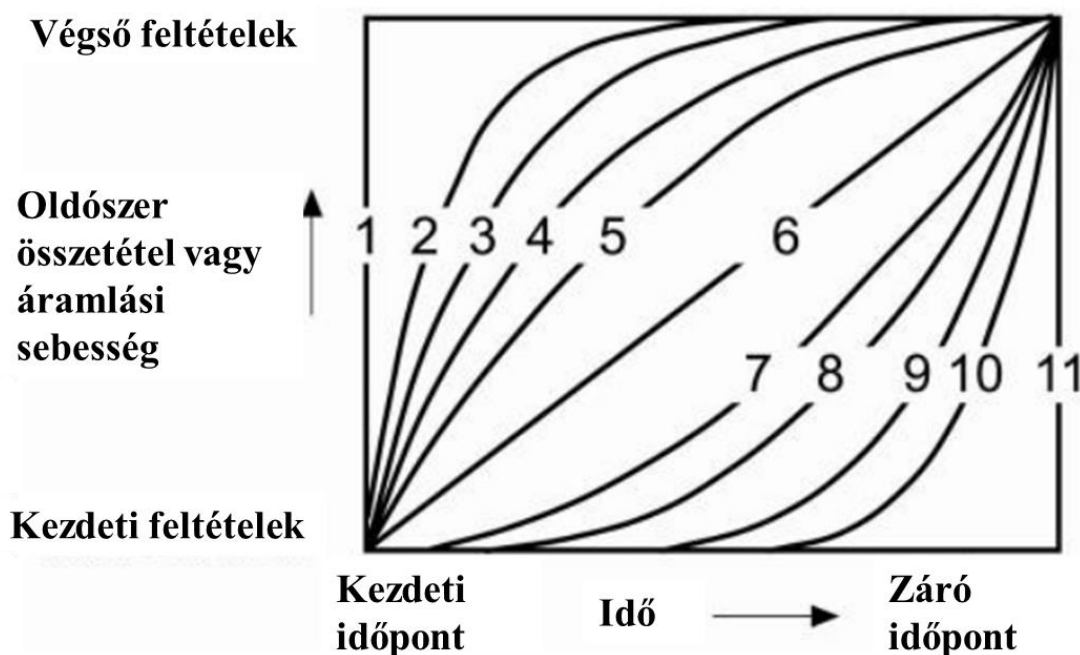
Az LC-MS analíziseket Waters ACQUITY H-Class UHPLC folyadékkromatográfiás rendszerrel (Waters) kapcsolt 5500 QTRAP (Sciex) tömegspektrometriás rendszeren végeztük. Az UHPLC készüléket az Empower 3 szoftvertrel (Waters), míg a tömegspektrométert az Analyst 1.6.3. verziójú szoftvertrel (Sciex) vezéreltük.

5.5.1. Aminosavak és biogén aminok vizsgálata

Az AccQ-Tag derivatizált minták kromatográfiás elválasztását AccQ-Tag Ultra C18 oszlopon (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm, Waters) végeztük, amely egy Acquity előtét oszloppal (0,2 μ m, 2,21 mm, Waters) volt felszerelve. Az alkalmazott gradiens elúciós módszer hossza 11 perc volt, az áramlási sebesség 0,65 ml/perc, az alkalmazott oszlop hőmérséklet pedig 54 °C volt. A kromatográfiás elválasztáshoz négy különböző oldószer keveréket használtunk, az „A” oldószer 100% AccQ-Tag Ultra A eluens, a „B” oldószer 10% AccQ-Tag Ultra B eluens LC tisztaságú vízzel hígítva, a „C” oldószer 100% LC tisztaságú víz, a „D” oldószer pedig 100% AccQ-Tag Ultra B eluens volt. Az **1. táblázat** tartalmazza az kromatográfiás elválasztás során alkalmazott gradiens elúciós profilt, az Acquity H-class rendszeren alkalmazható gradiens típusok pedig a **7. ábrán** láthatók.

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B	%C	%D	Gradiens típus
0.00	0.65	10.00	0.00	90.00	0.00	
0.29	0.65	9.90	0.00	90.10	0.00	6
3.50	0.65	9.90	0.00	90.10	0.00	6
4.60	0.65	9.90	25.00	65.10	0.00	7
5.49	0.65	9.00	80.00	11.00	0.00	6
7.10	0.65	8.00	25.00	57.90	9.10	6
7.30	0.65	8.00	15.60	57.90	18.50	6
7.50	0.65	8.00	12.00	57.90	22.10	6
8.20	0.65	7.80	0.00	77.20	15.00	6
8.30	0.65	4.00	0.00	36.30	59.70	6
8.55	0.65	4.00	0.00	36.30	59.70	6
8.60	0.65	4.00	65.00	26.00	5.00	6
9.20	0.65	4.00	60.00	36.00	0.00	6
9.70	0.65	10.00	0.00	90.00	0.00	6
10.90	0.65	10.00	0.00	90.00	0.00	6

1. táblázat Az aminosavak és biogén aminok elválasztásánál alkalmazott gradiens elúciós profil.



7. ábra Az Acquity H-class rendszeren alkalmazható gradiens típusok.

Az UHPLC-UV spektrumok detektálását PDA detektorral végeztem 260 nm hullámhosszon, 10 pont/másodperces adatgyűjtési sebességgel.

A kromatográfiás oszlopról érkező eluensek ionizálására elektroporlasztásos ionizációt (ESI) alkalmaztunk 5000 V feszültséggel. Az UHPLC-SRM spektrumokat pozitív ion módban regisztráltuk. Az ionforrás gáz 1 értéke 30 psi, az ionforrás gáz 2 értéke 50 psi, a szárítógáz értéke 30 psi, az ionforrás hőmérséklete pedig 500 °C volt, a ciklus idő 0.5 másodperc, a ciklusok száma 1319. Az alkalmazott egyedi deklaszter potenciál és ütközési energia értékeket a **4. táblázat** tartalmazza. A regisztrált UHPLC-UV spektrumokat az Empower 3 szoftverrel, míg az UHPLC-SRM spektrumokat Skyline szoftverrel [44] értékeltük (verzió szám 23.1.0.455).

5.5.2. AZA metabolitok vizsgálata

A 6-TG és 6-MMP molekulák folyadékkromatográfiás elválasztását AccQ-tag Ultra C18 oszlopon (1,7 µm; 2,1 × 100 mm, Waters) végeztük, amely előtt egy Acquity előtét oszlopot (0,2 µm; 2,1 mm Waters) használtunk. A teljes analízis hossza, az ekvilibrálási idővel együtt 4 perc volt. Az elválasztás során alkalmazott áramlási sebesség 0,40 ml/perc az oszlop hőmérséklete 40 °C volt. Az „A” eluens 0,02 mol/l ammónium-formiát, 0,3%

(v/v) hangyasavat tartalmazó vízben oldva (pH = 3,00), a „B” eluens pedig 100% acetonitril volt. A **2. táblázat** tartalmazza az UPLC elválasztás során alkalmazott elúciós gradienst.

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	%A	%B	Gradiens típus
0.00	0.40	90.00	10.00	-
0.10	0.40	90.00	10.00	6
1.00	0.40	10.00	90.00	6
1.50	0.40	90.00	10.00	6
4.00	0.40	90.00	10.00	6

2. táblázat Elúciós gradiens az AZA metabolitok elemzéséhez. „A” eluens: 0,02 mol/l ammónium-formiát 0,3% (v/v) hangyasavat tartalmazó vízben (pH = 3,00), „B” eluens: 100% acetonitril.

Az SRM alapú célzott MS-analízist elektropray ionizációval végeztük pozitív ion üzemmódban, 5500 V porlasztási feszültséggel. Az ionforrás hőmérsékletét 500 °C-ra, ionforrás gáz 1 értéke 30 psi, az ionforrás gáz 2 értéke 50 psi, a szárítógáz értéke 30 psi volt. Az alkalmazott deklaszter potenciál 100 eV volt, a fragmentációhoz pedig 40 eV ütközési energiát használtunk. Belső standardként a stabil izotópokkal jelölt 6-tioguanin-¹³C¹⁵N (6-TG_SIL) és 6-metil-merkaptopurin-D₃ (6-MMP_SIL) vegyületeket használtuk. Az UHPLC-SRM spektrumokat a Skyline szoftverrel (verzió szám 23.1.0.455) elemeztük [44].

5.6. LC-MS módszerek validálása

5.6.1. Aminosavak és biogén aminok vizsgálatára szolgáló módszer validálása

A kifejlesztett módszert a Galba és munkatársai és Grey és munkatársai [45,46] által alkalmazott, az FDA irányelveknek [47] megfelelő módon validáltuk. A validálás során vizsgáltuk a linearitást, pontosságot, egy napon belüli és napok közötti variabilitást, mátrix hatást, a visszanyerést, a kimutatási határt (LOD), a kvantitálási határt (LOQ) és a stabilitást.

A linearitást 0,25-30 µmol/L-es koncentráció tartományban vizsgáltuk mind három mátrixban (MilliQ víz, szérum és könny). Mindhárom vizsgált mátrix esetén három párhuzamos analízist végeztünk, majd a kapott kalibrációs egyenesek segítségével

meghatároztuk a kimutatási határt (LOD) és a kvantitálási határt (LOQ) a következő összefüggések felhasználásával:

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}_m/m \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}_m/m \quad (2)$$

ahol „SD_m” a meredekség szórása és „m” a meredekség:

A három különböző koncentrációjú QC mintát mindhárom mátrixban elkészítettük majd midnegyik mintát ötször analizáltuk és ezen eredményekből meghatároztuk a pontosságot, az egy napon belüli variabilitást, a mátrix hatást, a visszanyerést és a stabilitást. A napok közötti variabilitás számításához három egymást követő nap (naponta 5 mérés minden koncentrációból és mátrixból) mérési eredményeit használtuk fel. A visszanyerést a mért értékek és a néveleges értékek összevetésével számítottuk ki. A mátrixhatást (ME) a következő képlet felhasználásával határoztuk meg:

$$\text{ME} = [(A - B)/A] \times 100 \quad (3)$$

ahol az „A”, a Milli Q vízben mért görbe alatti terület, a „B” a szérum vagy a könny mátrixban ugyanahhoz a koncentrációhoz tartozó görbe alatti terület.

Az autosampler stabilitást úgy teszteltük, hogy a QC mintákat 12 órán keresztül 4°C a készülékben hagytuk, majd analizáltuk. A fagyasztási-olvasztási stabilitás meghatározásához a QC mintákat -70°C-on lefagyasztottuk, majd szobahőmérsékleten felolvasztottuk; ezt a fagyasztás-olvasztás ciklust pedig háromszor megismételtük. A stabilitást mind derivatizálás előtt, mind derivatizálás után fagyasztott mintákon megvizsgáltuk, az eredményeket pedig a frissen elkészített QC minták értékeihez hasonlítottuk.

5.6.2. AZA metabolitok vizsgálatára szolgáló módszer validálása

A kifejlesztett LC-MS módszert az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency- EMA) M10-es irányelve és gyógyszerekre vonatkozó nemzetközi szabályozásokat összehangoló ICH (International Council for Harmonisation) [48] előírásai alapján validáltuk Yu és munkatársai, valamint Miao és munkatársai [36,49] korábbi munkája alapján. Meghatároztuk a linearitást, a szelektivitást, a specificitást, a pontosságot

és a precizitást, az egy napon belüli és a napok közötti variabilitást, az átmosódást, a visszanyerést, a mátrixhatást, az alsó kvantitálási határt (LLOQ) és a felső kvantitálási határát (ULOQ).

A kalibrációs standardok ugyanabban a biológiai mátrixban készültek, mint a későbbiekben vizsgált klinikai minták. A vizsgált kalibrációs tartomány 2,5-5000 ng/ml volt, amit az Európai Gyógyszerügynökség iránymutatásainak megfelelően vizsgáltuk. A kritériumok szerint az LLOQ esetében a pontosság a névleges koncentráció $\pm 20\%$ -án belül, míg az összes többi kalibrációs pont esetén $\pm 15\%$ -os határon belül mozoghat és a kalibrációs pontok legalább 75% -ának teljesítenie kell a kritériumokat [48].

A szelektivitás meghatározásához olyan mátrix mintákat elemeztünk, ami nem tartalmazta a vizsgált vegyületeket és/vagy annak SIL verzióját. A kritérium szerint a vizsgált retenciós időknél nem lehetnek interferáló csúcsok.

A specificitás vizsgálatához 5-bromouracilt használtunk, amely egy purin nukleotid analógja a vizsgált molekuláknak. A kritérium alapján az 5-bromouracil nem zavarhatja a célmolekulák és SIL verziók meghatározását.

A pontosságot és precizitást 5, 20, 625 és 1250 ng/ml koncentrációjú QC minták elemzésével határoztuk meg. Az egy napon belüli és a napok közötti variabilitást a QC minták öt párhuzamos analíziséből határoztuk meg ugyanazon a napon és még két további napon keresztül.

A rendszer átmosódását a kalibrációs görbék ULOQ értékét követő mátrix minták elemzésével vizsgáltuk.

A mátrix hatását hat különböző mátrixból származó alacsony (20 ng/ml) és magas (1250 ng/ml) koncentrációjú QC analízisével vizsgáltuk három párhuzamost alkalmazva. Az eredményeket az azonos koncentrációjú metanol-víz (3:7) elegyben meghatározott koncentrációval. A mátrixhatás (ME) kiszámításához következő képletet használtuk:

$$ME = [(C_w - C_m)/C_w] \times 100, \quad (4)$$

ahol C_w az analitok MilliQ vízben lévő koncentrációja, C_m pedig a mátrixba kevert analitok azonos koncentrációjának koncentrációja. Az EMA kritérium alapján a pontosság és a variációs együttható nem lehet több mint 15% .

A minták fagyasztási-olvasztási stabilitását a QC minták elemzésével vizsgáltuk három fagyasztás-olvasztás ciklus után $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az EMA kritériumok alapján az alacsony és magas koncentrációjú QC mintákat (20 ng/ml, illetve 1250 ng/ml) a vizsgálandó klinikai

mintákkal azonos módon kell kezelni. A QC mintákat a fagyasztás-olvasztási ciklusok között legalább 12 órán át fagyasztva kell tartani és a stabilitás vizsgálatokat frissen készített kalibrációs standardok és QC-k felhasználásával kell elvégezni. A validált fagyasztási-olvasztási ciklusok számának legalább háromnak kell lennie. A vizsgált molekulák hosszú távú stabilitását -20 °C-on 10 hétig tárolt mátrixban vizsgáltuk.

A 6-TG és 6-MMP valamint a belső standardok törzsadatainak és munkaadatainak stabilitását a vizsgálati minták elemzéséhez használt tárolási körülmények között határoztuk meg az oldatok legalacsonyabb és legmagasabb koncentrációjának felhasználásával. Meghatároztuk a feldolgozott minták stabilitását is, beleértve az elemzés befejezéséig eltelt időt, valamint az autosampler stabilitást is, illetve az ismételt analízisek reprodukálhatóságát is vizsgáltuk.

5.7. Szérum és könny minták aminosav és biogén amin tartalmának analízise

A vizsgálatokhoz gyűjtött könnymintákból 3-3 µl mennyiséget MilliQ vízzel 50 µl-re egészítettünk ki, majd Nanosept3K szűrőn (VWR Kft.) centrifugáltuk, hogy a vizsgálandó komponenseket elválasszuk a fehérjétől és a nagyobb molekula tömegű vegyületektől. A centrifugálást 2x10 percig 16000 g-n végeztük 4°C-on, majd a szűrletet vákuum koncentrátorban (Thermo Scientific) beszáritottuk 80 µl borát pufferben történő feloldás után elvégeztük az 5.4 fejezetben ismertetett AccQ-Tag derivatizálási reakciót.

A szérum mintákból 100 µl-t szűrtünk át Nanosept3K szűrőn és hasonlóan a könnyminták előkészítéséhez 2x10 percig 16000 g-n 4°C-on centrifugáltuk. Az AccQ-Tag derivatizálást 10 µl szűrletből végeztük el.

Az így előkészített könnymintákat hígítás nélkül, míg a szérum mintákat hígítás nélkül és tízszeres hígításban is analizáltuk az LC-MS rendszeren. A kromatográfiás oszlopra felvitt térfogat minden esetben 1µl volt, a számított aminosav koncentráció értékek az eredeti mintákra vonatkoztak.

5.8. AZA metabolitok vizsgálata AIH-s betegek vérmintáiban

Az EDTA-val kezelt csőbe gyűjtött vérmintákat kétszeres térfogatú UPLC minőségű vízzel 1 percig keverve lizáltuk. Ezután 200 µL lizátumhoz 100 µL SIL molekula keveréket (0,2 µg/ml minden egyes vegyület esetében) és 150 µL (0,1 mol/l vízben oldott) DTT-t adtunk, majd a fehérjéket 40 µL 100%-os trifluorecetsavval 1 percig történő kevertetés

során kicsaptuk. A mintákat 15 percen keresztül 16100 g-vel centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd $2 \times 200 \mu\text{L}$ felülúszót egy új csőbe pipettáztunk és 45 percig 100°C -on inkubáltuk, majd ismét 15 percig 16100 g-vel centrifugáltuk. Ezt követően $200 \mu\text{L}$ felülúszót egy új csőbe pipettáztunk, és megismételtük az előző centrifugálási lépést. A tiszta felülúszóból $100 \mu\text{L}$ térfogatot pipettáztunk a mintatartókba, melyekből $5 \mu\text{L}$ -t injektáljuk az UPLC rendszerre. A 6-TGN-eket a savas körülmények között történő melegítéssel 6-TG-vé hidrolizáltuk, és a 6-TGN koncentrációját a 6-TG szintjének elemzésével határoztuk meg. A 6-TG és a 6-MMP koncentrációját ng/ml egységben adtuk meg, a 6-TGN és a 6-MMP koncentrációját pedig a vörösvérsejtszámra történő normalizálással számoltuk ki [50] a következő képlet segítségével:

$$C (\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ VVT}) = 8 \times 100 \times C (\text{ng/ml})/M (\text{g/mol})/\text{VVT}(\text{T/l}), \quad (5)$$

ahol $C (\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ VVT})$ a koncentrációt jelenti $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ VVT}$ -ben, $C (\text{ng/ml})$ az analit koncentrációját ng/ml-ben, $M (\text{g/mol})$ az analit molekulatömegét, és $\text{VVT} (\text{T/l})$ a vörösvértestek számát jelenti $10^{12}/\text{l}$ -ben az EDTA-ás vérmintákban.

6. Eredmények

Munkánk során az emberi szervezetben endogén módon megtalálható aminosavak és biogén aminok, valamint Azatioprin metabolit xenobiotikumok célzott tömegspektrometriás vizsgálatát végeztük el, mely magába foglalta a módszerek fejlesztését, validálását és alkalmazását biológiai mintákon.

6.1. UHPLC-MS módszerfejlesztés aminosavak és biogén aminok vizsgálatára

Mivel az aminosavak és biogén aminok mennyiségi változása kóros elváltozásokat jelezhet az emberi szervezetben, kifejlesztettünk egy a vizsgálatukra alkalmas gyors UHPLC-MS módszert. Az alanin, argininin, aszparagin, aszpartát, kadaverin, citrullin, cisztein, etanolamin, etil-amin, glutamát, glutamin, glicin, hisztamin, hisztidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, metil-amin, ornitin, fenilalanin, prolin, putreszcin, szerin, szerotonin, taurin, treonin, trionin, triptamin, triptofán, tiramin, tirozin, valin és 2-fenetil-amin molekulák vizsgálatára a 3.1.3.1 fejezetben részletezett AccQ-Tag derivatizációs technikát alkalmaztuk, melyet UHPLC-MS analízis követett.

6.1.1. Tömegspektrometriás paraméterek meghatározása

Mivel a mintaelőkészítés során használt derivatizálási reakció tömegkülönbséget eredményez a vizsgálandó molekulákon, a tömegspektrometriás analízis előtt szükséges volt meghatározni a prekursor ionok m/z értékét. A hisztidin, ornitin, citrullin és egyes biogén aminok esetében egynél több szabad aminocsoport is megtalálható a molekulában (2. ábra), így megvizsgáltuk a többszörös derivatizálódás lehetőségét is. Az 3. táblázat a több mint egy szabad aminocsoportot tartalmazó molekulák peridiktált prekursor ion m/z értékeit tartalmazza.

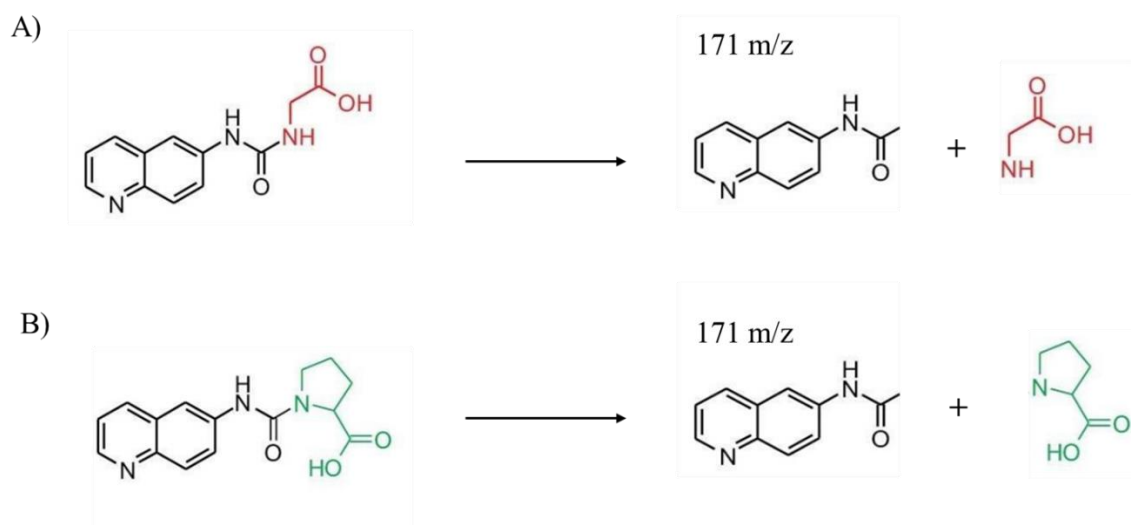
Név	Átlagos moláris tömeg (g/mol)	Egyszeresen derivatizát m/z	Kétszeresen derivatizát m/z
Citrulin	175.20	346.20	516.20
Hisztamin	111.15	282.20	452.20
Hisztidin	155.15	326.00	496.00
Kadaverin	102.18	273.20	443.20
Ornitin	132.16	303.20	473.20
Putreszcin	88.15	259.20	429.20
Szerotonin	176.21	347.20	517.20
Triptamin	160.26	331.20	501.20

3. táblázat Az egynél több szabad aminosóportot tartalmazó molekulák lehetséges prekursor ionjai AccQ-Tag reagenssel végzett származékképzés után.

A tömegspektrometriás vizsgálatok alapján a citrullin, hisztidin, hisztamin és triptamin esetében egy amino csoport esetében volt megfigyelhető a származékképzés, míg a kadaverin, ornitin, és putreszcin esetében két amino csoport származékképzése volt azonosítható. A szerotonin esetében egyszeres és kétszeres módosítás is azonosítható volt, azonban a kétszeresen módosított forma sokkal alacsonyabb intenzitással jelentkezett az egyszereshez képest az analízisek során. Mivel az egyszeresen és kétszeresen származékkolt molekulák közötti arány állandó volt, a további analízisek során a kétszeresen módosított forma értékeit használtuk a módszerfájl elkészítéséhez. A származékkolt molekulák fragmentációs analízisének elvégzése (**8. ábra**) után létrehoztuk a kiválasztott ionátmenetek vizsgálatára alkalmas SRM módszerfájlt, melynek részleteit a **4. táblázat** tartalmazza.

