

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**LC-HRMS analýza vybraných léčiv
v biologickém materiálu II.**

Kristýna Švarcová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martin Mžik, Ph.D.

Hradec Králové 2020

„Prohlašuji, že je tato diplomová práce mým autorským dílem. Veškeré informační zdroje a literatura, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

Hradec Králové, 2020

Kristýna Švarcová

Mé velké poděkování patří RNDr. Martinu Mžikovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, čas a trpělivost při zpracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a literaturu. Další poděkování patří PharmDr. Vítu Šestákovi, Ph.D., který mě svými přednáškami přivedl k této práci.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou při celém studiu.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu SVV 260 547.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Kristýna Švarcová

Konzultant: RNDr. Martin Mžik, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Název diplomové práce: LC-HRMS analýza vybraných léčiv v biologickém materiálu II.

Úzkostné poruchy za život postihnou až 25 % populace, celoživotní prevalence je 13,6 %. Nespavost za život postihuje nejméně třetinu populace, prevalence je 15-40 %. Léčiva užívaná k léčbě úzkostí a nespavosti snadno pronikají přes hematoencefalickou bariéru a ovlivňují CNS. Je tedy nezbytné určit správné dávkovací schéma a monitorovat léčbu. Výsledkem je optimalizace léčby, snížení nežádoucích účinků a zvýšení adherence pacienta k léčbě. Také je potřebná rychlá kvalitativní a kvantitativní analýza pro akutní případy intoxikace.

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací extrakční metody pro vybrané benzodiazepiny (alprazolam, bromazepam, diazepam, chlordiazepoxid, klonazepam, midazolam, oxazepam) a zolpidem v lidském séru. Následně byla provedena validace celé analytické metody pro použití v klinické praxi s využitím UHPLC-HRMS. Nejvhodnější úpravou vzorku před analýzou byla proteinová precipitace pomocí acetonitrilu, bylo dosaženo velmi dobré výtěžnosti a opakovatelnosti. Kvantitativní stanovení bylo prováděno metodou vnitřního standardu. Nejvhodnější vnitřní standard byl diazepam-d₅. Validace celé analytické metody byla provedena podle směrnice Evropské lékové agentury. Hodnocené validační parametry splnily požadovaná kritéria. Také bylo úspěšně provedeno externí hodnocení kvality benzodiazepinů a zolpidemu. Metoda byla úspěšně zavedena do klinické praxe.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Kristýna Švarcová

Consultant: RNDr. Martin Mžik, Ph.D.

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Title: LC-HRMS analysis of selected drugs in biological material II.

Anxiety disorders affect up to 25 % of the population in their life, the lifetime prevalence is 13,6 %. Insomnia affect at least one third of the population in their life, the prevalence is 15-40 %. Drugs used to treat anxiety and insomnia easily cross the blood-brain barrier and affect the CNS. It is therefore necessary to determine the correct dosing schedule and monitor treatment. The result is optimization of treatment, reduction of side effects and increased patient adherence to treatment. The rapid qualitative and quantitative analysis for urgent cases of intoxication is also needed.

This diploma thesis deals with development and optimization of an extraction method for selected benzodiazepines (alprazolam, bromazepam, diazepam, chlordiazepoxide, clonazepam, midazolam, oxazepam) and zolpidem in human serum. Subsequently, the whole analytical method was validated for use in clinical practice using the UHPLC-HRMS. Protein precipitation with acetonitrile was the most suitable sample preparation before analysis, very good recovery and repeatability were achieved. Quantitative determination was performed by the internal standard method. Diazepam-d₅ was the most suitable internal standard. The validation of the whole analytical method was performed according to the European Medicines Agency directive. The evaluated validation parameters met the required criteria. An external evaluation of the quality of benzodiazepines and zolpidem was also successfully performed. The method has been successfully introduced into the clinical practice.

Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BZDZ	benzodiazepiny
BZDZ-IS	směsný roztok vnitřních standardů pro benzodiazepiny
CV	variační koeficient
CRM	certifikovaný referenční materiál
DCM	dichlormethan
EHK	externí hodnocení kvality
EMA	European Medicines Agency/Evropská léková agentura
ESI	ionizace elektrosprejem
EtAC	ethylacetát
FDA	Food and Drug Administration/Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GABA	γ -aminomáselná kyselina
HEB	hematoencefalická bariéra
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICH	International Council on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use/Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků pro léčiva pro humánní užití
IEX	iontově výměnná chromatografie
IPC	iontově párová chromatografie
IS	vnitřní standard
IT	3D iontová past
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LIT	lineární iontová past
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LLOQ	spodní limit kvantifikace
ME	matricové efekty
MeOH	methanol

MEPS	mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím stříkačky
MF	matriční faktor
MRM	záznam více probíhajících reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MTBE	methyl-terc-butyléter
NP-HPLC	kapalinová chromatografie na normální fázi
PP	proteinová precipitace
PP zkumavky	polypropylenové zkumavky
Q	kvadrupól
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
RE	recovery/výtěžnost
RP-HPLC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RP-SPE	extrakce na pevné reverzní fázi
SALLE	vysolovací extrakce z kapaliny do kapaliny
SAX	silný anex
SCX	silný katex
SD	směrodatná odchylka
SEC	vylučovací chromatografie
SIM	selektivní záznam iontu
SLE	extrakce z kapaliny do kapaliny s pevným podkladem
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi
SRM	záznam vybraných reakcí
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC-HRMS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením
ULOQ	horní limit kvantifikace
WAX	slabý anex
WCX	slabý katex

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract	5
Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	11
2.1. Benzodiazepiny a Z-drugs.....	11
2.2. Úprava biologického materiálu před chromatografickou analýzou	14
2.2.1. Proteinová precipitace.....	14
2.2.2. Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	15
2.2.3. Extrakce na pevné fázi	17
2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	19
2.3.1. HPLC systém	19
2.3.2. Separační proces	20
2.3.3. Základní chromatografické parametry.....	22
2.3.4. UHPLC	23
2.4. Hmotnostní spektrometrie	23
2.4.1. Instrumentace MS	23
2.4.2. Skenovací módy	28
2.5. Validace bioanalytické metody.....	29
2.5.1. Selektivita (Selectivity).....	29
2.5.2. Přenos analytů (Carry-Over)	29
2.5.3. Spodní limit kvantifikace (LLOQ, Lower Limit of Quantification).....	30
2.5.4. Kalibrační křivka (Calibration Curve)	30
2.5.5. Přesnost (Accuracy).....	30
2.5.6. Preciznost (Precision).....	30
2.5.7. Diluční integrita (Dilution Integrity)	31
2.5.8. Matricové efekty (Matrix Effect) a Výtěžnost (Recovery).....	31
2.5.9. Stabilita (Stability).....	31
3. Cíle práce	32
4. Experimentální část.....	33
4.1. Přístroje, pomůcky a chemikálie	33

4.1.1.	Přístroje a pomůcky	33
4.1.2.	Chemikálie.....	33
4.2.	Pracovní postupy.....	34
4.2.1.	Příprava roztoků	34
4.2.2.	Vývoj extrakční metody	37
4.2.3.	Validace	38
4.3.	UHPLC-HRMS analýza	40
5.	Výsledky	41
5.1.	Optimalizace extrakčních podmínek	41
5.1.1.	Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	41
5.1.2.	Proteinová precipitace.....	46
5.2.	Výběr vhodného IS	47
5.3.	Validace.....	48
5.3.1.	Kalibrace	48
5.3.2.	QC vzorky	49
5.3.3.	Výtěžnost (Recovery, RE), Matricové efekty (ME).....	52
5.3.4.	Stabilita v autosampleru, Stabilita analytu v matrici při zamrazení a rozmrazení	53
5.4.	Externí hodnocení kvality (EHK).....	53
6.	Diskuze	55
7.	Závěr.....	57
8.	Seznam použité literatury	58

1. Úvod

Benzodiazepiny jsou léčiva užívána zejména k terapii úzkosti, v menší míře nespavosti a dalších konkrétních indikací (viz. kapitola 2.1.). Zolpidem se řadí do skupiny léčiv zvaných Z-drugs, jedná se o nebenzodiazepinová hypnotika. Všechna tato léčiva snadno pronikají přes hematoencefalickou bariéru a ovlivňují CNS, je tedy potřebné určit správné dávkovací schéma a monitorovat léčbu. Stanovováním hladin benzodiazepinů a zolpidemu v biologickém materiálu dochází k optimalizaci léčby, snížení nežádoucích účinků a zvýšení adherence pacienta k léčbě. U benzodiazepinů dochází často k případům akutní intoxikace (včetně kombinace s alkoholem), je tedy nezbytné provést rychlou kvalitativní a kvantitativní analýzu k neodkladné léčbě.

V praxi se ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení léčiv v biologickém materiálu využívají metody separační, které jsou citlivé, selektivní, reprodukovatelné a časově nenáročné. Jednou z těchto metod je kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Umožňuje stanovení více analytů najednou a je schopna stanovit velmi nízké koncentrace analytů. Kapalinová chromatografie umožňuje separovat analyty od složek matrice a hmotnostní spektrometr poskytne informace o struktuře daných látek, což je spojeno s významným zvýšením selektivity a citlivosti. To vše má značný dopad v klinické praxi – monitorování léčby, individualizace dávkovacího schématu léčiv, zlepšení adherence pacienta k léčbě, snížení nežádoucích dopadů léčby apod. Stanovení analytu a jeho koncentrace ve vzorku je pro správnou a neodkladnou terapii rovněž důležité při akutních případech – předávkování, závažné nežádoucí účinky, záměna léčiv apod. Je snahou vyvíjet co nejcitlivější a nej přesnější metody ke stanovení léčiv.

Vývoj bioanalytické metody spočívá v optimalizaci úpravy biologického materiálu a plné validaci metody, která je důležitá pro získání spolehlivých kvantitativních výsledků. Dle předloženého biologického materiálu je třeba zvolit nejvhodnější metodu úpravy, aby byla následná analýza s ohledem na předpokládanou koncentraci léčiva co nej přesnější. Obvykle se pracuje s malým množstvím biologického materiálu, ze kterého je třeba odstranit interferující složky matrice, případně vzorek zakoncentrovat pro dosažení potřebné citlivosti metody.

Teoretická část diplomové práce zahrnuje popis benzodiazepinů a Z-drugs, popis a principy úpravy biologického vzorku před analýzou, popis HPLC systému, hmotnostní spektrometrie a validační proces. Experimentální část této diplomové práce se zabývá vývojem a validací bioanalytické metody pro stanovení vybraných benzodiazepinů (alprazolam, bromazepam, diazepam, chlordiazepoxid, klonazepam, midazolam, oxazepam) a zolpidemu v lidském séru pomocí UHPLC-HRMS.

2. Teoretická část

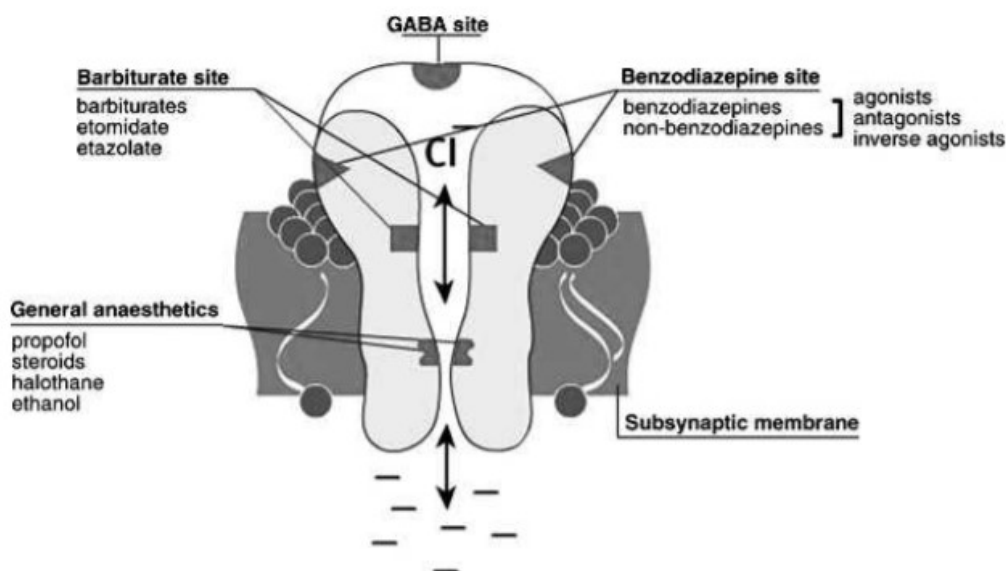
2.1. Benzodiazepiny a Z-drugs

Úzkostné poruchy patří mezi velmi častá duševní onemocnění, za život postihnou přibližně 25 % populace, přičemž celoživotní prevalence je 13,6 %. Úzkostné poruchy jsou charakterizovány opakujícími se nadměrnými úzkostmi, strachem a vegetativními změnami. Úzkost je běžnou reakcí organismu na různé situace. Poruchou se stává tehdy, když je úzkost nadměrná, dlouhotrvající, intenzivní a negativně ovlivňuje život jedince. Za úzkostnou poruchu se označuje také úzkost na nepřiměřené situace. Úzkostné poruchy se dělí do následujících skupin: panická porucha (intenzivní záchvat paniky), generalizovaná úzkostná porucha (dlouhodobé trvání úzkostných stavů), smíšená úzkostně depresivní porucha (úzkosti s příznaky deprese), sociální fobie (strach ze sociálních kontaktů), agorafobie (strach z míst, odkud je těžké uniknout, strach opustit domov) a specifické fobie. Velmi důležitou součástí léčby je kognitivně-behaviorální terapie (psychoterapeutický postup), z farmakoterapie se užívají anxiolytika (benzodiazepiny), případně antidepresiva. [1]

Nespavost (insomnie) je jednou z nejčastějších poruch spánku, za život postihne nejméně třetinu populace, prevalence je 15-40 %. Častěji postiženi nespavostí jsou starší lidé. Rozlišujeme dva základní typy insomnie – sekundární insomnie (následek jiného onemocnění) a primární insomnie (bez dalších souvislostí). Nespavost je stav, kdy je spánek obtížně dosažitelný, krátký, přerušovaný či nedostatečný, dle toho se dělí do třech základních kategorií: obtížné usínání, předčasné probouzení a noční probouzení. Velmi důležitou součástí léčby je správná spánková hygiena a nefarmakoterapeutické postupy, včetně kognitivně-behaviorální terapie. Ve farmakoterapii se uplatňují především hypnotika, dnes zejména Z-drugs, minoritně také benzodiazepiny. [2, 3]

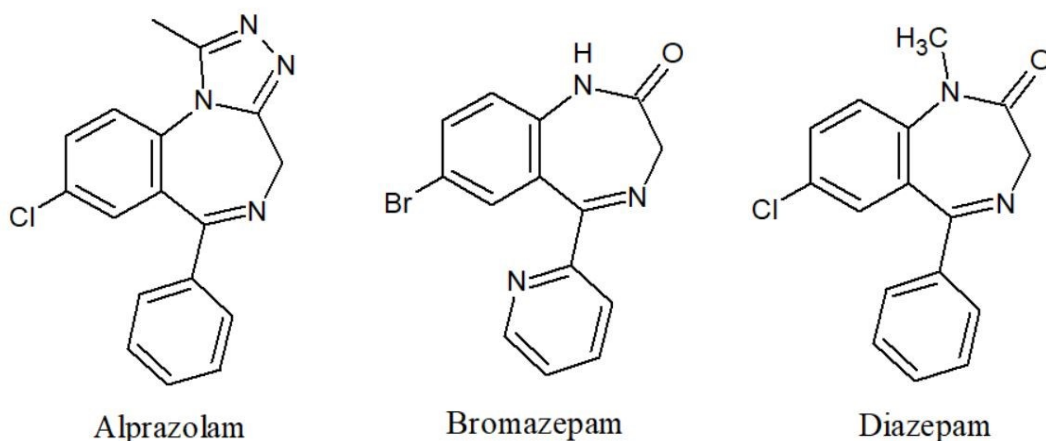
Benzodiazepiny jsou široce užívaná léčiva ovlivňující centrální nervový systém. V dnešní době se užívají zejména k terapii úzkosti jako anxiolytika, dále také nespavosti (hypnotika) a k celkovému útlumu (sedativa). Mimo to mají široké využití v různých neurologických indikacích. Benzodiazepiny jsou klasifikovány dle eliminačního poločasu na krátkodobě (oxazepam, midazolam), střednědobě (alprazolam, bromazepam, chlordiazepoxid) a dlouhodobě působící (diazepam, klonazepam). Krátkodobě působící BZDZ jsou preferovány v léčbě insomnie a při akutních případech, k léčbě úzkosti jsou preferovány dlouhodobě působící BZDZ. Alprazolam se používá jako anxiolytikum s rychlým nástupem účinku, např. při panických atakách. Jako anxiolytikum se dále využívá bromazepam a oxazepam. Diazepam se mimo hlavní indikaci využívá injekčně k léčbě akutních úzkostných poruch, dále se využívá při status epilepticus, delirium tremens, při spasmech kosterního svalstva a jako premedikace anestezie. Chlordiazepoxid se využívá jako anxiolytikum a premedikace anestezie. Klonazepam se využívá jako přídatná léčba epilepsie, dále jako přídatná léčba akutní mánie a při určitých poruchách pohybu. Midazolam se pro své sedativní účinky využívá zejména jako hypnotikum, intravenózně jako sedativum (preanestetikum a anestetikum). [2, 4, 5]

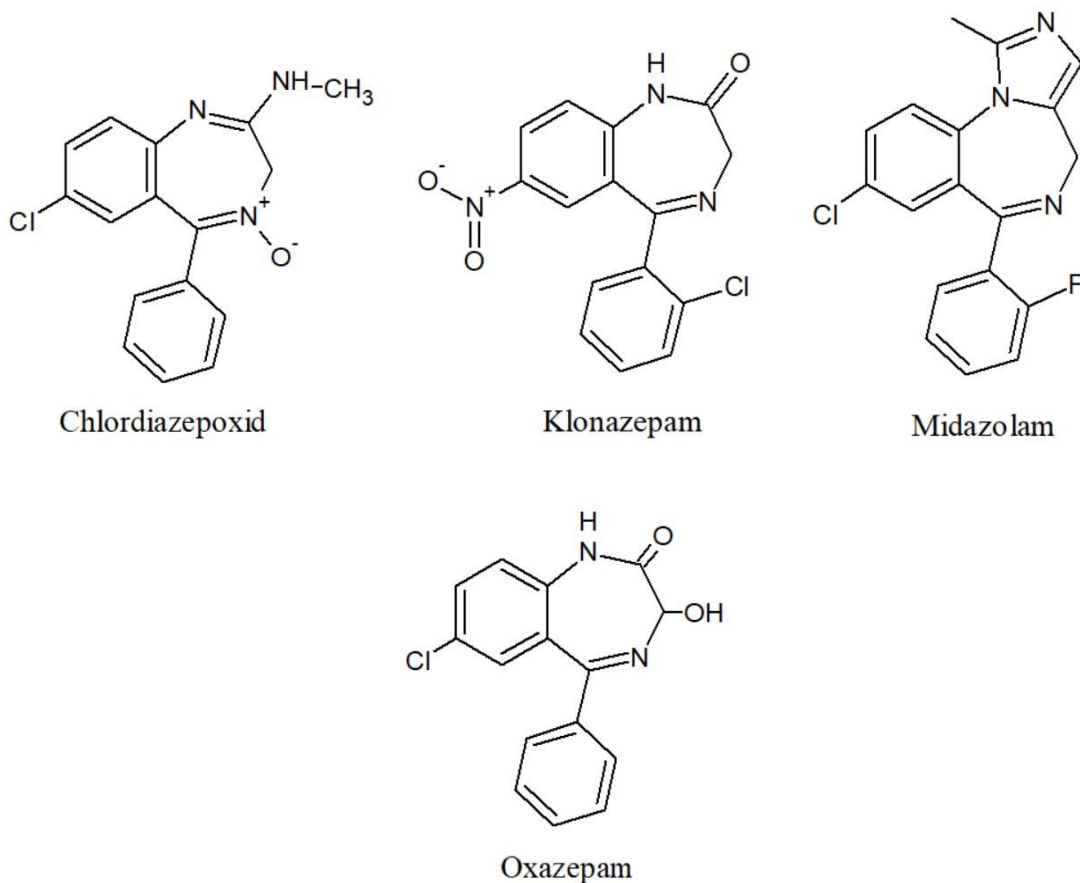
Vzhledem ke své lipofilní povaze BZDZ snadno pronikají přes hematoencefalickou bariéru (HEB), kde se váží na GABA receptorový komplex, zejména na subtyp GABA-A obsahující vazebné místo pro benzodiazepiny. BZDZ působí jako alosterické modulátory tohoto receptoru. Obsazením receptoru γ -aminomáselnou kyselinou (GABA), či jiným agonistou, dochází po vazbě BZDZ ke zvýšení propustnosti přilehlého chloridového kanálu pro chloridové anionty. Tím dochází k podpoře inhibičního účinku neurotransmiteru GABA v CNS. Podobu GABA receptorového komplexu znázorňuje Obr. 1. [2, 4, 5, 6]



Obr. 1: GABA receptorový komplex [6]