Komponens	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	t _R ablak (perc)	DP (eV)	CE (eV)
Hisztidin	326	171	1.06-1.90	230	18
Aszparagin	303	171	1.30-2.14	150	15
Taurin	296.15	171	1.51-2.35	120	25
Szerin	276	171	2.00-2.84	230	18
Glutamin	317	171	2.16-3.00	210	16
Arginin	345	171	2.28-3.12	110	21
Hisztamin	282.15	171	2.39-3.23	120	25
Glicin	246	171	2.54-3.38	230	15
Etanolamin	232.08	171	2.84-3.68	120	25
Aszpartát	304	171	3.10-3.94	160	16
Metilamin	202	171	3.48-4.32	120	25
Glutamát	318	171	4.45-5.29	210	16
Citrullin	346.2	171	4.54-5.38	120	25
Treonin	290	171	5.12-5.96	120	10
Alanin	260	171	5.58-6.42	160	13
Etilamin	216	171	5.77-6.61	120	25
Prolin	286	171	6.01-6.85	130	15
Ornitin	473.3	171	6.64-7.48	120	25
Cisztin	291	171	7.06-7.90	120	13
Lizin	487	171	7.25-8.09	230	22
Tirozin	352	171	7.30-8.14	210	15
Putreszcin	429.15	171	7.38-8.22	120	25
Metionin	320	171	7.52-8.36	120	16
Szerotonin ¹	347.2	171	7.58-8.42	120	25
Valin	288	171	7.63-8.47	100	16
Kadaverin	443.2	171	7.65-8.49	120	25
Tiramin	308.2	171	7.68-8.52	120	25
Izoleucin	302	171	8.08-8.92	120	25
Leucin	302	171	8.08-8.92	120	25
Szerotonin ²	517.2	171	8.14-8.98	130	15
Fenilalanin	336	171	8.30-9.14	160	20
Triptofán	375	171	8.41-9.25	160	20
SIL Triptofán	388	171	8.41-9.25	120	25
Triptamin	331.2	171	8.54-9.38	120	25
2-fenetil-amin	292.2	171	8.54-9.38	230	18

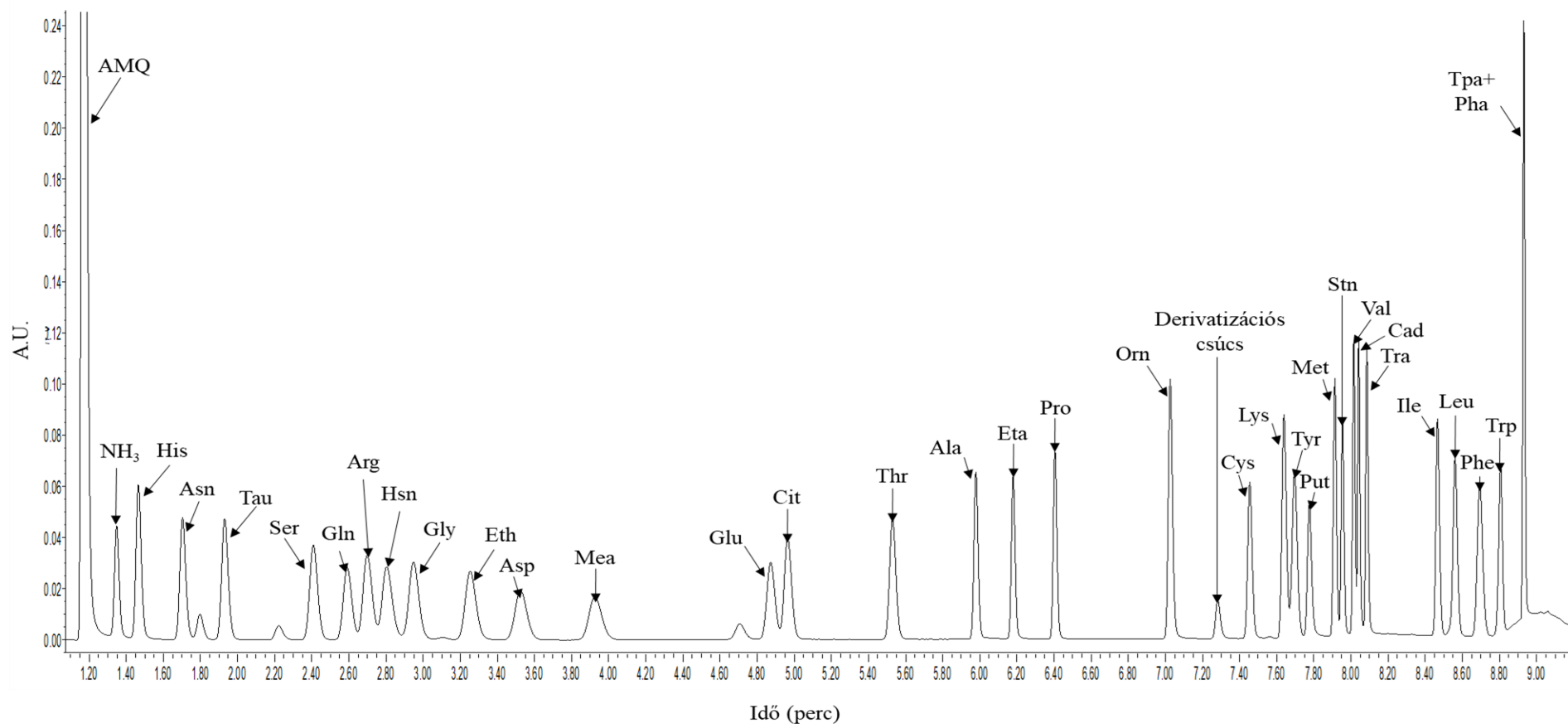
4. táblázat Az aninosvak és biogén aminok vizsgálatára alkalmas SRM módszer paramétereit. Q1 (m/z): perkurzor ion m/z, Q3 (m/z): fragmens ion m/z, t_R ablak: retenció időablak percben, DP (eV): deklaszter potenciál, CE (eV): ütközési energia.



8. ábra AccQ-Tag reagenssel módosított primer (A) és szekunder (B) aminok fragmentációja során képződő vizsgált fragmens ion szerkezete.

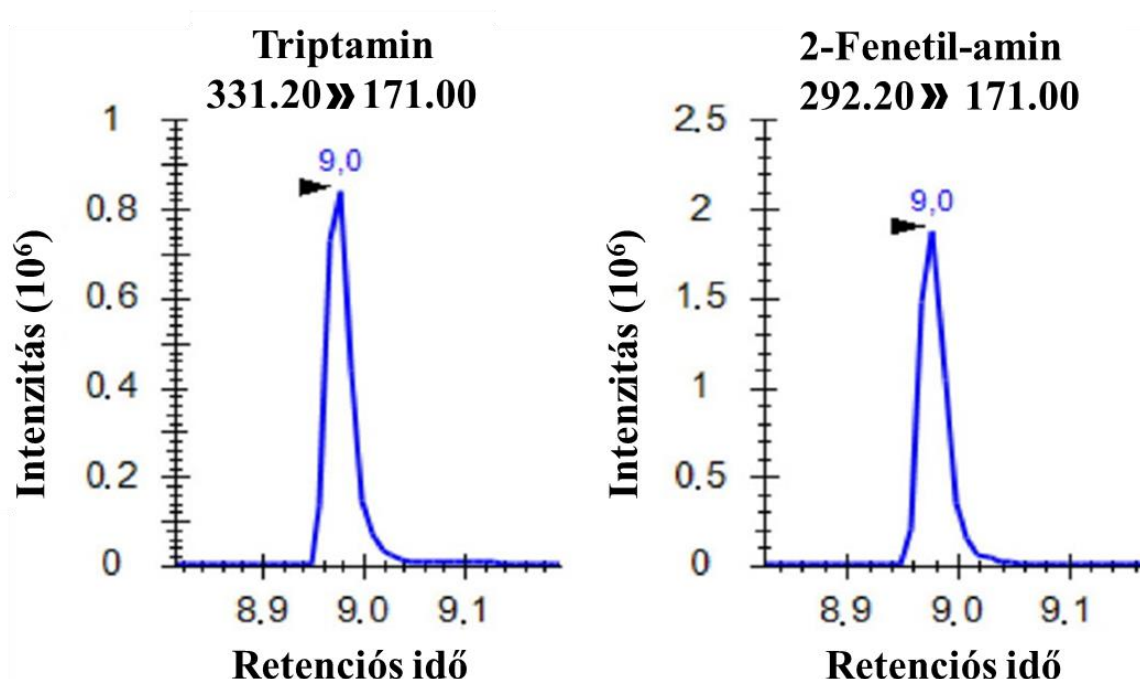
6.1.2. UHPLC-UV-MS módszerfejlesztés

A módszert egy 5500QTRAP tandem tömegspektrométerrel összekapcsolt Acquity H-Class UHPLC-rendszeren fejlesztettük ki. A kromatográfiás elúciós profilt optimalizáltuk, melynek eredményeként egy a 33 aminosav és biogén amin elválasztására alkalmas 11 perces gradienst hoztunk létre. A derivatizált molekulákat 260 nm-es hullámhosszon fotodiódasoros (PDA) detektorral és az 5500QTRAP tömegspektrométerrel SRM üzemmódban detektáltuk. Az **9. ábrán** a vizsgált derivatizált molekulák reprezentatív kromatogramja látható UHPLC-UV analízis során.



9. ábra A 33 derivatizált aminosav és biogén amin reprezentatív UV kromatogramja. Az x tengely az időt mutatja percben, míg az y tengely a 260 nm-en a PDA detektoron regisztrált intenzitást mutatja. Az aminosavak esetében a hárombetűs kódot használtuk, AMQ: 6-aminokinolin, Tau: taurin, Hsn: hisztamin, Eth: etanolamin, Mea: metil-amin, Eta: etil-amin, Derivatizációs csúcs: bisz-aminokinolin-karbamid, Put: putreszcín, Stn: szerotonin, Cad: kadaverin, Tra: tiramin, Tpa + Pha: triptamin és 2-fenetil-amin.

Az optimalizált kromatográfiás paraméterek alkalmazásával a derivatizált molekulák elválasztása a triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével sikeres volt, viszont a tömegkülönbség miatt az egyedi analízisük az SRM módszerrel elvégezhető volt (**10. ábra**).



10. ábra Az AccQ-Tag derivatizált triptamin és 2-fenetil-amin reprezentatív SRM-spektruma a megfelelő SRM-átmenetekkel. Az x tengelyen a retenció idő látható percben, míg az y tengely a csúcs intenzitást reprezentálja.

6.1.3. UHPLC-UV-MS módszer validáció

A kifejlesztett módszert az FDA iránymutatásainak megfelelően validáltuk Galba és munkatársai, valamint Grey és munkatársai munkája alapján [45,46]. A kalibrációs tartományt három különféle mátrixban, MilliQ vízben, szérumban és könnyben 0,25-30 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció vizsgáltuk, melyek alapján meghatároztuk a kimutatási határt (LOD) és a kvantitálási határt (LOQ) is. Az UV-detektorral regisztrált adatok alapján az 5.6.1 fejezetben feltüntetett összefüggések alapján számolt eredményeket az **1. melléklet** tartalmazza, míg az SRM-elemzés eredményeit a **2. melléklet tartalmazza**.

Az UV-detektorral regisztrált adatok estében a kimutatási határok (LOD) a következő szerint alakultak: MilliQ vízben 0,108-2,023 $\mu\text{mol/l}$, szérumban 0,097-2,304 $\mu\text{mol/l}$, könny mátrixban pedig 0,124-1,372 $\mu\text{mol/l}$ tartomány figyelhető meg. A kvantitálási határok esetében magasabb koncentrációk voltak megfigyelhetők: MilliQ

vízben 0,361-6,743 $\mu\text{mol/l}$, szérumban 0,325-7,679 $\mu\text{mol/l}$, könny mátrixban pedig 0,412-5,575 $\mu\text{mol/l}$. A lineáris kalibrációs tartomány MilliQ vízben mátrixban 1-20 $\mu\text{mol/l}$ közötti része minden vizsgált molekula esetében megfigyelhető, szérumban ez a tartomány módosul 2,5-25 $\mu\text{mol/l}$ -re, könny mátrix esetében pedig 1-15 $\mu\text{mol/l}$ -re.

Az SRM analízis eredményei alapján meghatározott kimutatási határok a következők szerint alakultak: MilliQ vízben 0,021-1,042 $\mu\text{mol/l}$, szérumban 0,025-0,858 $\mu\text{mol/l}$, könnyben 0,038-1,574 $\mu\text{mol/l}$ tartomány figyelhető meg. A kvantitálási határok esetében itt is magasabb koncentrációk voltak megfigyelhetők: MilliQ vízben 0,071-3,472 $\mu\text{mol/l}$, szérumban 0,083-2,86 $\mu\text{mol/l}$, könnyben 0,127-5,247 $\mu\text{mol/l}$. A lineáris kalibrációs tartomány 0,25-1 $\mu\text{mol/l}$ közötti része minden vizsgált molekula esetében megfigyelhető. A biogén aminok esetében jellemzően kis koncentrációban volt lineári összefüggés a görbe alatti terület és a koncentráció között, az aminosavak esetében viszont tágabb 0,25-20 $\mu\text{mol/l}$ közötti tartomány volt jellemző.

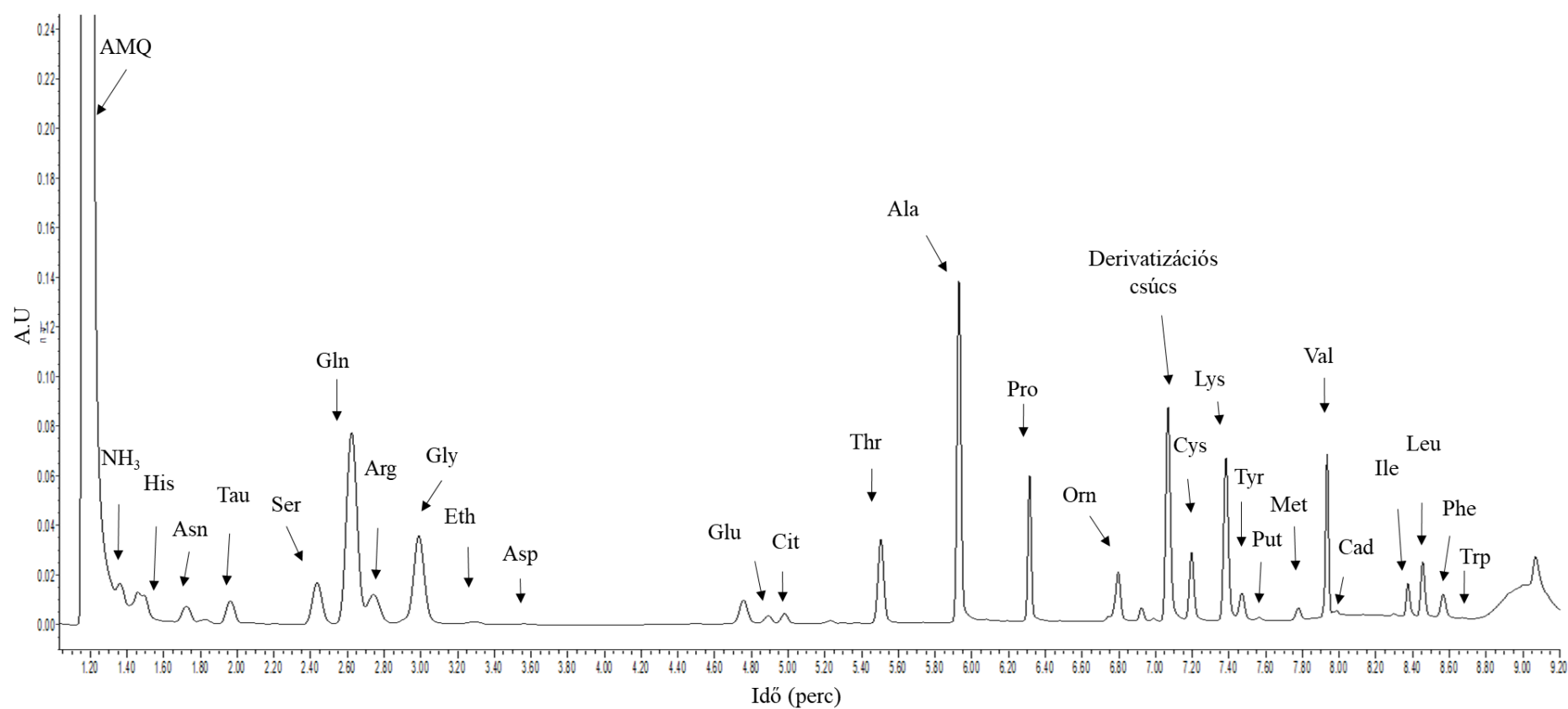
Az UHPLC-UV és az SRM analízissel regisztrált eredmények összehasonlítása azt mutatta, hogy míg a triptamin és a 2-fenetil-amin egyedi analízise SRM analízissel is elvégezhető, a számított lineáris dinamikai tartományok szélesebbek voltak az UHPLC-UV analízis esetében az SRM-hez képest. Az adatok alapján úgy döntöttünk, hogy az UHPLC-UV analízist használjuk a derivatizált aminosavak és biogén aminok mennyiségi meghatározására és a kifejlesztett módszer további validálására. Az SRM-analízist a kromatográfiás csúcsok megerősítésére, valamint az együttesen jelen lévő triptamin és 2-fenetil-amin minőségi és mennyiségi elemzésére alkalmaztuk.

A kifejlesztett módszer validálásához MilliQ víz, szérumban és könny mátrixokban QC mintákat hoztunk létre, melyek 2,5 $\mu\text{mol/l}$, 7,5 $\mu\text{mol/l}$ és 15 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban tartalmazták a vizsgált analitokat. A minták analízisével meghatároztuk az egy napon belüli és napok közötti variabilitást, pontosságát és precizitását, ezen eredményeket a **3. melléklet** tartalmazza. A 33 derivatizált molekula esetében a pontosság 85,66% és 114,41% között mozgott MilliQ vízben, 90,92% és 114,12% között szérumban és 91,39% és 114,80% között könny mátrixban. Az egy napon belüli és a napok közötti variabilitást és pontosság MilliQ vízben és a könny mátrixban 15% alattinak, míg szérumban pedig 9% alattinak bizonyult. A QC-minták elemzése során kapott adatokból számított visszanyerés 85%-nál magasabb volt (**4. melléklet**). A mátrixhatás vizsgálata során (**4. melléklet**) jelentős interferenciát tapasztaltunk. Szérumban 15% feletti volt a mátrixhatás a hisztidin, a glutamin, az arginin, a hisztamin, a szerotonin, a triptofán, a triptamin és a 2-fenetil-amin esetében, jellemzően az alacsony koncentráció esetében. A

könny mátrix estében a lizin, a tirozin, a valin, a kadaverin és a triptofán esetében figyeltünk meg 15%-ot meghaladó mátrixhatást. A molekulák stabilitását különböző körülmények között vizsgáltuk. Vizsgáltuk a stabilitásukat az autosamplerben, valamint derivatizálás előtti és derivatizálás utáni fagyasztási-olvasztási ciklusok során is (**5. melléklet**). Adatainkat figyelembe véve arra a következtetésre jutottunk, hogy a mintákat nem szabad 12 óránál hosszabb ideig az autosamplerben tárolni, és a fagyasztási-olvasztási ciklusokat is kerülni kell a pontos mennyiségi meghatározás érdekében.

6.3.1. Szérum és könny minták aninosav és biogén amin tartalmának meghatározása

A validált módszer segítségével meghatároztuk a kiválasztott aminosavak és biogén aminok koncentrációját egészséges önkéntesektől gyűjtött szérum- és könnymintákban. A mintagyűjtést követően a szérum és a könnymintákat 3 kDa-os spin oszlopokon tisztítottuk és AccQ-tag derivatizálásnak vetettük alá. A mintaelőkészítés során fellépő lehetséges veszteség meghatározásához megvizsgáltuk az aminosav és biogén amin standard keveréket tisztítás nélkül és tisztítás után. A tisztított és nem tisztított minták csúcsterületei között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az öt egészséges önkéntestől származó szérum mintákat derivatizáltuk, a validált módszerrel elemeztük, és kiszámítottuk a molekulák koncentrációját az eredeti mintatérfogatra vonatkoztatva. A molekulák azonosítását a kalibráció során alkalmazott standardok retenciós ideje alapján, valamint a specifikus SRM átmenetek segítségével végeztük el. A szérum reprezentatív UV spektrumát a **11. ábra** szemlélteti, az önkéntesektől gyűjtött mintákban meghatározott koncentráció értékeket az **5. táblázat** tartalmazza.



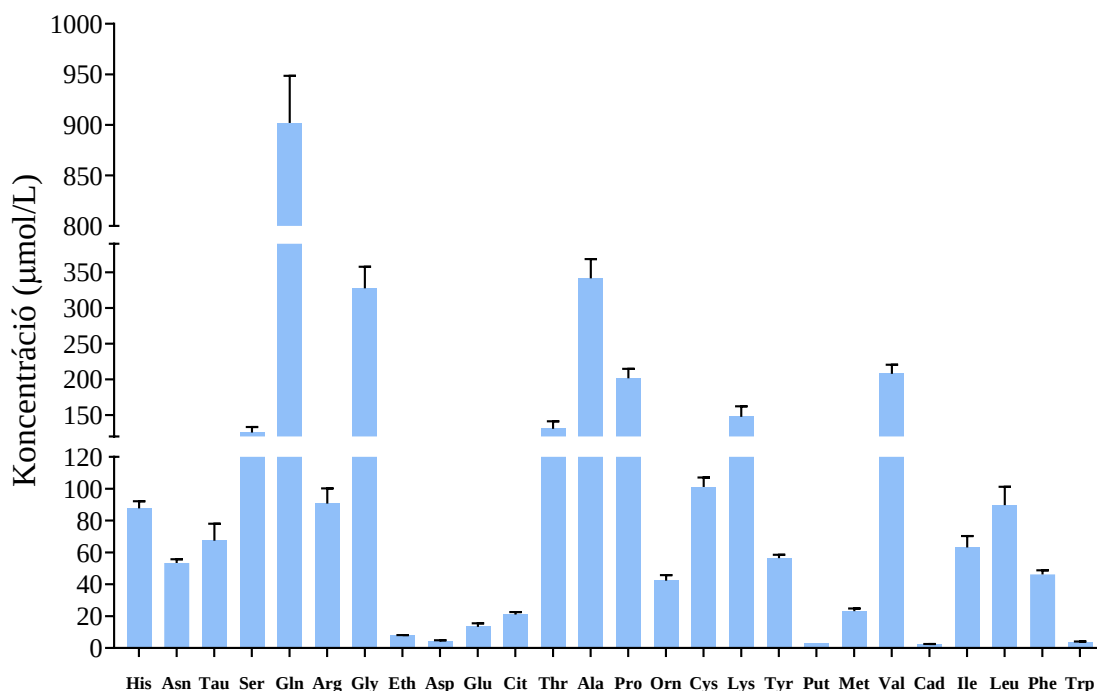
11. ábra Szérum minta reprezentatív UV kromatogramja. Az x tengely a retenciós időt mutatja percben, míg az y tengely a 260 nm-en a PDA detektoron regisztrált intenzitást mutatja. Az aminosavak esetében a hárombetűs kódot használtuk, AMQ: 6-aminokinolin, Tau: taurin, Eth: etanolamin, Derivatizációs csúcs: bisz-aminokinolin-karbamid, Put: putreszcín, Cad: kadaverin

Komponens	Rövidítés	Koncentráció (μmol/l)				
		Minta1	Minta2	Minta3	Minta4	Minta5
Hisztidin	His	70.96	102.66	103.64	77.36	83.75
Aszparagin	Asn	42.47	64.76	50.61	55.29	53.83
Taurin	Tau	52.09	129.92	41.72	53.22	60.30
Szerin	Ser	92.28	142.17	104.86	145.38	144.03
Glutamin	Gln	790.05	702.40	1025.00	919.45	1073.15
Arginin	Arg	46.95	115.61	72.63	126.12	92.15
Glicin	Gly	389.10	161.67	377.60	298.28	410.85
Etanolamin	Eth	7.97	6.96	7.81	8.19	8.75
Aszpartát	Asp	2.67	7.13	<LOQ	3.14	4.07
Metil-amin	Mea	SRM	SRM	SRM	SRM	SRM
Glutamát	Glu	7.93	24.02	5.02	14.91	14.53
Citrulin	Cit	16.03	23.33	19.19	28.84	17.85
Treonin	Thr	80.53	140.02	144.87	114.91	174.50
Alanin	Ala	324.90	346.20	204.81	276.20	455.50
Etil-amin	Eta	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Prolin	Pro	277.47	173.15	167.17	195.59	194.99
Ornitin	Orn	28.09	55.65	39.04	52.83	35.86
Cisztein	Cys	103.82	82.86	92.39	92.79	133.90
Lizin	Lys	103.09	223.05	129.16	111.65	171.02
Tirozin	Tyr	48.08	62.98	56.47	63.87	50.67
Putreszcin	Put	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2.63
Metionin	Met	17.89	26.42	31.44	18.52	21.25
Szerotonin	Stn	SRM	SRM	SRM	SRM	SRM
Valin	Val	204.36	282.25	188.30	190.14	174.23
Kadaverin	Cad	<LOQ	2.41	<LOQ	N.D.	N.D.
Izoleucin	Ile	53.77	104.82	56.57	56.86	43.73
Leucin	Leu	75.31	158.39	76.30	73.11	65.44
fenilalanin	Phe	46.62	59.21	36.84	48.95	39.50
Triptofán	Trp	<LOQ	6.33	2.60	2.92	2.27

5. táblázat A vizsgált aminosavak és biogén aminok koncentrációja egészséges önkéntesektől gyűjtött szérumban. <LOQ: a molekula UHPLC-UV analízissel azonosítható volt, de a koncentráció a kvantitálási határ alá esett; SRM: a molekula csak SRM módszerrel volt kimutatható, a koncentrációja a kvantitálási határ alá esett; N.D.: a molekula nem volt kimutatható. Az adatok két technikai párhuzamos átlagértékét reprezentálják.

Az 5 egészséges önkéntesből gyűjtött szérum mintában a hisztamin, a tiramin, a triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével valamennyi derivatizált aminosavat és biogén aminot azonosítani tudtuk. Az etil-amint UHPLC-UV analízissel kimutattuk a szérum mintákban, de a koncentráció a kvantitálási határérték alatt volt, míg a metil-amint csak SRM analízissel tudtuk kimutatni.

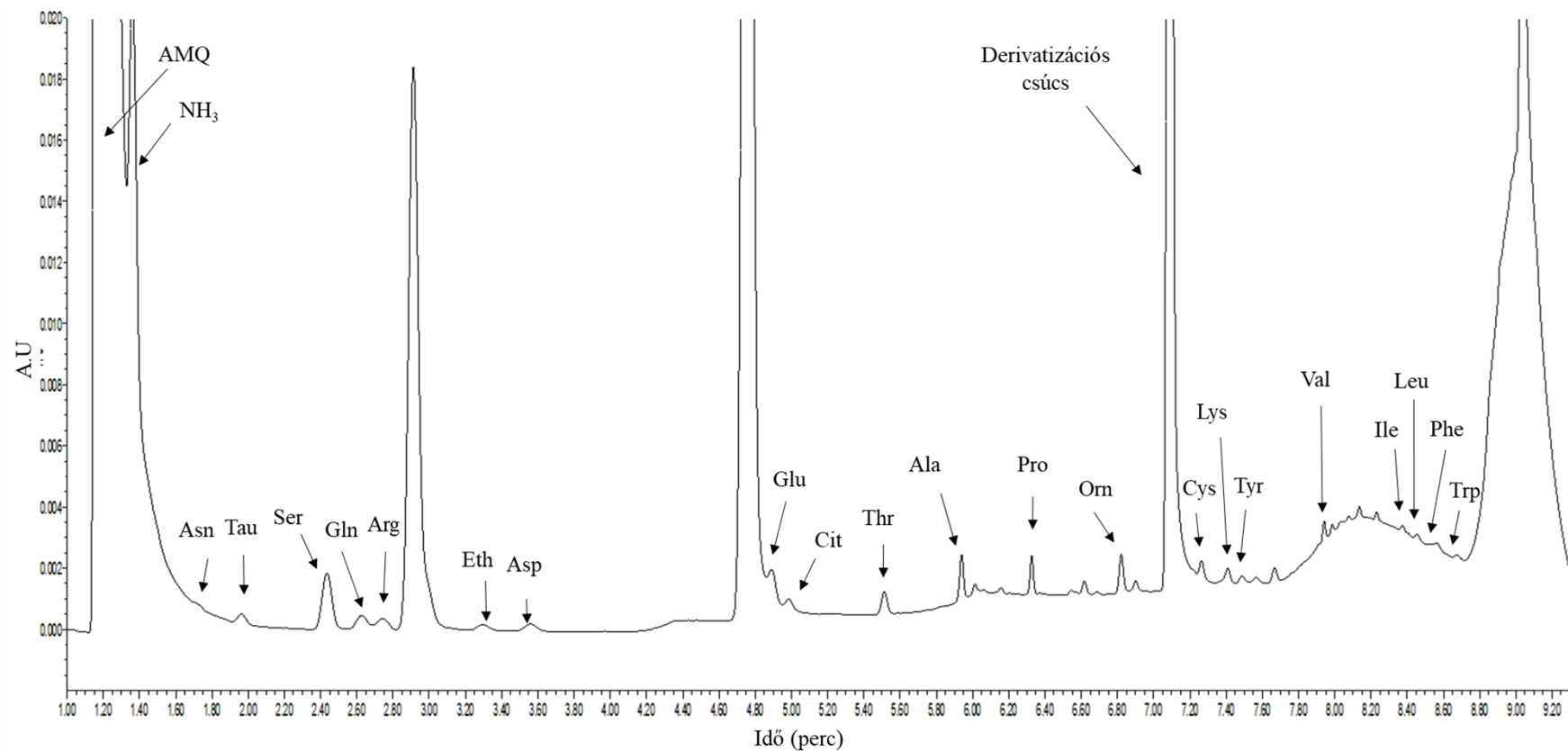
A **12. ábrán** a vizsgált molekulák átlag koncentrációi láthatók az analizált szérumban mintákban.



12. ábra Az aminosavak és biogén aminok koncentrációja a vizsgált szérumban mintákban $\mu\text{mol/l}$ dimenzióban ($n=5$). Az aminosavak a hárombetűs kódjukkal vannak feltüntetve. Az adatsor az egyes molekulák átlag koncentráció értékeit ábrázolja, a hibasávok az átlagtól való átlagos eltérést (SEM) reprezentálják. Tau: taurin, Eth: etanolamin, Put: putreszcin, Cad: kadaverin.

Az eredmények alapján a glutamin, az alanin és a glicin volt jelen a legnagyobb koncentrációban, míg a szerin, treonin, prolin, cisztein, lizin, valin és leucin koncentrációja $100 \mu\text{mol/l}$ -nél magasabban bizonyult. A vizsgált biogén aminok szintje jelentősen alacsonyabb volt a szérumban, mint a proteinogén és nem-proteinogén aminosavaké.

Ugyanezen 5 egészséges önkéntestől könnymintákat is gyűjtöttünk. A mintagyűjtés során mindkét szemből megkíséreltük a könny gyűjtését, azonban ez nem minden esetben volt lehetséges, így összesen 8 könnyminta analízisét végeztük el, melyeket egyedi mintaként tekintettük. A derivatizálás és elemzés után a vizsgált molekulák a szerotonin, putreszcin, triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével azonosíthatók voltak a mintákban (**6. táblázat**). A könnyminták reprezentatív UV spektrumát a **13. ábra** tartalmazza.



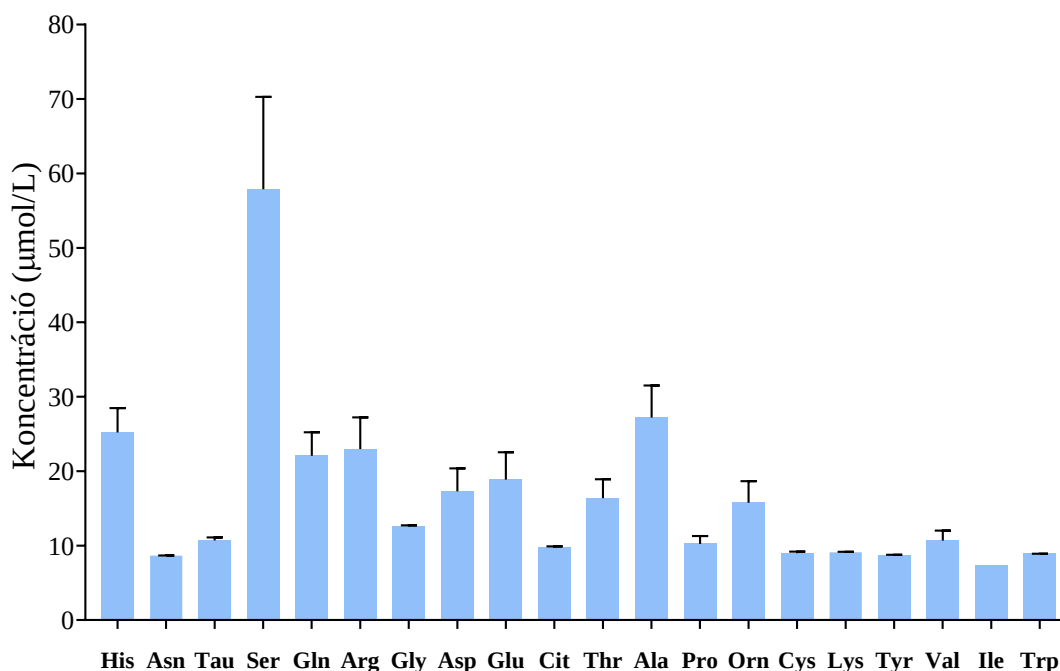
13. ábra Könny minta reprezentatív UV kromatogramja. Az x tengely a retenciós időt mutatja percben, míg az y tengely a 260 nm-en a PDA detektoron regisztrált intenzitást mutatja. Az aminosavak esetében a hárombetűs kódot használtuk, AMQ: 6-aminokinolin, Tau: taurin, Eth: etanolamin, Derivatizációs csúcs: bisz-aminokinolin-karbamid

Komponens	Rövidítés	Koncentráció (μmol/l)							
		Minta1		Minta2		Minta3		Minta4	Minta5
		OS	OD	OS	OD	OS	OD	OD	OD
Hisztidin	His	19.55	30.85	<LOQ	<LOQ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Aszparagin	Asn	<LOQ	8.86	<LOQ	<LOQ	SRM	SRM	SRM	SRM
Taurin	Tau	7.77	12.47	10.38	11.68	9.67	11.48	11.38	<LOQ
Szerin	Ser	103.98	149.07	64.47	83.27	26.37	16.60	10.25	9.03
Glutamin	Gln	20.97	38.72	9.70	17.77	<LOQ	23.15	<LOQ	<LOQ
Arginin	Arg	36.98	46.60	18.80	17.52	10.25	<LOQ	<LOQ	7.70
Histamine	Hsn	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	SRM	N.D.	N.D.	N.D.
Glicin	Gly	<LOQ	12.58	<LOQ	<LOQ	SRM	SRM	SRM	SRM
Etanolamin	Eth	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Aszpartát	Asp	13.35	26.98	<LOQ	11.53	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Metil-amin	Mea	SRM	SRM	SRM	SRM	SRM	SRM	SRM	SRM
Glutamát	Glu	15.35	30.22	<LOQ	11.02	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Citrulin	Cit	9.33	10.03	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Treonin	Thr	21.53	31.72	13.40	16.71	7.68	7.17	<LOQ	<LOQ
Alanin	Ala	40.02	48.17	25.53	30.00	10.45	9.05	<LOQ	<LOQ
Etil-amin	Eta	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Prolin	Pro	7.43	13.22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10.07	<LOQ	<LOQ
Ornitin	Orn	11.12	24.93	11.23	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cisztein	Cys	9.32	9.33	8.75	8.57	10.57	7.93	<LOQ	8.33
Lizin	Lys	9.10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Tirozin	Tyr	8.62	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Metionin	Met	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	N.D.	<LOQ
Szerotonin	Stn	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	SRM	N.D.	N.D.	N.D.
Valin	Val	9.88	14.67	<LOQ	7.48	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Kadaverin	Cad	N.D.	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	N.D.	N.D.
Tiramin	Tra	<LOQ	<LOQ	N.D.	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Izoleucin	Ile	7.30	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Leucin	Leu	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
fenilalanin	Phe	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Triptofán	Trp	8.88	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Triptamin+ 2-fenetil-amin	Tpa+Pha	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	SRM	N.D.	N.D.	N.D.

6. táblázat A vizsgált aminosavak és biogén aminok koncentrációja egészséges önkéntesektől gyűjtött könnymintákban. OS: Bal szem (Oculus sinister), OD: jobb szem (oculus dexter); <LOQ: a molekula UHPLC-UV analízissel azonosítható volt, de a koncentráció a kvantitálási határ alá esett; SRM: a molekula csak SRM módszerrel volt kimutatható, a koncentrációja a kvantitálási határ alá esett; N.D.: a molekula nem volt kimutatható. Az adatok két technikai párhuzamos átlagértékét reprezentálják.

Az etanolamin, etilamin, metionin, kadaverin, tiramin, leucin és fenilalanin UHPLC-UV analízissel kimutatható volt a könnymintákban, azonban a koncentrációjuk a kvantitálási határérték alá esett. A metilamint csak SRM analízissel tudtuk kimutatni.

A **14. ábra** a vizsgált molekulák átlag koncentrációi láthatók a vizsgált könnymintákban.



14. ábra Az aminosavak és biogén aminok koncentrációja a vizsgált könnymintákban µmol/l dimenzióban (n=5). Az aminosavak a hárombetűs kódjukkal vannak feltüntetve. Az adatsor az egyes molekulák átlag koncentráció értékeit ábrázolja, a hibasávok az átlagtól való átlagos eltérést (SEM) reprezentálják. Tau: taurin.

A validált módszerrel 17 proteinogén és 2 nem-proteinogén aminosav és a taurin mennyiségi meghatározása volt lehetséges. A szérumminták elemzése során kapott eredményekhez hasonlóan a biogén aminok koncentrációja a könnyben is alacsonyabb volt az aminosavakhoz képest. Eredményeink alapján a vizsgált biomolekulák közül a szerin koncentrációja a legmagasabb a könnyben.

6.2. UHPLC-MS módszerfejlesztés Azatioprin metabolitok vizsgálatára

Az AZA metabolitok koncentrációjának nyomon követése fontos információval szolgálhat az AIH-s betegek terápiája során, ezért kifejlesztettünk egy SRM-alapú LC-MS módszert a 6-TG és a 6-MMP azonosítására és mennyiségi meghatározására.

6.2.1. Tömegsektrometriás paraméterek meghatározása

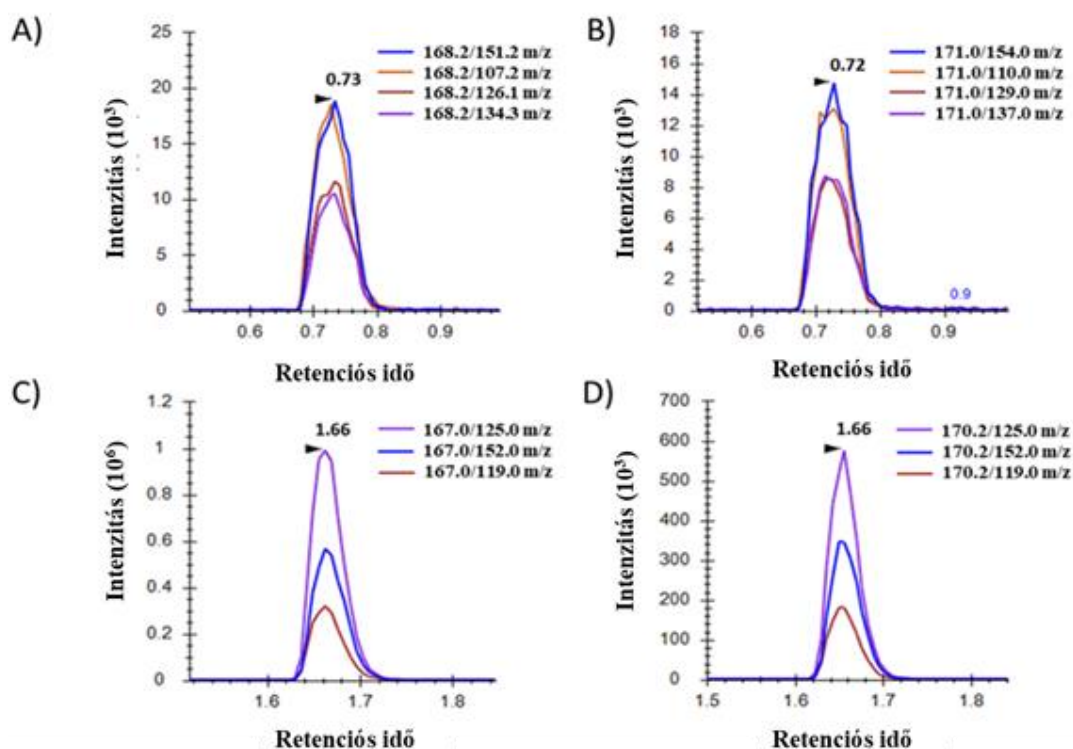
Az aminosav és biogén amin analízishez hasonlóan a módszerfejlesztés kezdetén meghatároztuk az SRM módszerfájlhoz szükséges paramétereket standard molekulák segítségével. Az analízishez stabil izotóppal jelölt (SIL) standardokat is felhasználtunk. Az SRM módszer paramétereit a **7. táblázat** tartalmazza.

Komponens	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	t_R ablak (perc)	DP (eV)	CE (eV)
6-TG	168.2	151.2	0.48-1.14	100	40
6-TG	168.2	134.3	0.48-1.14	100	40
6-TG	168.2	126.1	0.48-1.14	100	40
6-TG	168.2	107.2	0.48-1.14	100	40
6-TG_SIL	171	154	0.48-1.14	100	40
6-TG_SIL	171	137	0.48-1.14	100	40
6-TG_SIL	171	129	0.48-1.14	100	40
6-TG_SIL	171	110	0.48-1.14	100	40
6-MMP	167	152	1.36-2.02	100	40
6-MMP	167	134	1.36-2.02	100	40
6-MMP	167	119	1.36-2.02	100	40
6-MMP_SIL	170.2	152	1.36-2.02	100	40
6-MMP_SIL	170.2	125	1.36-2.02	100	40
6-MMP_SIL	170.2	119	1.36-2.02	100	40

7. táblázat Az SRM elemzés paramétereit. Q1 m/z: Perkursor ion, Q3 m/z: termékion, t_R ablak: retenciós időablak percben, DP (eV): deklaszter potenciál, CE (eV): ütközési energia. 6-TG_SIL: Stabil izotópjelzett 6-tioguanin- $^{13}C^{15}N$. 6-MMP_SIL: Stabil izotóp-jelölt 6-metil-merkaptopurin- D_3 .

6.2.2. UHPLC-MS módszerfejlesztés

A módszert egy Acquity H-Class UHPLC készülékhez (Waters) kapcsolt 5500QTRAP tandem tömegspektrometriás (Sciex) rendszeren fejlesztettük ki. Optimalizáltunk egy megfelelő kromatográfiás elúciós profilt optimalizáltuk, és egy gyors, 4 perces gradienst hoztunk létre. A SIL standardokat minőségi kontrollként és a pontos mennyiségi meghatározás érdekében használtunk. Az alkalmazott SRM-átmenetek specifikusak voltak (**15. ábra**) a célmolekulákra, ennek megfelelően a célmolekulák és szintetikus megfelelőik azonosítása sikeresen megtörtént. A mért retenciós idők 0,73 perc (6-TG és 6-TG_SIL) és 1,66 perc (6-MMP és 6-MMP_SIL) voltak.



15. ábra A vizsgált azatioprin metabolitok reprezentatív SRM-spektrumai: (A) 6-TG, (B) 6-TG_SIL, (C) 6-MMP, (D) 6-MMP_SIL. Az x tengelyen a retenciós idő látható percben, míg az y tengely a csúcs intenzitást reprezentálja. A spektrumok mellett az egyes SRM átmenetek is láthatóak.

6.2.3. UHPLC-MS módszer validáció

A kifejlesztett LC-MS módszert az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) iránymutatásai szerint validáltuk [48], melynek során vizsgáltuk a módszer szelektivitását, specificitását, az átmosódást, a lineáris tartományt, az alsó kvantitálás határt (LLOQ), a felső kvantitálási határt (ULOQ), a pontosságot, a precizitást, a visszanyerést, a mátrixhatást és a stabilitást.

6.2.3.1. A módszer érzékenysége és kalibrációs tartománya

A módszer érzékenységének és kalibrációs tartományának meghatározásához a mátrixot egészséges önkéntesektől gyűjtött vérmintákból állítottuk elő. Mindkét vizsgált molekula esetén 2,5-2500 ng/ml koncentráció tartományban vizsgáltuk a linearitást az elkészített mátrixban. A kalibrációs görbe, az LLOQ és az ULOQ meghatározásához a lineáris tartományt három független kísérlet során, két ismétlésben, három napon keresztül

vizsgáltuk. A regisztrált adatok felhasználásával lineáris regresszió analízist végeztünk logaritmikus skálák alkalmazásával. Az elemzés során a 6-TG esetében $y = 0,0073 \cdot x + 0,0042$ ($R^2 = 1$), míg a 6-MMP esetében $y = 0,0087 \cdot x - 0,0035$ ($R^2 = 0,9993$) egyenleteket kaptuk. Az LLOQ 5 ng/ml-nek, míg az ULOQ 1250 ng/ml-nek bizonyult mindkét vizsgált molekula esetében.

6.2.3.2. Szelektivitás, specificitás és átmosódás vizsgálata

A rendszer szelektivitásának és átmosódásának meghatározásához hat egyedi mátrix mintát (analit és SIL nélküli) használtunk. A 6-TG szelektivitása esetében az analit válasz az LLOQ értéken 7,60 %, míg a 6-MMP esetében 2,31 % volt; a SIL belső standard válaszok az LLOQ értéken 1,12%, illetve 0,02% voltak (8. táblázat).

Komponens	Szelektivitás Analit válasz (%)	Specificitás Analit válasz (%)	Átmosódás Analit válasz (%)
6-TG	7.60	5.17	10.37
6-TG-IS	1.12	0.15	1.09
6-MMP	2.31	1.48	3.28
6-MMP-IS	0.02	0.03	0.01

8. táblázat A szelektivitás a specificitás és az átmosódás vizsgálati eredményei analitonként.

Az átmosódás vizsgálata során a 6-TG és a 6-MMP analit válaszai a mátrix mintában az ULOQ injektálása után 10,37 % és 3,28 %, míg a SIL belső standardok válaszai 1,09 % és 0,01 % voltak (8. táblázat).

A specificitást 100 ng/ml koncentrációjú 5-bromouracil injektálásával teszteltük, amely molekula szerkezete hasonló a cél molekulákhoz. Eredményeink azt mutatták, hogy az analit válaszok 5,17 % és 1,48 % voltak a 6-TG és 6-MMP esetében, míg az SIL belső standard válaszok 0,15 % és 0,03 % voltak a 6-TG_SIL és 6-MMP_SIL esetében a vizsgált retenció idő tartományokban (8. táblázat).

6.2.3.3. Pontosság, precizitás és visszanyerés

A módszer validálása során megvizsgáltuk a napon belüli és a napok közötti analízisek pontosságát, precizitását és visszanyerését (9. táblázat).

Komponens	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Egy napon belüli analízisek (n=5)				Napok közötti analízisek (n=15)			
		Számolt koncentráció (ng/ml)	SD	CV%	Visszanyerés %	Számolt koncentráció (ng/ml)	SD	CV%	Visszanyerés %
6-TG	5	4.49	0.19	4.22	89.72	4.31	0.63	14.55	86.18
	20	19.34	1.01	5.23	96.71	17.82	2.43	13.60	89.12
	625	605.36	15.05	2.49	96.86	626.49	53.68	8.57	100.24
	1250	1171.08	21.75	1.86	93.69	1252.12	122.61	9.79	100.17
6-MMP	5	5.07	0.38	7.44	101.40	4.69	0.64	13.66	93.86
	20	18.88	0.87	4.63	94.40	18.00	2.69	14.93	90.00
	625	598.71	16.06	2.68	95.79	667.39	73.10	10.95	106.78
	1250	1096.89	19.03	1.74	87.75	1207.29	179.60	14.88	96.58

9. táblázat A 6-TG és a 6-MMP pontossága, precizitása és visszanyerése. SD: standard deviáció, CV%: variációs együttható%.