Všechny benzodiazepiny sdílejí společný strukturní motiv – spojený benzenový a diazepinový kruh, který dává jméno celé lékové skupině. U všech terapeuticky významných benzodiazepinů se dále nachází na diazepin připojený fenylový cyklus. Strukturní vzorce vybraných benzodiazepinů znázorňuje Obr. 2. [4]





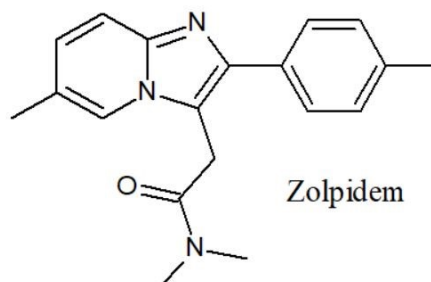
Obr. 2: Strukturní vzorce vybraných benzodiazepinů

Ze struktury BZDZ vyplývá jejich výrazný lipofilní charakter, váží se na plazmatické bílkoviny a snadno pronikají do tkání a přes HEB. Benzodiazepiny mají výbornou dostupnost po perorálním podání, aplikují se i intravenózně či intramuskulárně. Dále je možné BZDZ podat nazálně, bukálně či rektálně – tyto způsoby aplikace se využívají zejména u midazolamu. Metabolismus probíhá zejména v játrech. [5, 6, 7]

Mezi běžné nežádoucí účinky benzodiazepinů patří somnolence, únava, letargie, dále zhoršení motorických funkcí, závratě, ataxie. BZDZ mohou vyvolat anterográdní amnesii a při náhlém vysazení rebound fenomén, zejména u starších pacientů. Z důvodu pomalého vylučování z organismu a kumulace ve tkáních se mohou projevit NÚ jako zmatenost, dezorientace a narušené myšlení. BZDZ mohou vyvolávat závislost, a tím vést ke zvyšování dávek a prohlubování NÚ, proto se doporučují užívat maximálně po dobu 4 týdnů. Při akutní intoxikaci benzodiazepiny dochází k sedaci, porušení motorických funkcí, zmatenosti a ospalosti až dlouhému spánku. V kombinaci s látkami tlumícími CNS (alkohol, opiáty, barbituráty atd.) hrozí respirační útlum. Kombinace BZDZ s alkoholem způsobuje tzv. „imperativní spánek“, sopor až bezvědomí. Dále vznikají delirantní stavy s agresivním chováním s následným výpadkem paměti. Vzniklým účinkům akutního předávkování lze zabránit podáním antagonisty flumazenilu. [2, 6, 8, 9]

Jako Z-drugs jsou označována moderní hypnotika třetí generace, patří mezi ně zolpidem, zopiklon, zaleplon a eszopiklon. Ačkoliv nemají benzodiazepinovou strukturu, působí jako agonisté benzodiazepinového receptoru GABA komplexu. Na rozdíl

od benzodiazepinů neovlivňují strukturu spánku a vzhledem k rychlému nástupu účinku a krátkému působení se hodí zejména k navození spánku při problémech s usínáním. Obr. 3 znázorňuje strukturní vzorec zolpidemu. [2, 5]



Obr. 3: Strukturní vzorec zolpidemu

2.2. Úprava biologického materiálu před chromatografickou analýzou

Biologický materiál, jakožto složitou komplexní maticí, je nutné před vlastní analýzou upravit. Vlastní úprava vzorku je velmi důležitým a zároveň kritickým krokem celé analýzy, je časově náročná a je častým zdrojem chyb, jelikož ovlivňuje přesnost a správnost výsledků. V klinické praxi jsou nejčastěji používanými biologickými materiály plasma a sérum oddělené z krve, plná krev a moč. Dále se využívají žluč, stolice, mozkomíšní mok, sliny, pot, mateřské mléko, vlasy, nehty a další. Biologická matrice je složena ze dvou hlavních složek, a to organické (proteiny, enzymy, lipidy atd.) a anorganické (soli, ionty atd.). Ze vzorku je většinou nutné tyto složky odstranit, neboť mohou interferovat s měřenými analyty či ucpávat analytický systém. Zároveň úpravou vzorku můžeme analyty zakonzentrovat, neboť se ve vzorku často vyskytují pouze ve stopovém množství. [10, 11]

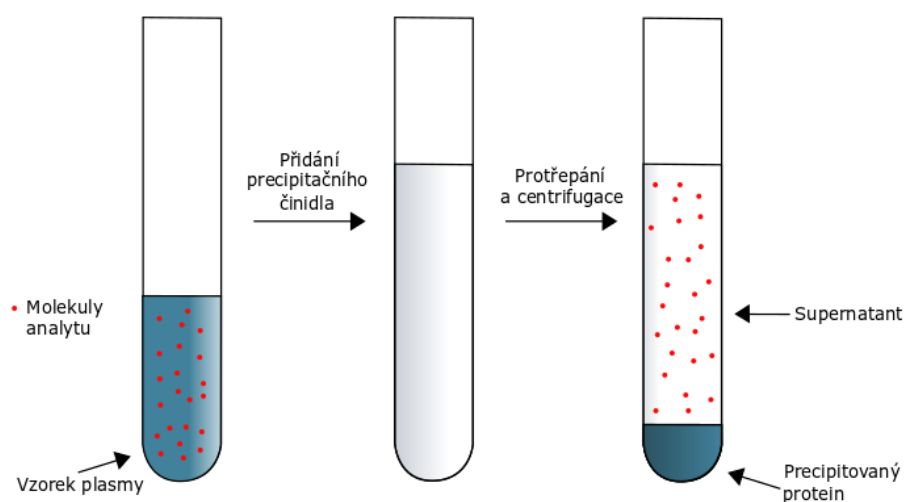
Výběr vhodné úpravy vzorku závisí na následné chromatografické metodě analýzy, na povaze a počtu analytů, jejich koncentraci v biologické matici, na povaze matrice vzorku, chemické stabilitě a afinitě analytů k proteinům či jiným složkám matrice, rozpustnosti a dalších podmínkách. Důležitým kritériem je v dnešní době také automatizace metody, časová a finanční nenáročnost, počet vzorků k analýze a v neposlední řadě ekologický přístup. Nejčastěji se k úpravě vzorku využívá proteinová precipitace (PP), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction) a extrakce na pevné fázi (SPE, solid-phase extraction). [11, 12]

2.2.1. Proteinová precipitace

Proteinová precipitace (**PP, srážení proteinů, deproteinace**) je často využívanou metodou úpravy plasmy či séra, ale i jiných biologických materiálů před analýzou. Proteiny v plasmě či séru je nutné odstranit – v chromatografickém systému dochází ke srážení se složkami mobilní fáze (organická rozpouštědla a pufrovací soli), tím dochází k ucpání kolony a snížení její účinnosti. PP je rychlá a jednoduchá metoda vhodná pro hydrofilní i hydrofobní sloučeniny. [12, 13]

Jako precipitační činidla se nejčastěji používají organická rozpouštědla mísitelná s vodou, zejména acetonitril (ACN) a methanol (MeOH), dále organické a anorganické kyseliny, soli či ionty kovů (ZnSO₄). [13]

Proteinová precipitace spočívá v přidavku precipitačního činidla ke vzorku v poměru alespoň 2:1, následuje třepání a centrifugace. Při centrifugaci dojde k oddělení sraženiny a supernatantu, který se poté přímo analyzuje nebo se odpaří do sucha a rekonstruuje v minimálním objemu mobilní fáze. Mezi výhody PP patří rychlost a jednoduchost s minimálními náklady a potřebným vybavením. PP je velmi účinná k odstranění proteinů ve vzorku, v supernatantu ale mohou zůstat další endogenní (především fosfolipidy) a exogenní složky plasmy. Následkem může být pokles selektivity a citlivosti – např. potlačení signálu v hmotnostně spektrometrické analýze díky matricové supresi. Další nevýhodou je naředění vzorku přidáním precipitačního činidla, což má za následek pokles koncentrace měřeného analytu. Obr. 4 popisuje princip proteinové precipitace. [11-14]



Obr. 4: Princip proteinové precipitace

V moderních bioanalytických laboratořích se využívají destičky s 96 jamkami, které umožňují proteinovou precipitaci pro 96 vzorků najednou. Zařízení se skládá ze dvou destiček, přičemž jamky ve vrchní destičce obsahují filtry s velikostí pórů 0,2 μm a spodní destička slouží jako sběrná. Do jamek vrchní destičky se napipetuje nejprve srážedlo (nejčastěji acetonitril), poté vzorek plasmy v poměru např. 3:1, utěsní se a třepe. Nakonec se supernatant od sraženiny přefiltruje za pomoci vakua, přetlaku nebo odstředěním do sběrných jamek. Tento proces může být plně automatizovaný. [13]

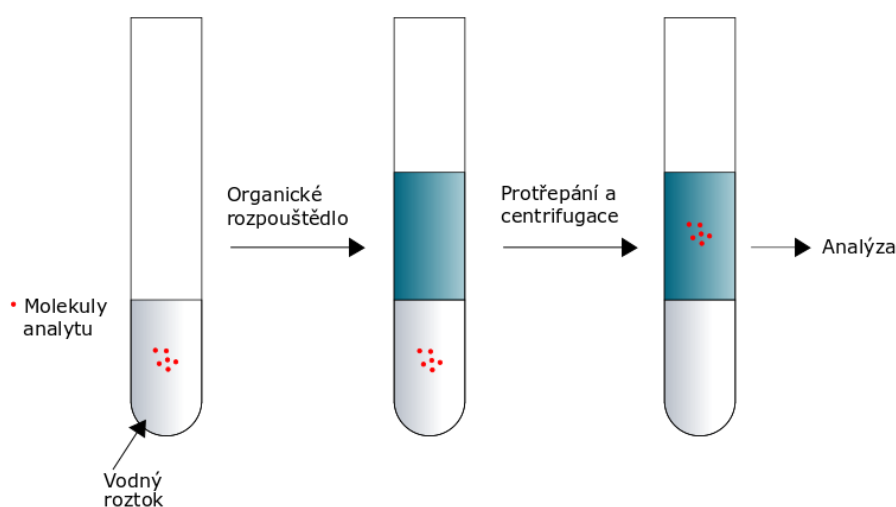
2.2.2. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (**LLE, liquid-liquid extraction**) patří mezi první techniky vyvinuté pro úpravu vzorků a nadále je široce využívána. Principem LLE je přesun molekul analytu z biologické tekutiny (vodná fáze) do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou. Rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné kapaliny souvisí s jejich rozdělovacím koeficientem log P a řídí se Nernstovým zákonem:

$$K_D = \frac{c_1}{c_2}$$

kde K_D představuje rozdělovací poměr, c_1 koncentraci látky v organické fázi a c_2 koncentraci látky ve vodné fázi. [13-15]

LLE je vhodná pro všechny vodné biologické vzorky, jako např. krev, plasma, sérum, moč. Pro maximální účinnost extrakce (extrahují se pouze analyty v neutrální formě) je nutné upravovat pH vzorku, a to přidáním pufru nebo kyselého či zásaditého roztoku. Následuje přidání extrakčního činidla nemísitelného s vodou (organické rozpouštědlo) ke vzorku o vhodném pH. Vytvoří se dvě nemísitelné fáze a během třepání dojde k přesunu molekul analytu ze vzorku do organického rozpouštědla. Zároveň dojde k vyčištění cílového vzorku pro analýzu, jelikož ve vodné fázi zůstávají interferující látky z biologického vzorku, jako proteiny, fosfolipidy a soli. Po centrifugaci se odebere organická fáze s analytem (extrakt), odpaří se do sucha a rekonstruuje v malém množství mobilní fáze, čímž je vzorek připraven k analýze. Princip LLE popisuje Obr. 5. [13, 15]



Obr. 5: Princip LLE

Výběr organického rozpouštědla závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu. Obecně platí, že nepolární nebo málo polární látky se nejlépe extrahují v nepolárních rozpouštědlech, středně polární nebo aromatické látky v aromatických rozpouštědlech a polární látky v rozpouštědlech polárních, která musí být stále nemísitelná s vodou. Mezi typická rozpouštědla pro LLE řadíme např. heptan, hexan, xylen, dichlormethan, ethyl-acetát, methyl-terc-butyléter (MTBE). Pro úpravu polaritý rozpouštědla a zvýšení účinnosti extrakce je možné organická rozpouštědla míchat v různých poměrech. [11, 13]

Volba rozpouštědla dále závisí na jeho hustotě a viskozitě. Pro účinnou extrakci je vhodná nízká viskozita rozpouštědla, čímž se zajistí dokonalé promísení s vodnou fází během třepání a snadný přechod molekul analytu. Hustotu rozpouštědla je nutné znát pro odběr vzorku k analýze. Rozpouštědla s hustotou nižší, než je hustota vody, tvoří vrchní vrstvu dvou nemísitelných kapalin. Při vyšší hustotě je rozpouštědlo spodní vrstvou nemísitelných kapalin a je obtížnější vzorek odebrat. Pokud biologický vzorek obsahuje vysokou koncentraci matricových složek, je možné využít LLE se zpětnou extrakcí pro lepší vyčištění vzorku. Principem je přesun analytu nejprve z vodné fáze (vzorek) do organického rozpouštědla, a poté do jiné vodné fáze, která se použije k analýze. [13]

Mezi výhody LLE patří nízké náklady, opakovatelnost a jednoduchost provedení, zakoncentrování analytu a čistota extraktu. Nevýhodou je nevhodnost metody pro hydrofilní sloučeniny, náročný vývoj metody pro extrakci více analytů nebo metabolitů s rozdílnou lipofilitou, časová náročnost, vysoká spotřeba rozpouštědel, tvorba emulzí a nutnost odpaření a rekonstituce vzorku před analýzou. [15]

Další alternativy LLE jsou:

- **SALLE (salting-out assisted LLE):** Principem je využití organických rozpouštědel mísitelných s vodou a solí o vysoké koncentraci pro oddělení fází. Výhodou této metody oproti LLE je širší aplikovatelnost pro analyty různé lipofility, lepší výtěžnost a kompatibilita s chromatografickými systémy (např. HILIC). [13, 15]
- **SLE (solid supported LLE):** SLE využívá destičky s 96 jamkami, ve kterých je inertní pevný podklad (např. silikagel). Vodný vzorek se na křemelinu adsorbuje jako tenká vrstva na povrchu, poté se přidá organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou. Rozpouštědlo je v systému několik minut zadrženo pro dosažení extrakce, následně je vypuštěno do jamek sběrné desky. Velký povrch na rozhraní mezi kapalinami maximalizuje účinnost extrakce, a tedy výtěžnost analytu a minimalizuje možnost tvorby emulze. Za použití vakua lze SLE automatizovat. [13, 15, 16]

2.2.3. Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (**SPE, solid-phase extraction**) patří mezi často využívané metody přípravy vzorků, zejména plasmy, séra a moči. Základem SPE jsou extrakční kolonky naplněné stacionární pevnou fází. Extrakce analytu je založena na interakcích mezi pevnou a kapalnou fází (vzorek), zatímco složky matrice kolonou pouze procházejí. SPE je svým způsobem formou nízkotlakové chromatografie. Stejně jako u kapalinové chromatografie je i u SPE velmi důležitý výběr kolonky. Dle výběru materiálu sorbentu lze SPE rozdělit do třech kategorií:

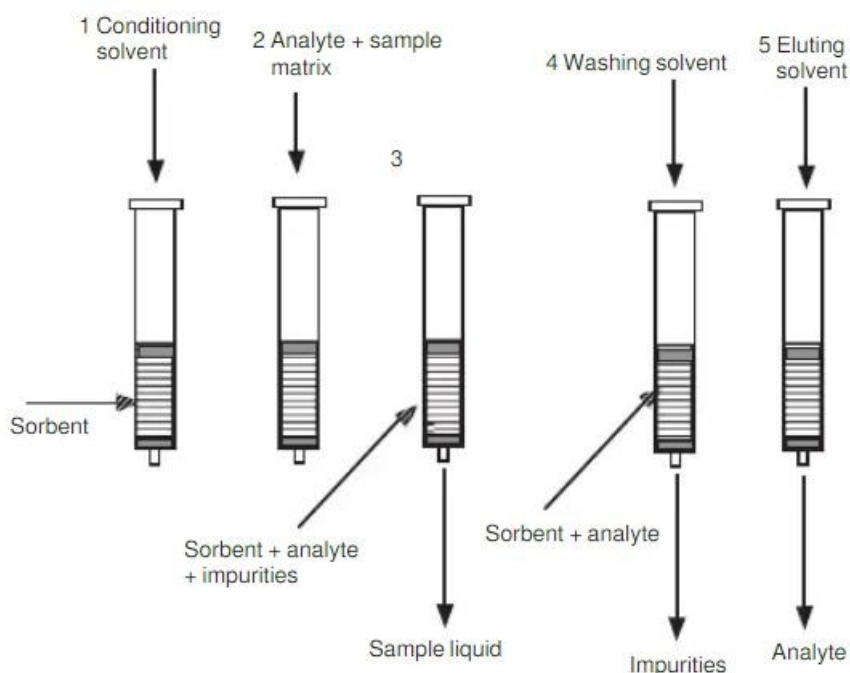
- **SPE s reverzní fází** – (RP)-SPE využívající nepolární stacionární fázi (např. silikagel s navázanými alkylovými řetězci).
- **SPE s normální fází** využívající polární stacionární fázi (např. silikagel s navázanými polárními skupinami).
- **Iontově výměnná SPE** využívající iontové funkční skupiny. [13-15]

Nejčastěji používané kolonky jsou kombinací (RP)-SPE a iontově výměnných SPE. Vhodná stacionární fáze se volí zejména podle chemických vlastností analytu a použitého rozpouštědla. [13-15]

Vlastní SPE sestává z několika kroků:

- 1) **Aktivace sorbentu (kondicionování):** Slouží k aktivaci funkčních skupin sorbentu k účinné extrakci. Aktivace se provádí pomocí polárního organického rozpouštědla, nejčastěji methanolu. Sorbent již nesmí před aplikací vzorku vyschnout.
- 2) **Ekvibrace stacionární fáze:** Provádí se za účelem optimalizace prostředí pro extrakci odstraněním přebytku methanolu, a to vodou či vodnými pufrými.

- 3) **Aplikace vzorku:** Do kolonky je aplikován biologický vzorek, který protéká přes sorbent. Zatímco molekuly analytu jsou na sorbentu zadržovány pomocí různých interakcí, složky matrice procházejí skrze sorbent.
- 4) **Promývání:** Kolonka je proplachována jedním či více promývacími roztoky k odstranění interferujících látek z matrice. Analyt nesmí být v těchto roztocích rozpustný a nadále zůstává v kolonce. Tímto krokem dojde k vyčištění vzorku.
- 5) **Eluce analytu:** Pomocí vhodného rozpouštědla (eluent), které přeruší interakce analytu s funkčními skupinami stacionární fáze, je uvolněn analyt z extrakční kolonky a výsledný eluát je připraven k další úpravě nebo analýze. Princip SPE je znázorněn na Obr. 6. [13, 14]



Obr. 6: Princip SPE [17]

Mezi hlavní výhody SPE patří vysoká výtěžnost, zakoncentrování analytu, čistota vzorku, nižší spotřeba organických rozpouštědel, vhodnost použití metody pro širokou škálu analytů (dle výběru stacionární fáze) a možnost automatizace. Nevýhodami jsou časová náročnost, několika krokový postup a vyšší cena metody – kolonky jsou většinou vyráběny na jedno použití. [14, 15]

Pro větší série vzorků se využívá 96 jamkový formát SPE pro extrakci 96 vzorků současně. Další možností je automatizovaná on-line extrakce, při které je vzorek z kolonky proplachován stejným rozpouštědlem, kterým byl do kolonky nanesen. Nakonec je vzorek eluován přímo do HPLC systému. [13, 17]

SPE má mnoho alternativ, mezi nejrozšířenější patří **SPME (solid phase microextraction, mikroextrakce na tuhou fázi)** a **MEPS (microextraction by packed sorbent, mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím stříkačky)**. Obě tyto metody patří mezi mikroextrakce s minimální spotřebou rozpouštědel. Při SPME dochází k rozdělování analytů mezi vzorek a stacionární fázi ve formě vláken. Extrakci lze provést třemi způsoby:

- Přímá extrakce – vlákno je přímo ponořeno do vodného vzorku a dojde k přesunu analytu na vlákno.
- Headspace SPME – k extrakci analytu dochází z plynné fáze nad vzorkem a vlákno je tak chráněno před interferujícími látkami z matrice.
- Extrakce s membránovou ochranou – membrána odděluje vzorek od vlákna, propouští molekuly analytu a zabraňuje prostupu interferujících látek. [14, 18]

Tato metoda je nejčastěji spojována s plynovou chromatografií. MEPS je miniaturizovaná SPE probíhající ve stříkačce. Sorbent je umístěn ve vhodném obalu mezi válcem a jehlou stříkačky, v tomto prostoru poté probíhá celý proces extrakce. Sorbent může být různě modifikován a je určen k mnohonásobnému používání, na rozdíl od SPE na jedno použití. Metodu lze propojit s kapalinovou i plynovou chromatografií. [14, 18]