Adataink azt mutatják, hogy a pontosság, a visszanyerés és a precizitás (CV%) az egyes koncentrációk esetében a névleges koncentráció 15%-ánál kisebb volt.

6.2.3.4. Mátrixhatás vizsgálata

A mátrix hatását hat különböző mátrixból származó alacsony (20 ng/ml) és magas (1250 ng/ml) koncentrációjú QC analízisével vizsgáltuk három párhuzamost alkalmazva. A mátrixhatás vizsgálat eredményei a **10. táblázatban** láthatók.

Komponens	QC (ng/ml)	Átlag konc. (ng/ml)	SD	CV%	Visszanyerés (%)	Mátrixhatás (%)
6-TG	20	20.378	2.431	11.932	101.889	5.033
	1250	1436.8	175.363	12.205	114.944	-12.793
6-MMP	20	22.284	3.213	14.419	111.421	3.08
	1250	1436.06	212.728	14.813	114.884	-12.877

10. táblázat A mátrixhatás és a visszanyerés vizsgálati eredményei a 6-TG és a 6-MMP esetében. SD: standard deviáció, CV%: variációs együttható%.

A pontosság (CV%), a visszanyerés és a mátrixhatás minden egyes koncentrációnál a névleges koncentráció 15%-ánál kisebbnek bizonyult.

6.2.3.5. Stabilitás vizsgálatok

A validálás során megvizsgáltuk a fagyasztás-olvasztási stabilitását, a hosszú távú tárolási (10 hét) stabilitását és a munkaoldatok stabilitását. A tárolás minden esetben -20°C-on történt. Az analitok stabilitását alacsony (20 ng/ml) és magas (1250 ng/ml) koncentrációjú QC minták elemzésével határoztuk meg két technikai párhuzamost analizálva. Az eredményeket a **11. táblázat** tartalmazza.

Komponens		6-TG		6-MMP	
QC elméleti koncentráció (ng/ml)		20	1250	20	1250
három fagysztási-olvasztási ciklus után	Átlag koncentráció (ng/ml)	21.42	1439.19	22.65	1240.67
	SD	2.11	22.00	0.00	14.01
	CV%	9.84	1.53	0.02	1.13
	Visszanyerés (%)	107.11	115.14	113.25	99.25
Hosszútávú tárolás -20 °C-on	Átlag koncentráció (ng/ml)	12.86	822.29	13.87	764.15
	SD	0.14	16.06	0.04	2.35
	CV%	1.09	1.95	0.30	0.31
	Visszanyerés (%)	64.29	65.78	69.35	61.13
Munka oldat stabilitása	Átlag koncentráció (ng/ml)	26.17	1583.54	20.41	1369.73
	SD	1.65	75.22	0.20	10.70
	CV%	6.29	4.75	0.97	0.78
	Visszanyerés (%)	130.87	126.68	102.05	109.58

11. táblázat A 6-TG és a 6-MMP stabilitási vizsgálatainak eredményei.

Kísérleteink során az autosampler stabilitást is teszteltük. A vizsgálatokhoz hat AZA-val kezelt AIH-s betegtől származó vérmintát analizáltunk közvetlenül a mintaelőkészítés után és hat órán át 4°C-on az autosamplerben történő tárolás után. Az eredményeket a **12. táblázat** tartalmazza.

Komponens	Minta azonosító	Koncentráció (ng/ml)	Koncentráció (ng/ml)	SD	CV%
		0 h	6 h		
6-TG	S_06	73.36	74.93	3.71	5.00
	S_09	81.13	80.03	2.65	3.28
	S_26	111.40	116.84	6.38	5.59
	S_31	103.80	99.95	3.56	3.49
	S_38	69.83	71.53	1.82	2.58
	S_58	92.72	92.17	1.47	1.59
6-MMP	S_06	2631.37	2594.93	22.36	0.86
	S_09	1929.34	1859.15	67.36	3.56
	S_26	877.86	931.80	51.64	5.71
	S_31	2489.42	2587.77	58.55	2.31
	S_38	451.82	429.46	18.42	4.18
	S_58	805.33	795.90	39.48	4.93

12. táblázat Autosampler stabilitási vizsgálat eredményei. SD: standard deviáció, CV%: variációs együttható%.

Az ismételt injektálási reprodukálhatóságot alacsony, közepes és magas koncentrációjú QC minták öt párhuzamos injektálásával teszteltük 12 óra autosamplerben történő tárolás majd három órás -20°C-on tárolás után. Az eredményeket a **13. táblázat** tartalmazza.

Komponens	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Átlag koncentráció (ng/ml)	SD	CV%	Visszanyerés %
6-TG	20	22.84	0.20	0.85	114.22
	625	552.88	20.71	3.75	88.46
	1250	1250.96	43.59	3.49	100.08
6-MMP	20	31.85	2.24	7.04	159.27
	625	782.60	58.94	7.53	125.22
	1250	1620.34	26.72	1.65	129.63

13. táblázat Az ismételt injektálási reprodukálhatóság vizsgálata. SD: standard deviáció, CV%: variációs együttható%.

A 6-TG esetében a visszanyerést vizsgálva a különbségek 15%-nál alacsonyabbak voltak, míg a 6-MMP esetében a különbségek 25%-és 60% között mozogtak. A legmagasabb visszanyerési hatékonyságot a 20 ng/ml koncentrációjú QC mintában tapasztaltuk.

6.2.4. AZA metabolitok koncentrációjának meghatározása AIH-ban szenvedő betegek vérmintáiban

Hogy bizonyítsuk a validált módszer használhatóságát klinikai minták elemzésére, megvizsgáltuk a 6-TG és 6-MMP mennyiségét AIH-ban szenvedő betegek vérmintáiban. A betegek különböző dózisú AZA (Imuran) kezelést kaptak. A terápiás hatékonyság szempontjából fontos 6-TGN és MMPr koncentrációkat a 6-TG és 6-MMP koncentrációjának vörösvértest számra történő normalizálásával számoltuk ki az 5.2.4. fejezetben tárgyalt képlet segítségével [51,52]. A vizsgált analitok koncentrációját és a derivált koncentráció értékeit a **14. táblázat** tartalmazza.

Minta azonosító	AZA (Imuran) dózis (mg)	Vörösvértest szám (T/l)	Koncentráció (ng/ml)		Koncentráció (pmol/8x10 ⁸ VVT)	
			6-TG	6-MMP	6-TGNs	6-MMPr
S_34	25	4.48	23.82	11.72	25.44	12.60
S_40	100	4.08	128.26	2175.13	150.42	2566.01
S_42	50	3.24	45.81	69.86	67.66	103.78
S_56	37.5	3.97	132.18	1445.52	159.31	1752.54

14. táblázat Az AZA metabolitok koncentrációja és vörösvértest számta normalizált AIH-ban szenvedő betegek vérmintáiban. Vörösvértest szám (T/l): a minták vörösvértest száma 10¹²/l dimenzióban.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a validált módszer segítségével meghatározott metabolit koncentráció arányos az alkalmazott terápiás dózissal.

7. Diszkusszió

A metabolomikai vizsgálatok kulcsszerepet játszanak az endogén molekulák és xenobiotikumok analízisében, mivel képesek átfogó képet adni a biológiai rendszerek kémiai összetételéről. Az endogén molekulák, mint például a metabolitok, információt nyújtanak a sejtek és szövetek állapotáról, míg a xenobiotikumok, mint a gyógyszerek, toxikus anyagok vagy környezeti szennyezők, hatással lehetnek a metabolikus hálózatokra. A metabolomika lehetővé teszi a molekuláris interakciók, biokémiai utak és fiziológiai válaszok feltérképezését, ami elengedhetetlen a betegségek mechanizmusainak megértésében, a biomarkerek azonosításában, valamint a gyógyszerfejlesztésben és a toxicitás előrejelzésében. Az LC-MS analízis különösen fontos eszköze ennek a területnek, mivel képes a metabolitokat és valamint a xenobiotikumokat érzékenyen és specifikus vizsgálatára. Az LC-MS technika kombinálja a kromatográfia előnyeit a tömegspektrometriával, amelyek lehetővé teszik a vegyületek elválasztását valamint a molekulák azonosítását és kvantitálását. Ez a módszer különösen hasznos a metabolikus hálózatok megértésében, a gyógyszerek hatásainak és toxicitásának vizsgálatában, valamint a betegségek mechanizmusainak feltárásában.

A kutatás során célom célzott LC-MS módszerek tervezése, validálása és alkalmazása volt biológiai mintákon.

7.1. Aminosavak és biogén aminok meghatározása

Kifejlesztettünk egy LC-MS módszert szérum és könnyeminták aminosav és biogén amin tartalmának vizsgálatára, melyet az FDA iránymutatásainak megfelelően validáltunk. A validációs kísérletek eredményeiből megállapítottuk, hogy a módszer megfelelő érzékenységgű és széles dinamikus tartománnyal rendelkezik, amely alkalmassá teszi komplex biológiai minták elemzésére. Az UV- és SRM alapú detektálás eredményeit összehasonlítva arra a következtetésre jutottunk, hogy az UV detektálás szélesebb dinamikus tartománnyal rendelkezik, ezért a célmolekulák kvantitálására ezt a detektálási módot használtuk. Az SRM-analízist a kromatográfias csúcsok megerősítésére, valamint az együttesen jelen lévő triptamin és 2-fenetil-amin minőségi és mennyiségi elemzésére alkalmaztuk. A variabilitás, pontosság és precizitás vizsgálata során az eredmények az FDA kritériumoknak megfelelően $\pm 15\%$ -nál kisebb eltérést mutattak. Jelentős mátrix hatást azonosítottunk a vizsgálataink során, így ezen módszer használata során a kalibrációs görbét célszerű az alkalmazott mátrixban elkészíteni a megfelelő kvantitálás érdekében.

A stabilitási vizsgálatok alapján elmondható, hogy kerülni kell a minták hosszú távú tárolását és az ismételt fagyasztás-olvasztás ciklusokat.

Az emberi testfolyadékok közül a szérum a legszélesebb körben alkalmazott biológiai minta az orvostudományban, különösen a kóros elváltozások diagnosztizálásában és az alkalmazott terápia monitorozásában. A szérum fehérjékben és metabolitokban gazdag, és minimálisan invazív módon nyerhető minta, így kiemelt jelentőséget kap a biomarker kutatásokban [53,54]. A validált módszer segítségével megvizsgáltuk öt egészséges önkéntes szérum mintáját. A hisztamin, a tiramin, a triptamin és a 2-fenetil-amin kivételével minden célmolekulát sikerült azonosítanunk és az etil-amin és metil-amin kivételével a kvantitálásuk is lehetséges volt. Az eredmények alapján a szérumban a glutamin és az alanin koncentrációja a legmagasabb, amely összhangban van a tudományos irodalommal [55–57]. A főbb nitrogén transzporterek mellett a szerin, glicin, treonin, prolin, lizin, valin és leucin koncentrációja 100 $\mu\text{mol/l}$ -nél nagyobbak bizonyult. A vizsgált biogén aminok szintje jelentősen alacsonyabb volt a szérumban, mint a proteinogén és nem-proteinogén aminosavaké.

A szérum aminosav profiljában bekövetkező változások monitorozásának fontos szerepe van mind a biológiai mind pedig az orvostudományokban, mivel az aminosavak fontos szerepet töltenek be a szervezet homeosztatikus folyamataiban és bizonyos betegségek patogenezisében is. Összefüggést találtak a szérum glicin koncentráció és az inzulinrezisztencia, valamint a metabolikus szindróma között [58,59]. Az elágazó láncú aminosavak, mint a valin, leucin és izoleucin emelkedett mennyiségét azonosították juharszirup betegségben [60], míg jelentős csökkenésüket mutatták ki az elágazó láncú ketosav-dehidrogenáz-kináz hiány okozta autizmus esetében [61]. Az aminosavak mellett a biogén aminok is fontos szerepet játszanak a homeosztatikus és patológias folyamatokban. Az etanolamin, mint a plazmalogének alkotóeleme szerepet játszhat neurológiai problémák, például az Alzheimer-kór kialakulásában [62,63]. A poliaminok, mint például a putreszin és a kadaverin különböző funkciókat töltenek be az emberi szervezetben, és jelentős szerepük van olyan kóros állapotokban, mint a krónikus veseelégtelenség vagy az autoimmun pajzsmirigybetegek [64,65]. Ezen kívül a kadaverint az emlőrák kialakulásának szabályozójaként is azonosították [66].

Bár a különböző patológias elváltozások diagnosztizálásához leggyakrabban szérum mintákat vizsgálnak, a könny is jelentős orvostudományi relevanciával bír. A könny fehérjetartalmának változását több lokális és szisztémás patológias elváltozással is összefüggésbe hozták [67–70], így fontos szerepet játszik biomarker kutatásokban [71–

74]. A könnyminták vizsgálatának további előnye a nem invazív és viszonylag egyszerű mintavételei mód. Az ugyanazon öt egészséges egyéntől gyűjtött könny analízise során a szerotonin, a triptamin, putreszcin és a 2-fenetil-amin kivételével minden célmolekula azonosítása sikeres volt. Az etanolamin, etilamin, metilamin, metionin, kadaverin, tiramin, leucin és fenilalanin kivételével a vizsgált molekulák kvantitatív meghatározása is lehetséges volt. A szérumminták elemzése során kapott eredményekhez hasonlóan a könnyekben a biogén aminok koncentrációja alacsonyabb volt, mint az aminosavaké. Továbbá kimutattuk, hogy a vizsgált aminosavak és biogén aminok eltérő koncentrációban fordulnak elő a könnyben és a szérumban.

Bár értékes biomarker forrásként szolgál, a könny metabolit profiljában bekövetkező változásokat nem vizsgálták olyan behatóan, mint a szérum esetében. Több tanulmány során is megfigyelték a könny metabolit profiljának változását keratoconus, keratitis és száraz szem szindróma esetében [75–77], azonban a könnyben található aminosavak és biogén aminok jelentőségéről csak korlátozott információ áll rendelkezésre a szakirodalomban. ChenZhuo és munkatársai kimutatták, hogy az alanin, aszpartát és taurin szintje szignifikánsan magasabb volt a száraz szem szindrómában szenvedő betegek könnyében, mint az egészséges kontrollokéban [78]. Nakatsukasa és munkatársai munkája alapján az arginin, metionin és taurin mennyisége csökkenést mutatott, míg az ornitin, lizin és treonin mennyisége növekedést mutatott szemfelszíni betegségekből [79].

Bár a tudományos irodalomban elérhető információ mennyisége korlátozott, a rendelkezésre álló tanulmányokból kiderül, hogy a könny aminosav- és biogén amin profiljának elemzése értékes információkkal szolgálhat a különböző patológiás elváltozásokra jellemző molekuláris változásokról.

7.2. Azatioprin metabolitok meghatározása

Az aminosavak és biogén aminok vizsgálatát lehetővé tevő módszer mellett kifejlesztettünk egy Azatioprin metabolitok kvantitálására alkalmas célzott tömegspektrometriás módszert is, melyet az Európai Gyógyszerügynökség irányelvei szerint validáltunk. A validációs kísérletek eredményeiből megállapítottuk, hogy a módszer megfelelő érzékenységgű és specifitásával, minden vizsgált paraméter megfelelt az EMA által támogatott kritériumoknak [48]. A kalibrációs pontok esetében az LLOQ-érték esetében a névleges koncentráció 20 %-ánál kisebb, az összes többi pont esetében pedig 15 %-nál kisebb eltérést tapasztaltunk. A szelektivitás, specifitás és átmosódás vizsgálata során az

eredményeink 20% és 5% alatti eltérést mutattak az analit és belső standard válaszok tekintetében, a pontosság, precizitás és visszanyerési vizsgálatok során pedig az eltérések a névleges koncentráció 15%-ánál kisebbnek bizonyultak. A mátrix hatás vizsgálata során az aminosav és biogén amin vizsgálati módszerhez képest sokkal alacsonyabb zavaró hatást detektáltunk. Bár a stabilitás vizsgálatok során alkalmazott három fagyasztási-olvasztási ciklus nem változtatta meg a célmolekulák koncentrációját, a -20 °C-on tárolt minták koncentrációja a vizsgált 10 hetes időtartam alatt jelentősen csökkent. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a minták hosszú távú tárolását kerülni kell. Az autosampler történő 6 órás expozíció nem változtatta meg jelentősen a molekulák koncentrációját, azonban a minták újbóli injektálásának reprodukálhatósági vizsgálata során sokkal nagyobb eltéréseket tapasztaltunk, különösen az alacsony koncentrációk és a 6-MMP esetében. A validált módszerrel megvizsgáltunk különböző AZA (Imuran) dózissal kezett betegektől származó vérmintákat és meghatároztuk a 6-TG és 6-MMP koncentrációját, valamint a vörösvértest számra történő normlizálással a 6-TGN és 6-MMPr mennyiségét. Az adataink alapján elmondható volt, hogy a validált módszer segítségével meghatározott metabolit koncentráció értékek összhangban vannak a gyógyszer dózisával.

Az AZA metabolitok koncentrációjának monitorozása a kezelés során fontos szereppel bír a gyógyszer toxicitás megelőzése szempontjából. Összefüggést mutattak ki a magas 6-MMPr szintje és a hepatotoxicitás között; amennyiben a 6-MMPr koncentráció meghaladja az $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ VVT}$ értéket, háromszorosára növekszik a hepatotoxicitás kockázata [33,80,81]. Emellett a 6-TGN szint vizsgálata hasznos lehet azon betegek esetében, akik az optimálisan beállított AZA/6-merkaptopurin dózis ellenére sem reagálnak a terápiára [82].

Yu és munkatársai nemrégiben publikáltak egy UPLC-UV módszert a 6-TG és a 6-MMP vizsgálatára vörösvértestekben [36]. Bár módszerük hasznosnak bizonyult az AZA metabolitok elemzésére, az általunk kifejlesztett és validált módszer célzott tömegspektrometriás technikát és stabil izotóppal jelzett standardokat használ, ami nagyobb pontosságot és szelektivitást biztosít. Bár a módszerünk lineáris dinamikus tartománya kissé szűkebb, mint a Yu és munkatársai által kifejlesztett módszeré, azonban az MS-analízis nagyobb érzékenysége miatt az LLOQ érték mindkét molekula esetében alacsonyabb. Az MS-alapú azonosítás nagy szelektivitást biztosít, ami lehetővé teszi a potenciális zavaró ágensek kiszűrését. A munkacsoportunk által kifejlesztett UHPLC-MS módszer alkalmas az alacsony AZA metabolit koncentrációjával rendelkező betegek vérmintáinak megbízható vizsgálatára.

7.3 A vizsgálatok korlátai

Munkánk első részében egy gyors, érzékeny, validált SRM analízissel kombinált UHPLC-UV módszert fejlesztettünk, ami alkalmas a 33 AccQ-Tag-derivatizált aminosav és biogén aminosav egyidejű vizsgálatára. Bár a validált módszer jól használható a vizsgált testfolyadékok elemzésére, a mintavétel és a minta előkészítése kihívást jelenthet. Eredményeink azt mutatták, hogy a minta előkészítése során kerülni kell a fagyasztási-olvasztási ciklusokat, ezért a minták tárolását és felhasználását a legnagyobb körültekintéssel kell végezni. További korlátot jelenthet a minták egyedi variabilitása és a bazális könnyminták alacsony gyűjthető mennyisége. A könnytermelés sebessége egyénenként jelentős eltéréseket mutat, és sok esetben a könnyminta gyűjtés nem lehetséges. A módszerünk 3 µl könnymintát igényel, ezért az alacsony könnytermelési rátával rendelkező alanyok nem vonhatók be a vizsgálatokba. Kimutattuk, hogy a könnyek aminosavtartalma nem csak az egyének között, hanem a bal és a jobb szem között is nagymértékű változékonyságot mutat. A könnyminta gyűjtés során célszerű, ha ugyanaz a személy végzi a mintagyűjtést, a technikai eltérések minimalizálása érdekében, de az egyéni különbségek a könnyek összetételében továbbra is problémát jelenthetnek. A bemutatott módszert a vizsgált két testfolyadékon kívül más, orvosi szempontból fontos testfolyadékok, például nyál és verejték elemzésére is tovább lehet optimalizálni. További korlátot jelentett, hogy a biogén aminosavak koncentrációja többnyire a kvantitálási határ alá esett. Míg egészséges körülmények között a biogén aminosavak koncentrációja alacsony a testfolyadékokban, addig a kóros elváltozások, például a cukorbetegség, számos molekula, például a putreszcin és hisztamin koncentrációját megnövelhetik [83,84]. Munkánk második részében kifejlesztettünk és validáltunk egy célzott tömegspektrometriás módszert két AZA metabolit, a 6-TG és 6-MMP mennyiségének vizsgálatára. Bár a módszer jól használhatónak bizonyult a klinikai minták elemzése során, vizsgálatunk egyik limitáló tényezője, hogy csak ezen két AZA-metabolitra összpontosítottunk, más potenciális metabolitok, mint például a 6-tioinozinsav, vagy potenciális toxikus származékok, mint például a 6-tioinozin-monofoszfát elemzésére nem került sor. Egy másik limitáló tényezőt az alkalmazott analitikai rendszer, amelynek üzemeltetésére csak megfelelően kiképzett személyzet képes. Azonban a tömegspektrométerek által biztosított szelektivitás, amely lehetővé teszi a célmolekulák megkülönböztetését a potenciálisan interferáló anyagoktól, szükségessé teszi az alkalmazásukat, különösen olyan esetekben, amikor fontos terápiás változtatásokkal kapcsolatos döntéseket kell hozni.

8. Összefoglalás

A kutatás során célunk humán testfolyadék minták elemzésére alkalmas metabolomikai módszerek fejlesztése volt, melyek hiánypótlóak a klinikai kutatásokban. Az aminosavak és biogén aminok elemzése fontos információval szolgálhat az orvostudományokban, ám legjobb tudomásunk szerint jelenleg nincs olyan validált analitikai módszer amely alkalmas ezen molekulák egyidejű vizsgálatára. Ezért kifejlesztettünk és az FDA irányelvek szerint validáltunk egy UHPLC-MS módszert, ami alkalmas 33 aminosav és biogén amin egyidejű gyors analizésére komplex biológiai mintákból. A validált módszert szérumszám- és könnyemintákban teszteltük, bizonyítva a módszer megbízhatóságát és alkalmazhatóságát klinikai szempontból releváns mintákban. Az egészséges önkéntesektől gyűjtött minták analizéséből származó eredmények összhangban állnak a tudományos irodalomban fellelhető adatokkal.

Az Azatioprin metabolitok vizsgálata fontos szereppel bír a terápiás gyógyszerkezelés beállításában, mely a kezelés hatékonysága szempontjából kiemelten fontos. Munkánk során kifejlesztettünk és az Európai Gyógyszerügynökség kritériumai szerint validáltunk egy UHPLC-MS módszert két Azatioprin metabolit, a 6-tioguanin és a 6-metilmerkaptopurin analizésére. A validált módszert azatioprin kezelés alatt álló autoimmun hepatitiszben szenvedő betegek vérmintáiban teszteltük. A kifejlesztett módszer alkalmasnak bizonyult a két metabolit koncentrációjának meghatározására, emellett az általunk meghatározott koncentráció értékek összhangban voltak a gyógyszer dózisával is. Az eredmények alapján a kifejlesztett módszer alkalmas a vizsgált molekulák mennyiségi meghatározására klinikai mintákban, és segíthet a gyógyszer dózisának optimalizálásában a kezelés során.

9. Summary

The aim of our research was to develop metabolomic methods for the analysis of human body fluid samples, which are a niche in clinical research. The analysis of amino acids and biogenic amines can provide important information for the medical sciences, but to the best of our knowledge there is currently no validated analytical method that can simultaneously analyse these molecules. Therefore, we have developed and validated a UHPLC-MS method according to the FDA guidelines for the rapid simultaneous analysis of 33 amino acids and biogenic amines from complex biological samples. The validated method was tested on serum and tear samples, demonstrating the reliability and applicability of the method on samples with clinical relevance. The results obtained from the analysis of samples collected from healthy volunteers are in agreement with data available in the scientific literature.

The analysis of azathioprine metabolites plays an important role in the therapeutic drug level adjustment, which has high importance in the efficacy of treatment. In our work, we developed and validated a UHPLC-MS method for the analysis of two azathioprine metabolites, 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine, according to the criteria of the European Medicines Agency. The validated method was tested on blood samples from patients with autoimmune hepatitis treated with azathioprine. The method developed proved to be suitable for the determination of the concentrations of the two metabolites and the determined concentration values were consistent with the dose of the drug. The results suggest that the developed method is suitable for the quantification of the tested molecules in clinical samples and may help to optimise the drug dose during treatment.

10. Tárgyszavak/keywords

származékképzés	derivatization;
folyadékkromatográfia	liquid chromatography (LC);
tömegspektrometria	mass spectrometry (MS);
testfolyadék	body fluid;
szérum	serum;
könny	tears;
módszerfejlesztés	method development;
validáció	validation
azathioprin	azathioprine;
6-tioguanin	6-thioguanine;
6-metil-merkaptó-purin	6-methyl-mercaptopurine;

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kalló Gergőnek a folyamatos támogatásért, segítségért, útmutatásért, melyek nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönetet mondok Dr. Csősz Éva professzor asszonynak, a szakmai irányítatásért és hogy a munkámat a Proteomika Szolgáltató Laboratóriumban végezhettem.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Tőzsér József professzor úrnak a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet vezetőjének a lehetőségért, hogy a munkámat az intézet keretein belül végezhettem.

Köszönetet mondok Dr. Papp Mária professzor asszonynak és kutatócsoportjának, különösen Dr. Kovács Patrícának az azatioprin mérések során végzett munkájukért és azért, hogy a beteg mintákat rendelkezésünkre bocsátották. Külön köszönöm Dr. Mezei Zoltánnak a validációs mérésekkel kapcsolatos tanácsait.

Ezúton köszönöm meg a Proteomika Szolgáltató Laboratórium jelenlegi és korábbi munkatársának, PhD hallgatójának a segítségért, támogatásáért különösképpen, Kökényesiné Csáki Juliannának, Csatári-Kovács Renátának, Bertalan Pertra Magdolnának, Dr. Márkus Bernadettnek és Bába Orsolyának.

Végül, de nem utolsó sorban nagy hálával tartozom a családomnak, édesanyámnak és a fiamnak, hogy mindig számíthattam rájuk és segítettek a céljaim elérésében.

A kutatás az NKFIH FK 134605, GINOP-2.3.4-15-2016-00002 és TKP2021-EGA-20 (Biotechnológia) pályázatok által valósulhat meg.

12. Mellékletek

1. melléklet : A vizsgált molekulák PDA detektorral meghatározott kalibrációs paraméterei különböző mátrixokban . t_R: retenciós idő, MQ: MilliQ víz, LOD: kimutatási határ, LOQ: kvantitálási határ.

Komponens	Rövidítés	t _R (perc)			LOD (µmol/l)			LOQ (µmol/l)			Lineáris taromány (µmol/l)			R ²			Kalibrációs egyenes		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Hisztidin	His	1.445	1.445	1.447	1.811	2.304	0.725	6.036	7.679	2.416	1.00-25.00	2.50-30.00	1.00-25.00	0.9960	0.9929	0.9962	y=3860.5x-2913	y=3892.1x-5107.1	y=3669.8x-2107.1
Aszparagin	Asn	1.678	1.677	1.679	0.382	0.337	0.593	1.272	1.124	1.976	0.50-25.00	0.50-30.00	0.50-20.00	0.9946	0.9979	0.9981	y=3828.2x-190.91	y=3748x-663.53	y=3720.2x-818.48
Taurin	Tau	1.916	1.917	1.915	0.203	0.198	0.218	0.677	0.659	0.728	0.25-25.00	2.50-30.00	0.50-25.00	0.9987	0.9996	0.9977	y=4890x-523.91	y=4729.1x-2402.4	y=4420.8x+312.95
Szerin	Ser	2.370	2.367	2.372	0.206	0.222	0.177	0.688	0.741	0.589	0.25-25.00	2.50-25.00	0.50-25.00	0.9963	0.9983	0.9938	y=4479.2x-66.304	y=4448.8x-1539.6	y=4009.3x+1387.1
Glutamin	Gln	2.547	2.546	2.550	2.023	1.911	1.672	6.743	6.368	5.575	0.50-25.00	0.50-30.00	1.00-25.00	0.9937	0.9973	0.9954	y=1417.1x-106.37	y=1286x+1204.9	y=1389.2x+476.11
Arginin	Arg	2.643	2.643	2.650	1.372	0.097	0.779	4.572	0.325	2.598	0.50-20.00	0.50-25.00	1.00-25.00	0.9971	0.9909	0.9889	y=1608.9x-750.81	y=1412.1x-372.8	y=1731x-193.31
Hisztamin	Hsn	2.748	2.744	2.754	0.717	0.753	0.518	2.390	2.510	1.728	0.50-25.00	2.50-25.00	0.50-25.00	0.9964	0.9974	0.9950	y=2629.8x-81.772	y=2668.8x-2084.9	y=2577.5x-546.46
Glicin	Gly	2.911	2.906	2.913	0.407	0.379	0.736	1.357	1.263	2.454	0.50-25.00	2.50-30.00	1.00-25.00	0.9961	0.9992	0.9932	y=4152.6x+635.83	y=4139.6x-1428.2	y=3710.6x+566.8
Etanolamin	Eth	3.208	3.205	3.212	0.253	0.223	0.279	0.844	0.745	0.931	0.50-25.00	2.50-30.00	0.25-15.00	0.9952	0.9989	0.9995	y=4658.6x-173.92	y=4606.2x-2136.7	y=4269.7x+269.24
Aszpartát	Asp	3.482	3.475	3.481	0.253	0.223	0.204	0.842	0.743	0.680	0.50-25.00	0.50-30.00	0.50-20.00	0.9870	0.9964	0.9976	y=4180.9x+305.26	y=4188.1x-278.46	y=4263.2-1075.9
Metil-amin	Mea	3.876	3.870	3.879	0.256	0.306	0.204	0.853	1.018	0.681	0.25-25.00	0.50-30.00	0.25-15.00	0.9885	0.9965	0.9991	y=4057.6x-149.51	y=4080x-1009.4	y=3915x-408.56
Glutamát	Glu	4.845	4.840	4.841	0.444	0.491	0.359	1.481	1.637	1.197	0.25-25.00	0.50-30.00	0.25-15.00	0.9900	0.9971	0.9985	y=3650.5x+159.46	y=3830.6x-290.2	y=3578.2x+69.564
Citrullin	Cit	4.940	4.938	4.938	0.372	0.438	0.277	1.240	1.459	0.923	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-15.00	0.9962	0.9989	0.9997	y=4024.1x+36.865	y=4088.8x-1881.8	y=3734.5x+223.58
Treonin	Thr	5.493	5.500	5.514	0.183	0.168	0.197	0.609	0.560	0.655	0.25-25.00	2.50-30.00	1.00-25.00	0.9962	0.9991	0.9923	y=4577x-189.99	y=4518.4x-1481.8	y=4097.2x+1032.5
Alanin	Ala	5.946	5.956	5.977	0.221	0.235	0.124	0.735	0.783	0.412	0.25-25.00	1.00-30.00	0.25-15.00	0.9910	0.9973	0.9989	y=4485.8x-301.83	y=4444.7x+401.51	y=4229.7x+46.267
Etil-amin	Eta	6.146	6.157	6.181	0.184	0.132	0.149	0.614	0.440	0.496	0.50-25.00	0.25-30.00	0.25-15.00	0.9809	0.9948	0.9982	y=4651.6x+1115.2	y=4698.4x-191.1	y=4616.2x-299.08
Prolin	Pro	6.356	6.378	6.417	0.133	0.160	0.264	0.444	0.533	0.879	0.25-25.00	2.50-30.00	1.00-25.00	0.9948	0.9987	0.9916	y=4175.9x-37.55	y=4144.9x-1235.4	y=3756.1x+882.19
Ornitin	Orn	6.914	6.970	7.061	0.149	0.167	0.164	0.496	0.557	0.545	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-15.00	0.9892	0.9964	0.9987	y=7707.5x-40.697	y=7813.7x-2198.1	y=7290.7x+363.3
Cisztein	Cys	7.336	7.397	7.492	0.168	0.140	0.200	0.559	0.465	0.666	0.50-25.00	2.50-30.00	1.00-25.00	0.9982	0.9995	0.9974	y=3983x-579.2	y=3855x-1903.3	y=3483.4x+443.04
Lizin	Lys	7.521	7.578	7.668	0.226	0.255	0.523	0.753	0.849	1.742	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-15.00	0.9859	0.9945	0.9983	y=6416.8x+263.85	y=6297.1x-552.86	y=5433.3x-148.64
Tirozin	Tyr	7.596	7.643	7.724	0.168	0.243	0.780	0.559	0.811	2.599	0.50-25.00	2.50-30.00	0.50-25.00	0.9990	0.9996	0.9991	y=4213.5x-194.44	y=3992.8x-2012.4	y=3402.4x+2.7552
Putreszcín	Put	7.665	7.719	7.796	0.141	0.261	0.132	0.469	0.871	0.440	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-15.00	0.9891	0.9966	0.9987	y=7099.6x-194.6	y=7616.2x-3549.9	y=7072.7x-42.892
Metionin	Met	7.865	7.887	7.922	0.132	0.129	0.383	0.440	0.431	1.276	0.50-25.00	2.50-30.00	1.00-25.00	0.9970	0.9994	0.9949	y=4363.9x-142.2	y=4184x-1767.6	y=3639.9x+879.88
Szerotonin	Stn	7.920	7.935	7.962	0.814	0.124	0.383	2.714	0.414	1.278	0.50-30.00	2.50-25.00	0.25-30.00	0.9980	0.9978	0.9981	y=3858.1x-1256.7	y=3782.5x-4345.7	y=3295.7x-47.009
Valin	Val	7.991	8.001	8.019	0.113	0.391	0.208	0.376	1.304	0.693	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-20.00	0.9943	0.9985	0.9982	y=3972.4x+114.77	y=3670.1x-486.45	y=2371.7x+142.08
Kadaverin	Cad	8.029	8.033	8.044	0.207	0.142	0.330	0.690	0.472	1.100	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-15.00	0.9858	0.9947	0.9977	y=6926.8x+255.02	y=7099x-2537.3	y=5684.9x-79.418
Tiramin	Tra	8.069	8.075	8.090	0.297	0.299	0.195	0.990	0.995	0.649	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-20.00	0.9983	0.9996	0.9992	y=4229.9x+82.921	y=4164.2x-1991	y=4183.3x-270.81
Izoleucin	Ile	8.446	8.453	8.468	0.129	0.165	0.184	0.431	0.552	0.614	0.25-25.00	2.50-30.00	0.50-20.00	0.9949	0.9986	0.9979	y=4553x-38.987	y=4547.8x-1589.8	y=4396.9x-967.46

1. melléklet folytatás

Komponens	Rövidítés	tr (perc)			LOD (µmol/l)			LOQ (µmol/l)			Lineáris taromány (µmol/l)			R ²			Kalibrációs egyenes		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Leucin	Leu	8.535	8.544	8.562	0.108	0.113	0.245	0.361	0.376	0.818	0.25-20.00	0.50-25.00	0.25-20.00	0.9982	0.9974	0.9988	y=5886.6x-913.74	y=5546x+747.22	y=5280.4x+157.72
Fenilalanin	Phe	8.662	8.673	8.696	0.166	0.160	0.210	0.552	0.532	0.701	0.25-25.00	2.50-30.00	0.50-25.00	0.9987	0.9996	0.9982	y=4783.6x-200.49	y=4600.5x-2403.9	y=4259x+40.601
Triptofán	Trp	8.785	8.794	8.807	0.606	0.217	0.197	2.020	0.724	0.656	1.00-25.00	2.50-30.00	0.25-25.00	0.9992	0.9995	0.9993	y=3638.1x-1608.8	y=3438.7x-3021.5	y=3197.3x-322.9
Triptamin+ 2-fenetil-amin	Tpa + Pha	8.932	8.931	8.933	0.143	0.175	0.267	0.467	0.584	0.889	0.25-25.00	2.50-30.00	0.25-25.00	0.9975	0.9995	0.9966	y=10129x-1079.1	y=9741.7x-5269.3	y=8947.3x+2112.5

2. melléklet : A vizsgált molekulák SRM analízissel meghatározott kalibrációs paraméterei különböző mátrixokban . tr: retenció idő, MQ: MilliQ víz, LOD: kimutatási határ, LOQ: kvantitálási határ.

Komonens	Rövidítés	LOD (µmol/l)			LOQ (µmol/l)			Lineáris taromány (µmol/l)			R ²			Kalibrációs egyenes		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Hisztidin	His	0.615	0.384	0.054	2.050	1.281	0.182	0.25-5.00	0.25-15.00	0.25-30.00	0.9501	0.9571	0.9901	y=12312x+188.41	y=6690.8x+299.92	y=5816x+583
Aszparagin	Asn	0.104	0.065	0.093	0.348	0.218	0.309	0.25-25.00	0.25-30.00	0.25-30.00	0.9922	0.9971	0.9812	y=371420x+303930	y=333720x+42504	y=301810x+59681
Taurin	Tau	0.106	0.079	0.134	0.352	0.263	0.448	0.25-15.00	0.25-15.00	0.25-10.00	0.9844	0.9939	0.991	y=124750x+184720	y=1091100x+222630	y=1132800x+131900
Szerin	Ser	0.338	0.123	0.161	1.126	0.410	0.536	0.25-20.00	0.25-15.00	0.25-20.00	0.9728	0.9939	0.9914	y=230160x+43664	y=188530x+35518	y=173870x+41266
Glutamin	Gln	0.267	0.114	0.104	0.890	0.380	0.346	0.25-20.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9811	0.9933	0.9945	y=116290x+9123.6	y=92320x+76101	y=89145x+6316.2
Arginin	Arg	0.061	0.050	0.039	0.203	0.166	0.131	0.25-25.00	0.25-30.00	0.25-25.00	0.9969	0.9964	0.9958	y=75362x+1810.2	y=69439x+2550.3	y=64679x+4159.5
Hisztamin	Hsn	0.195	0.107	0.074	0.649	0.357	0.245	0.25-15.00	0.25-10.00	0.25-10.00	0.9718	0.9954	0.99	y=1628100x+32780	y=1475700x+176490	y=1527800x+228440
Glicin	Gly	0.400	0.140	0.105	1.333	0.466	0.352	0.25-15.00	0.25-15.00	0.25-20.00	0.969	0.9937	0.9928	y=87225x+43383	y=71687x+23415	y=66764x+22287
Etanolamin	Eth	0.060	0.099	0.073	0.200	0.331	0.243	0.25-2.50	0.25-5.00	0.25-2.50	0.9946	0.9861	0.9891	y=7892700x+578120	y=5700900x+1002000	y=6852100x+596130
Aszpartát	Asp	0.057	0.108	0.130	0.192	0.359	0.435	0.25-20.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9957	0.9957	0.9945	y=243470x+15357	y=213400x+10136	y=209250x+14457
Metil-amin	Mea	0.094	0.067	0.038	0.313	0.223	0.127	0.25-2.50	0.25-2.50	0.25-2.50	0.9899	0.9794	0.9879	y=10998000x+854830	Y=9605800X+780600	y=9828200x+1005600
Glutamát	Glu	0.176	0.156	0.048	0.588	0.519	0.160	0.25-20.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9914	0.9955	0.9961	y=200980x+20420	y=172740x+15552	y=167000x+19499
Citrullin	Cit	0.107	0.053	0.129	0.358	0.177	0.431	0.25-20.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9903	0.9895	0.9924	y=787570x+115960	y=651310x+115560	y=665430x+99481
Treonin	Thr	0.105	0.053	0.094	0.351	0.176	0.312	0.25-25.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9911	0.999	0.9969	y=130650x+11749	y=114800x+15572	y=110240x+10328
Alanin	Ala	0.176	0.088	0.110	0.587	0.293	0.366	0.25-20.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9931	0.9931	0.9963	y=321060x+38689	y=276410x+111620	y=282980x+38419
Etil-amin	Eta	0.197	0.200	0.145	0.657	0.666	0.482	0.25-1.00	0.25-1.00	0.25-1.00	0.9967	0.9876	0.996	y=3884500x+13176	y=12643000x+526520	y=11584000x+1455100
Prolin	Pro	0.118	0.060	0.066	0.393	0.201	0.221	0.25-15.00	0.25-15.00	0.25-15.00	0.9897	0.9955	0.9729	y=910020x+106240	y=819010x+132710	y=788890x+140950
Ornitin	Orn	0.115	0.078	0.066	0.383	0.259	0.222	0.25-20.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9943	0.9953	0.9981	y=336010x+41211	y=285230x+35028	y=287020x+39900
Cisztein	Cys	0.069	0.044	0.040	0.231	0.146	0.132	0.25-25.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9953	0.9973	0.9977	y=245860x+19091	y=211030x+26068	y=214730x+14727
Lizin	Lys	0.097	0.079	0.074	0.324	0.264	0.247	0.25-25.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9865	0.9933	0.9944	y=84038x+14540	y=70943x+16772	y=71621x+7238.7

2. melléklet folytatás

Komonens	Rövidítés	LOD (μmol/l)			LOQ (μmol/l)			Lineáris tartomány (μmol/l)			R ²			Kalibrációs egyenes		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Tirozin	Tyr	0.113	0.094	0.076	0.377	0.314	0.253	0.25-25.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9905	0.995	0.9956	y=154990x+18819	y=128700x+16351	y=130000x+14760
Putreszcin	Put	0.095	0.035	0.077	0.317	0.118	0.257	0.25-20.00	0.25-20.00	0.25-20.00	0.9912	0.9951	0.9917	y=632210x+113100	y=569010x+77417	y=564250x+101050
Metionin	Met	0.086	0.030	0.068	0.286	0.100	0.227	0.25-15.00	0.25-20.00	0.25-20.00	0.9949	0.9946	0.9912	y=751150x+75080	y=571340x+64245	y=534400x+69109
Szerotonin ¹	Str ¹	0.076	0.030	0.116	0.254	0.100	0.387	0.25-5.00	0.25-5.00	0.25-7.50	0.9908	0.9992	0.9882	y=2161700x+160200	y=1782800x+78256	y=1620900x+222090
Szerotonin ²	Str ²	0.167	0.025	0.416	0.558	0.083	1.385	0.25-15.00	0.25-20.00	0.25-20.00	0.9904	0.9972	0.9694	y=31572x+2602.1	y=31062x+1033.9	y=23389x+2350.9
Valin	Val	0.085	0.045	0.110	0.284	0.150	0.366	0.25-15.00	0.25-10.00	0.25-20.00	0.989	0.9972	0.9873	y=736370x+102230	y=673670x+181120	y=567960x+102060
Kadaverin	Cad	0.126	0.046	0.085	0.420	0.154	0.285	0.25-15.00	0.25-10.00	0.25-20.00	0.984	0.9955	0.9913	y=689730x+152960	y=645020x+48681	y=547430x+106030
Tiramin	Tra	0.280	0.133	0.162	0.933	0.444	0.541	0.25-1.00	0.25-1.00	0.25-1.0	0.9649	0.9946	0.9782	y=7583600x+554690	y=6577500x+94653	y=6118600x+127410
Izoleucin	Ile	1.042	0.029	0.157	3.472	0.098	0.523	0.25-1.00	0.25-5.00	0.25-5.00	0.9925	0.9943	0.9747	y=3822900x-3670.2	y=2493000x+431770	y=2356600x+322130
Leucin	Leu	0.021	0.054	0.162	0.071	0.179	0.540	0.25-2.50	0.25-5.00	0.25-5.00	0.9927	0.9851	0.9771	y=3502400x+164690	y=2581300x+507180	y=2410800x+298750
Fenilalanin	Phe	0.097	0.046	1.574	0.322	0.153	5.247	0.25-15.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.996	0.9971	0.9818	y=503990x+35433	y=412360x+55367	y=400020x+35017
Triptofán	Trp	0.098	0.038	0.410	0.326	0.128	1.365	0.25-15.00	0.25-30.00	0.25-20.00	0.9956	0.9936	0.9707	y=560190x+32549	y=432100x+45221	y=413050x+29569
Triptamin	Tpa	0.601	0.674	0.554	2.004	2.247	1.847	0.25-2.50	0.25-2.50	0.25-2.50	0.9641	0.9432	0.9506	y=3685800x+385210	y=3700100x+106100	y=2748700x+354500
2-fenetil-amin	Pha	0.072	0.858	0.725	0.241	2.860	2.417	0.25-2.50	0.25-1.00	0.25-2.50	0.9402	0.9947	0.9533	y=4511600x+1890500	y=5292600x+373080	y=5132000x+857750

3. melléklet : Egy napon belüli és napok közötti pontosság és variabilitás.