2.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

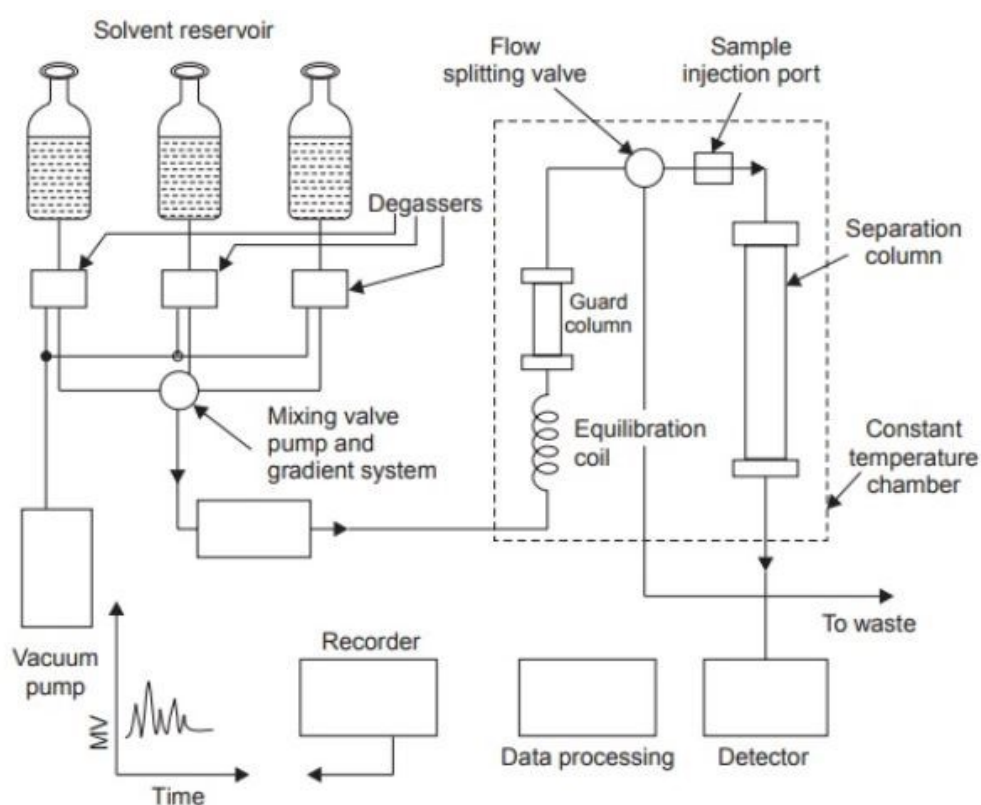
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (**HPLC, High-Performance Liquid Chromatography**) je nejrozšířenější separační technika, sloužící k separaci s následnou identifikací a kvantifikací analytů ve vzorku. Principem je průchod mobilní fáze s obsahem analytů skrze stacionární fázi v chromatografické koloně, přičemž dochází k separaci analytů na základě rozdílných interakcí s oběma fázemi. Typická chromatografická kolona je dlouhá 5-15 cm o průměru 2,1-4,6 mm a je naplněna stacionární fází o velikosti částic 2,6-5 μm . [13, 19]

2.3.1. HPLC systém

HPLC systém je složen z mnoha komponent, které zajišťují vlastní separaci a následnou detekci analytů. Celý HPLC systém je řízen softwarem, který slouží i pro vyhodnocování dat. K základním složkám systému patří: [20, 21]

- **Zásobníky mobilní fáze:** Slouží jako zásobárny dostatečného množství mobilní fáze pro kontinuální chod analýzy. Součástí je obvykle **filtr** pro odstranění nečistot a za zásobníky umístěn **odplyňovací systém (degaser)** pro odstranění plynných složek. [19-21]
- **Vysokotlaké čerpadlo:** Zajišťuje konstantní a kontinuální tok mobilní fáze do systému. Na základě poměru jednotlivých roztoků mobilní fáze rozdělujeme analýzu na **izokratickou** či **gradientovou eluci**. Při izokratické eluci je složení mobilní fáze během analýzy neměnné, zatímco při gradientové eluci se postupně mění poměry jednotlivých roztoků mobilní fáze. Gradientová eluce umožňuje lepší rozdělení komplexního vzorku na jednotlivé komponenty, pokud se při izokratické eluci nerozdělí nebo k tomu dojde až po dlouhé době analýzy. Jednotlivé složky mobilní fáze jsou dokonale promíseny ve **směšovacím zařízení**. [19-21]
- **Dávkovač vzorku:** Slouží k zavedení vzorku do mobilní fáze před vstupem do kolony. Dnešní moderní přístroje mají místo jednoduchého dávkovače **autosampler** (automatický dávkovač), který dávkuje různé objemy různých vzorků z vialek do systému na základě parametrů zadaných v PC. [19-21]

- **Kolona:** Je vlastním srdcem celého HPLC systému, ve kterém dochází k separaci směsi analytů. Kolona je zpravidla umístěna v **termostatu** a udržována na určité teplotě. Před vlastní separační kolonou je často umístěna **předkolona**, slouží k ochraně kolony před nečistotami a nevhodnými látkami. [19-21]
 - **Detektor:** Kontinuálně detekuje separované analyty na základě měření jejich fyzikálně-chemických vlastností. Existuje mnoho druhů detektorů, které se dělí na spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické, detektory na bázi aerosolu, chemiluminiscenční, vodivostní, bezkontaktní vodivostní a hmotnostně spektrometrické. [19-21]
 - **Počítač se softwarem:** Kontroluje a řídí všechny parametry HPLC, získává a vyhodnocuje data z detektoru a monitoruje výkon systému. [19-21]
- Celé schéma HPLC systému je znázorněno na Obr. 7.

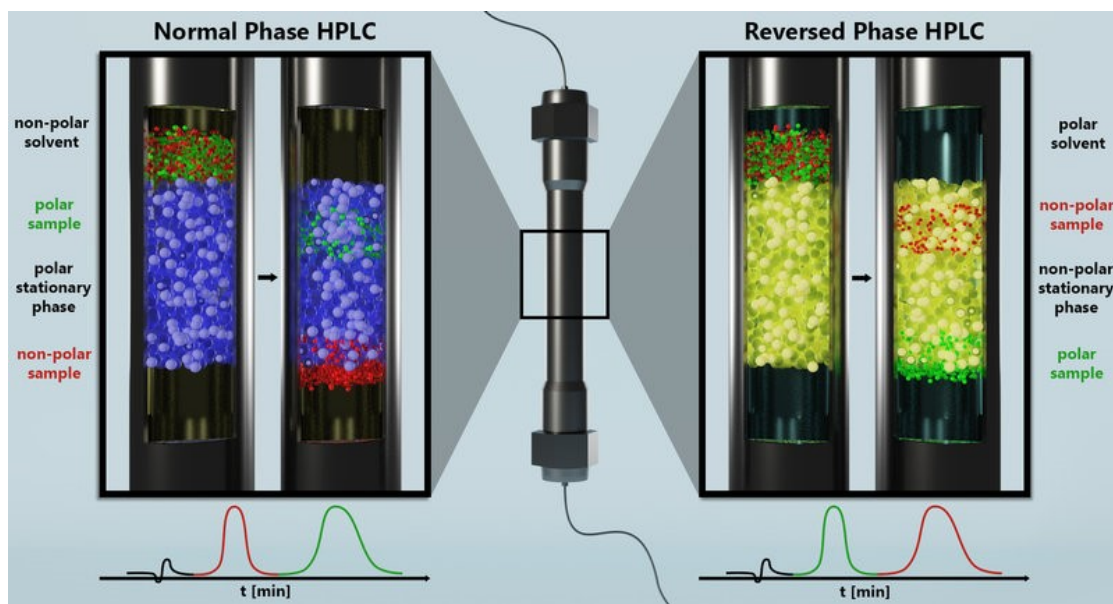


Obr. 7: Schéma HPLC systému [22]

2.3.2. Separační proces

Podle podstaty interakce analytu se stacionární fází lze HPLC techniky třídit podle tzv. chromatografických módů do následujících skupin: chromatografie na normální fázi, chromatografie na reverzní fázi, iontově výměnná chromatografie, vylučovací chromatografie, iontově párová chromatografie, hydrofilní interakční chromatografie a hydrofobní interakční chromatografie. Základními mezimolekulovými interakcemi jsou van der Waalsovy síly a vazby vodíkovým můstkem. Vylučovací chromatografie není založena na interakcích, ale na rozdílné velikosti molekul analytů. [19-21]

- Chromatografie na normální fázi (NP-HPLC, Normal-Phase Chromatography):**
 V těchto systémech jsou využívány polární stacionární fáze a mobilní fáze s nižší polaritou, než je polarita stacionární fáze. Typickou stacionární fází je nemodifikovaný silikagel. Separace analytů je dána specifickými mezimolekulárními interakcemi s povrchem sorbentu (van der Waalsovy interakce dipól-dipól) a dalšími nespecifickými interakcemi s mobilní fází (např. vodíkové můstky). Čím silnější je interakce mezi analytem a stacionární fází, tím delší je čas retence. Využití této metody ustupuje do pozadí, nicméně se stále používá např. k analýze analytů, které se v jiných systémech rozkládají. [19-21]
 - Chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC, Reversed-Phase Chromatography):**
 Polarita mobilní a stacionární fáze je u tohoto typu chromatografie obrácená. Povrch stacionární fáze je nepolární, kdežto mobilní fáze je polární, používají se zejména vodné roztoky často v kombinaci s organickými rozpouštědly (ACN, MeOH). RP-HPLC využívá k separaci slabé disperzní síly. Nejpoužívanější stacionární fází je modifikovaný silikagel s nepolárními řetězci navázanými na povrchu (např. C18, C8), ale uplatňují se i jiné povrchové modifikace jako fenylhexyl nebo pentafluorofenyl. RP-HPLC je nejvyužívanější separační technikou v HPLC. [19-21]
- Obr. 8 popisuje rozdíly mezi NP-HPLC a RP-HPLC.



Obr. 8: Rozdíly mezi NP-HPLC a RP-HPLC [23]

- Iontově výměnná chromatografie (IEX, Ion-Exchange Chromatography):**
 Stacionární fáze je u tohoto typu chromatografie ve formě iontoměníčů. Separace probíhá na základě elektrostatických interakcí mezi ionty analytu a opačně nabitými ionizovanými centry stacionární fáze. Nejčastěji používané stacionární fáze jsou pryskyřice (např. styrenové, akrylátové) a chemicky vázané iontoměníče na silikagelu. Ionoměniče (ionexy) lze dále dělit na katexy a anexy podle funkčních skupin. Katexy jsou ve formě kyselin a slouží k výměně kationtů, dále se dělí na silné (SCX, strong cation exchanger) a slabé (WCX, weak cation exchanger). Anexy jsou ve formě bází pro výměnu aniontů. Stejně jako katexy se podle svých schopností dělí na silné

(SAX, strong anion exchanger) a slabé (WAX, weak anion exchanger). IEX se využívá např. ke stanovení aminokyselin, kationtů či aniontů ve vodě, nukleových kyselin a peptidů. [19, 21]

- **Vylučovací chromatografie (SEC, Size-Exclusion Chromatography):** Vylučovací chromatografie je založena na separaci analytů dle jejich molekulové velikosti. Mobilní fáze s analyty prochází skrze pórovitou stacionární fázi o různé velikosti pórů, ve kterých se různě velké molekuly analytu zadržují, nedochází však k žádným významným chemickým interakcím mezi analytem a stacionární fází. Velké molekuly vzhledem ke své velikosti nevstupují do pórů, ale prochází okolo stacionární fáze spolu s mobilní fází. Menší molekuly do pórů vstupují a na koloně se zadržují. Výsledkem separace je rozdělení molekul podle velikosti, přičemž jako první se eluují velké molekuly. Tato metoda se využívá nejčastěji k separaci makromolekul (proteiny, peptidy, polymery). [19-21]
- **Iontově párová chromatografie (IPC, Ion-Pair Chromatography):** Slouží k analýze vysoce polárních a iontových sloučenin. Součástí mobilní fáze je iontové párovací činidlo. Jeho součástí je molekula s opačně nabitým iontem, než má analyt a velká hydrofobní část (tenzid) pro interakci se stacionární fází. Využívá se stacionární fáze pro RP-HPLC. [21, 24]
- **Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, Hydrophilic-Interaction Chromatography):** HILIC se využívá zejména k analýze polárních sloučenin, dále k analýze nabitých sloučenin (iontů). Stacionární fáze je polární jako u NP-HPLC (např. silikagel), mobilní fáze je naopak podobná fázím v režimu RP-HPLC. [25]
- **Hydrofobní interakční chromatografie (HIC, Hydrophobic-Interaction Chromatography):** K retenci dochází v důsledku hydrofobních interakcí mezi hydrofobní stacionární fází a nepolárními skupinami na povrchu makromolekul (proteiny) ve vodné mobilní fázi s přidavkem soli. Slouží zejména k separaci proteinů a velkých peptidů v nativním stavu, k tomuto účelu se využívá gradientová eluce se snižující se iontovou silou mobilní fáze – gradient začíná vysokou koncentrací soli v mobilní fázi, poté se koncentrace snižuje a dochází k eluci. [21, 26]

2.3.3. Základní chromatografické parametry

- **Retenční čas (t_R):** Doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maximální koncentrace. Objem mobilní fáze, který kolonou za tuto dobu proteče se nazývá **retenční objem (V_R)**. Retenční čas je kvalitativním parametrem.
- **Výška píku (h), Plocha pod píkem (A):** Kvantitativní parametry separace.
- **Rozlišení (R_s):** Parametr označující míru rozdělení dvou analytů do samostatných píků. Cílem separace je získat optimální rozlišení v minimálním čase. Vypočítává se z retenčních časů a šířek dvou sousedících píků. Pro dosažení co nejlepšího rozlišení je potřeba dosáhnout hodnoty $R_s = 1,5$ a vyšší. Jedná se o bezrozměrnou veličinu.
- **Počet teoretických pater (N):** Bezrozměrná veličina vyjadřující **separační účinnost** kolony, jde tedy o kvalitativní parametr. Účinnost je charakterizována mírou rozšiřování elučních zón během separace na koloně. Čím je hodnota vyšší, tím je

kolona účinnější. Hodnota N je ovlivněna délkou kolony, retenčním časem, rychlostí průtoku mobilní fáze, velikostí částic stacionární fáze, teplotou, viskozitou mobilní fáze.

- **Výškový ekvivalent teoretického patra (H):** Hodnota definující potřebnou délku kolony pro dosažení jednoho teoretického patra, využívá se k porovnání kolon různých délek. Obvykle se vyjadřuje v μm .
- **Asymetrie píku:** Vyjadřuje míru souměrnosti píku. Je vyjádřena buď pomocí **faktoru chvostování T_f** – tailing factor – (šířka píku v 5 % výšky ku dvojnásobku šířky vzestupné části), nebo pomocí **faktoru asymetrie A** (poměr šířky sestupné části píku k vzestupné části píku v 5 či 10 % výšky píku). [21, 27]

2.3.4. UHPLC

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, Ultra-High Performance Liquid Chromatography) je jednou z moderních úprav HPLC. Specifické konstrukční řešení UHPLC systému umožňuje pracovat při tlacích nad 1300 bar (oproti 300 bar u HPLC), což je základním předpokladem pro efektivní využití stacionárních fází s velikostí částic menší než 2 μm . Tím je dosaženo vyšší separační účinnosti, zlepšení rozlišení píků a významného zkrácení doby analýzy při zachování stejné selektivity a kapacity separace. Stacionární fáze musí být vysoce chemicky a mechanicky odolná. Stejně jako u HPLC lze kromě celkově porézních částic využít také povrchově porézní částice s neporézním jádrem (core-shell částice) pro zlepšení účinnosti separace. [21, 28]

2.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (**MS, Mass Spectrometry**) je fyzikálně-chemická metoda, jejímž principem je převedení molekul na ionty, rozdělení těchto iontů dle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) a nakonec měření množství vytvořených iontů. MS poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o měřených analytech (i ve velmi nízkých koncentracích). Hmotnostní spektrometry se hojně využívají ve spojení s HPLC systémem, jelikož neslouží pouze jako univerzální detektory, ale prostřednictvím fragmentačních spekter poskytují strukturní informace o daném analytu. [13, 29, 30]

2.4.1. Instrumentace MS

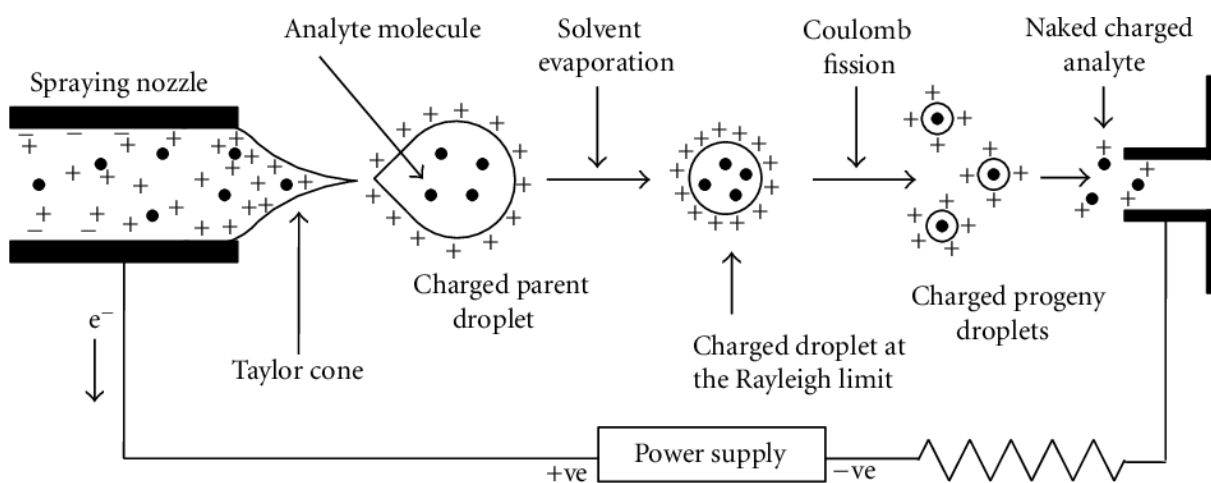
Hlavními součástmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor iontů. Celý systém je řízen počítačovým softwarem. [29]

2.4.1.1. Iontový zdroj

Hmotnostní analyzátor dokáže zpracovat pouze analyty v nabitě formě (ionty). Z tohoto důvodu vstupují molekuly analytu nejprve do iontového zdroje, kde jsou ionizovány. Ionizace může probíhat za atmosférického tlaku nebo za vakua. Z pohledu mechanismu převodu látek z neutrálního stavu do formy iontů rozdělujeme dva základní typy ionizačních technik – tvrdé a měkké. Tvrdé ionizační techniky jsou vysoce energetické a způsobují rozsáhlou fragmentaci molekulárních iontů, patří zde např. elektronová ionizace či chemická

ionizace. Tento typ ionizace se využívá výhradně ve spojení s plynovou chromatografií. Měkké ionizační techniky umožňují ionizaci molekul bez jejich fragmentace. Mezi tyto techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ty jsou také nejčastěji využívány v LC-MS bioanalýze. [13, 31, 32]

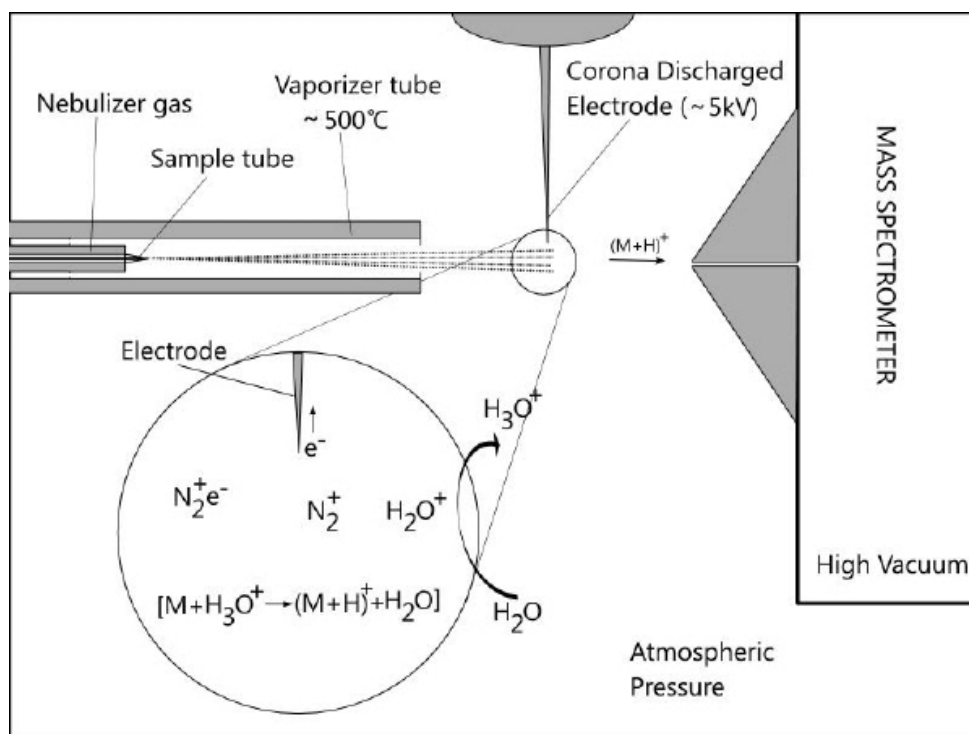
- Ionizace elektrosprejem (ESI, Electrospray Ionization):** ESI probíhá za atmosférického tlaku a využívá se pro středně polární až polární sloučeniny. Mobilní fáze s analyty z chromatografické kolony vstupuje do iontového zdroje kapilárou, na jejíž konec je vloženo vysoké napětí (3-6 kV). Současně je na konci kapiláry přiváděn plyn (nejčastěji dusík), který způsobí rozprášení mobilní fáze (nebulizaci) – z kapiláry tedy vystupují nabitě kapičky. V důsledku vypařování mobilní fáze se kapičky postupně zmenšují a zvyšují se odpudivé síly mezi stejně nabitými ionty, až dojde k překročení povrchového napětí (Rayleighův limit) a následné explozi kapiček na menší částice (coulombická exploze). Tento proces se několikrát opakuje, až se ionty analytu uvolňují z malých kapiček elektrostatickou repulzí a vstupují do hmotnostního analyzátoru. Výsledné molekulové ionty v pozitivním módu jsou $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, atd. nebo $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+CH_3COO]^-$, atd. pro negativní mód (M je molekulová hmotnost sloučeniny, H je hmotnost protonu). Schematický princip ESI je znázorněn na Obr. 9. [13, 29, 31]