Komponens	QC koncentráció (μmol/l)	Napon belüli variabilitás (n=5)									Napok közötti variabilitás (n=15)								
		Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %			Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Hisztidin	2.5	2.804	2.821	2.779	1.23	0.83	0.72	112.18	112.83	111.15	2.787	2.815	2.762	1.43	1.54	1.28	111.47	112.59	110.48
	7.5	8.131	7.981	8.119	1.99	2.18	0.13	108.41	106.41	108.25	7.959	7.886	7.994	2.07	1.73	2.32	106.12	105.14	106.59
	15	15.188	16.572	16.757	6.22	0.27	1.84	101.25	110.48	111.71	15.979	16.365	16.855	5.36	1.37	1.45	106.53	109.10	112.37
Aszparagin	2.5	2.728	2.709	2.756	3.41	0.72	0.88	109.13	108.37	110.24	2.728	2.713	2.826	3.90	2.69	4.07	109.12	108.51	113.04
	7.5	8.199	8.494	8.362	2.30	0.71	0.50	109.32	113.26	111.50	8.378	8.576	8.277	2.35	2.68	1.87	111.71	114.35	110.36
	15	15.494	16.434	17.099	1.95	1.65	0.59	103.29	109.56	114.00	15.951	15.786	16.604	2.85	4.22	2.56	106.34	105.24	110.69

3. melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (µmol/l)	Napon belüli variabilitás (n=5)									Napok közötti variabilitás (n=15)								
		Átlag koncentráció (µmol/l)			RSD%			Pontosság %			Átlag koncentráció (µmol/l)			RSD%			Pontosság %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Taurin	2.5	2.397	2.734	2.400	2.62	0.76	3.35	95.89	109.36	96.00	2.369	2.788	2.446	2.40	3.15	2.98	94.75	111.51	97.83
	7.5	7.358	8.295	7.971	1.31	0.52	1.10	98.10	110.60	106.29	7.342	8.229	7.749	1.47	1.09	3.49	97.89	109.72	103.32
	15	13.957	16.087	16.213	0.73	0.20	1.25	93.05	107.24	108.09	14.422	15.411	16.168	2.47	4.57	0.91	96.15	102.74	107.79
Szerin	2.5	2.571	2.677	2.557	1.84	1.01	2.35	102.84	107.09	102.27	2.557	2.688	2.598	2.37	1.08	1.93	102.29	107.51	103.93
	7.5	7.740	8.360	8.328	0.60	0.46	1.24	103.19	111.47	111.04	7.714	8.333	8.031	0.66	0.77	4.69	102.85	111.10	107.08
	15	14.194	15.734	17.119	0.24	0.24	0.42	94.62	104.89	114.13	14.822	15.038	16.700	3.15	4.55	1.94	98.82	100.25	111.33
Glutamin	2.5	2.732	2.636	2.727	1.38	3.12	0.88	109.27	105.43	109.06	2.676	2.583	2.662	2.19	4.54	3.29	107.04	103.32	106.48
	7.5	8.465	8.079	8.004	2.10	2.89	1.34	112.87	107.72	106.72	8.321	7.990	7.957	2.58	2.66	2.57	110.95	106.53	106.09
	15	16.476	16.311	16.629	1.98	1.43	1.66	109.84	108.74	110.86	16.563	16.326	16.332	1.74	2.38	3.29	110.42	108.84	108.88
Arginin	2.5	2.856	2.521	2.511	6.22	1.45	4.04	114.22	100.85	100.44	2.500	2.402	2.412	14.93	8.95	4.71	100.00	96.09	96.48
	7.5	8.307	7.443	7.570	3.10	2.47	4.06	110.76	99.24	100.94	7.423	7.323	6.863	9.36	7.39	14.98	98.97	97.64	91.51
	15	15.604	16.335	13.798	3.65	1.22	2.40	104.02	108.90	91.99	14.693	15.173	14.005	10.11	7.07	8.49	97.95	101.15	93.37
Hisztamin	2.5	2.245	2.607	2.406	2.34	0.37	2.58	89.82	104.26	96.26	2.134	2.591	2.262	7.99	1.80	8.50	85.36	103.65	90.46
	7.5	7.565	6.819	7.145	2.58	1.25	1.43	100.87	90.92	95.26	6.819	6.826	6.599	8.50	2.13	12.53	90.92	91.01	87.98
	15	13.466	14.405	13.708	2.01	1.60	2.34	89.77	96.03	91.39	13.444	13.373	14.003	2.79	6.16	3.79	89.63	89.15	93.36
Glicin	2.5	2.406	2.742	2.669	2.20	2.23	1.88	96.25	109.67	106.76	2.464	2.732	2.699	3.02	1.66	1.75	98.57	109.27	107.95
	7.5	7.584	8.477	8.516	0.92	1.56	0.66	101.12	113.03	113.54	7.565	8.443	8.212	1.13	1.09	4.63	100.86	112.57	109.49
	15	14.226	16.146	16.981	1.26	0.89	0.48	94.84	107.64	113.20	14.906	15.413	16.928	3.58	4.57	0.69	99.37	102.76	112.86
Etanolamin	2.5	2.545	2.721	2.730	1.73	0.87	2.55	101.81	108.84	109.18	2.520	2.766	2.680	1.61	2.50	2.80	100.81	110.65	107.22
	7.5	7.526	8.213	8.206	0.93	1.01	1.08	100.34	109.50	109.41	7.545	8.156	7.850	1.05	0.85	4.73	100.60	108.74	104.67
	15	13.962	15.479	16.551	0.50	0.35	0.50	93.08	103.19	110.34	14.567	14.785	16.148	2.90	4.81	2.03	97.11	98.57	107.65
Aszpartát	2.5	2.521	2.586	2.791	2.94	2.06	2.43	100.83	103.46	111.62	2.517	2.577	2.817	2.84	6.95	2.86	100.69	103.06	112.67
	7.5	7.896	8.420	8.070	1.10	1.04	0.65	105.28	112.27	107.60	7.935	8.175	7.715	0.87	2.33	4.23	105.80	109.00	102.86
	15	14.263	14.363	15.855	0.64	0.29	0.92	95.09	95.75	105.70	14.914	13.996	15.115	3.95	2.14	3.87	99.42	93.30	100.77
Metil-amin	2.5	2.657	2.789	2.726	2.71	2.01	1.61	106.28	111.55	109.06	2.619	2.735	2.812	3.11	5.53	3.23	104.77	109.41	112.46
	7.5	7.960	8.491	8.329	1.47	0.64	1.53	106.13	113.21	111.05	8.031	8.265	7.866	1.64	2.35	4.85	107.08	110.20	104.88
	15	14.484	14.583	16.826	0.34	0.47	0.19	96.56	97.22	112.17	15.044	14.360	15.899	4.41	2.21	4.57	100.30	95.73	105.99

3. melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (μmol/l)	Napon belüli variabilitás (n=5)									Napok közötti variabilitás (n=15)								
		Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %			Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Glutamát	2.5	2.761	2.668	2.771	5.09	0.53	1.16	110.43	106.71	110.84	2.722	2.729	2.833	4.03	3.97	3.07	108.86	109.14	113.33
	7.5	8.217	8.463	8.268	4.64	2.21	0.63	109.56	112.84	110.24	8.312	8.532	8.091	2.78	1.80	3.07	110.83	113.76	107.88
	15	15.068	14.960	16.780	4.09	0.34	0.43	100.45	99.73	111.87	15.814	14.611	16.364	4.37	2.34	2.33	105.43	97.41	109.09
Citruillin	2.5	2.665	2.788	2.779	4.33	0.87	0.37	106.61	111.50	111.17	2.661	2.783	2.840	2.82	1.62	1.85	106.43	111.30	113.58
	7.5	8.116	8.500	8.597	3.63	0.62	0.41	108.21	113.33	114.63	8.131	8.575	8.403	2.09	0.82	3.91	108.42	114.34	112.04
	15	15.046	16.120	17.031	3.98	0.23	0.24	100.31	107.47	113.54	15.732	15.579	17.156	3.90	4.28	1.07	104.88	103.86	114.38
Treonin	2.5	2.599	2.666	2.635	2.03	0.25	1.02	103.95	106.65	105.41	2.572	2.733	2.646	2.23	3.82	1.11	102.88	109.32	105.86
	7.5	7.727	8.498	8.399	0.55	0.49	0.63	103.02	113.31	111.99	7.760	8.371	8.094	1.01	1.18	4.59	103.46	111.62	107.92
	15	14.261	15.809	17.220	0.28	0.41	0.45	95.07	105.40	114.80	14.895	15.060	16.758	3.16	4.67	2.11	99.30	100.40	111.72
Alanin	2.5	2.679	2.713	2.723	0.96	1.13	2.47	107.17	108.53	108.93	2.637	2.689	2.739	3.30	1.54	2.50	105.49	107.57	109.54
	7.5	7.964	8.171	8.465	0.27	1.00	0.38	106.18	108.95	112.86	8.026	8.417	8.006	0.97	2.22	5.85	107.01	112.23	106.75
	15	14.501	15.364	17.038	0.30	0.36	0.38	96.67	102.43	113.59	15.144	14.854	16.318	3.53	3.25	3.41	100.96	99.02	108.79
Etil-amin	2.5	2.613	2.758	2.824	2.68	1.59	1.34	104.50	110.33	112.98	2.571	2.682	2.836	2.00	6.32	2.09	102.84	107.29	113.42
	7.5	8.147	8.534	8.441	0.65	0.23	0.57	108.63	113.78	112.55	8.172	8.381	7.949	1.32	1.72	4.74	108.97	111.75	105.99
	15	14.891	14.522	16.989	0.17	0.26	0.25	99.28	96.81	113.26	15.411	14.417	15.862	5.19	1.27	5.64	102.74	96.11	105.75
Prolin	2.5	2.531	2.803	2.553	0.32	8.50	0.59	101.26	112.11	102.13	2.531	2.796	2.594	1.59	5.45	1.36	101.25	111.84	103.77
	7.5	7.666	8.360	8.304	0.22	0.31	0.36	102.21	111.47	110.72	7.667	8.312	7.964	0.49	0.48	4.65	102.23	110.83	106.19
	15	14.253	15.652	17.046	1.55	1.26	0.21	95.02	104.35	113.64	14.766	14.945	16.533	2.81	4.49	2.33	98.44	99.63	110.22
Ornitin	2.5	2.704	2.822	2.781	1.33	0.27	0.32	108.15	112.89	111.22	2.723	2.803	2.862	1.27	0.73	2.50	108.94	112.13	114.49
	7.5	7.974	8.552	8.541	1.03	0.25	0.27	106.32	114.02	113.88	8.108	8.440	8.101	1.64	1.03	4.64	108.11	112.54	108.01
	15	14.391	15.039	17.014	0.37	0.20	0.46	95.94	100.26	113.43	15.205	14.490	16.349	4.45	3.97	3.39	101.37	96.60	108.99
Cisztein	2.5	2.563	2.813	2.633	0.46	0.51	1.69	102.51	112.52	105.32	2.565	2.835	2.656	1.51	1.58	1.23	102.58	113.39	106.25
	7.5	7.588	8.306	8.352	0.86	0.23	0.39	101.18	110.75	111.36	7.512	8.208	8.124	0.98	0.91	4.31	100.16	109.44	108.32
	15	14.159	16.201	17.161	0.27	0.23	0.35	94.40	108.00	114.40	14.595	15.220	16.774	2.23	6.29	1.85	97.30	101.46	111.83
Lizin	2.5	2.787	2.747	2.795	2.43	1.54	0.99	111.50	109.86	111.81	2.728	2.772	2.789	2.17	1.41	1.33	109.12	110.87	111.58
	7.5	8.390	8.251	8.411	0.62	1.12	0.61	111.87	110.02	112.14	8.274	8.290	8.423	2.36	0.83	0.89	110.32	110.53	112.31
	15	15.160	16.111	16.944	0.56	0.41	1.27	101.07	107.41	112.96	15.479	15.202	17.141	4.40	5.56	1.30	103.20	101.35	114.27

3. melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (μmol/l)	Napon belüli variabilitás (n=5)									Napok közötti variabilitás (n=15)								
		Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %			Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Tirozin	2.5	2.486	2.720	2.640	2.37	1.47	1.37	99.44	108.79	105.61	2.358	2.715	2.615	4.47	0.92	1.73	94.30	108.60	104.60
	7.5	7.876	7.684	7.441	1.77	1.88	3.42	105.01	102.45	99.21	7.580	7.538	7.483	3.45	3.37	4.59	101.07	100.51	99.78
	15	15.402	15.918	16.000	0.74	1.42	3.36	102.68	106.12	106.67	15.135	15.255	16.120	2.03	3.85	3.98	100.90	101.70	107.47
Putreszcin	2.5	2.797	2.824	2.696	1.39	0.22	1.32	111.89	112.97	107.82	2.828	2.811	2.801	1.92	0.79	2.91	113.12	112.44	112.03
	7.5	8.365	8.428	8.461	1.32	0.55	0.33	111.53	112.38	112.81	8.569	8.445	8.063	1.96	0.95	4.89	114.25	112.60	107.51
	15	15.209	14.965	17.139	0.51	0.70	0.69	101.40	99.77	114.26	16.188	14.681	16.535	4.79	3.04	2.85	107.92	97.87	110.23
Metionin	2.5	2.725	2.810	2.503	2.04	0.47	1.07	109.01	112.38	100.13	2.716	2.799	2.515	1.25	1.71	2.85	108.65	111.96	100.61
	7.5	8.172	8.031	8.292	0.74	0.84	0.82	108.96	107.08	110.56	8.069	8.037	8.393	1.55	1.11	2.52	107.59	107.16	111.91
	15	15.201	16.930	16.918	0.23	1.12	1.09	101.34	112.87	112.79	15.671	16.312	16.954	2.30	4.51	0.79	104.47	108.75	113.03
Szerotonin	2.5	2.368	2.853	2.481	1.09	0.41	0.96	94.73	114.12	99.22	2.306	2.835	2.437	2.46	0.90	1.58	92.22	113.42	97.50
	7.5	6.714	7.601	7.483	0.28	0.16	0.31	89.52	101.34	99.78	6.484	7.527	7.264	3.63	1.14	3.76	86.45	100.37	96.85
	15	12.849	15.170	15.709	0.18	0.16	0.25	85.66	101.13	104.73	12.927	14.394	15.529	1.31	5.62	0.93	86.18	95.96	103.53
Valin	2.5	2.709	2.810	2.606	1.29	1.32	3.41	108.37	112.39	104.26	2.633	2.761	2.617	2.94	3.08	4.44	105.32	110.46	104.69
	7.5	8.367	8.202	8.287	1.30	1.38	2.58	111.55	109.36	110.50	7.931	8.143	8.216	4.35	1.57	1.80	105.74	108.57	109.54
	15	15.772	16.835	16.810	0.14	1.17	1.97	105.15	112.23	112.07	15.673	16.155	16.203	1.65	4.15	3.14	104.49	107.70	108.02
Kadaverin	2.5	2.785	2.739	2.755	3.24	0.84	3.23	111.39	109.57	110.22	2.772	2.778	2.769	3.41	2.80	2.36	110.89	111.12	110.76
	7.5	8.451	8.549	8.354	1.11	0.14	1.76	112.68	113.98	111.39	8.581	8.613	8.388	1.57	1.43	1.59	114.41	114.84	111.84
	15	15.358	15.694	17.018	0.72	0.19	1.40	102.39	104.63	113.45	16.333	15.367	17.053	5.60	3.75	0.99	108.89	102.44	113.68
Tiramin	2.5	2.540	2.692	2.699	0.72	1.91	0.38	101.59	107.66	107.94	2.662	2.726	2.829	3.41	1.68	3.39	106.48	109.03	113.15
	7.5	7.675	8.400	7.846	0.81	0.28	0.65	102.33	112.00	104.61	7.914	8.522	7.958	2.30	2.55	3.70	105.52	113.62	106.10
	15	14.641	16.606	15.790	0.63	0.10	0.33	97.61	110.71	105.27	15.563	16.409	16.230	4.37	2.84	2.09	103.75	109.39	108.20
Izoleucin	2.5	2.520	2.774	2.817	1.10	5.54	1.17	100.81	110.97	112.67	2.562	2.771	2.749	2.32	3.22	2.27	102.47	110.86	109.95
	7.5	7.544	8.267	8.136	1.44	1.14	1.35	100.58	110.23	108.48	7.721	8.295	7.946	1.89	0.73	4.02	102.95	110.59	105.95
	15	13.820	15.344	16.291	1.76	1.18	1.31	92.13	102.29	108.61	14.778	14.886	16.027	4.89	3.62	1.47	98.52	99.24	106.85
Leucin	2.5	2.742	2.667	2.750	1.70	0.94	0.76	109.68	106.67	109.99	2.743	2.623	2.791	2.70	5.32	1.26	109.74	104.90	111.65
	7.5	7.732	8.263	8.386	0.46	0.31	0.48	103.09	110.17	111.81	7.830	8.152	7.527	1.32	1.02	14.45	104.40	108.69	100.36
	15	13.865	15.018	16.463	0.35	0.15	0.16	92.43	100.12	109.76	14.524	14.439	15.946	3.41	3.55	2.55	96.83	96.26	106.30

3. melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (μmol/l)	Napon belüli variabilitás (n=5)									Napok közötti variabilitás (n=15)								
		Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %			Átlag koncentráció (μmol/l)			RSD%			Pontosság %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Fenilalanin	2.5	2.430	2.679	2.740	1.18	0.88	1.22	97.21	107.14	109.59	2.392	2.819	2.697	2.05	5.96	1.59	95.68	112.77	107.89
	7.5	7.471	8.419	8.360	0.70	0.66	0.94	99.61	112.25	111.46	7.331	8.323	8.130	1.58	1.00	3.68	97.74	110.98	108.41
	15	14.200	16.579	16.972	0.70	0.59	0.48	94.66	110.53	113.15	14.548	15.781	16.788	1.91	4.78	0.93	96.99	105.21	111.92
Tryptofán	2.5	2.764	2.798	2.725	0.72	0.83	0.65	110.57	111.92	109.01	2.809	2.818	2.739	2.63	1.28	0.97	112.38	112.71	109.56
	7.5	8.602	8.300	7.382	0.39	0.99	1.74	114.70	110.66	98.42	8.514	8.274	7.401	0.82	2.79	2.29	113.52	110.31	98.68
	15	16.213	16.968	16.953	0.74	1.06	0.87	108.09	113.12	113.02	16.604	17.153	16.955	1.78	1.51	1.01	110.69	114.36	113.04
Tryptamin + 2-fenetil-amin	2.5	2.505	2.576	2.495	1.07	0.41	0.69	100.20	103.05	99.79	2.501	2.578	2.500	1.11	1.22	0.75	100.03	103.13	99.99
	7.5	7.393	8.129	7.934	0.25	0.19	0.32	98.57	108.39	105.78	7.335	8.112	7.815	0.95	0.44	2.61	97.80	108.16	104.20
	15	14.028	15.963	16.300	0.11	0.26	0.21	93.52	106.42	108.66	14.359	15.352	16.235	1.85	4.24	0.35	95.73	102.35	108.23

4. melléklet: Viisszanyerés és mátrixhatás

Komponens	QC koncentráció (µmol/l)	Átlag koncentráció (µmol/l)			Viisszanyerés %			Mátrix hatás %	
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	Szérum	Könny
Hisztidin	2.5	2.804	2.821	2.779	112.18	112.83	111.15	25.80	-2.24
	7.5	8.131	7.981	8.119	108.41	106.41	108.25	8.86	2.77
	15	15.188	16.572	16.757	101.25	110.48	111.71	-6.59	-6.58
Aszparagin	2.5	2.728	2.709	2.756	109.13	108.37	110.24	7.44	7.98
	7.5	8.199	8.494	8.362	109.32	113.26	111.50	0.08	2.90
	15	15.494	16.434	17.099	103.29	109.56	114.00	-3.06	-6.21
Taurin	2.5	2.397	2.734	2.400	95.89	109.36	96.00	6.00	2.47
	7.5	7.358	8.295	7.971	98.10	110.60	106.29	-3.86	-0.27
	15	13.957	16.087	16.213	93.05	107.24	108.09	-8.78	-6.29
Szerin	2.5	2.571	2.677	2.557	102.84	107.09	102.27	9.42	-1.64
	7.5	7.740	8.360	8.328	103.19	111.47	111.04	-3.04	-0.51
	15	14.194	15.734	17.119	94.62	104.89	114.13	-7.79	-10.25
Glutamin	2.5	2.732	2.636	2.727	109.27	105.43	109.06	-22.04	-13.25
	7.5	8.465	8.079	8.004	112.87	107.72	106.72	2.48	2.48
	15	16.476	16.311	16.629	109.84	108.74	110.86	4.56	-1.44
Arginin	2.5	2.856	2.521	2.511	114.22	100.85	100.44	17.07	-8.06
	7.5	8.307	7.443	7.570	110.76	99.24	100.94	19.64	-2.35
	15	15.604	16.335	13.798	104.02	108.90	91.99	6.82	2.72
Hisztamin	2.5	2.245	2.607	2.406	89.82	104.26	96.26	16.35	2.87
	7.5	7.565	6.819	7.145	100.87	90.92	95.26	18.67	9.81
	15	13.466	14.405	13.708	89.77	96.03	91.39	-2.91	1.54
Glicin	2.5	2.406	2.742	2.669	96.25	109.67	106.76	6.64	1.49
	7.5	7.584	8.477	8.516	101.12	113.03	113.54	-4.78	-0.12
	15	14.226	16.146	16.981	94.84	107.64	113.20	-9.54	-6.47
Etanolamin	2.5	2.545	2.721	2.730	101.81	108.84	109.18	11.01	-2.06
	7.5	7.526	8.213	8.206	100.34	109.50	109.41	-2.32	-1.20
	15	13.962	15.479	16.551	93.08	103.19	110.34	-6.62	-9.35
Aszpartát	2.5	2.521	2.586	2.791	100.83	103.46	111.62	2.67	0.21
	7.5	7.896	8.420	8.070	105.28	112.27	107.60	-5.00	-0.03
	15	14.263	14.363	15.855	95.09	95.75	105.70	0.11	-10.98
Metil-amin	2.5	2.657	2.789	2.726	106.28	111.55	109.06	2.47	3.45
	7.5	7.960	8.491	8.329	106.13	113.21	111.05	-4.62	-0.16
	15	14.484	14.583	16.826	96.56	97.22	112.17	0.23	-11.67
Glutamát	2.5	2.761	2.668	2.771	110.43	106.71	110.84	3.01	2.47
	7.5	8.217	8.463	8.268	109.56	112.84	110.24	-6.55	1.67
	15	15.068	14.960	16.780	100.45	99.73	111.87	-3.35	-8.97
Citruillin	2.5	2.665	2.788	2.779	106.61	111.50	111.17	11.58	1.49
	7.5	8.116	8.500	8.597	108.21	113.33	114.63	-0.54	1.12
	15	15.046	16.120	17.031	100.31	107.47	113.54	-5.69	-5.35

4. melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (μmol/l)	Átlag koncentráció (μmol/l)			Visszanyerés %			Mátrix hatás %	
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	Szérum	Könny
Treonin	2.5	2.599	2.666	2.635	103.95	106.65	105.41	9.73	-1.07
	7.5	7.727	8.498	8.399	103.02	113.31	111.99	-4.95	-0.77
	15	14.261	15.809	17.220	95.07	105.40	114.80	-7.48	-9.99
Alanin	2.5	2.679	2.713	2.723	107.17	108.53	108.93	-6.35	1.30
	7.5	7.964	8.171	8.465	106.18	108.95	112.86	-3.67	-1.21
	15	14.501	15.364	17.038	96.67	102.43	113.59	-6.09	-11.37
Etil-amin	2.5	2.613	2.758	2.824	104.50	110.33	112.98	3.77	3.99
	7.5	8.147	8.534	8.441	108.63	113.78	112.55	-2.28	0.90
	15	14.891	14.522	16.989	99.28	96.81	113.26	3.34	-10.99
Prolin	2.5	2.531	2.803	2.553	101.26	112.11	102.13	1.44	0.58
	7.5	7.666	8.360	8.304	102.21	111.47	110.72	-4.51	-0.31
	15	14.253	15.652	17.046	95.02	104.35	113.64	-7.00	-9.12
Ornitin	2.5	2.704	2.822	2.781	108.15	112.89	111.22	4.54	0.79
	7.5	7.974	8.552	8.541	106.32	114.02	113.88	-5.21	-1.98
	15	14.391	15.039	17.014	95.94	100.26	113.43	-4.00	-12.21
Cisztein	2.5	2.563	2.813	2.633	102.51	112.52	105.32	7.14	0.14
	7.5	7.588	8.306	8.352	101.18	110.75	111.36	-1.59	0.37
	15	14.159	16.201	17.161	94.40	108.00	114.40	-8.48	-7.89
Lizin	2.5	2.787	2.747	2.795	111.50	109.86	111.81	7.76	17.14
	7.5	8.390	8.251	8.411	111.87	110.02	112.14	4.98	15.81
	15	15.160	16.111	16.944	101.07	107.41	112.96	-3.44	5.78
Tirozin	2.5	2.486	2.720	2.640	99.44	108.79	105.61	13.94	12.59
	7.5	7.876	7.684	7.441	105.01	102.45	99.21	13.10	23.25
	15	15.402	15.918	16.000	102.68	106.12	106.67	4.88	15.85
Putreszcín	2.5	2.797	2.824	2.696	111.89	112.97	107.82	8.67	3.27
	7.5	8.365	8.428	8.461	111.53	112.38	112.81	-2.45	-1.02
	15	15.209	14.965	17.139	101.40	99.77	114.26	-2.45	-12.42
Methonin	2.5	2.725	2.810	2.503	109.01	112.38	100.13	15.00	14.97
	7.5	8.172	8.031	8.292	108.96	107.08	110.56	10.38	12.56
	15	15.201	16.930	16.918	101.34	112.87	112.79	-4.34	5.64
Szerotonin	2.5	2.368	2.853	2.481	94.73	114.12	99.22	18.20	-3.14
	7.5	6.714	7.601	7.483	89.52	101.34	99.78	0.99	0.13
	15	12.849	15.170	15.709	85.66	101.13	104.73	-9.76	-7.05
Valin	2.5	2.709	2.810	2.606	108.37	112.39	104.26	9.67	41.86
	7.5	8.367	8.202	8.287	111.55	109.36	110.50	11.20	40.64
	15	15.772	16.835	16.810	105.15	112.23	112.07	2.34	36.26
Kadaverin	2.5	2.785	2.739	2.755	111.39	109.57	110.22	13.49	20.26
	7.5	8.451	8.549	8.354	112.68	113.98	111.39	1.09	19.35
	15	15.358	15.694	17.018	102.39	104.63	113.45	-2.10	9.35

4. melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (µmol/l)	Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Mátrix hatás %	
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	Szérum	Könny
Tiramin	2.5	2.540	2.692	2.699	101.59	107.66	107.94	14.86	-1.77
	7.5	7.675	8.400	7.846	102.33	112.00	104.61	-1.35	-0.01
	15	14.641	16.606	15.790	97.61	110.71	105.27	-8.30	-6.08
Izoleucin	2.5	2.520	2.774	2.817	100.81	110.97	112.67	3.57	0.16
	7.5	7.544	8.267	8.136	100.58	110.23	108.48	-4.96	-1.45
	15	13.820	15.344	16.291	92.13	102.29	108.61	-8.44	-12.37
Leucin	2.5	2.742	2.667	2.750	109.68	106.67	109.99	-2.04	3.61
	7.5	7.732	8.263	8.386	103.09	110.17	111.81	-4.42	0.36
	15	13.865	15.018	16.463	92.43	100.12	109.76	-4.13	-7.91
Fenilalanin	2.5	2.430	2.679	2.740	97.21	107.14	109.59	13.18	-2.49
	7.5	7.471	8.419	8.360	99.61	112.25	111.46	-2.22	-0.30
	15	14.200	16.579	16.972	94.66	110.53	113.15	-9.07	-6.79
Tryptofán	2.5	2.764	2.798	2.725	110.57	111.92	109.01	21.87	0.67
	7.5	8.602	8.300	7.382	114.70	110.66	98.42	14.04	21.59
	15	16.213	16.968	16.953	108.09	113.12	113.02	3.57	6.09
Tryptamin + 2-fenetil-amin	2.5	2.505	2.576	2.495	100.20	103.05	99.79	18.39	-0.57
	7.5	7.393	8.129	7.934	98.57	108.39	105.78	-0.17	0.96
	15	14.028	15.963	16.300	93.52	106.42	108.66	-6.54	-4.92

5.Melléklet: Autosampler stabilitás és fagyasztás-olvasztás ciklus stabilitás

Komponens	QC koncentráció (µmol/l)	Autosampler stabilitás						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció előtt						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció után					
		Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Hisztidin	2.5	1.823	2.348	2.035	72.91	93.94	81.40	1.032	1.666	1.198	41.27	66.64	47.94	1.488	1.592	1.221	59.50	63.69	48.83
	7.5	6.649	7.394	5.806	88.65	98.58	77.41	5.412	4.127	5.307	72.16	55.02	70.76	5.129	5.880	5.198	68.38	78.40	69.31
	15	13.742	13.421	15.011	91.62	89.47	100.08	9.167	10.495	10.741	61.11	69.96	71.61	8.783	10.673	11.118	58.55	71.15	74.12
Aszparagin	2.5	2.341	2.230	2.333	93.66	89.19	93.34	1.716	2.269	2.115	68.62	90.75	84.60	1.905	2.105	2.093	76.20	84.22	83.72
	7.5	6.978	6.763	6.804	93.04	90.17	90.72	6.690	5.780	6.836	89.20	77.06	91.15	5.609	6.050	6.042	74.79	80.67	80.56
	15	13.269	12.835	14.023	88.46	85.57	93.48	11.422	13.521	12.125	76.15	90.14	80.84	9.856	12.536	12.523	65.70	83.57	83.48
Taurin	2.5	2.305	2.675	2.277	92.20	106.98	91.10	1.872	2.650	1.933	74.87	105.99	77.33	2.124	2.435	2.030	84.95	97.41	81.19
	7.5	7.205	7.791	7.313	96.07	103.88	97.50	7.061	6.437	7.456	94.14	85.83	99.41	6.353	7.096	6.737	84.71	94.62	89.82
	15	14.004	13.982	15.754	93.36	93.21	105.02	12.144	14.466	13.148	80.96	96.44	87.65	11.072	13.852	14.245	73.82	92.35	94.97
Szerin	2.5	2.411	2.636	2.169	96.44	105.45	86.78	1.711	2.567	1.853	68.46	102.68	74.11	2.088	2.340	1.867	83.54	93.61	74.69
	7.5	7.249	7.417	7.222	96.65	98.89	96.30	6.845	6.007	7.239	91.26	80.09	96.52	6.033	6.584	6.341	80.45	87.78	84.55
	15	13.858	13.498	15.624	92.39	89.99	104.16	11.632	13.674	12.763	77.55	91.16	85.09	10.038	12.822	13.319	66.92	85.48	88.79
Glutamin	2.5	2.216	1.969	1.916	88.64	78.76	76.65	0.840	1.570	0.858	33.61	62.78	34.31	1.308	1.301	0.884	52.30	52.05	35.38
	7.5	6.771	6.759	4.982	90.28	90.12	66.43	3.620	2.717	3.367	48.27	36.23	44.89	3.678	3.689	3.216	49.04	49.19	42.87
	15	12.631	11.699	13.102	84.20	77.99	87.34	4.702	5.987	6.355	31.35	39.91	42.37	4.481	5.525	5.500	29.88	36.83	36.67
Arginin	2.5	2.961	2.414	2.562	118.43	96.57	102.50	1.099	0.735	0.807	43.97	29.40	32.27	1.819	0.841	1.225	72.74	33.65	49.02
	7.5	8.383	9.009	5.757	111.78	120.12	76.76	3.409	1.809	2.689	45.45	24.12	35.85	4.727	4.890	4.045	63.03	65.20	53.94
	15	15.622	15.817	14.780	104.15	105.45	98.53	4.552	4.544	5.149	30.35	30.30	34.33	6.755	7.787	7.317	45.03	51.91	48.78
Hisztamin	2.5	2.373	2.852	2.324	94.90	114.09	92.97	1.173	1.903	1.502	46.91	76.11	60.09	1.847	2.116	1.809	73.89	84.64	72.36
	7.5	7.222	7.898	6.495	96.29	105.31	86.60	4.753	4.222	4.721	63.37	56.29	62.95	5.209	6.177	5.431	69.46	82.37	72.42
	15	14.077	13.913	14.693	93.84	92.76	97.95	7.795	9.149	8.348	51.96	60.99	55.66	8.783	10.946	10.875	58.56	72.97	72.50
Glicin	2.5	2.265	2.755	2.221	90.58	110.19	88.83	1.593	2.624	2.015	63.73	104.96	80.61	1.952	2.419	2.003	78.09	96.78	80.14
	7.5	7.268	7.801	7.393	96.91	104.01	98.58	6.850	6.176	7.337	91.34	82.35	97.82	5.904	6.765	6.549	78.72	90.20	87.32
	15	14.094	14.014	16.005	93.96	93.43	106.70	11.744	14.156	12.998	78.30	94.38	86.65	10.174	13.626	13.878	67.83	90.84	92.52
Etanolamin	2.5	2.412	2.635	2.322	96.47	105.39	92.86	1.669	2.490	1.953	66.77	99.61	78.10	2.057	2.340	1.999	82.29	93.62	79.98
	7.5	7.503	7.662	7.529	100.04	102.16	100.38	7.158	6.252	7.506	95.44	83.36	100.08	6.180	6.846	6.449	82.40	91.28	85.98
	15	14.294	13.968	15.972	95.29	93.12	106.48	12.184	14.295	13.096	81.23	95.30	87.31	10.351	13.465	13.700	69.01	89.77	91.33
Aszpartát	2.5	2.562	2.297	2.498	102.48	91.87	99.94	1.351	2.176	2.185	54.05	87.06	87.39	1.789	1.979	1.977	71.56	79.16	79.07
	7.5	8.147	7.320	7.598	108.62	97.59	101.30	7.310	6.140	7.489	97.47	81.87	99.85	6.178	6.264	6.026	82.38	83.53	80.35
	15	15.197	14.467	15.601	101.31	96.45	104.00	12.733	14.849	13.198	84.89	98.99	87.99	10.258	13.602	12.902	68.38	90.68	86.01

5.Melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (µmol/l)	Autosampler stabilitás						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció előtt						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció után					
		Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Metil-amin	2.5	2.536	2.327	2.277	101.43	93.09	91.09	1.427	2.371	1.943	57.07	94.84	77.73	1.807	2.046	1.850	72.29	81.82	73.99
	7.5	8.009	7.283	7.518	106.78	97.10	100.24	7.276	6.091	7.313	97.01	81.22	97.51	5.480	6.005	5.821	73.07	80.07	77.62
	15	15.033	14.434	16.073	100.22	96.22	107.15	12.376	14.843	13.671	82.50	98.95	91.14	9.580	13.405	12.924	63.87	89.37	86.16
Glutamát	2.5	2.709	2.323	2.445	108.36	92.94	97.79	1.682	2.222	2.048	67.27	88.88	81.94	2.043	2.010	2.080	81.73	80.38	83.19
	7.5	8.177	7.227	7.572	109.03	96.37	100.96	7.103	5.561	7.145	94.70	74.15	95.27	6.172	6.115	6.206	82.29	81.54	82.74
	15	15.279	13.889	15.938	101.86	92.59	106.25	11.922	13.235	12.644	79.48	88.23	84.30	10.097	12.609	12.915	67.31	84.06	86.10
Citrullin	2.5	2.491	2.731	2.489	99.65	109.23	99.54	1.705	2.490	2.022	68.22	99.59	80.90	2.143	2.395	2.156	85.73	95.78	86.24
	7.5	7.475	7.649	7.493	99.67	101.99	99.90	6.728	5.792	7.093	89.71	77.22	94.57	6.260	6.703	6.586	83.46	89.37	87.82
	15	14.263	13.816	15.795	95.09	92.11	105.30	11.440	13.123	12.200	76.27	87.49	81.33	10.399	12.933	13.525	69.33	86.22	90.16
Treonin	2.5	2.427	2.559	2.166	97.09	102.37	86.63	1.755	2.502	1.977	70.20	100.09	79.09	2.046	2.353	1.904	81.82	94.11	76.15
	7.5	7.695	7.534	7.307	102.60	100.46	97.42	7.354	6.145	7.614	98.06	81.93	101.51	6.422	6.824	6.940	85.62	90.99	92.53
	15	15.022	14.577	16.858	100.14	97.18	112.39	12.913	14.801	14.078	86.09	98.67	93.85	10.388	13.591	14.411	69.25	90.61	96.08
Alanin	2.5	2.448	2.199	2.233	97.93	87.96	89.34	1.757	2.322	2.037	70.29	92.87	81.47	1.941	1.970	1.937	77.65	78.81	77.50
	7.5	7.437	6.742	6.930	99.16	89.90	92.40	7.388	6.235	7.641	98.51	83.13	101.88	5.580	5.888	5.763	74.40	78.50	76.84
	15	14.609	13.280	14.566	97.40	88.53	97.11	11.845	14.560	13.153	78.97	97.07	87.68	9.256	12.600	12.183	61.70	84.00	81.22
Etil-amin	2.5	2.501	2.266	2.321	100.05	90.63	92.82	1.352	2.242	1.914	54.08	89.69	76.55	1.622	1.959	1.880	64.87	78.37	75.21
	7.5	7.848	7.078	7.661	104.64	94.37	102.14	6.614	5.949	6.695	88.19	79.33	89.27	4.996	5.929	5.585	66.61	79.05	74.47
	15	14.355	14.067	15.626	95.70	93.78	104.17	11.303	14.350	12.970	75.36	95.67	86.47	9.531	13.350	11.802	63.54	89.00	78.68
Prolin	2.5	2.379	2.512	2.194	95.18	100.47	87.75	1.736	2.519	1.906	69.44	100.77	76.23	2.000	2.296	1.890	80.00	91.84	75.60
	7.5	7.356	7.311	7.513	98.07	97.48	100.17	7.190	6.149	7.250	95.87	81.98	96.67	6.153	6.747	6.276	82.04	89.96	83.67
	15	14.129	13.462	15.573	94.19	89.75	103.82	11.650	13.722	13.361	77.67	91.48	89.07	9.966	13.296	13.745	66.44	88.64	91.63
Ornitin	2.5	2.578	2.295	2.161	103.11	91.82	86.44	1.626	2.529	2.097	65.06	101.17	83.88	1.852	2.090	1.900	74.08	83.60	75.99
	7.5	7.172	6.715	7.025	95.62	89.53	93.66	7.425	6.218	7.676	99.00	82.91	102.35	5.449	5.984	5.631	72.66	79.79	75.08
	15	14.885	12.820	14.914	99.23	85.47	99.43	12.749	14.557	13.313	84.99	97.05	88.75	9.490	12.342	12.245	63.27	82.28	81.63
Cisztein	2.5	2.254	2.528	2.162	90.18	101.13	86.47	1.727	2.512	1.922	69.08	100.46	76.87	1.978	2.312	1.862	79.12	92.48	74.49
	7.5	6.727	7.223	6.984	89.70	96.31	93.12	6.593	5.883	7.151	87.91	78.44	95.35	5.964	6.642	6.468	79.51	88.56	86.24
	15	13.279	13.113	15.389	88.53	87.42	102.59	11.412	13.582	12.289	76.08	90.54	81.93	10.331	12.866	13.747	68.87	85.77	91.65
Lizin	2.5	2.471	2.289	2.551	98.85	91.57	102.04	1.412	2.225	2.144	56.47	89.00	85.76	1.836	2.107	2.248	73.43	84.28	89.91
	7.5	7.500	6.920	8.062	100.00	92.26	107.50	6.525	6.818	7.628	86.99	90.91	101.71	5.545	6.000	6.523	73.93	80.00	86.98
	15	13.918	13.523	16.986	92.79	90.15	113.24	10.951	10.278	13.432	73.00	68.52	89.54	9.241	12.745	13.947	61.61	84.97	92.98

5.Melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (µmol/l)	Autosampler stabilitás						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció előtt						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció után					
		Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Tirozin	2.5	2.370	2.777	2.773	94.80	111.09	110.90	1.734	2.381	2.140	69.38	95.26	85.60	2.244	2.571	2.560	89.78	102.84	102.38
	7.5	7.028	7.702	8.288	93.70	102.70	110.51	6.067	5.699	7.301	80.89	75.98	97.34	6.390	7.295	7.764	85.21	97.27	103.51
	15	13.609	13.678	17.362	90.73	91.19	115.75	10.698	12.325	12.661	71.32	82.17	84.40	11.534	14.061	16.215	76.89	93.74	108.10
Putreszcin	2.5	2.606	2.502	2.203	104.24	100.06	88.13	1.563	2.445	1.881	62.52	97.82	75.23	1.876	2.195	1.841	75.04	87.81	73.63
	7.5	8.040	7.354	7.299	107.21	98.05	97.32	6.965	5.623	6.763	92.87	74.97	90.17	5.596	6.048	5.510	74.61	80.64	73.46
	15	15.234	13.963	15.613	101.56	93.08	104.09	11.694	13.300	11.619	77.96	88.67	77.46	9.336	12.522	11.927	62.24	83.48	79.51
Metionin	2.5	2.373	2.615	2.367	94.93	104.58	94.66	1.736	2.493	1.979	69.45	99.73	79.15	2.104	2.395	2.090	84.17	95.80	83.60
	7.5	7.033	7.447	7.622	93.77	99.30	101.63	6.550	5.918	7.421	87.33	78.91	98.94	6.125	6.821	6.941	81.66	90.95	92.55
	15	13.523	13.480	16.312	90.15	89.87	108.75	11.231	13.286	12.896	74.88	88.57	85.98	10.539	13.324	14.710	70.26	88.83	98.07
Szerotonin	2.5	2.282	2.942	2.202	91.29	117.66	88.06	1.999	2.867	1.952	79.95	114.70	78.07	2.339	2.798	2.141	93.57	111.94	85.65
	7.5	6.268	7.529	7.002	83.57	100.38	93.36	6.273	6.339	7.028	83.64	84.52	93.71	6.087	7.239	6.854	81.16	96.52	91.39
	15	12.617	13.049	15.631	84.11	86.99	104.20	10.941	13.283	12.421	72.94	88.56	82.80	11.125	13.759	14.890	74.16	91.73	99.27
Valin	2.5	2.341	2.548	3.494	93.65	101.92	139.75	1.032	1.472	1.794	41.30	58.88	71.77	2.036	2.384	3.262	81.42	95.34	130.49
	7.5	7.048	7.431	10.742	93.97	99.08	143.23	4.041	3.411	6.157	53.88	45.48	82.10	6.028	6.863	9.835	80.38	91.51	131.14
	15	13.460	13.741	22.687	89.73	91.61	151.25	6.917	7.712	10.567	46.11	51.41	70.45	10.170	13.698	20.540	67.80	91.32	136.93
Kadaverin	2.5	2.606	2.448	2.653	104.22	97.92	106.12	1.162	1.912	1.807	46.47	76.47	72.27	1.856	2.228	2.341	74.25	89.13	93.63
	7.5	7.759	7.081	8.469	103.45	94.41	112.92	5.567	4.365	6.374	74.22	58.20	84.99	5.506	6.027	6.666	73.42	80.35	88.88
	15	14.371	13.668	17.923	95.80	91.12	119.48	9.318	10.582	11.279	62.12	70.54	75.20	9.336	12.717	14.463	62.24	84.78	96.42
Tiramin	2.5	2.488	2.849	2.481	99.51	113.96	99.24	2.038	2.798	2.232	81.53	111.94	89.27	2.321	2.573	2.297	92.83	102.92	91.88
	7.5	7.290	7.823	7.165	97.21	104.31	95.53	7.384	6.835	7.422	98.45	91.13	98.96	6.420	7.194	6.549	85.60	95.92	87.32
	15	14.080	13.945	14.864	93.87	92.97	99.09	12.894	15.058	12.811	85.96	100.39	85.41	11.569	14.046	13.696	77.13	93.64	91.31
Izoleucin	2.5	2.450	2.555	2.515	98.00	102.22	100.61	1.741	2.539	2.228	69.65	101.55	89.12	2.064	2.329	2.277	82.56	93.15	91.07
	7.5	7.323	7.328	7.233	97.64	97.71	96.43	6.934	6.052	7.243	92.45	80.69	96.58	6.033	6.569	6.380	80.44	87.59	85.07
	15	13.988	13.535	15.040	93.25	90.23	100.27	11.810	13.874	12.391	78.73	92.49	82.61	10.241	13.137	13.119	68.28	87.58	87.46
Leucin	2.5	2.741	2.304	2.440	109.63	92.15	97.59	1.729	1.842	1.573	69.14	73.68	62.92	2.152	2.062	2.199	86.07	82.47	87.96
	7.5	7.836	7.350	7.643	104.48	98.00	101.91	5.868	5.441	4.944	78.24	72.55	65.92	6.110	6.454	6.524	81.46	86.05	86.99
	15	14.139	13.887	15.464	94.26	92.58	103.09	10.761	13.926	9.664	71.74	92.84	64.43	10.175	13.338	13.661	67.83	88.92	91.07
Fenilalanin	2.5	2.281	2.722	2.418	91.23	108.90	96.71	1.834	2.588	2.111	73.38	103.51	84.45	2.200	2.505	2.281	87.99	100.20	91.25
	7.5	6.803	7.503	7.284	90.71	100.04	97.12	6.663	6.272	7.316	88.85	83.62	97.55	6.262	7.067	6.912	83.49	94.23	92.16
	15	13.196	13.355	15.302	87.97	89.03	102.01	11.704	13.837	12.780	78.02	92.25	85.20	11.282	13.699	14.505	75.21	91.33	96.70

5.Melléklet folytatás

Komponens	QC koncentráció (µmol/l)	Autosampler stabilitás						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció előtt						Fagyasztás-olvasztás ciklus derivatizáció után					
		Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %			Átlag koncentráció (µmol/l)			Visszanyerés %		
		MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny	MQ	Szérum	Könny
Tryptofán	2.5	2.421	2.803	2.223	96.85	112.12	88.91	2.068	2.730	1.917	82.70	109.19	76.69	2.254	2.631	2.100	90.16	105.24	84.00
	7.5	6.620	7.305	6.798	88.27	97.40	90.64	6.425	6.366	6.810	85.67	84.88	90.81	6.124	6.988	6.509	81.65	93.17	86.79
	15	12.550	12.797	14.308	83.67	85.31	95.39	11.212	13.435	12.037	74.75	89.57	80.24	11.131	13.364	13.890	74.20	89.09	92.60
Tryptamin + 2-fenetil-amin	2.5	2.194	2.546	1.996	87.76	101.83	79.85	1.779	2.468	1.711	71.14	98.71	68.46	2.036	2.323	1.837	81.43	92.94	73.49
	7.5	6.240	6.832	6.394	83.21	91.10	85.26	6.121	5.832	6.436	81.62	77.76	85.81	5.566	6.366	5.884	74.21	84.88	78.45
	15	13.935	13.956	13.590	92.90	93.04	90.60	10.600	12.620	11.317	70.67	84.13	75.45	11.736	14.321	12.724	78.24	95.47	84.82

13. Irodalomjegyzék

1. Veronika, Á.; Gergő, Á. *Orvosi biokémia: egyetemi tankönyv*; Negy, átdolgozott kiadás.; Semmelweis Kiadó: Budapest, 2016; ISBN 9789633314005.
2. Furka, A. *Szerves Kémia*; 1988; ISBN 963 18 1258 8.
3. Cox, M.; Nelson, D. *Lehninger Principles of Biochemistry*; 2000; Vol. 5; ISBN 978-3-662-08290-4.
4. Ogawa, S.; Fujii, T.; Koga, N.; Hori, H.; Teraishi, T.; Hattori, K.; Noda, T.; Higuchi, T.; Motohashi, N.; Kunugi, H. Plasma L-Tryptophan Concentration in Major Depressive Disorder: New Data and Meta-Analysis. *J Clin Psychiatry* **2014**, *75*, 14646, doi:10.4088/JCP.13r08908.
5. Song, Y.; Xu, C.; Kuroki, H.; Liao, Y.; Tsunoda, M. Recent Trends in Analytical Methods for the Determination of Amino Acids in Biological Samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *147*, 35–49, doi:10.1016/j.jpba.2017.08.050.
6. Zhang, J.; Pavlova, N.N.; Thompson, C.B. Cancer Cell Metabolism: The Essential Role of the Nonessential Amino Acid, Glutamine. *The EMBO Journal* **2017**, *36*, 1302–1315, doi:10.15252/embj.201696151.
7. Han, X.; Xiao, H.; Liu, Q.; Zhang, L.; Yang, Q.; Zhao, N.; Huang, Y.; Zhang, D. Determination of Plasma Amino Acid Biomarkers by High Performance Liquid Chromatography for Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Analytical Letters* **2013**, *46*, 2813–2827, doi:10.1080/00032719.2013.814055.
8. Jutel, M.; Akdis, M.; Akdis, C.A. Histamine, Histamine Receptors and Their Role in Immune Pathology. *Clinical & Experimental Allergy* **2009**, *39*, 1786–1800, doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x.
9. Gainetdinov, R.R.; Hoener, M.C.; Berry, M.D. Trace Amines and Their Receptors. *Pharmacol Rev* **2018**, *70*, 549–620, doi:10.1124/pr.117.015305.
10. Pegg, A.E. Functions of Polyamines in Mammals*. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, 14904–14912, doi:10.1074/jbc.R116.731661.
11. Van den Eynde, V. The Trace Amine Theory of Spontaneous Hypertension as Induced by Classic Monoamine Oxidase Inhibitors. *J Neural Transm* **2021**, *128*, 1741–1756, doi:10.1007/s00702-021-02399-9.
12. Fiori, L.M.; Turecki, G. Implication of the Polyamine System in Mental Disorders. *J Psychiatry Neurosci* **2008**, *33*, 102–110.
13. Li, J.; Meng, Y.; Wu, X.; Sun, Y. Polyamines and Related Signaling Pathways in Cancer. *Cancer Cell International* **2020**, *20*, 539, doi:10.1186/s12935-020-01545-9.
14. Ninomiya, T.; Kanzaki, N.; Hirakawa, Y.; Yoshinari, M.; Higashioka, M.; Honda, T.; Shibata, M.; Sakata, S.; Yoshida, D.; Teramoto, T.; et al. Serum Ethylamine Levels as an Indicator of L-Theanine Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes in a General Japanese Population: The Hisayama Study. *Diabetes Care* **2019**, *42*, 1234–1240, doi:10.2337/dc18-2655.
15. Mitchell, S.C.; Zhang, A.Q. Methylamine in Human Urine. *Clinica Chimica Acta* **2001**, *312*, 107–114, doi:10.1016/S0009-8981(01)00608-8.
16. Zorn, B.F. [On the incidence of volatile biogenic amines in the blood of pregnant women, parturients and puerperae in normal and pathological pregnancies]. *Arch Gynakol* **1960**, *194*, 178–182, doi:10.1007/BF00668951.
17. Patel, D.; Witt, S.N. Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, *2017*, 4829180, doi:10.1155/2017/4829180.
18. Saldanha, D.; Kumar, N.; Ryali, V.; Srivastava, K.; Pawar, A. Serum Serotonin Abnormality in Depression. *Medical Journal Armed Forces India* **2009**, *65*, 108–112, doi:10.1016/S0377-1237(09)80120-2.