Obr. 9: Princip ESI [33]

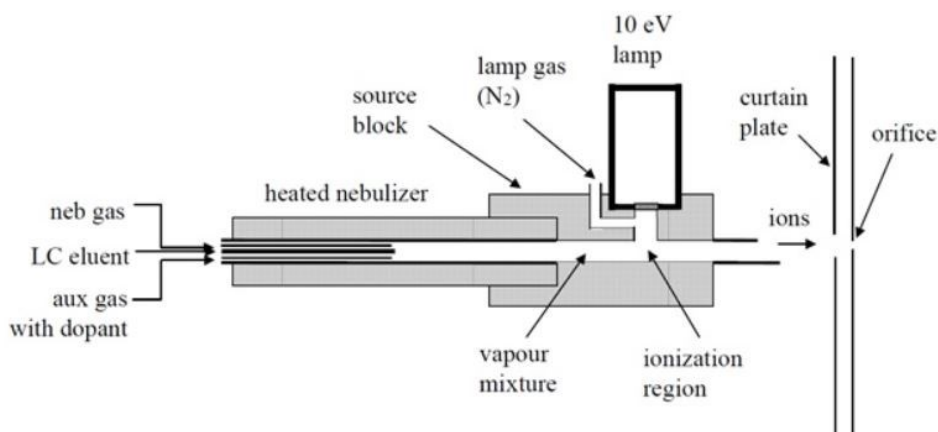
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization):** APCI se používá pro středně polární až nepolární látky s molekulovou hmotností do 1500 Da. Mobilní fáze s analyty je nejprve zmlžena proudem dusíku za vzniku aerosolu. Kapičky aerosolu jsou dále vedeny temperovanou kapilárou (400-500 °C), kde dochází k postupnému odpařování mobilní fáze. Součástí iontového zdroje je kovová jehla s vloženým vysokým napětím (3-4 kV), které způsobuje koronový výboj a umožňuje ionizaci. Nejprve jsou ionizovány molekuly dusíku, které následně způsobí ionizaci molekul vody (z mobilní fáze), které přenášejí náboj na molekuly analytu – vznikají ionty

$[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$. Celý proces probíhá za atmosférického tlaku. Princip APCI je znázorněn na Obr. 10. [13, 31]



Obr. 10: Princip APCI [34]

- Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, Atmospheric Pressure Photoionization):** APPI je technika podobná APCI a využívá se pro malé nepolární sloučeniny, probíhá za atmosférického tlaku. Převodění kapalně fáze v plynnou probíhá stejným způsobem jako u APCI, k ionizaci se ale namísto koronového výboje z jehly využívá UV lampa (např. kryptonová výbojka). Energie fotonů je přenesena přímo na molekuly analytu (přímá ionizace), do rozpouštědla (ionizace z rozpouštědla na analyt) nebo do dopantu (ionizace z dopantu na analyt), pokud se použije (nejčastěji toluen a aceton). Princip APPI je znázorněn na Obr. 11. [13, 31]



Obr. 11: Princip APPI [35]

2.4.1.2. Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor pracuje pod vysokým vakuem a rozděluje jednotlivé ionty na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). U vícenásobně nabitých iontů jsou hodnoty m/z pouze zlomkem jejich skutečné molekulové hmotnosti. Výkon hmotnostního analyzátoru je popsán základními parametry: rozlišení, správnost určení hodnoty m/z , rychlost skenování, lineární dynamický rozsah a hmotnostní rozsah. [13, 29, 31]

Rozlišení (R) popisuje schopnost poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou m/z , vypočítá se jako podíl hmotnosti iontu (m) a šířky píku v polovině jeho výšky (Δm).

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Správnost určení m/z (E) vyjadřuje míru shody mezi naměřenou a teoretickou m/z . Vypočítá se jako podíl rozdílu mezi naměřenou a teoretickou hodnotou m/z (δm) ku teoretické hodnotě m/z ($m_{theoretical}$). Hodnota E může nabývat pozitivních či negativních hodnot, ideální je hodnota blíží se nule.

$$E = \left(\frac{\delta m}{m_{theoretical}} \right) * 10^6 ppm$$

Rychlost skenování je určena dobou skenovacího cyklu. Doba cyklu je doba potřebná ke získání hmotnostního spektra a udává se v jednotkách Hertz (Hz). Rychlost skenování může být až několik stovek hertzů.

Lineární dynamický rozsah je rozsah koncentrací, ve kterém je odezva lineárně závislá.

Hmotnostní rozsah je rozsah hodnot m/z , ve kterém analyzátor zaznamenává spektra. [13, 36, 37, 38]

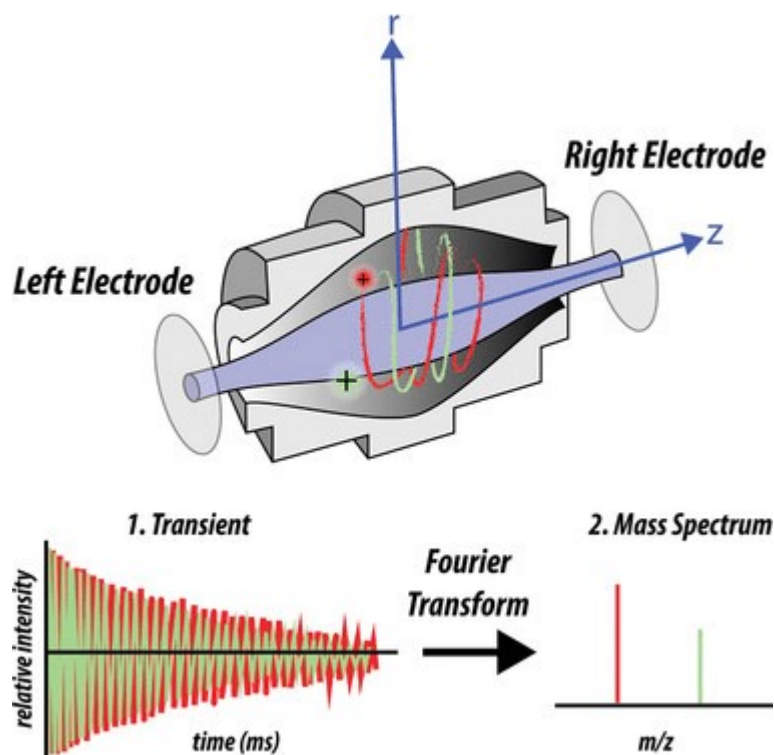
Dělení iontů podle m/z , které v hmotnostních analyzátoch probíhá za vysokého vakua, lze dosáhnout na podkladě různých fyzikálních principů s využitím elektrických nebo magnetických polí. Hmotnostní analyzátoy rozdělujeme na několik základních typů: [31]

- **Kvadrupólový analyzátor (Q, Quadrupole):** Kvadrupól se skládá ze čtyř stejných pravidelně uspořádaných kovových tyčí, umístěných paralelně k sobě. Na tyče je vloženo stejnosměrné napětí, na dvě protilehlé kladné, na další dvě záporné, dále je na tyče vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Tím je vytvořeno oscilující elektromagnetické pole, do něhož vstupují ionty z iontového zdroje. Ionty oscilují mezi tyčemi a kvadrupólem projdou pouze ionty o určité m/z se stabilní trajektorií, u ostatních iontů dojde ke kolizi na tyčích kvadrupólu a ionty nejsou detekovány. Rozlišovací schopnost kvadrupólu je nízká (do 5 000), hmotnostní rozsah do 3 000. [13, 29, 38]

Další možností je využití tandemového seskupení kvadrupólu – **trojitý kvadrupól (QqQ)**. První a třetí kvadrupól slouží jako hmotnostní analyzátoy, prostřední kvadrupól jako kolizní cela. V prvním kvadrupólu jsou ionty filtrovány podle hmotnosti, poté vybrané ionty vstupují do kolizní cely a pomocí přiváděného plynu dochází k jejich fragmentaci. Fragmentované ionty vstupují do třetího kvadrupólu a jsou děleny podle m/z . Výhodou trojitého kvadrupólu je vysoká selektivita a citlivost. [13]

- **3D iontová past (IT, 3D-Ion Trap):** Je tvořena centrální kruhovou elektrodou a dvěma koncovými elipsoidními elektrodami – ve své podstatě odpovídá 3D uspořádání kvadrupólu. Mezi elektrodami je oscilující elektrické pole, do něhož vstupují ionty vysokou rychlostí. Uvnitř analyzátoru je helium, které v důsledku srážek odebírá iontům kinetickou energii a stabilizuje jejich pohyb v pasti. Kolize s heliem je mírná, tudíž nezpůsobí fragmentaci iontů. Na rozdíl od kvadrupólového analyzátoru mohou být v iontové pasti zachyceny ionty různých hmotností, ne pouze ionty o určité m/z . Zvyšováním napětí na elektrodách dochází k postupnému vypuzování iontů směrem k detektoru. 3D iontová past se využívá zejména v kvalitativní analýze. Rozlišovací schopnost je nízká (2 000-4 000), hmotnostní rozsah do 6 000. [13, 31, 38]
- **Lineární (2D) iontová past (LIT, Linear Ion Trap):** LIT je kombinací kvadrupólu a iontové pasti – na obou koncích kvadrupólového analyzátoru jsou umístěny elektrody, které umožňují prostorovou stabilizaci iontů uvnitř pasti. Ionty jsou také zpomalovány inertním plynem, létají mezi koncovými elektrodami a zároveň oscilují mezi tyčemi. Výhodou oproti 3D iontové pasti je mnohem vyšší účinnost i kapacita zachycení iontů (více než 50 %, u 3D-IT pouze 5 %). Tím je dosaženo vyšší citlivosti měření a lineárního dynamického rozsahu. [31]
- **Analyzátor doby letu (TOF, Time Of Flight):** Hodnota m/z iontů je v TOF analyzátoru určena jejich dobou letu od místa urychlení přes letovou trubici po dopad na detektor. Ionty jsou přiváděny z iontového zdroje do letové trubice, kde jsou akcelerovány napěťovým pulzem – pulzní extrakce je založena na pulzním elektrickém poli mezi dvěma deskami (odpuzovací deska a extrakční mřížka). Z extrakční mřížky ionty vstupují do trubice, kde již není elektrické pole a ionty si udržují stálou rychlost, kterou do letové trubice vstoupily. Protože jsou všechny ionty akcelerovány stejnou kinetickou energií, hodnota m/z je nepřímo úměrná době letu (lehčí ionty mají vyšší rychlost, a tím kratší dobu letu). Pro zlepšení rozlišení se využívá iontové zrcadlo (reflektron). U lineárního TOF není rozlišení příliš vysoké (1 000-3 000), s použitím reflektoru se rozlišovací schopnost zvyšuje až na 15 000-25 000. [13, 29, 38]
- **Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR, Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance):** Tento analyzátor využívá k zachycení a udržení iontů magnetické pole. Je tvořen šesti vodivými deskami uspořádanými do krychle, která je vložena do silného magnetického pole vytvořeného supravodivým magnetem. Ionty se pohybují ve spirálovitých drahách kolmých na magnetické pole tzv. cyklotronovou frekvencí. Frekvence pohybu iontů je závislá na jejich m/z . FT-ICR má velmi vysokou rozlišovací schopnost (1-20 milionů) a hmotnostní rozsah 4 000-10 000. [13, 38]
- **Elektrostatická orbitální past (Orbitrap):** Orbitrap je nejnovější hmotnostní analyzátor a je kombinací iontové pasti a FT-ICR. Orbitrap poskytuje mnohem vyšší rozlišení (100 000 – 1 000 000) oproti základním typům analyzátorů a velmi dobrý hmotnostní rozsah (6 000). Je tvořen vnější elektrodou tvaru barelu, rozdělenou na dvě stejné části oddělené velmi tenkou šterbinou a centrální

vřetenovitou elektrodou. Mezi vnější a centrální elektrodu je vloženo napětí, které mezi nimi vytváří elektrické pole. Ionty vstupující do elektrického pole se pohybují po stabilních trajektoriích okolo a podél centrální elektrody. Frekvence axiální oscilace iontů je závislá pouze na jejich m/z . Pohybující se ionty vytváří indukující proud na vnějších elektrodách. Po amplifikaci signálu a Fourierově transformaci je získáno hmotnostní spektrum. Schéma Orbitrapu je znázorněno na Obr. 12. [29, 31, 32, 38]



Obr. 12: Schéma orbitální pasti [39]

2.4.1.3. Detektor

Ionty z hmotnostního analyzátoru vstupují do detektoru, kde jsou detekovány a přeměněny do vhodného signálu. Proces detekce probíhá pod vakuem a výsledkem je hmotnostní spektrum. Nejvyžívanějšími detektory jsou **elektronásobič**, **fotonásobič** a **Faradayova klec**. FT-ICR a orbitální past detektory nepotřebují, protože analyzátorů přímo zaznamenávají indukovaný proud s následnou přeměnu proudu na signál. [31, 32]

2.4.2. Skenovací módy

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu lze v hmotnostní spektrometrii využít různých skenovacích módů. **Sken celého spektra (Full Scan)** zaznamenává všechny ionty v daném rozsahu m/z . Využívá se zejména u vysokorozlišovacích přístrojů, kdy vzniklé hmotnostní spektrum poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o iontu. Přístroje s nízkým rozlišením neposkytují dostatečné informace. Pro získání informací o konkrétním iontu se využívá **selektivní záznam iontu (SIM, selected ion monitoring)**, kdy je monitorována konkrétní hodnota m/z . Výsledkem je závislost intenzity signálu na určité m/z . Při fragmentaci iontu a sledování vybraného fragmentu využíváme **záznam vybraných reakcí (SRM,**

selected reaction monitoring) – pokud probíhá reakcí více, nazývá se také **multiple reaction monitoring (MRM)**. Stanoví se intenzita specifické hodnoty m/z fragmentu. SRM se využívá v kvantitativní analýze. Mezi další módy patří **sken produktových iontů** (sledujeme produktové ionty vzniklé fragmentací vybraného prekurzorového iontu), **skan prekurzorových iontů** (sledujeme spektrum všech prekurzorových iontů, z kterých vzniká určitý fragment) a **skan neutrálních ztrát** (sledujeme prekurzory, které ztrácí neutrální částici, využívá se u strukturně podobných látek). [13, 19, 21]

2.5. Validace bioanalytické metody

Validace analytické metody je proces k získání důkazu o vhodnosti metody pro zamýšlené použití. Validací proces má zaručit, že daná metoda splňuje předem definované požadavky a produkuje spolehlivé výsledky. Validace bioanalytické metody se nejčastěji provádí podle směrnic *Guideline on Bioanalytical Method Validation* (EMA, European Medicines Agency, vydána v roce 2011) [40] a *Bioanalytical Method Validation; Guidance for Industry* (FDA, Food and Drug Administration, vydána v roce 2018) [41]. Ve farmaceutické praxi se dále využívá validační směrnice ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). [14]

Směrnice EMA 2011 a FDA 2018 jsou si velmi podobné – validační kritéria a parametry jsou v podstatě totožné. Na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK, kde probíhal vývoj metody, se v bioanalytické praxi využívá směrnice EMA 2011, která je již dlouho etablována. Validací parametry této směrnice jsou selektivita, přenos analytů, spodní limit kvantifikace, kalibrační křivka, přesnost, preciznost, diluční integrita, matricové efekty a výtěžnost, stabilita. [40, 41, 42]

2.5.1. Selektivita (Selectivity)

Selektivita je schopnost metody odlišit analyzované látky a IS (vnitřní standard, Internal Standard) od endogenních složek v matrici či jiných složek ve vzorku. Selektivita se prokazuje pomocí minimálně šesti různých blankových vzorků (pouze biologická matrice bez analytu a IS), které jsou jednotlivě analyzovány a hodnoceny. Selektivita metody je prokázána, pokud je odezva interferujících složek matrice menší než 20 % LLOQ (spodní limit kvantifikace, Lower Limit of Quantification) analytu a 5 % pro IS. [40]

2.5.2. Přenos analytů (Carry-Over)

Přenos analytu z jedné analýzy do druhé se posuzuje nástřikem blankových vzorků po vzorku o vysoké koncentraci nebo kalibračním standardu horního limitu kvantifikace (ULOQ, Upper Limit of Quantification). Přenos analytu do blankového vzorku nesmí přesáhnout 20 % LLOQ, u IS do 5 %. [40]

2.5.3. Spodní limit kvantifikace (LLOQ, Lower Limit of Quantification)

LLOQ představuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, kterou lze stanovit s definovanou přesností a precizností. LLOQ je nejnižším kalibračním bodem a signál analytu by měl být nejméně 5x větší než signál blankového vzorku. [40]

2.5.4. Kalibrační křivka (Calibration Curve)

Kalibrační křivka vyjadřuje závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu. Kalibrační standardy se připraví přidáním známých koncentrací analytu do blankové matrice. Koncentrace vzorků se volí podle předpokládaného koncentračního rozmezí měřeného analytu, přičemž pro každý analyt se vytvoří vlastní kalibrační křivka. Rozsah koncentrací je vymezen spodním limitem kvantifikace (LLOQ) a horním limitem kvantifikace (ULOQ). Kalibrační křivka sestává z minimálně šesti kalibračních standardů, ze slepého vzorku (blank, matrice bez analytu a IS) a z nulového vzorku (matrice s IS bez analytu). Kalibrační křivky jsou získány z nejméně tří měření. Sestavená kalibrační závislost by měla být ideálně lineární (nelineární modely jsou však akceptovatelné) a doplněna o zpětný přepočítání koncentrací. Zpětný přepočítání koncentrací má povolenou odchylku 15 % od dané hodnoty, u LLOQ je tato odchylka 20 %, přičemž toto kritérium musí splnit alespoň 75 % kalibračních standardů (minimum je 6 bodů). [40]

2.5.5. Přesnost (Accuracy)

Přesnost popisuje těsnost shody mezi průměrnou stanovenou hodnotou koncentrace a hodnotou nominální (skutečnou), vyjadřuje se v procentech. Přesnost se posuzuje u vzorků pro kontrolu kvality (QC vzorky, Quality Control) se známým množstvím analytu. QC vzorky se vyhodnotí pomocí kalibrační křivky a získané koncentrace se porovnávají s nominální hodnotou. Měření přesnosti se provádí v rámci jednoho cyklu (Within-run accuracy) a mezi všemi cykly (Between-run accuracy). Přesnost v jednom cyklu se stanovuje analýzou nejméně pěti vzorků o minimálně 4 koncentracích, pokrývajících rozsah kalibrační křivky: LLOQ, nízká hodnota QC (maximálně trojnásobek LLOQ), střední hodnota QC (30-50 % rozsah kalibrační křivky) a vysoká hodnota QC (nejméně 75 % rozsahu kalibrační křivky). Průměrná koncentrace má povolenou odchylku 15 % od dané koncentrace QC, 20 % pro LLOQ. Pro přesnost mezi cykly se vyhodnocují vzorky z nejméně tří sérií. [40]

2.5.6. Preciznost (Precision)

Preciznost popisuje těsnost shody výsledků mezi měřeními jednotlivých QC vzorků o dané nominální koncentraci. Vyjadřuje se jako variační koeficient (CV) a provádí se pro stejné vzorky jako u stanovení přesnosti. Měření preciznosti v jednom cyklu (Within-run precision) se provádí pro vzorek LLOQ a vzorky QC o nízké, střední a vysoké koncentraci. CV nesmí přesáhnout 15 % odchylku od QC a 20 % od LLOQ. Pro preciznost mezi cykly (Between-run precision) se ověřují vzorky minimálně ze tří sérií. [40]

2.5.7. Diluční integrita (Dilution Integrity)

Diluční integrita prokazuje, zda naředění vzorku neovlivní přesnost a preciznost měření. Prokazuje se přidáním analytu o koncentraci vyšší než ULOQ do matrice s následným naředěním blankovou matricí. Povolená odchylka pro přesnost a preciznost je 15 %. [40]

2.5.8. Matricové efekty (Matrix Effect) a Výtěžnost (Recovery)

Matricové efekty se prokazují zejména pro hmotnostní spektrometrii s použitím alespoň 6 blankových matric od individuálních dárců. Pro každý analyt a IS každé šarže se vypočítá matriční faktor (MF, Matrix Factor), a to jako poměr plochy píku analytu či IS přidaného do blankové matrice po úpravě ku ploše píku čistého roztoku analytu či IS. Poměrem MF analytu a MF IS získáme vnitřním standardem normalizovaný MF_N . Měření se provádí alespoň na dvou koncentračních hladinách. Variační koeficient normalizovaného MF_N ze šesti šarží by neměl být vyšší než 15 %. [40]

Směrnice EMA 2011 explicitně neřeší výtěžnost metody. Její hodnocení je proto provedeno dle směrnice FDA 2018 [41]. Výtěžnost (Recovery) se prokazuje k zajištění účinnosti a reprodukovatelnosti extrakční metody. Porovnávají se výsledky analýzy extrahovaných vzorků s analytem přidaným před extrakcí a extrakty s analytem přidaným po extrakci. Výtěžnost nemusí být 100 %, ale musí být konzistentní a reprodukovatelná.

2.5.9. Stabilita (Stability)

Stabilita se vyhodnocuje k ověření toho, zda příprava vzorku, analýza a podmínky skladování neovlivňují koncentraci analytů. Hodnocení se provádí pomocí vzorků QC o nízké a vysoké koncentraci (maximálně trojnásobek LLOQ a hodnota blízká ULOQ). Vzorky jsou analyzovány ihned po přípravě a následně po skladování za daných podmínek hodnocení. Vzorky QC se porovnávají na základě kalibrační křivky a získané koncentrace jsou porovnávány s nominálními koncentracemi, přičemž povolená odchylka je 15 %. Dle směrnice se provádějí následující zkoušky stability:

- Stabilita zásobního roztoku a pracovních roztoků analytu a IS.
- Stabilita v autosampleru
- Stabilita analytu v matrici při zamrazení a rozmrazení.
- Krátkodobá stabilita analytu v matrici při pokojové teplotě nebo teplotě, při které se vzorek zpracovává.
- Dlouhodobá stabilita analytu v matrici v mrazničce. [40]

3. Cíle práce

Diplomová práce se zabývá vývojem a validací analytické metody pro stanovení vybraných benzodiazepinů a zolpidemu v biologickém materiálu (krevní sérum). Mezi cíle diplomové práce patří:

- Vývoj a optimalizace extrakčních podmínek vybraných benzodiazepinů (alprazolam, bromazepam, diazepam, chlordiazepoxid, klonazepam, midazolam, oxazepam) a zolpidemu.
- Validace bioanalytické metody pro použití v klinické praxi s využitím ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem (UHPLC-HRMS).
- Ověření spolehlivosti validované metody účastí v cyklu externího hodnocení kvality se získáním certifikátu.

4. Experimentální část

4.1. Přístroje, pomůcky a chemikálie

4.1.1. Přístroje a pomůcky

- Automatické pipety Finnpiquette F1, Thermo Scientific, Finsko (2-20 μ l, 20-200 μ l, 10-100 μ l, 100-1 000 μ l, 5-50 μ l)
- Špičky k automatickým pipetám Finntip Flex 200, Finntip Flex 1 000
- Třepačka (Vortex) IKA Vibrax VXR Basic (typ VX2E), Německo
- Centrifuga Sigma, Německo
- Ultrazvuková lázeň Transsonic 420, Německo
- Vakuová odparka Christ, Německo
- Polypropylenové zkumavky (PP zkumavky) 2 ml, Sarstedt, Německo
- Laboratorní sklo (kádinky, vialky, inzerty, lahve na roztoky)
- UHPLC-HRMS Q-Exactive Focus, ThermoFisher Scientific, Německo

4.1.2. Chemikálie

4.1.2.1. Standardy

- Alprazolam roztok (A-903, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM
- Bromazepam roztok (B-903, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM
- Diazepam roztok (D-907, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM
- Chlordiazepoxid roztok (C-022, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM
- Klonazepam roztok (C-907, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM
- Midazolam roztok (M-908, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM
- Oxazepam roztok (O-902, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM
- Zolpidem roztok (Z-017, Cerilliant), 1.0 mg/ml v methanolu, ampule 1 ml, CRM

4.1.2.2. Vnitřní standardy

- Alprazolam-d₅ (roztok 100 μ g/ml v MeOH, CRM, Supelco)
- Diazepam-d₅ (roztok 100 μ g/ml v MeOH, CRM, Supelco)
- Klonazepam-d₄ (roztok 100 μ g/ml v MeOH, CRM, Supelco)
- Reserpin (CRM, Supelco)
- Zolpidem-d₆ (roztok 100 μ g/ml v MeOH, CRM, Supelco)
- Sufentanil-d₅ (roztok 100 μ g/ml v MeOH, CRM, Supelco)

4.1.2.3. Rozpouštědla

- Acetonitril, LC-MS Chromasolv (Honeywell)
- Dichlormethan, Fluka
- Ethylacetát, LC-MS Chromasolv (Honeywell)

- Hexan, Chromasolv (Honeywell)
- Isopropanol, Lichrosolv (Merck)
- Methanol, LC-MS Chromasolv (Honeywell)
- MTBE (methyl-terc-butyléter), anhydrous 99,8 %, Sigma-Aldrich

4.1.2.4. Ostatní

- Hydroxid sodný 0,5 mol/l, anhydrous 98 %, Sigma-Aldrich
- Ultračistá voda
- ZnSO₄ 40 mM v MeOH 66%

4.2. Pracovní postupy

4.2.1. Příprava roztoků

4.2.1.1. Příprava směsných kalibrátorů

Koncentrace zakoupených certifikovaných referenčních materiálů (zásobních roztoků) byla pro všechny měřené analyty (standardy) 1 mg/ml v MeOH. Pro validační účely bylo připraveno 10 směsných kalibračních roztoků. Smísením vypočítaných objemů zásobních roztoků s methanolem byl připraven směsný kalibrátor nejvyšší koncentrace K₁₀, z něj byly poté dalším ředěním připraveny směsné kalibrátory o nižších koncentracích K₉-K₁. Pro měření se využíval vzorek (95 μl) s přídatkem 5 μl směsného kalibrátoru. Zásobní roztoky a směsné kalibrátory byly uloženy v mrazicím boxu při -20 °C. Koncentrace směsných kalibrátorů a výsledné koncentrace standardů ve vzorku jsou uvedeny v Tab. 1 a Tab. 2.

Standard	Koncentrace standardů v kalibračních roztocích K ₁ -K ₁₀ [ng/ml]									
	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	K ₉	K ₁₀
Alprazolam	80	140	245	429	750	1 313	2 298	4 021	12 315	14 800
Bromazepam	160	280	490	858	1 501	2 626	4 596	8 042	24 630	29 600
Diazepam	320	560	980	1 715	3 001	5 252	9 191	16 085	49 260	59 100
Chlordiazepoxid	320	560	980	1 715	3 001	5 252	9 191	16 085	49 260	59 100
Klonazepam	80	140	245	429	750	1 313	2 298	4 021	7 037	8 400
Midazolam	160	280	490	858	1 501	2 626	4 596	8 042	14 074	16 900
Oxazepam	320	560	980	1 715	3 001	5 252	9 191	16 085	49 260	59 100
Zolpidem	80	140	245	429	750	1 313	2 298	4 021	12 315	14 800

Tab. 1: Koncentrace směsných kalibrátorů

Standard	Výsledné koncentrace standardů ve vzorku [ng/ml]									
	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇	K ₈	K ₉	K ₁₀
Alprazolam	4,0	7,0	12,3	21,4	37,5	65,7	114,9	201,1	351,9	615,7
Bromazepam	8,0	14,0	24,5	42,9	75,0	131,3	229,8	402,1	703,7	1 231,5
Diazepam	16,0	28,0	49,0	85,8	150,1	262,6	459,6	804,2	1 407,4	2 463,0
Chlordiazepoxid	16,0	28,0	49,0	85,8	150,1	262,2	459,6	804,2	1 407,4	2 463,0
Klonazepam	4,0	7,0	12,3	21,4	37,5	65,7	114,9	201,1	351,9	615,7
Midazolam	8,0	14,0	24,5	42,9	75,0	131,3	229,8	402,1	703,7	1 231,5
Oxazepam	16,0	28,0	49,0	85,8	150,1	262,6	459,6	804,2	1 407,4	2 463,0
Zolpidem	4,0	7,0	12,3	21,4	37,5	65,7	114,9	201,1	351,9	615,7

Tab. 2: Výsledné koncentrace standardů ve vzorku

4.2.1.2. Příprava směsného vnitřního standardu

Při vývoji metody byly použity různé vnitřní standardy (IS). Jako izotopicky značené IS se využily alprazolam-d₅, diazepam-d₅, klonazepam-d₄, zolpidem-d₆, sufentanil-d₅ a neznačený reserpin. Koncentrace pracovních roztoků pro alprazolam-d₅ a sufentanil-d₅ byla 10 000 ng/ml, která byla připravena ředěním ze zakoupených zásobních roztoků o koncentraci 100 000 ng/ml. Roztok reserpinu byl připraven navážením potřebného množství pevného reserpinu a rozpuštěním v methanolu na koncentraci 100 000 ng/ml. Koncentrace ostatních zakoupených zásobních roztoků IS byla rovněž 100 000 ng/ml. Smísením zásobních roztoků a doplněním methanolem do objemu 500 µl byl připraven směsný roztok vnitřních standardů (BZDZ-IS). Množství směsného IS, přidávaného ke všem typům vzorků, činilo 5 µl ke 100 µl biologického materiálu (séra). Zásobní roztoky a směsné IS byly uloženy v mrazicím boxu při -20 °C. Koncentrace vnitřních standardů ve směsném IS a výsledné koncentrace ve vzorku jsou uvedeny v Tab. 3 a Tab. 4.

Při vývoji a validaci metody byl také využíván acetonitril s obsahem BZDZ-IS – acetonitril zde sloužil jako precipitačního činidlo (ACN s BZDZ-IS). ACN s BZDZ-IS byl připraven smísením 0,125 ml BZDZ-IS s ACN do celkového objemu 10 ml – celkové množství ACN v tomto smíseném IS činilo 98,75 %. Množství ACN s BZDZ-IS přidávaného ke vzorkům činilo 400 µl.

IS	Koncentrace [ng/ml]
Alprazolam-d ₅	400
Diazepam-d ₅	4 000
Klonazepam-d ₄	800
Reserpin	2 000
Zolpidem-d ₆	2 000
Sufentanil-d ₅	1 000

Tab. 3: Koncentrace vnitřních standardů ve směsném IS

IS	Výsledné koncentrace ve vzorku [ng/ml]
Alprazolam-d ₅	20
Diazepam-d ₅	200
Klonazepam-d ₄	40
Reserpin	100
Zolpidem-d ₆	100
Sufentanil-d ₅	50

Tab. 4: Výsledné koncentrace IS ve vzorku

4.2.1.3. Příprava QC roztoků

Při vývoji metody byly za účelem validace připraveny kontrolní roztoky QC (Quality Control), a to ve čtyřech koncentracích (LLOQ, QCA, QCB a QCC) pokrývajících rozsah kalibrační křivky dle směrnice EMA. QC roztok nejvyšší koncentrace (QCC) byl připraven ze směsného kalibrátoru K₁₀ naředěním methanolem a představoval 75 % rozsahu kalibrační křivky. QCB roztok byl připraven dalším ředěním methanolem a představoval střední hodnotu rozsahu kalibrační křivky. Dalším ředěním byl připraven roztok QCA a jeho hodnota činila 2,5násobek hodnoty LLOQ. Roztok LLOQ, představující spodní limit kvantifikace, odpovídal hodnotou směsnému kalibrátoru K₁. QC roztoky včetně LLOQ byly uloženy v mrazicím boxu při -20 °C. Koncentrace standardů ve směsných QC roztocích a výsledné koncentrace QC ve vzorku jsou uvedeny v Tab. 5 a Tab. 6.

Standard	Koncentrace [ng/ml]			
	LLOQ	QCA	QCB	QCC
Alprazolam	80	200	900	8 445
Bromazepam	160	400	1 801	16 889
Diazepam	320	800	3 602	33 778
Chlordiazepoxid	320	800	3 602	33 778
Klonazepam	80	200	900	8 445
Midazolam	160	400	1 801	16 889
Oxazepam	320	800	3 602	33 778
Zolpidem	80	200	900	8 445

Tab. 5: Koncentrace standardů ve směsných QC roztocích

Standard	Výsledné koncentrace ve vzorku [ng/ml]			
	LLOQ	QCA	QCB	QCC
Alprazolam	4,0	10,0	45,0	422,2
Bromazepam	8,0	20,0	90,0	844,5
Diazepam	16,0	40,0	180,1	1 688,9
Chlordiazepoxid	16,0	40,0	180,1	1 688,9
Klonazepam	4,0	10,0	45,0	422,2
Midazolam	8,0	20,0	90,0	844,5
Oxazepam	16,0	40,0	180,1	1 688,9
Zolpidem	4,0	10,0	45,0	422,2

Tab. 6: Výsledné koncentrace QC ve vzorku

4.2.2. Vývoj extrakční metody

4.2.2.1. Optimalizace extrakčních podmínek

Během vývoje metody pro úpravu vzorku před vlastní analýzou se testovaly: extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) v neutrálním a zásaditém prostředí a proteinová precipitace (PP). Všechny vzorky pro extrakční experimenty byly připravovány v triplikátu. Hlavními požadavky kladenými na extrakční metodu byla jednoduchá a rychlá proveditelnost, dostatečná výtěžnost a opakovatelnost. V rámci vývoje byla testována různá organická rozpouštědla a jejich kombinace.

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) v neutrálním prostředí

Během testování LLE byla použita následující extrakční činidla: ethylacetát, dichlormethan, hexan, MTBE. Dále byly zkoušeny směsi: ethylacetát:dichlormethan (8:2), hexan:ethylacetát (5:5), ethylacetát:MTBE (7:3), hexan:ethylacetát (94:6), ethylacetát:dichlormethan:MTBE (6:2:2), ethylacetát:dichlormethan (5:5).

K 95 µl blankového séra bylo přidáno 5 µl roztoku QCA a 500 µl extrakčního činidla. Poté byly vzorky třepány 10 minut na vortexu (rychlostí 1 500 ot/min) a následně 5 minut centrifugovány (rychlostí 15 000 ot/min při 20 °C). Po oddělení vrstev bylo odebráno 300 µl organické fáze do PP zkumavky a vloženo do vakuové odparky k odpaření do sucha (10-15 minut, 40 °C). Odparek byl poté rozpuštěn ve 100 µl směsi MeOH a vody v poměru 50:50, protřepán na vortexu (1 min, 800-1 000 ot/min), přenesen do vialky s inzertem a analyzován.

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) v zásaditém prostředí

LLE v zásaditém prostředí byla provedena za stejných podmínek a za použití stejných extrakčních činidel jako neutrální LLE, avšak ke vzorku bylo navíc přidáno 20 µl NaOH (0,5 mol/l).

K 95 µl blankového séra bylo přidáno 5 µl roztoku QCA, 20 µl NaOH a 500 µl extrakčního činidla. Poté byly vzorky třepány 10 minut na vortexu (rychlostí 1 500 ot/min)

a následně 5 minut centrifugovány (rychlostí 15 000 ot/min při 20 °C). Po oddělení vrstev bylo odebráno 300 µl organické fáze do PP zkumavky a vloženo do vakuové odparky k odpaření do sucha (10-15 minut, 40 °C). Odparek byl poté rozpuštěn ve 100 µl směsi MeOH a vody v poměru 50:50, protřepán na vortexu (1 min, 800-1 000 ot/min), přenesen do vialky s inzertem a analyzován.

Proteinová precipitace (PP)

Při proteinové precipitaci byla použita následující precipitační činidla: acetonitril, methanol, isopropanol, 40 mM ZnSO₄ v MeOH 66% a směs ACN:MeOH (50:50).

K 95 µl blankového séra bylo přidáno 5 µl roztoku QCA a 400 µl precipitačního činidla. Vzorky byly třepány 1 minutu na vortexu (rychlostí 1 500 ot/min), poté 5 minut centrifugovány (rychlostí 15 000 ot/min při 20 °C). Supernatant byl přenesen do vialky s inzertem a analyzován.

4.2.2.2. Výběr vhodného IS

Pro výběr vhodného IS byly připraveny 2 kalibrační řady. K 95 µl blankového séra bylo přidáno 5 µl kalibrátoru K₁-K₁₀ a následně 400 µl ACN s BZDZ-IS. ACN zde sloužil jako precipitační činidlo, které se ukázalo být nejvhodnější pro úpravu vzorku. Vzorky byly třepány 1 minutu na vortexu (rychlostí 1 500 ot/min), poté 5 minut centrifugovány (rychlostí 15 000 ot/min při 20 °C) a následně byl supernatant přenesen do vialky s inzertem a analyzován. Jako kalibrační bod K₀ bylo analyzováno čisté blankové sérum.

4.2.3. Validace

Při validaci byly testovány následující parametry: kalibrační závislost, přesnost a preciznost (QC vzorky), výtěžnost (Recovery), matricové efekty, stabilita v autosampleru a stabilita analytu v matrici při zamrazení a rozmrazení (Freeze-Thaw). Validace vycházela ze směrnice EMA, parametr výtěžnost ze směrnice FDA. Měření validace bylo provedeno ve třech setech (batch) během tří různých dnů. Schéma validace je uvedeno v Tab. 7.

Batch 1	Batch 2	Batch 3
Kalibrace	Kalibrace	Kalibrace
QC vzorky	QC vzorky	QC vzorky
	Recovery	Freeze-Thaw
	Matricové efekty	Autosampler stability

Tab. 7: Schéma validace

4.2.3.1. Kalibrace

Kalibrace byla měřena v každém validačním setu ve dvou sériích. Kalibrační body vycházely z řady kalibrátorů (K₁-K₁₀), z nultého kalibrátoru K₀ a slepého vzorku (C₀). Kalibrační vzorky K₁-K₁₀ byly připraveny přídatkem 5 µl příslušného kalibrátoru k 95 µl

blankového séra. Následně bylo přidáno 400 µl ACN s BZDZ-IS. Nultý kalibrátor K₀ byl připraven smísením 100 µl blankového séra s 400 µl ACN s BZDZ-IS. Slepý vzorek C₀ neobsahoval kalibrátor ani IS, byl připraven smísením 100 µl blankového séra s 400 µl ACN. Všechny vzorky byly 5 minut třepány na vortexu (1 500 ot/min), poté 5 minut centrifugovány (15 000 ot/min, 20 °C), následně byl supernatant přepipetován do vialky s inzertem a analyzován.

4.2.3.2. QC vzorky

Všechny QC vzorky (LLOQ, QCA, QCB, QCC) byly v každém validačním setu připraveny po šesti. K 95 µl blankového séra bylo přidáno 5 µl příslušného QC vzorku (LLOQ odpovídalo K₁) a následně 400 µl ACN s BZDZ-IS. Vzorky byly 5 minut třepány na vortexu (1 500 ot/min), poté 5 minut centrifugovány (15 000 ot/min, 20 °C), následně byl supernatant přepipetován do vialky s inzertem a analyzován.

4.2.3.3. Recovery

Pro měření výtěžnosti metody byly využity QC vzorky (QCA, QCB a QCC), přičemž bylo připraveno 6 vzorků pro každou z těchto koncentrací. Ke 100 µl blankového séra bylo přidáno 400 µl ACN, vzorky byly 5 minut třepány na vortexu (1 500 ot/min) a následně 5 minut centrifugovány (15 000 ot/min, 20 °C). 92 µl supernatantu bylo přepipetováno do nové PP zkumavky a byly přidány 4 µl příslušného QC vzorku a 4 µl směšného IS. Po promíchání byly vzorky přepipetovány do vialky s inzertem a analyzovány.

4.2.3.4. Matricové efekty

Pro měření matricových efektů byly rovněž využity QC vzorky (QCA, QCB, QCC), přičemž bylo připraveno 6 vzorků pro každou z těchto koncentrací. K 92 µl 80 % ACN byly přidány 4 µl příslušného QC vzorku a 4 µl směšného IS. Vzorky se promíchaly, byly přepipetovány do vialky s inzertem a analyzovány.

4.2.3.5. Stabilita analytu v matrici při zamrazení a rozmrazení (Freeze-Thaw)

Pro měření freeze-thaw stability byly využity 2 koncentrační hladiny (QCB a QCC vzorky), přičemž pro každou koncentraci bylo připraveno 6 vzorků. K 95 µl blankového séra bylo přidáno 5 µl příslušného QC vzorku. Ke třem vzorkům bylo přidáno 400 µl ACN s BZDZ-IS, poté byly vzorky 5 minut třepány na vortexu (1 500 ot/min), 5 minut centrifugovány (15 000 ot/min, 20 °C) a následně byl supernatant přepipetován do vialky s inzertem a analyzován. Zbylé tři vzorky byly zamrazeny na 30 minut při -20 °C, a poté rozmrazeny v teplé vodě. Tento postup byl 3x zopakován. Poté bylo přidáno 400 µl ACN s BZDZ-IS. Vzorky byly 5 minut třepány na vortexu (1 500 ot/min), 5 minut centrifugovány (15 000 ot/min, 20 °C) a následně byl supernatant přepipetován do vialky s inzertem a analyzován.