19. Serotonin as a New Therapeutic Target for Diabetes Mellitus and Obesity Available online: <https://e-dmj.org/journal/view.php?doi=10.4093/dmj.2016.40.2.89> (accessed on 18 September 2024).
20. Meussen, B.; Zeeland, A.; Bruins, M.; Sanders, J. A Fast and Accurate UPLC Method for Analysis of Proteinogenic Amino Acids. *Food Analytical Methods* **2013**, *7*, doi:10.1007/s12161-013-9712-7.
21. Stragierowicz, J.; Daragó, A.; Brzeźnicki, S.; Kilanowicz, A. Optimization of Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) with Fluorescence Detector (FLD) Method for the Quantitative Determination of Selected Neurotransmitters in Rat Brain. *Med Pr* **2017**, *68*, 583–591, doi:10.13075/mp.5893.00622.
22. Boogers, I.; Plugge, W.; Stokkermans, Y.Q.; Duchateau, A.L.L. Ultra-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids in Protein Hydrolysates Using an Automated Pre-Column Derivatisation Method. *J Chromatogr A* **2008**, *1189*, 406–409, doi:10.1016/j.chroma.2007.11.052.
23. Xu, W.; Zhong, C.; Zou, C.; Wang, B.; Zhang, N. Analytical Methods for Amino Acid Determination in Organisms. *Amino Acids* **2020**, *52*, 1071–1088, doi:10.1007/s00726-020-02884-7.
24. Farouk, H.; Ebrahim, H.; Sonbol, H.; Malak, M.; Kamal, M.; Ibrahim, N.; Shawky, A.; Zarad, W.; Emad, A.; Emara, S. Sensitivity Enhancement for Separation-Based Analytical Techniques Utilizing Solid-Phase Enrichment Approaches and Analyte Derivatization for Trace Analysis in Various Matrices. *Separations* **2023**, *10*, 351, doi:10.3390/separations10060351.
25. Armenta, J.M.; Cortes, D.F.; Pisciotta, J.M.; Shuman, J.L.; Blakeslee, K.; Rasoloson, D.; Ogunbiyi, O.; Sullivan, D.J.; Shulaev, V. Sensitive and Rapid Method for Amino Acid Quantitation in Malaria Biological Samples Using AccQ.Tag Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-MS/MS with Multiple Reaction Monitoring. *Anal Chem* **2010**, *82*, 548–558, doi:10.1021/ac901790q.
26. Metz, T.O.; Zhang, Q.; Page, J.S.; Shen, Y.; Callister, S.J.; Jacobs, J.M.; Smith, R.D. The Future of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) in Metabolic Profiling and Metabolomic Studies for Biomarker Discovery. *Biomark Med* **2007**, *1*, 159–185, doi:10.2217/17520363.1.1.159.
27. Plumb, R.S.; Johnson, K.A.; Rainville, P.; Smith, B.W.; Wilson, I.D.; Castro-Perez, J.M.; Nicholson, J.K. UPLC/MS(E); a New Approach for Generating Molecular Fragment Information for Biomarker Structure Elucidation. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 1989–1994, doi:10.1002/rcm.2550.
28. Armenta, J.M.; Cortes, D.F.; Pisciotta, J.M.; Shuman, J.L.; Blakeslee, K.; Rasoloson, D.; Ogunbiyi, O.; Sullivan, D.J.Jr.; Shulaev, V. Sensitive and Rapid Method for Amino Acid Quantitation in Malaria Biological Samples Using AccQ•Tag Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-MS/MS with Multiple Reaction Monitoring. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 548–558, doi:10.1021/ac901790q.
29. Cohen, S.A. Amino Acid Analysis Using Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate. In *Amino Acid Analysis Protocols*; Cooper, C., Packer, N., Williams, K., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2000; pp. 39–47 ISBN 978-1-59259-047-6.
30. Pape, S.; Schramm, C.; Gevers, T.J. Clinical Management of Autoimmune Hepatitis. *United European Gastroenterol J* **2019**, *7*, 1156–1163, doi:10.1177/2050640619872408.
31. Linzay, C.D.; Sharma, B.; Pandit, S. Autoimmune Hepatitis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
32. KASL Clinical Practice Guidelines for Management of Autoimmune Hepatitis 2022. *Clin Mol Hepatol* **2023**, *29*, 542–592, doi:10.3350/cmh.2023.0087.
33. Yarur, A.J.; Abreu, M.T.; Deshpande, A.R.; Kerman, D.H.; Sussman, D.A. Therapeutic Drug Monitoring in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology* **2014**, *20*, 3475–3484, doi:10.3748/wjg.v20.i13.3475.

34. Udomkarnjananun, S.; Francke, M.I.; De Winter, B.C.M.; Mulder, M.B.; Baan, C.C.; Metselaar, H.J.; den Hoed, C.M.; Hesselink, D.A. Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs in Hepatology and Gastroenterology. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2021**, *54–55*, 101756, doi:10.1016/j.bpg.2021.101756.
35. Cangemi, G.; Barabino, A.; Barco, S.; Parodi, A.; Arrigo, S.; Melioli, G. A Validated HPLC Method for the Monitoring of Thiopurine Metabolites in Whole Blood in Paediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2012**, *25*, 435–444, doi:10.1177/039463201202500213.
36. Yu, H.; Li, D.; Xiang, D.; Li, X.; Liu, L.; Liu, D.; Gong, X. Development and Validation of a Novel HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Azathioprine Metabolites in Human Red Blood Cells. *Heliyon* **2023**, *9*, e13870, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13870.
37. Lee, Y.J.; Choi, W.Y.; Park, K.S.; Kim, Y.J.; Cho, K.B.; Kim, E.S.; Jang, B.K.; Chung, W.J.; Hwang, J.S. Differences in the Adverse Effects of Azathioprine between Inflammatory Bowel Disease and Autoimmune Hepatitis in Korean Patients. *Korean J Gastroenterol* **2014**, *64*, 348–355, doi:10.4166/kjg.2014.64.6.348.
38. Colombel, J.-F.; Sandborn, W.J.; Rutgeerts, P.; Enns, R.; Hanauer, S.B.; Panaccione, R.; Schreiber, S.; Byczkowski, D.; Li, J.; Kent, J.D.; et al. Adalimumab for Maintenance of Clinical Response and Remission in Patients with Crohn's Disease: The CHARM Trial. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 52–65, doi:10.1053/j.gastro.2006.11.041.
39. Patel, S.; Yarur, A.J. A Review of Therapeutic Drug Monitoring in Patients with Inflammatory Bowel Disease Receiving Combination Therapy. *J Clin Med* **2023**, *12*, 6577, doi:10.3390/jcm12206577.
40. Jenő, F.; Róbert, K.; Szabolcs, F. *Modern folyadékkromatográfia*; KromKorm Kft: Budapest, 2017; ISBN 9789631281712.
41. Csősz, É.; Darula, Z.; Drahos, L.; Emri, M.; Hunyadi-Gulyás, É.; Janáky, T.; Juhász, G.; Kalló, G.; Kékesi, K.A.; Klement, É.; et al. *Bevezetés a proteomikába: a fehérjék korszerű vizsgálata*; Semmelweis Egyetem, 2023; ISBN 978-963-331-600-9.
42. Berta, A. Collection of Tear Samples with or without Stimulation. *American Journal of Ophthalmology* **1983**, *96*, 115–116, doi:10.1016/0002-9394(83)90473-7.
43. Csősz, É.; Tóth, N.; Deák, E.; Csutak, A.; Tózsér, J. Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients Following Glaucoma Surgery. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 4096, doi:10.3390/ijms19124096.
44. Adams, K.J.; Pratt, B.; Bose, N.; Dubois, L.G.; St John-Williams, L.; Perrott, K.M.; Ky, K.; Kapahi, P.; Sharma, V.; MacCoss, M.J.; et al. Skyline for Small Molecules: A Unifying Software Package for Quantitative Metabolomics. *J Proteome Res* **2020**, *19*, 1447–1458, doi:10.1021/acs.jproteome.9b00640.
45. Gray, N.; Zia, R.; King, A.; Patel, V.C.; Wendon, J.; McPhail, M.J.W.; Coen, M.; Plumb, R.S.; Wilson, I.D.; Nicholson, J.K. High-Speed Quantitative UPLC-MS Analysis of Multiple Amines in Human Plasma and Serum via Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate: Application to Acetaminophen-Induced Liver Failure. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 2478–2487, doi:10.1021/acs.analchem.6b04623.
46. Galba, J.; Piešťanský, J.; Kováč, A.; Olešová, D.; Cehlár, O.; Kertys, M.; Kozlík, P.; Chal'ová, P.; Tirčová, B.; Slíž, K.; et al. Fast and Sensitive Screening of Oxandrolone and Its Major Metabolite 17-Epi-Oxandrolone in Human Urine by UHPLC—MS/MS with On-Line SPE Sample Pretreatment. *Molecules* **2021**, *26*, 480, doi:10.3390/molecules26020480.
47. Research, C. for D.E. and Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics> (accessed on 18 September 2024).
48. ICH M10 on Bioanalytical Method Validation - Scientific Guideline | European Medicines Agency Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline> (accessed on 28 May 2024).

49. Miao, Q.; Bai, Y.-J.; Zhang, J.-L.; Li, Y.; Su, Z.-Z.; Yan, L.; Wang, L.-L.; Zou, Y.-G. Highly Sensitive and Rapid Determination of Azathioprine Metabolites in Whole Blood Lysate by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2020**, *1136*, 121802, doi:10.1016/j.jchromb.2019.121802.
50. Lin, R.; Lin, W.; Wang, C.; Dong, J.; Zheng, W.; Zeng, D.; Liu, Y.; Lin, C.; Jiao, Z.; Huang, P. Population Pharmacokinetics of Azathioprine Active Metabolite in Patients with Inflammatory Bowel Disease and Dosage Regimens Optimisation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2021**, *128*, 482–492, doi:10.1111/bcpt.13530.
51. Chrzanowska, M.; Krzymański, M. Determination of 6-Thioguanine and 6-Methylmercaptapurine Metabolites in Renal Transplantation Recipients and Patients with Glomerulonephritis Treated with Azathioprine. *Ther Drug Monit* **1999**, *21*, 231–237, doi:10.1097/00007691-199904000-00015.
52. Lin, R.; Lin, W.; Wang, C.; Dong, J.; Zheng, W.; Zeng, D.; Liu, Y.; Lin, C.; Jiao, Z.; Huang, P. Population Pharmacokinetics of Azathioprine Active Metabolite in Patients with Inflammatory Bowel Disease and Dosage Regimens Optimisation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2021**, *128*, 482–492, doi:10.1111/bcpt.13530.
53. Fernández-Olavarria, A.; Mosquera-Pérez, R.; Díaz-Sánchez, R.-M.; Serrera-Figallo, M.-A.; Gutiérrez-Pérez, J.-L.; Torres-Lagares, D. The Role of Serum Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer: A Systematic Review. *J Clin Exp Dent* **2016**, *8*, e184–e193, doi:10.4317/jced.52736.
54. Mehta, S.; Bhimani, N.; Gill, A.J.; Samra, J.S.; Sahni, S.; Mittal, A. Serum Biomarker Panel for Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Front Oncol* **2021**, *11*, 708963, doi:10.3389/fonc.2021.708963.
55. Waagepetersen, H.S.; Sonnewald, U.; Larsson, O.M.; Schousboe, A. A Possible Role of Alanine for Ammonia Transfer Between Astrocytes and Glutamatergic Neurons. *Journal of Neurochemistry* **2000**, *75*, 471–479, doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750471.x.
56. Chaudhry, F.A.; Reimer, R.J.; Edwards, R.H. The Glutamine Commute : Take the N Line and Transfer to the A. *Journal of Cell Biology* **2002**, *157*, 349–355, doi:10.1083/jcb.200201070.
57. Levitt, D.G.; Levitt, M.D. A Model of Blood-Ammonia Homeostasis Based on a Quantitative Analysis of Nitrogen Metabolism in the Multiple Organs Involved in the Production, Catabolism, and Excretion of Ammonia in Humans. *Clin Exp Gastroenterol* **2018**, *11*, 193–215, doi:10.2147/CEG.S160921.
58. Lustgarten, M.S.; Price, L.L.; Phillips, E.M.; Fielding, R.A. Serum Glycine Is Associated with Regional Body Fat and Insulin Resistance in Functionally-Limited Older Adults. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e84034, doi:10.1371/journal.pone.0084034.
59. Li, X.; Sun, L.; Zhang, W.; Li, H.; Wang, S.; Mu, H.; Zhou, Q.; Zhang, Y.; Tang, Y.; Wang, Y.; et al. Association of Serum Glycine Levels with Metabolic Syndrome in an Elderly Chinese Population. *Nutrition & Metabolism* **2018**, *15*, 89, doi:10.1186/s12986-018-0325-4.
60. Aliu, E.; Kanungo, S.; Arnold, G.L. Amino Acid Disorders. *Annals of Translational Medicine* **2018**, *6*, 471–471, doi:10.21037/atm.2018.12.12.
61. Novarino, G.; El-Fishawy, P.; Kayserili, H.; Meguid, N.A.; Scott, E.M.; Schroth, J.; Silhavy, J.L.; Kara, M.; Khalil, R.O.; Ben-Omran, T.; et al. Mutations in BCKD-Kinase Lead to a Potentially Treatable Form of Autism with Epilepsy. *Science* **2012**, *338*, 394–397, doi:10.1126/science.1224631.
62. Goodenowe, D.B.; Cook, L.L.; Liu, J.; Lu, Y.; Jayasinghe, D.A.; Ahiahonu, P.W.K.; Heath, D.; Yamazaki, Y.; Flax, J.; Krenitsky, K.F.; et al. Peripheral Ethanolamine Plasmalogen Deficiency: A Logical Causative Factor in Alzheimer's Disease and Dementia. *Journal of Lipid Research* **2007**, *48*, 2485–2498, doi:10.1194/jlr.P700023-JLR200.
63. Maeba, R.; Araki, A.; Fujiwara, Y. Serum Ethanolamine Plasmalogen and Urine Myo-Inositol as Cognitive Decline Markers. In *Advances in Clinical Chemistry*; Makowski, G.S., Ed.; Advances in Clinical Chemistry; Elsevier, 2018; Vol. 87, pp. 69–111.

64. Igarashi, K.; Ueda, S.; Yoshida, K.; Kashiwagi, K. Polyamines in Renal Failure. *Amino Acids* **2006**, *31*, 477–483, doi:10.1007/s00726-006-0264-7.
65. Song, J.; Shan, Z.; Mao, J.; Teng, W. Serum Polyamine Metabolic Profile in Autoimmune Thyroid Disease Patients. *Clinical Endocrinology* **2019**, *90*, 727–736, doi:10.1111/cen.13946.
66. Kovács, T.; Mikó, E.; Vida, A.; Sebő, É.; Toth, J.; Csonka, T.; Boratkó, A.; Ujlaki, G.; Lente, G.; Kovács, P.; et al. Cadaverine, a Metabolite of the Microbiome, Reduces Breast Cancer Aggressiveness through Trace Amino Acid Receptors. *Sci Rep* **2019**, *9*, 1300, doi:10.1038/s41598-018-37664-7.
67. Kalló, G.; Emri, M.; Varga, Z.; Ujhelyi, B.; Tőzsér, J.; Csutak, A.; Csősz, É. Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0158000, doi:10.1371/journal.pone.0158000.
68. Csősz, É.; Boross, P.; Csutak, A.; Berta, A.; Tóth, F.; Póliska, S.; Török, Z.; Tőzsér, J. Quantitative Analysis of Proteins in the Tear Fluid of Patients with Diabetic Retinopathy. *Journal of Proteomics* **2012**, *75*, 2196–2204, doi:10.1016/j.jprot.2012.01.019.
69. Li, B.; Sheng, M.; Li, J.; Yan, G.; Lin, A.; Li, M.; Wang, W.; Chen, Y. Tear Proteomic Analysis of Sjögren Syndrome Patients with Dry Eye Syndrome by Two-Dimensional-Nano-Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Sci Rep* **2014**, *4*, 5772, doi:10.1038/srep05772.
70. Wong, T.T.; Zhou, L.; Li, J.; Tong, L.; Zhao, S.Z.; Li, X.R.; Yu, S.J.; Koh, S.K.; Beuerman, R.W. Proteomic Profiling of Inflammatory Signaling Molecules in the Tears of Patients on Chronic Glaucoma Medication. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2011**, *52*, 7385–7391, doi:10.1167/iovs.10-6532.
71. Csősz, É.; Kalló, G.; Márkus, B.; Deák, E.; Csutak, A.; Tőzsér, J. Quantitative Body Fluid Proteomics in Medicine — A Focus on Minimal Invasiveness. *Journal of Proteomics* **2017**, *153*, 30–43, doi:10.1016/j.jprot.2016.08.009.
72. Aluru, S.V.; Agarwal, S.; Srinivasan, B.; Iyer, G.K.; Rajappa, S.M.; Tatu, U.; Padmanabhan, P.; Subramanian, N.; Narayanasamy, A. Lacrima Proline Rich 4 (LPRR4) Protein in the Tear Fluid Is a Potential Biomarker of Dry Eye Syndrome. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e51979, doi:10.1371/journal.pone.0051979.
73. Hagan, S.; Martin, E.; Enríquez-de-Salamanca, A. Tear Fluid Biomarkers in Ocular and Systemic Disease: Potential Use for Predictive, Preventive and Personalised Medicine. *EPMA Journal* **2016**, *7*, 15, doi:10.1186/s13167-016-0065-3.
74. von Thun und Hohenstein-Blaul, N.; Funke, S.; Grus, F.H. Tears as a Source of Biomarkers for Ocular and Systemic Diseases. *Experimental Eye Research* **2013**, *117*, 126–137, doi:10.1016/j.exer.2013.07.015.
75. Karamichos, D.; Zieske, J.D.; Sejersen, H.; Sarker-Nag, A.; Asara, J.M.; Hjortdal, J. Tear Metabolite Changes in Keratoconus. *Experimental Eye Research* **2015**, *132*, 1–8, doi:10.1016/j.exer.2015.01.007.
76. Shrestha, G.S.; Vijay, A.K.; Stapleton, F.; White, A.J.; Pickford, R.; Carnt, N.A. Tear Metabolite Expression in Bacterial Keratitis: Outcomes of an Untargeted Approach. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2021**, *62*, 1948.
77. Jiang, Y.; Yang, C.; Zheng, Y.; Liu, Y.; Chen, Y. A Set of Global Metabolomic Biomarker Candidates to Predict the Risk of Dry Eye Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, doi:10.3389/fcell.2020.00344.
78. ChenZhuo, L.; Murube, J.; Latorre, A.; del Río, R.M. Different Concentrations of Amino Acids in Tears of Normal and Human Dry Eyes. In *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3: Basic Science and Clinical Relevance Part A and B*; Sullivan, D.A., Stern, M.E., Tsubota, K., Dartt, D.A., Sullivan, R.M., Bromberg, B.B., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2002; pp. 617–621 ISBN 978-1-4615-0717-8.
79. Nakatsukasa, M.; Sotozono, C.; Shimbo, K.; Ono, N.; Miyano, H.; Okano, A.; Hamuro, J.; Kinoshita, S. Amino Acid Profiles in Human Tear Fluids Analyzed by High-Performance

- Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *American Journal of Ophthalmology* **2011**, *151*, 799-808.e1, doi:10.1016/j.ajo.2010.11.003.
80. Dubinsky, M.C.; Lamothe, S.; Yang, H.Y.; Targan, S.R.; Sinnett, D.; Théorêt, Y.; Seidman, E.G. Pharmacogenomics and Metabolite Measurement for 6-Mercaptopurine Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2000**, *118*, 705–713, doi:10.1016/s0016-5085(00)70140-5.
 81. Shaye, O.A.; Yadegari, M.; Abreu, M.T.; Poordad, F.; Simon, K.; Martin, P.; Papadakis, K.A.; Ippoliti, A.; Vasilias, E.; Tran, T.T. Hepatotoxicity of 6-Mercaptopurine (6-MP) and Azathioprine (AZA) in Adult IBD Patients. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* **2007**, *102*, 2488.
 82. Lee, M.-N.; Kang, B.; Choi, S.Y.; Kim, M.J.; Woo, S.Y.; Kim, J.-W.; Choe, Y.H.; Lee, S.-Y. Relationship between Azathioprine Dosage, 6-Thioguanine Nucleotide Levels, and Therapeutic Response in Pediatric Patients with IBD Treated with Azathioprine. *Inflamm Bowel Dis* **2015**, *21*, 1054–1062, doi:10.1097/MIB.0000000000000347.
 83. Fernandez-Garcia, J.C.; Delpino-Rius, A.; Samarra, I.; Castellano-Castillo, D.; Muñoz-Garach, A.; Bernal-Lopez, M.R.; Queipo-Ortuño, M.I.; Cardona, F.; Ramos-Molina, B.; Tinahones, F.J. Type 2 Diabetes Is Associated with a Different Pattern of Serum Polyamines: A Case–Control Study from the PREDIMED-Plus Trial. *Journal of Clinical Medicine* **2019**, *8*, 71, doi:10.3390/jcm8010071.
 84. Pini, A.; Obara, I.; Battell, E.; Chazot, P.L.; Rosa, A.C. Histamine in Diabetes: Is It Time to Reconsider? *Pharmacological Research* **2016**, *111*, 316–324, doi:10.1016/j.phrs.2016.06.021.

14. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/55/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Guba Andrea

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Guba, A.**, Kovács, P., Mezei, Z. A., Papp, M., Csősz, É., Kalló, G.: Analysis of Azathioprine Metabolites in Autoimmune Hepatitis Patient Blood-Method Development and Validation. *Int. J. Mol. Sci.* 25 (20), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms252011233>
IF: 4.9 (2023)
2. **Guba, A.**, Bába, O., Tőzsér, J., Csősz, É., Kalló, G.: Fast and Sensitive Quantification of AccQ-Tag Derivatized Amino Acids and Biogenic Amines by UHPLC-UV Analysis from Complex Biological Samples. *Metabolites*. 12 (3), 272, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo12030272>
IF: 4.1

További közlemények

3. Csengő, E., Lőrincz, H., Csősz, É., **Guba, A.**, Kárai, B., Tóth, J., Csiha, S., Paragh, G., Harangi, M., Nagy, G. G.: Newly Initiated Statin Treatment Is Associated with Decreased Plasma Coenzyme Q10 Level After Acute ST-Elevation Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* 26 (1), 1-18, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26010106>
IF: 4.9 (2023)
4. Arianti, R., Vinnai, B. Á., Győry, F., **Guba, A.**, Csősz, É., Kristóf, E., Fésüs, L.: Availability of abundant thiamine determines efficiency of thermogenic activation in human neck area derived adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 119, 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109385>
IF: 4.8





5. Nokhoijav, E., **Guba, A.**, Vadadokhau, U., Tözsér, J., Győri, Z., Kalló, G., Csősz, É.: Comparative Analysis of Amino Acid and Biogenic Amine Compositions of Fermented Grape Beverages. *Metabolites*. 13 (8), 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo13080892>
IF: 3.4
6. Vámos, A., Arianti, R., Vinnai, B. Á., Alrifai, R., Shaw, A., Póliska, S., **Guba, A.**, Csősz, É., Csomós, I., Mocsár, G., Lányi, C., Balajthy, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: Human Abdominal Subcutaneous-Derived Active Beige Adipocytes Carrying FTO rs1421085 Obesity-Risk Alleles Exert Lower Thermogenic Capacity. *Front. Cell. Dev. Biol.* 11, 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2023.1155673>
IF: 4.6
7. Nokhoijav, E., **Guba, A.**, Kumar, A., Kunkli, B., Kalló, G., Káplár, M., Somodi, S., Garai, I., Csutak, A., Tóth, N., Emri, M., Tözsér, J., Csősz, É.: Metabolomic Analysis of Serum and Tear Samples from Patients with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23094534>
IF: 5.6

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 32,3

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.14.