4.2.3.6. Stabilita v autosampleru

Pro měření stability v autosampleru byly využity 2 koncentrační hladiny (QCB a QCC vzorky), přičemž pro každou koncentraci bylo analyzováno 6 vzorků. K měření byly použity již připravené vzorky, které byly poté ponechány 24 hodin v autosampleru, znovu nastříknuty na kolonu a analyzovány.

4.3. UHPLC-HRMS analýza

Stanovení hladin vybraných benzodiazepinů a zolpidemu bylo prováděno na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením Q-Exactive Focus ve spojení s UHPLC. Vysoké rozlišení ($R = 70\,000$) a správnost určení m/z (<2 ppm s využitím interní kalibrace) zajistilo dostatečnou selektivitu metody bez nutnosti provádět fragmentaci analyzovaných molekul. Analyty byly stanovovány jako molekulové ionty $[M+H]^+$ ve Full-MS módu (sken celého spektra) v rozsahu m/z 70-900. Hmotnostní spektrometr, vybavený ionizačním zdrojem HESI-II (Heated-electrospray ionization), operoval v pozitivním módu ionizace s nastavením těchto parametrů: spray voltage + 3.5 kV; S-lens RF level + 70 V; capillary temperature 350 °C; aux gas heater temperature 350 °C; sheet gas flow 45 arbitrary units; auxiliary gas flow 15 arbitrary units.

Separace analytů probíhala na koloně Luna Omega 1,6 μm Polar C18 (50 x 2,1 mm ID; Phenomenex, Torrance, USA), chráněnou odpovídající předkolonkou (C18, Phenomenex) v gradientovém módu s rychlostí průtoku mobilní fáze 0,6 ml/min a při 45 °C. Složení mobilní fáze bylo následující: roztok A – 0,1% HCOOH; roztok B – ACN:MeOH (50:50) s obsahem 0,1% HCOOH. Program gradientu: 0 % B 0-0,5 min; 100 % B 0,5-3,5 min; proplach kolony při 100% organice a následná ekvilibrace do výchozích podmínek. Celková doba analýzy byla 5,5 minut. Přehled analytů je uveden v Tab. 8.

Standard	Sumární vzorec	$[M+H]^+$	R_t (min)
Alprazolam	$C_{17}H_{13}ClN_4$	309,09015	2,90
Bromazepam	$C_{14}H_{10}BrN_3O$	316,00800	2,58
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	285,07892	3,04
Chlordiazepoxid	$C_{16}H_{14}ClN_3O$	300,08982	2,32
Klonazepam	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	316,04835	2,79
Midazolam	$C_{18}H_{13}ClFN_3$	326,08548	2,49
Oxazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	287,05818	2,77
Zolpidem	$C_{19}H_{21}N_3O$	308,17574	2,30

Tab. 8: Přehled analytů

5. Výsledky

5.1. Optimalizace extrakčních podmínek

5.1.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny byla provedena pomocí extrakčních činidel ethylacetátu (EtAC), dichlormethanu (DCM), hexanu, methyl-terc-butyléru (MTBE) a jejich kombinací: ethylacetát:dichlormethan (8:2), hexan:ethylacetát (5:5), ethylacetát:MTBE (7:3), hexan:ethylacetát (94:6), ethylacetát:dichlormethan:MTBE (6:2:2) a ethylacetát:dichlormethan (5:5). Výtěžnost extrakce pro jednotlivá činidla byla získána na základě výpočtu poměru plochy analytu ve vzorku ku ploše analytu v čistém rozpouštědle. Vliv matricových efektů pro účely optimalizace extrakčních podmínek byl cíleně zanedbán. Výsledky procentuální výtěžnosti včetně směrodatné odchylky (SD) vypočítané z měření triplikátů jsou uvedeny v Tab. 9 a Tab. 10.

Extrakce byla nejprve testována v neutrálním prostředí za použití všech výše zmíněných činidel (Tab. 9). Nejméně vhodným činidlem byl hexan, který většinu standardů extrahoval v minimálním množství nebo vůbec. Nejvyšší výtěžnosti dosáhl u diazepam, a to pouze 43,4 %. Z čistých extrakčních činidel dosahoval nejvyšší výtěžnosti s přijatelnou opakovatelností ethylacetát, přičemž nejhorsích výsledků při extrakci do ethylacetátu dosáhl diazepam. Při testování směsí činidel se jako nevhodnější prokázala kombinace ethylacetát:dichlormethan:MTBE (6:2:2), která dosahovala vysoké výtěžnosti s velmi dobrou opakovatelností. Nejméně vhodná byla kombinace hexan:ethylacetát (94:6), kdy se výtěžnosti nad 50 % dosáhlo pouze u diazepam a midazolamu.

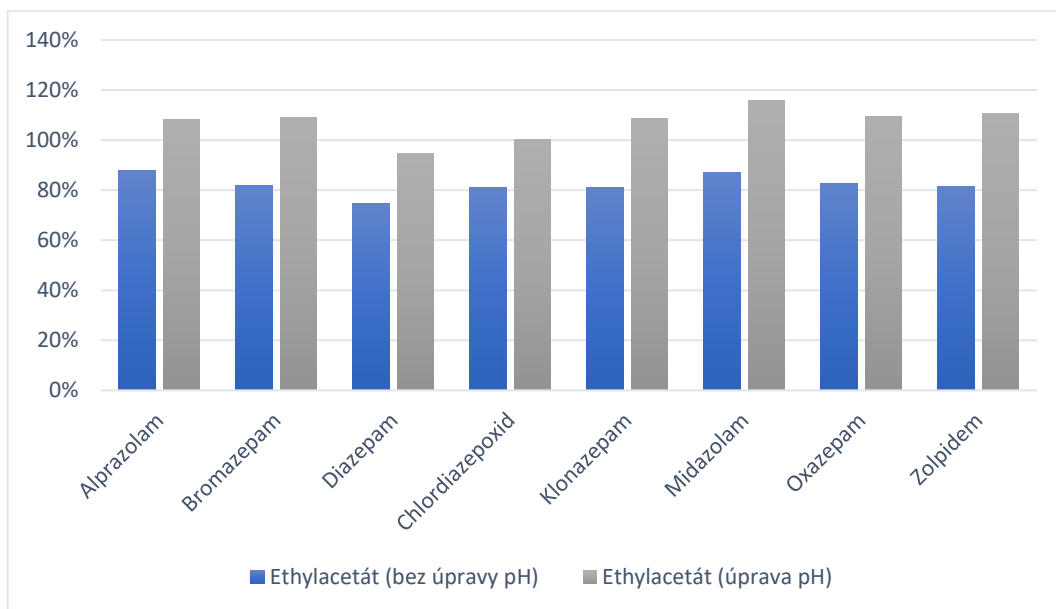
Z důvodu bazicity analyzovaných látek byla pro zjištění účinku extrakce testována LLE v zásaditém prostředí (Tab. 10). Zásaditého prostředí bylo dosaženo přidavkem NaOH (0,5 mol/l). K extrakci byla použita stejná extrakční činidla a jejich kombinace jako při LLE v neutrálním prostředí. Ve většině případů (s výjimkou dichlormethanu) se zvýšila výtěžnost extrakce do všech činidel oproti neutrálnímu prostředí. Nejhorsích výsledků stále dosahoval hexan, výtěžnost se výrazně zlepšila pouze u midazolamu (52,6 %). Z čistých extrakčních činidel dosahoval nejvyšší výtěžnosti s přijatelnou opakovatelností stále ethylacetát. U kombinace hexan:ethylacetát (94:6) došlo u většiny standardů ke zhoršení výtěžnosti. V zásaditém prostředí se výrazně zlepšila výtěžnost a opakovatelnost u směsi hexan:ethylacetát (5:5) a ethylacetát:MTBE (7:3), která se ukázala být nejvhodnější extrakční směsí pro LLE vybraných benzodiazepinů a zolpidemu. Grafy 1-10 znázorňují porovnání výtěžnosti standardů do extrakčních činidel v neutrálním a zásaditém prostředí.

Standard	Výtěžnost ± SD [%]									
	EtAC	DCM	Hexan	MTBE	EtAC:DCM (8:2)	Hexan:EtAC (5:5)	EtAC:MTBE (7:3)	Hexan:EtAC (94:6)	EtAC:DCM:MTBE (6:2:2)	EtAC:DCM (5:5)
Alprazolam	87,8 ± 10,7	62,9 ± 5,1	1,1 ± 13,7	52,7 ± 21,7	84,4 ± 7,6	72,3 ± 4,7	87,9 ± 15,0	9,9 ± 9,3	82,4 ± 3,8	73,9 ± 8,5
Bromazepam	81,7 ± 9,6	62,0 ± 8,1	0	66,0 ± 6,4	87,3 ± 5,9	80,9 ± 3,6	89,1 ± 2,3	19,7 ± 6,7	85,5 ± 4,3	68,3 ± 6,0
Diazepam	74,5 ± 20,2	41,9 ± 12,8	43,4 ± 6,2	48,8 ± 24,5	78,4 ± 5,0	80,7 ± 4,6	66,6 ± 17,5	62,1 ± 7,4	76,3 ± 4,1	47,1 ± 7,5
Chlordiazepoxid	81,2 ± 8,4	59,9 ± 5,3	3,0 ± 6,4	64,1 ± 7,8	85,2 ± 5,2	75,2 ± 3,9	89,7 ± 0,7	25,1 ± 4,6	85,3 ± 5,8	67,1 ± 4,6
Klonazepam	81,1 ± 12,8	59,1 ± 6,8	0	58,2 ± 12,2	86,8 ± 7,9	80,8 ± 5,4	81,7 ± 6,8	31,1 ± 4,9	84,2 ± 3,9	62,7 ± 3,4
Midazolam	86,9 ± 11,6	56,4 ± 5,3	20,5 ± 4,2	66,3 ± 3,9	88,7 ± 5,0	77,1 ± 4,5	86,7 ± 4,1	59,3 ± 3,7	86,6 ± 3,8	65,3 ± 4,0
Oxazepam	82,7 ± 10,5	61,3 ± 6,1	0	61,1 ± 8,1	86,1 ± 7,2	78,5 ± 4,7	85,7 ± 2,5	9,7 ± 6,1	84,3 ± 3,6	66,7 ± 3,8
Zolpidem	81,5 ± 10,9	64,3 ± 6,8	1,6 ± 8,6	38,1 ± 11,2	87,7 ± 6,4	80,6 ± 5,7	87,2 ± 1,2	11,7 ± 6,7	87,3 ± 4,3	68,7 ± 3,8

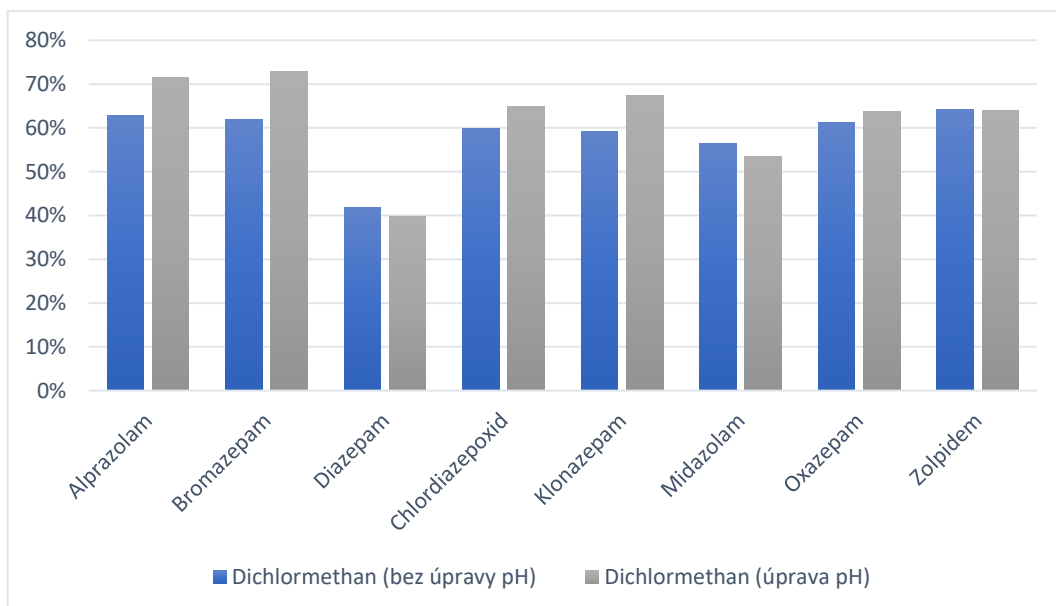
Tab. 9: Výtěžnost standardů při LLE v neutrálním prostředí

Standard	Výtěžnost ± SD [%]									
	EtAC	DCM	Hexan	MTBE	EtAC:DCM (8:2)	Hexan:EtAC (5:5)	EtAC:MTBE (7:3)	Hexan:EtAC (94:6)	EtAC:DCM:MTBE (6:2:2)	EtAC:DCM (5:5)
Alprazolam	108,3 ± 10,7	71,5 ± 8,8	1,8 ± 6,0	68,0 ± 8,1	106,4 ± 6,6	83,0 ± 3,6	98,3 ± 3,6	8,7 ± 4,0	98,9 ± 5,9	93,1 ± 8,7
Bromazepam	108,9 ± 10,7	72,9 ± 4,2	0	76,1 ± 7,2	107,4 ± 7,9	90,3 ± 3,7	100,2 ± 2,4	16,8 ± 3,6	102,0 ± 3,8	94,6 ± 9,5
Diazepam	94,6 ± 9,3	39,7 ± 4,3	48,7 ± 15,7	79,9 ± 6,4	84,1 ± 10,7	76,9 ± 3,6	98,3 ± 2,5	65,1 ± 3,7	85,4 ± 1,9	69,6 ± 8,0
Chlordiazepoxid	100,3 ± 12,0	64,9 ± 2,5	1,3 ± 6,2	74,3 ± 5,6	99,0 ± 6,4	82,9 ± 3,4	87,6 ± 3,2	22,1 ± 8,3	91,0 ± 5,6	83,7 ± 9,2
Klonazepam	108,5 ± 11,8	67,3 ± 3,8	0	70,5 ± 6,3	107,1 ± 7,7	95,1 ± 4,7	97,6 ± 2,7	10,8 ± 6,8	101,6 ± 6,9	93,6 ± 10,4
Midazolam	116,0 ± 9,7	53,5 ± 3,9	52,6 ± 2,2	85,6 ± 5,8	112,0 ± 6,2	95,7 ± 2,9	101,9 ± 2,0	72,5 ± 6,2	102,2 ± 4,0	90,6 ± 9,4
Oxazepam	109,5 ± 10,8	63,8 ± 3,4	0	72,7 ± 6,7	105,9 ± 7,2	88,8 ± 4,0	96,1 ± 3,3	6,9 ± 9,2	98,2 ± 5,4	90,8 ± 9,0
Zolpidem	110,6 ± 13,2	63,9 ± 3,0	25,2 ± 3,7	74,3 ± 6,5	106,1 ± 7,0	90,6 ± 4,3	94,0 ± 2,0	29,1 ± 20,7	100,2 ± 5,7	90,8 ± 9,1

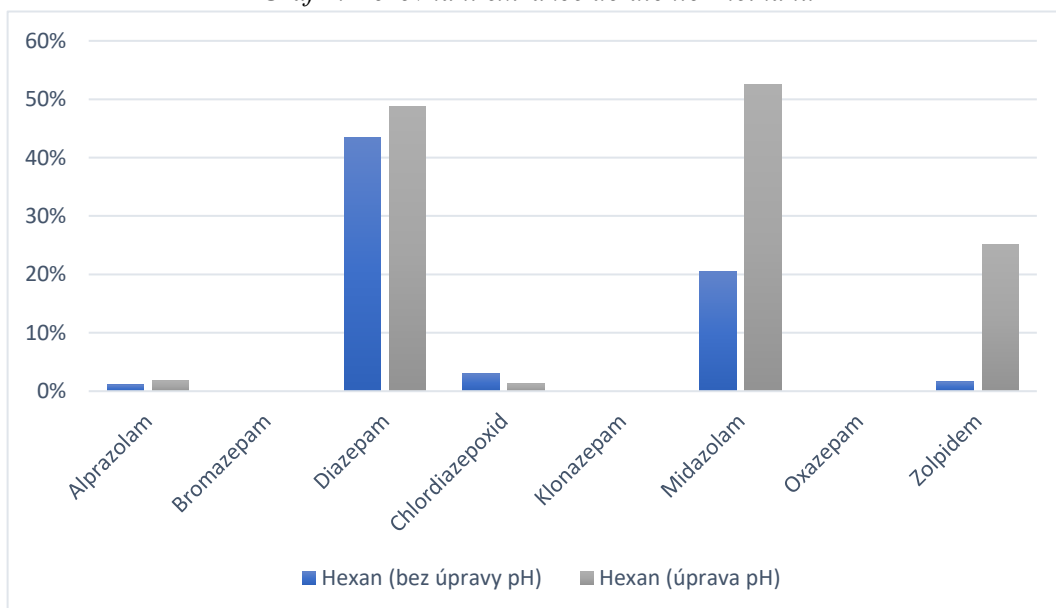
Tab. 10: Výtěžnost standardů při LLE v zásaditém prostředí



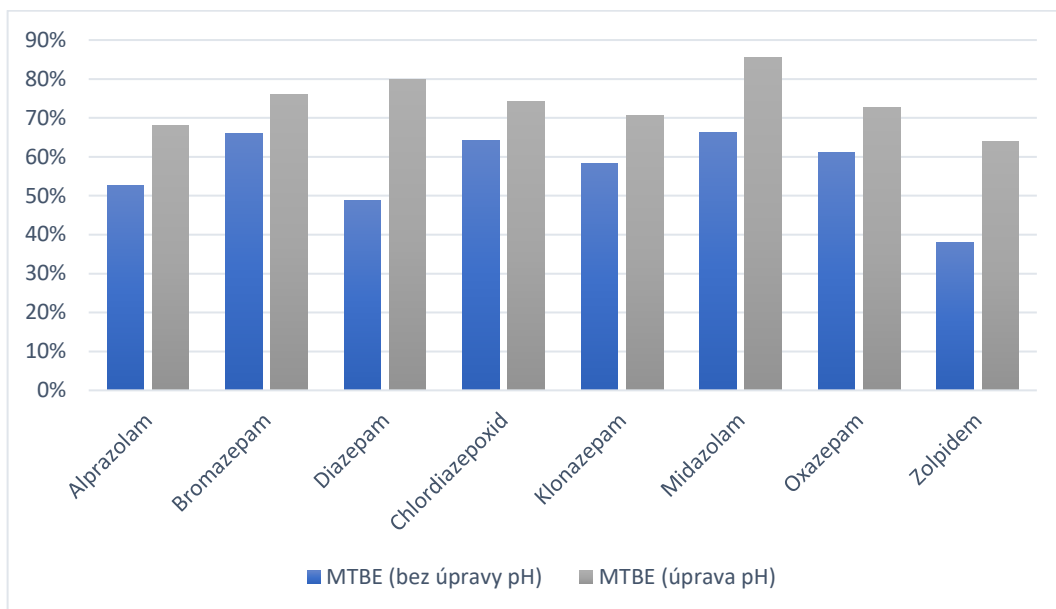
Graf 1: Porovnání extrakce do ethylacetátu



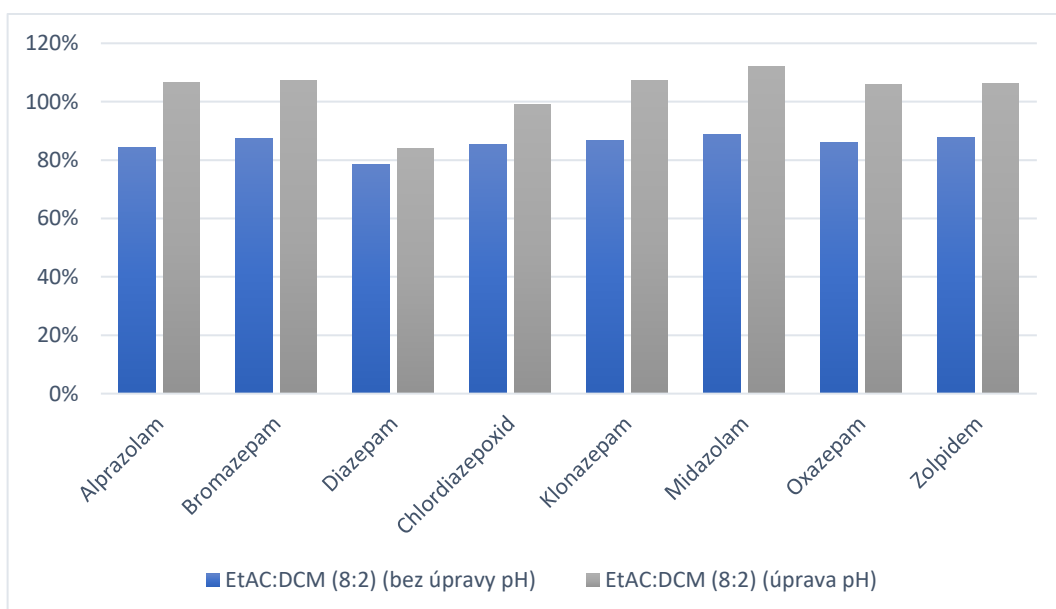
Graf 2: Porovnání extrakce do dichlormethanu



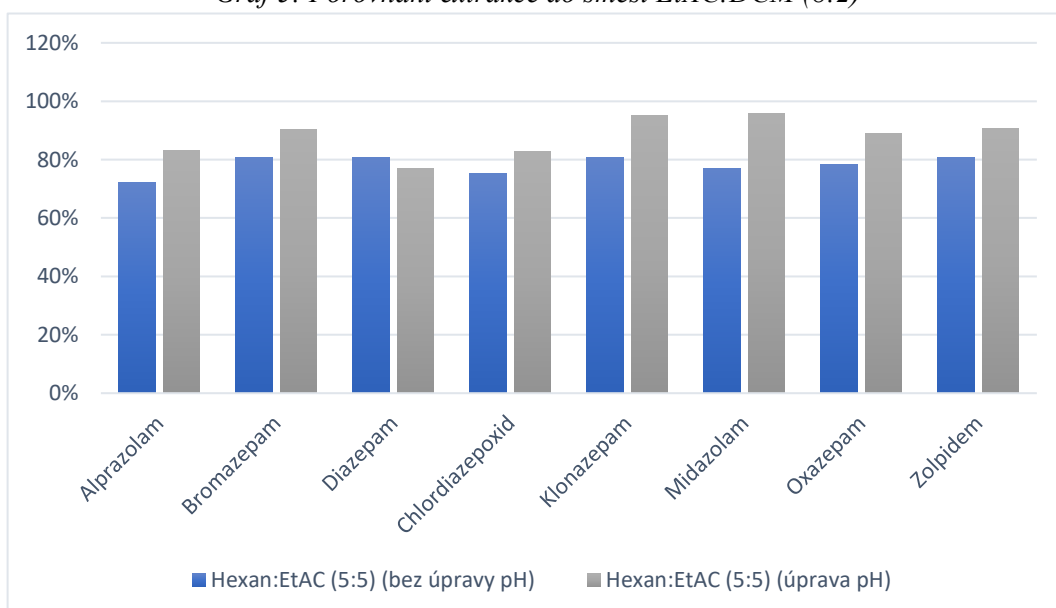
Graf 3: Porovnání extrakce do hexanu



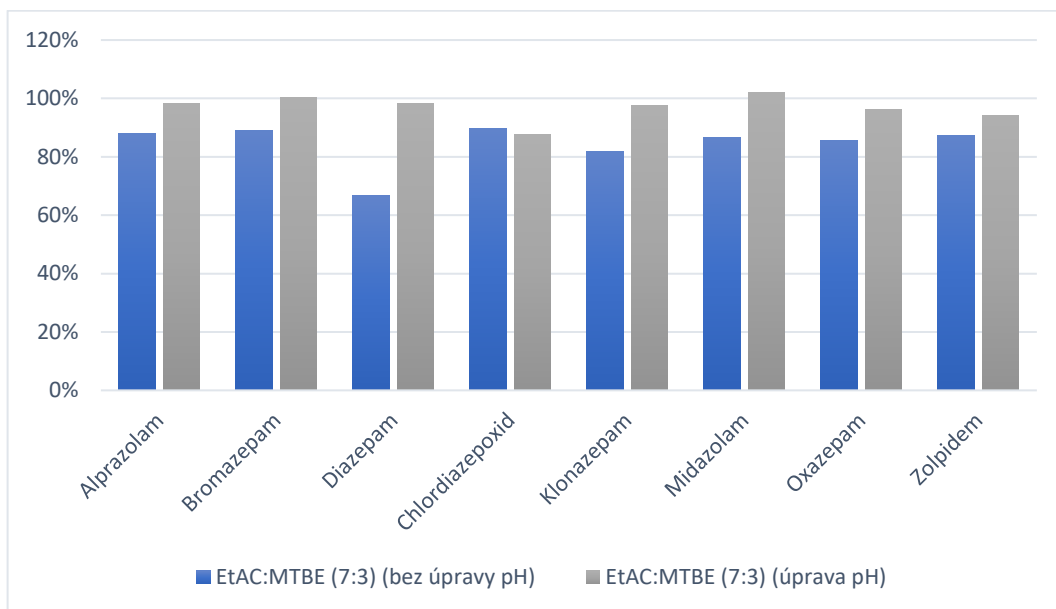
Graf 4: Porovnání extrakce do MTBE



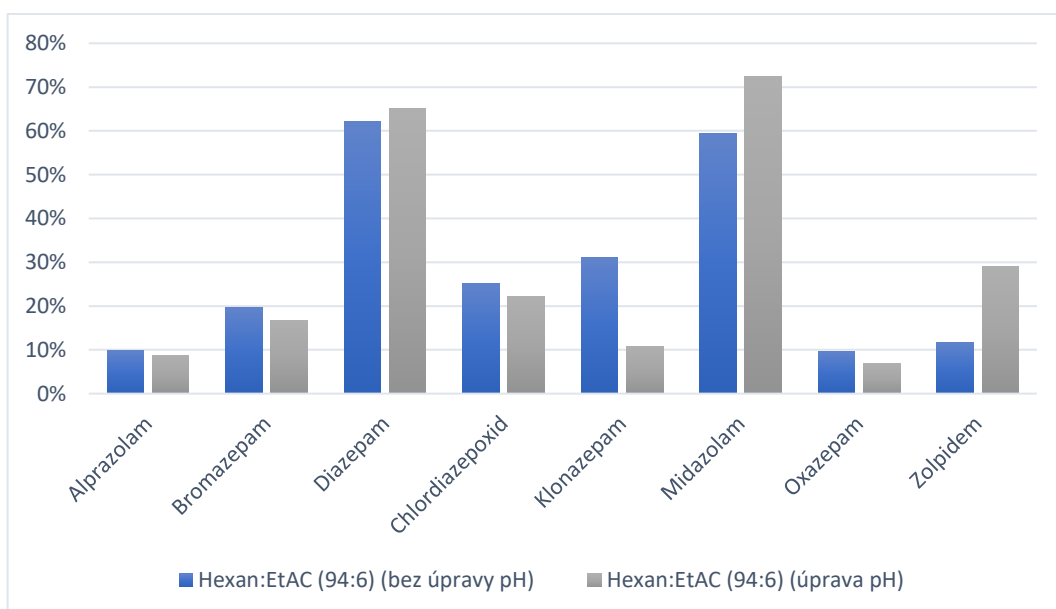
Graf 5: Porovnání extrakce do směsi EtAC:DCM (8:2)



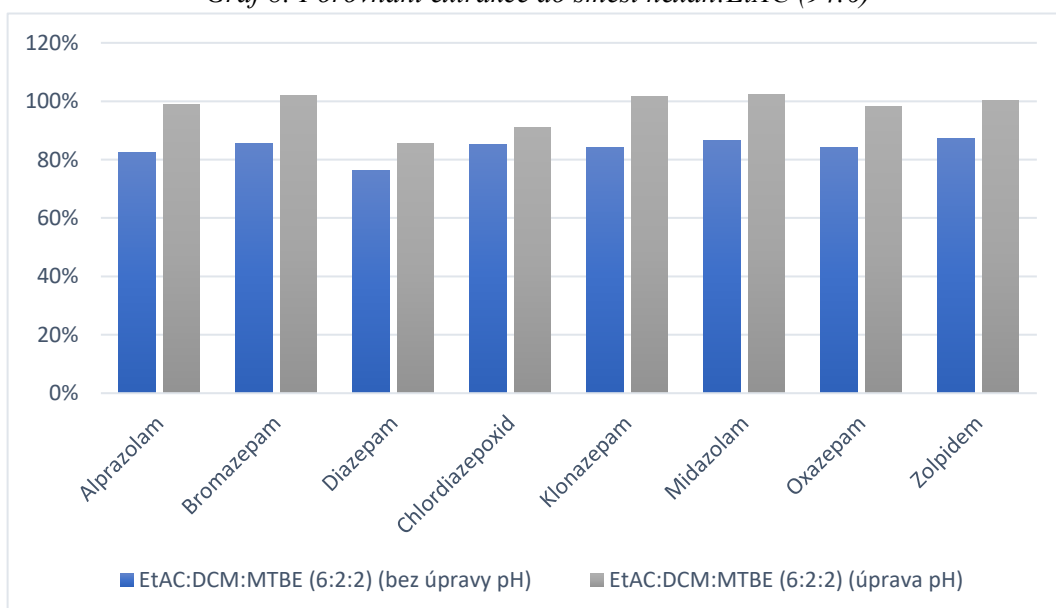
Graf 6: Porovnání extrakce do směsi hexan:EtAC (5:5)



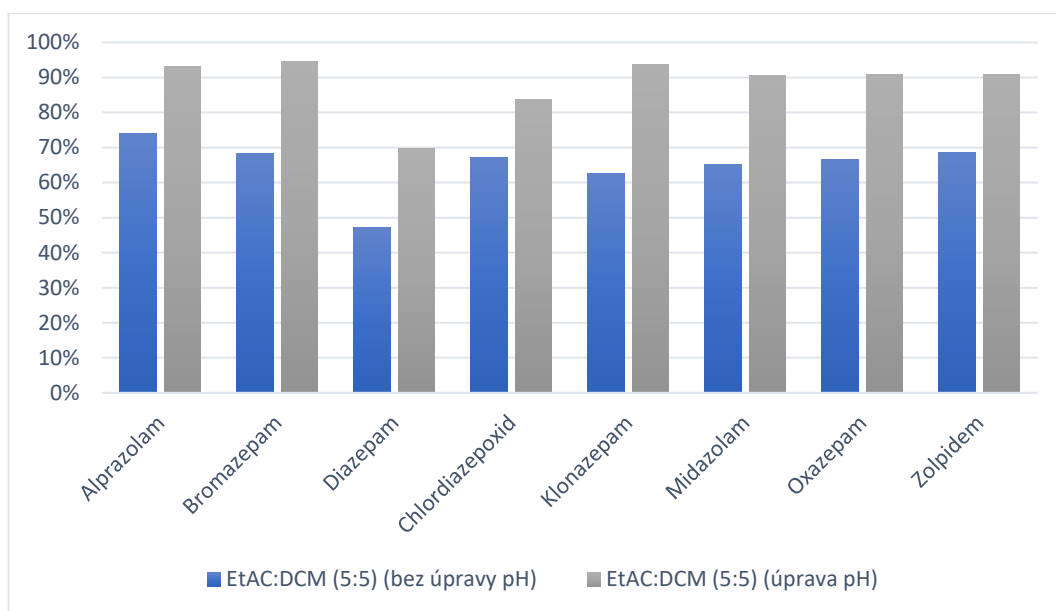
Graf 7: Porovnání extrakce do směsi EtAC:MTBE (7:3)



Graf 8: Porovnání extrakce do směsi hexan:EtAC (94:6)



Graf 9: Porovnání extrakce do směsi EtAC:DCM:MTBE (6:2:2)



Graf 10: Porovnání extrakce do směsi EtAC:DCM (5:5)

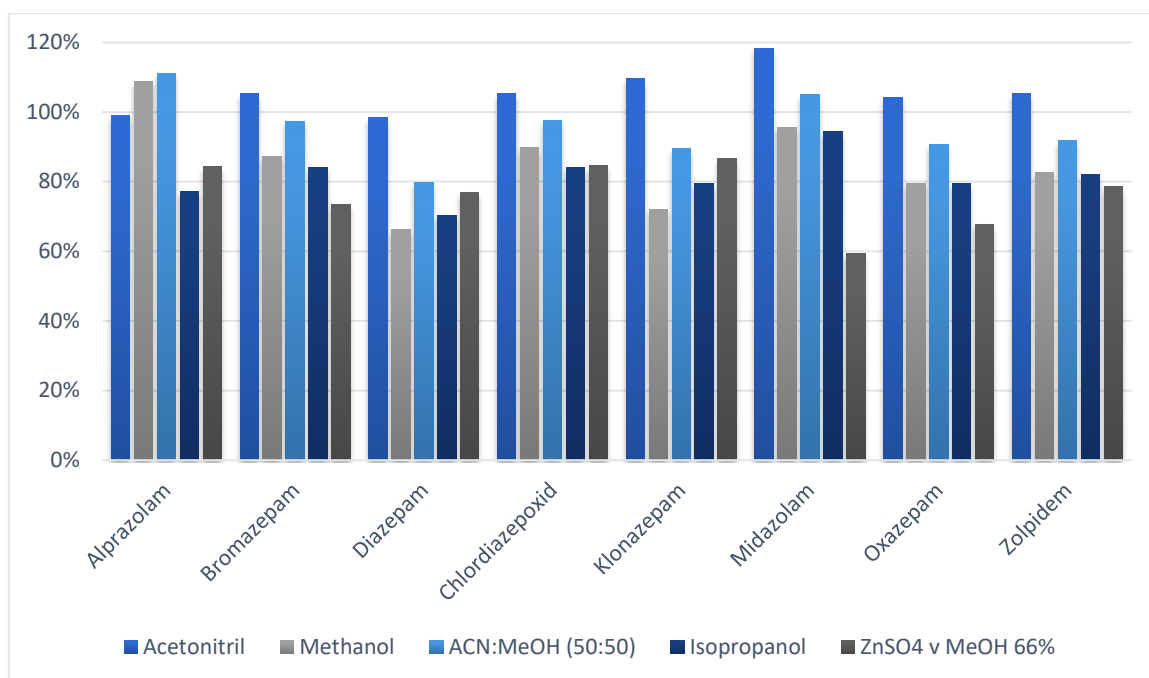
5.1.2. Proteinová precipitace

Další zkoušenou extrakční metodou byla proteinová precipitace. Testovanými precipitačními činidly byly acetonitril, methanol, ACN:MeOH (50:50), isopropanol a 40 mM ZnSO₄ v MeOH 66%. Výtěžnost precipitace byla stejně jako u LLE zjištěna na základě výpočtu poměru plochy analytu ve vzorku ku ploše analytu v čistém rozpouštědle. Výsledky procentuální výtěžnosti včetně směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tab. 11. Porovnání výtěžnosti jednotlivých precipitačních činidel je znázorněno v Grafu 11.

Všechna precipitační činidla prokázala dobrou výtěžnost (59-118 %), nejhorších výsledků dosahoval ZnSO₄ v MeOH. Nejvhodnějším precipitačním činidlem byl acetonitril, který dosahoval nejvyšší výtěžnosti (98-118 %) a nejlepší opakovatelnosti. Z tohoto důvodu, včetně rychlosti a jednoduchosti provedení, byla proteinová precipitace acetonitrilem zvolena jako metoda volby pro úpravu vzorku před analýzou i pro následnou validaci.

Standard	Výtěžnost ± SD [%]				
	Acetonitril	Methanol	ACN:MeOH (50:50)	Isopropanol	ZnSO ₄ v MeOH 66%
Alprazolam	98,9 ± 1,4	108,7 ± 5,8	111,0 ± 7,7	77,1 ± 4,1	84,5 ± 4,2
Bromazepam	105,4 ± 2,5	87,3 ± 9,4	97,4 ± 6,8	84,1 ± 2,2	73,4 ± 5,6
Diazepam	98,5 ± 1,1	66,3 ± 5,3	79,8 ± 5,0	70,2 ± 3,4	76,8 ± 2,5
Chlordiazepoxid	105,3 ± 0,5	89,9 ± 7,8	97,5 ± 7,2	84,1 ± 3,5	84,7 ± 4,8
Klonazepam	109,6 ± 2,3	72,0 ± 6,8	89,6 ± 7,1	79,5 ± 2,4	86,6 ± 3,7
Midazolam	118,4 ± 1,3	95,5 ± 6,4	105,1 ± 6,4	94,4 ± 3,0	59,4 ± 3,5
Oxazepam	104,1 ± 1,1	79,5 ± 7,1	90,6 ± 6,5	79,4 ± 2,2	67,6 ± 3,0
Zolpidem	105,4 ± 1,1	82,7 ± 6,9	91,8 ± 7,3	82,0 ± 3,7	78,6 ± 2,9

Tab. 11: Výtěžnost standardů při proteinové precipitaci



Graf 11: Porovnání výtěžnosti precipitačních činidel

5.2. Výběr vhodného IS

Analyty alprazolam, diazepam, klonazepam a zolpidem měly k dispozici izotopicky značené vnitřní standardy. Z tohoto důvodu pro tyto analyty nebyla testována vhodnost jiných IS a validace byla provedena s odpovídajícími deuterovanými IS. Vnitřní standardy ke zbývajícím analytům (bromazepam, chlordiazepoxid, midazolam a oxazepam) byly vybírány na základě hodnocení kalibrační závislosti pomocí příslušného IS, konkrétně koeficientu determinace R^2 , který popisuje celkovou variabilitu závislé proměnné na regresním modelu. Jako regresní model byl zvolen polynom druhého stupně s využitím vážkové analýzy $1/x^2$. Každý analyt byl hodnocen individuálně vůči všem vnitřním standardům (alprazolam- d_5 , diazepam- d_5 , klonazepam- d_4 , zolpidem- d_6 , sufentanil- d_5 a reserpin). Vypočítané koeficienty determinace kalibrační závislosti jednotlivých analytů vůči IS jsou uvedeny v Tab. 12. Nejhorších výsledků dosahoval reserpin a alprazolam- d_5 , nejlepších diazepam- d_5 , dále sufentanil- d_5 a zolpidem- d_6 . Finálně pro všechny čtyři analyty byl vybrán jako nejvhodnější IS diazepam- d_5 . Před validací metody nebyly v samotném experimentu hodnoceny matricové efekty. Pokud by příslušný vnitřní standard dostatečně nekorigoval matricové efekty, musel by být vybrán jiný. Jelikož se v rámci validace metody používal BZDZ-IS s obsahem všech šesti vnitřních standardů, a zároveň hmotnostní spektrometr pracoval ve Full-MS módu, bylo případně možné retrospektivně vyhodnotit validační sekvence na jakýkoliv vnitřní standard bez nutnosti opětovné přípravy vzorků.

Standard	Koeficient determinace (R ²)					
	Alprazolam-d ₅	Diazepam-d ₅	Klonazepam-d ₄	Reserpin	Zolpidem-d ₆	Sufentanil-d ₅
Bromazepam	0,9988	0,9994	0,9990	0,9989	0,9991	0,9991
Chlordiazepoxid	0,9982	0,9991	0,9983	0,9977	0,9985	0,9985
Midazolam	0,9981	0,9988	0,9982	0,9975	0,9984	0,9984
Oxazepam	0,9983	0,9990	0,9986	0,9986	0,9987	0,9988

Tab. 12: Výběr vhodného IS dle koeficientu determinace

5.3. Validace

Po optimalizaci extrakční metody a s využitím předem definovaných chromatografických a hmotnostně spektrometrických podmínek analýzy vybraných benzodiazepinů a zolpidemu, byla metoda validována dle doporučení směrnice EMA. Mezi sledované parametry validace patřily: kalibrační závislost, přesnost a preciznost v sérii a mezi sériemi, výtěžnost, matricové efekty, stabilita analytů v autosampleru a stabilita analytů v matrici při zamrazení a rozmrazení.

5.3.1. Kalibrace

Hodnocení kalibračních závislostí probíhalo z dvojího měření v každém validačním setu. U každé desetibodové kalibrace byl proveden zpětný přepočítání koncentrací jednotlivých kalibračních bodů. Dle validačních kritérií byla povolena odchylka od dané hodnoty koncentrace nejvýše 15 %, u LLOQ (představováno bodem K₁) 20 %, přičemž toto kritérium splnilo minimálně 8 z 10 kalibračních bodů. Pro účely hodnocení QC vzorků byly obě kalibrace zprůměrovány. Jako regresní model byla zvolena polynomická funkce druhého stupně ($y = ax^2 + bx + c$) s využitím vážkové analýzy $1/x^2$. Opakovatelnost kalibračních měření v rámci celého validačního procesu (celkem 6 kalibrací) je vyjádřena jako průměrná hodnota členu b se směrodatnou odchylkou a variačním koeficientem (Tab. 13). V Tab. 14 jsou uvedeny koncentrační rozmezí daných analytů včetně kalibračního rozsahu metody.

Standard	b ± SD	CV (%)
Alprazolam	0,06203 ± 0,0071	11,4
Bromazepam	0,00082 ± 0,00007	8,4
Diazepam	0,00587 ± 0,0004	6,9
Chlordiazepoxid	0,00263 ± 0,00031	11,9
Klonazepam	0,01763 ± 0,00258	14,6
Midazolam	0,00422 ± 0,00032	7,6
Oxazepam	0,00197 ± 0,00022	11,2
Zolpidem	0,01028 ± 0,00063	6,1

Tab. 13: Opakovatelnost kalibračních měření v rámci celého validačního procesu

Standard	Terapeutické rozmezí [ng/ml]	Toxicita [ng/ml]	Kalibrační rozsah [ng/ml]
Alprazolam	5-50	100-400	4-615,7
Bromazepam	50-200	300-400	8-1 231,5
Diazepam	100-2 000	3 000-5 000	16-2 463,0
Chlordiazepoxid	400-3 000	3 000-10 000	16-2 463,0
Klonazepam	20-80	100	4-615,7
Midazolam	40-100	1 000	8-1 231,5
Oxazepam	200-1 500	2 000	16-2 463,0
Zolpidem	80-150	500	4-615,7

Tab. 14: Koncentrační rozmezí jednotlivých analytů [44]

5.3.2. QC vzorky

Analýzou QC vzorků na čtyřech hladinách (LLOQ, QCA, QCB, QCC) byla hodnocena preciznost a přesnost metody pro každou z validačních sérií včetně výsledků mezi sériemi. Povolené odchylky dle směrnice EMA jsou 15 % pro QC vzorky, 20 % pro LLOQ. Výsledky splňují validační kritéria směrnice EMA a pohybují se v rozmezí povolených odchylek. Uvedeny jsou v Tab. 15 a Tab. 16.

Standard	QC	BATCH 1			BATCH 2			BATCH 3		
		Stanovená koncentrace ve vzorku [ng/ml]	Preciznost (Precision) (%CV)	Přesnost (Accuracy) [%]	Stanovená koncentrace ve vzorku [ng/ml]	Preciznost (Precision) (%CV)	Přesnost (Accuracy) [%]	Stanovená koncentrace ve vzorku [ng/ml]	Preciznost (Precision) (%CV)	Přesnost (Accuracy) [%]
Alprazolam	LLOQ	4,26	3,0	6,5	3,47	2,8	-13,3	4,16	2,9	4,0
	QCA	10,67	3,6	6,7	9,76	1,6	-2,4	9,08	4,3	-9,2
	QCB	45,64	1,2	1,4	43,55	0,9	-3,2	39,95	3,3	-11,2
	QCC	403,80	2,3	-4,4	437,36	6,1	3,6	384,23	2,6	-9,0
Bromazepam	LLOQ	8,42	1,5	5,3	8,38	3,3	4,7	8,68	5,6	8,5
	QCA	20,09	2,8	0,5	19,77	3,7	-1,2	20,80	2,2	4,0
	QCB	87,59	2,7	-2,7	89,16	2,3	-0,9	83,26	2,3	-7,5
	QCC	870,96	1,7	3,1	874,72	3,0	3,6	787,18	1,7	-6,8
Diazepam	LLOQ	14,86	3,3	-7,1	17,21	1,8	7,6	14,82	1,6	-7,3
	QCA	40,19	1,4	0,5	39,70	1,6	-0,8	37,40	7,3	-6,5
	QCB	175,13	2,4	-2,8	174,87	1,6	-2,9	171,63	5,3	-4,7
	QCC	1 604,48	1,9	-5,0	1 594,34	2,6	-5,6	1 860,76	4,6	10,2
Chlordiazepoxid	LLOQ	16,33	2,0	2,1	15,29	3,8	-4,4	14,44	7,7	-9,8
	QCA	40,91	3,0	2,3	34,77	2,9	-13,1	35,49	7,1	-11,3
	QCB	178,49	2,7	-0,9	162,41	2,0	-9,8	166,66	4,7	-7,5
	QCC	1 626,27	1,3	-3,7	1 545,40	4,5	-8,5	1 920,43	3,6	13,7
Klonazepam	LLOQ	3,81	3,0	-4,9	3,75	5,4	-6,2	3,85	8,9	-3,6
	QCA	9,55	1,2	-4,5	9,96	3,6	-0,4	9,34	6,0	-6,6
	QCB	42,85	2,4	-4,8	38,79	0,5	-13,8	43,43	6,6	-3,5
	QCC	397,39	1,5	-5,9	365,18	2,2	-13,5	451,48	4,9	6,9
Midazolam	LLOQ	8,46	2,0	5,8	7,34	1,0	-8,3	7,08	5,0	-11,5
	QCA	20,44	2,6	2,2	18,64	2,4	-6,8	18,36	7,4	-8,2
	QCB	88,77	3,3	-1,4	82,80	1,8	-8,0	85,98	5,1	-4,5
	QCC	820,29	1,7	-2,9	796,02	3,8	-5,7	940,40	4,0	11,4
Oxazepam	LLOQ	16,83	2,6	5,2	14,41	3,8	-10,0	18,96	4,7	18,5
	QCA	42,19	1,2	5,5	38,31	2,0	-4,2	42,22	6,4	5,6
	QCB	174,34	1,6	-3,2	193,92	1,6	7,7	178,64	4,7	-0,8
	QCC	1 655,81	2,6	-2,0	1 849,41	4,9	9,5	1 627,44	1,6	-3,6
Zolpidem	LLOQ	4,29	1,7	7,2	3,70	2,0	-7,4	3,86	3,9	-3,5
	QCA	10,70	1,7	7,0	9,62	2,7	-3,8	10,08	6,4	0,8
	QCB	45,20	0,9	0,4	48,45	0,6	7,7	45,30	7,3	0,7
	QCC	401,32	2,0	-4,9	452,28	4,4	7,1	413,20	1,9	-2,1

Tab. 15: Vyhodnocení QC vzorků – preciznost a přesnost měření v rámci cyklů

Standard	QC	INTER-BATCH		
		Průměrná koncentrace ve vzorku [ng/ml]	Preciznost (Precision) (%CV)	Přesnost (Accuracy) [%]
Alprazolam	LLOQ	3,96	9,6	-0,9
	QCA	9,83	7,5	-1,7
	QCB	43,05	5,9	-4,3
	QCC	408,46	6,8	-3,3
Bromazepam	LLOQ	8,49	4,0	6,2
	QCA	20,22	3,5	1,1
	QCB	86,67	3,8	-3,7
	QCC	844,29	5,4	0,0
Diazepam	LLOQ	15,63	7,7	-2,3
	QCA	39,09	5,1	-2,3
	QCB	173,87	3,0	-3,5
	QCC	1 686,53	8,2	-0,1
Chlordiazepoxid	LLOQ	15,35	6,9	-4,0
	QCA	37,06	8,8	-7,4
	QCB	169,19	5,1	-6,1
	QCC	1 697,37	10,3	0,5
Klonazepam	LLOQ	3,80	5,9	-4,9
	QCA	9,62	4,7	-3,8
	QCB	41,69	6,4	-7,4
	QCC	404,68	9,7	-4,1
Midazolam	LLOQ	7,63	8,6	-4,7
	QCA	19,15	6,6	-4,3
	QCB	85,85	4,3	-4,6
	QCC	852,24	8,3	0,9
Oxazepam	LLOQ	16,73	12,1	4,6
	QCA	40,91	5,9	2,3
	QCB	182,30	5,5	1,2
	QCC	1 710,89	6,8	1,3
Zolpidem	LLOQ	3,93	6,9	-1,6
	QCA	10,10	5,9	1,0
	QCB	46,45	4,9	3,2
	QCC	424,14	6,2	0,5

Tab. 16: Vyhodnocení QC vzorků – preciznost a přesnost mezi cykly

5.3.3. Výtěžnost (Recovery, RE), Matricové efekty (ME)

Výsledky měření výtěžnosti a matricových efektů jsou k porovnání uvedeny v Tab. 17. Výtěžnost byla měřena k zajištění účinnosti a reprodukovatelnosti metody. Matricové efekty byly měřeny z důvodu použití hmotnostního spektrometru ke zjištění ovlivňování výsledků složkami matrice. Dle směrnice EMA je povolená odchylka pro ME 15 %.

Výtěžnost metody pro dané analyty se prokázala být dostatečná (pohybuje se v rozmezí 86–93 %) s dobrou opakovatelností na všech koncentračních hladinách. Matricové efekty splňují validační kritérium směrnice EMA, kdy získané hodnoty nepřesahují povolenou odchylku 15 %. Matricové efekty jsou korigovány pomocí vnitřního standardu, přičemž se diazepam-d₅ ukázal být nejvhodnějším vnitřním standardem pro analyty, které nemají izotopický IS. Rozdíl ve výsledcích ME mezi analyty s izotopickým IS a analyty, pro které byl vybrán diazepam-d₅, není patrný.

Standard	QC	Výtěžnost [%]	Matricové efekty [%]
Alprazolam	QCA	89,5 ± 6,0	96,0 ± 3,7
	QCB	91,7 ± 6,6	103,8 ± 0,7
	QCC	89,1 ± 4,7	101,1 ± 1,6
Bromazepam	QCA	86,1 ± 4,1	92,3 ± 6,1
	QCB	88,7 ± 6,0	103,6 ± 3,9
	QCC	88,6 ± 3,9	100,1 ± 2,5
Diazepam	QCA	88,6 ± 4,8	101,4 ± 4,7
	QCB	91,8 ± 6,9	105,5 ± 3,8
	QCC	91,9 ± 4,5	103,6 ± 1,8
Chlordiazepoxid	QCA	92,2 ± 4,6	95,9 ± 4,2
	QCB	90,1 ± 5,5	107,2 ± 5,9
	QCC	93,0 ± 4,8	100,8 ± 1,8
Klonazepam	QCA	87,3 ± 2,7	100,1 ± 3,8
	QCB	88,8 ± 5,8	110,4 ± 5,9
	QCC	88,3 ± 4,9	106,2 ± 2,6
Midazolam	QCA	88,5 ± 7,0	99,9 ± 5,2
	QCB	90,3 ± 6,2	104,5 ± 4,7
	QCC	92,3 ± 4,5	101,0 ± 1,7
Oxazepam	QCA	87,6 ± 6,5	102,3 ± 6,8
	QCB	88,7 ± 7,1	106,7 ± 6,6
	QCC	88,3 ± 5,1	105,4 ± 3,1
Zolpidem	QCA	90,4 ± 4,5	101,7 ± 3,2
	QCB	90,2 ± 5,6	105,9 ± 6,0
	QCC	89,0 ± 4,2	106,3 ± 2,0

Tab. 17: Vyhodnocení výtěžnosti a matricových efektů

5.3.4. Stabilita v autosampleru, Stabilita analytu v matrici při zamrazení a rozmrazení

Výsledky měření stability v autosampleru a stability analytu v matrici při zamrazení a rozmrazení jsou uvedeny v Tab. 18. Povolená odchylka dle směrnice EMA je 15 %. Validační kritérium je splněno.

Standard	QC	Stabilita v autosampleru [%]	Stabilita při zamrazení a rozmrazení [%]
Alprazolam	QCB	101,2	104,4
	QCC	100,2	104,8
Bromazepam	QCB	100,9	108,1
	QCC	100,4	101,9
Diazepam	QCB	98,9	102,8
	QCC	99,4	100,6
Chlordiazepoxid	QCB	97,9	105,5
	QCC	100,4	99,7
Klonazepam	QCB	99,8	102,9
	QCC	100,6	101,1
Midazolam	QCB	98,7	101,1
	QCC	98,9	101,7
Oxazepam	QCB	100,3	104,7
	QCC	101,3	100,3
Zolpidem	QCB	99,2	102,7
	QCC	100,0	98,9

Tab. 18: Vyhodnocení stability v autosampleru a stability při zamrazení a rozmrazení

5.4. Externí hodnocení kvality (EHK)

Externí hodnocení kvality je zkoušení způsobilosti dané metody pomocí mezilaboratorního porovnávání. Cílem EHK je, aby daná metoda poskytovala přesné, věrohodné a srovnatelné výsledky (alespoň v rámci státu). EHK probíhá formou cyklů, kdy jsou účastníkům hodnocení rozesílány neznámé vzorky k měření a testování [43]. Firma ARVECON GmbH nabízí externí hodnocení kvality benzodiazepinů v séru (cyklus BZF). EHK bylo provedeno pro všechny benzodiazepiny (včetně zolpidemu), které jsou součástí této diplomové práce, s výjimkou chlordiazepoxidu, který není součástí příslušné EHK. Výsledky účasti na EHK jsou uvedeny v Tab. 19. Klíčovým hodnotícím parametrem je z-skóre, které je vypočteno jako podíl mezi rozdílem stanovené a cílové hodnoty a směrodatnou odchylkou (viz vzorec). Akceptovatelný výsledek z-skóre pro získání příslušného certifikátu musí být ≤ 2 .

$$z - \text{skóre} = \frac{\text{stanovená hodnota} - \text{cílová hodnota}}{SD}$$

Všechny analyty testováním EHK úspěšně prošly a získaly příslušný certifikát, který laboratoři umožňuje vydávat kvantitativní výsledky. Naměřené koncentrace se velmi přibližovaly koncentracím cílovým, což je vidět na nízkých hodnotách z-skóre.

Standard	Cílová koncentrace [ng/ml]	Limit hodnocení [ng/ml]	Naměřená koncentrace [ng/ml]	Spiked value [ng/ml]	Z-skóre
Alprazolam	71,4	37,4-105,4	79,2	75,0	0,45
Bromazepam	109,0	59,0-159,0	113,0	105,0	0,16
Diazepam	263,0	159,0-367,0	269,0	275,0	0,11
Klonazepam	67,7	35,1-100,3	72,0	70,0	0,26
Midazolam	145,0	81,0-209,0	144,0	140,0	-0,03
Oxazepam	361,0	225,0-497,0	329,0	380,0	-0,47
Zolpidem	151,0	85-217,0	159,0	165,0	0,24

Tab. 19: Výsledky externího hodnocení kvality benzodiazepinů, cyklus GTFCh – BZF 2/19

6. Diskuze

Benzodiazepiny alprazolam, bromazepam, diazepam, chlordiazepoxid, klonazepam, midazolam, oxazepam a zolpidem byly stanovovány v lidském séru pomocí UHPLC-HRMS analýzy. Nejvhodnější metoda úpravy vzorku před analýzou byla proteinová precipitace. Jako precipitační činidlo byl zvolen acetonitril, který prokázal výbornou výtěžnost a opakovatelnost pro všechny standardy. Jako vnitřní standard pro analýzu byl zvolen diazepam-d₅.

Proteinová precipitace je často volenou úpravou vzorku před LC-MS analýzou. Pro stanovení benzodiazepinů, s použitím hmotnostní spektrometrie jako detekce, ji jako metodu úpravy vzorku využili i další autoři zabývající se podobnou problematikou – např. kvantitativní stanovení větší skupiny benzodiazepinů (lorazepam, diazepam, flunitrazepam, midazolam, oxazepam, temazepam, alprazolam, nordazepam, 7-aminoflunitrazepam, norflunitrazepam, klonazepam a bromazepam) a dalších látek [45], jako precipitační činidlo byl zvolen methanol a následně byla provedena filtrace. Měření bylo prováděno na HPLC-MS/MS s využitím elektrospreje a lineární iontové pasti v pozitivním módu. Metoda byla validována a posouzena jako vhodná do běžné praxe. Dalším příkladem použití proteinové precipitace před LC-MS analýzou je stanovení diazepamu v potkaním séru [46] ve farmakokinetické studii či bromazepamu [47] v bioekvivalenční studii. V prvním případě byla provedena precipitace v 96 jamkové destičce s použitím acetonitrilu jako precipitačního činidla a následné měření na UHPLC-MS/MS s využitím elektrospreje a trojitého kvadrupólu v pozitivním módu. PP acetonitrem byla vyhodnocena jako velmi účinná a celá metoda spolehlivá a reprodukovatelná. Výtěžnost diazepamu se pohybovala kolem 90 %, stejně jako v našem případě. Ve druhém případě byl rovněž využit acetonitril jako precipitační činidlo, následné měření bylo prováděno na HPLC-MS/MS. Jako ionizační zdroj byly použity APCI a ESI, jako hmotnostní analyzátor trojitý kvadrupól a iontová past. Při validaci bylo dosaženo nižší výtěžnosti bromazepamu než v našem případě. Metoda byla schválena jako vhodná pro účely bioekvivalence.

Další často prováděnou metodou úpravy vzorku je extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE). Ve spojení s LC-MS byla vyvinuta metoda pro kvantitativní stanovení benzodiazepinů (alprazolam, bromazepam, klonazepam, clotiazepam, etizolam, flunitrazepam, lorazepam a metabolit ethylloflazepátu) v mateřském mléce a v plasmě [48]. Extrakčním činidlem pro LLE byl ethylacetát a následná analýza byla prováděna na LC-MS/MS s využitím elektrospreje v pozitivním módu. LLE se prokázala dobrou výtěžností a velmi dobrou citlivostí. Metoda je používána ke stanovení alprazolamu v mateřském mléce. Další metoda byla vyvinuta pro rychlé stanovení osmi benzodiazepinů současně (klonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, midazolam, N-desalkylflurazepam, nordiazepam a oxazepam) v plné krvi [49]. Extrakčním činidlem pro LLE byl n-butylchlorid, analýza byla prováděna na LC-APCI-MS v pozitivním módu. Výtěžnost metody byla dostačující a její použitelnost byla v dané laboratoři prokázána. Samotná metoda byla použita k analýze krve několika trestních případů.

LLE byla dalším způsobem úpravy vzorku testovaným při vývoji naší metody. Ke zkoušení bylo využito několik extrakčních činidel včetně ethylacetátu, který byl použit

i ve výše zmíněné studii. Výtěžnost a opakovatelnost ethylacetátu a určitých směsí činidel byla velmi dobrá, nicméně v porovnání s proteinovou precipitací acetonitrilem jsme nakonec LLE jako úpravu vzorku před analýzou nezvolili. Proteinová precipitace pomocí acetonitrilu prokazovala mnohem vyšší výtěžnost a lepší opakovatelnost oproti LLE, k tomu se jedná o metodu rychlou a nenáročnou na provedení.

Další metodou úpravy vzorku před analýzou je extrakce na pevné fázi (SPE). SPE ve spojení s LC-MS byla využita v řadě studií, např. ke stanovení skupiny sedativních látek včetně benzodiazepinů (diazepam, nitrazepam, nordazepam, oxazepam a flurazepam) v plasmě s využitím ve forenzní analýze [50]. Analýza byla prováděna na UHPLC-MS/MS s využitím elektrospreje a trojitého kvadrupólu. Dalším příkladem využití SPE je vývoj metody pro stanovení olanzapinu (antipsychotika) v plasmě [51]. Analýza byla prováděna na UHPLC-MS/MS s využitím elektrospreje a trojitého kvadrupólu v pozitivním módu. Nový přístup ke stanovení benzodiazepinů (nordiazepam, diazepam, lorazepam a oxazepam) byl vyvinut s využitím 96 jamkových disků SPE a analýzou na HPLC-MS/MS s využitím trojitého kvadrupólu [52].

Ačkoliv se SPE vyznačuje dobrou a opakovatelnou výtěžností a dobrými matricovými efekty, proces úpravy vzorku je v porovnání s LLE a PP náročnější časově, finančně i samotným provedením. Proto po vyhodnocení výsledků LLE a PP nebyla extrakce na pevné fázi vůbec prováděna.

7. Závěr

V experimentální části diplomové práce je popsán vývoj a validace UHPLC-HRMS metody ke stanovení vybraných benzodiazepinů (alprazolam, bromazepam, diazepam, chlordiazepoxid, klonazepam, midazolam, oxazepam) a zolpidemu v lidském séru pro použití v klinické praxi. Pro vývoj metody byly testovány dva způsoby úpravy vzorku před analýzou: extrakce z kapaliny do kapaliny a proteinová precipitace. Při extrakci z kapaliny do kapaliny bylo u některých extrakčních činidel a jejich kombinací dosaženo dobrých a opakovatelných výsledků výtěžnosti, u většiny analytů dosahovala ještě lepších hodnot extrakce z kapaliny do kapaliny po úpravě pH vzorku hydroxidem sodným (0,5 mol/l). Nicméně v porovnání s výsledky proteinové precipitace tato metoda úpravy vzorku nakonec nebyla zvolena. Pro úpravu vzorku před analýzou byla využita proteinová precipitace pomocí acetonitrilu, která dosahovala nejlepších výsledků výtěžnosti s velmi dobrou opakovatelností pro všechny analyty. Celková doba přípravy vzorku byla velmi krátká – do 10 minut. Kvantitativní stanovení benzodiazepinů a zolpidemu bylo prováděno metodou vnitřního standardu. Pro analyty, které nemají k dispozici odpovídající deuterované vnitřní standardy byl jako nejvhodnější IS vybrán diazepam-d₅. Celá metoda byla úspěšně zvalidována podle směrnice EMA 2011. Hodnocenými parametry validace byly: kalibrační závislost, přesnost a preciznost v sérii a mezi sériemi, výtěžnost, matricové efekty, stabilita analytů v autosampleru a stabilita analytů v matrici při zamrazení a rozmrazení. Všechny parametry splňovaly daná kritéria směrnice. Laboratoř se zúčastnila cyklu EHK (GTFCh – BZF 2/19 od společnosti ARVECON GmbH) hodnotící přesnost stanovení hladin vybraných benzodiazepinů a zolpidemu se získáním certifikátu. Metoda byla úspěšně zavedena do klinické praxe.

8. Seznam použité literatury

- [1] PRAŠKO, J. *Úzkostné poruchy: klasifikace, diagnostika a léčba*. Praha: Portál, 2005. ISBN 80-7178-997-6.
- [2] VLČEK, J., FIALOVÁ, D., VYTRÍSALOVÁ, M. *Klinická farmacie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-3169-8.
- [3] MORÁŇ, M. *Poruchy spánku*. Interní medicína pro praxi, 2009; 11(10), www.internimedica.cz. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2009/10/08.pdf>, zobrazeno 2. 3. 2020.
- [4] DOLEŽAL, M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2382-5.
- [5] PARKER, K. L, BRUNTON, L. L, GOODMAN, L. S., LAZO, J. S., GILMAN, A. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (11th ed.)*, New York: McGraw-Hill, 2006. ISBN 0-07-142280-3.
- [6] GRIFFIN, C. E. 3rd., KAYE, A. M., BUENO, F. R., KAYE, A. D. *Benzodiazepine pharmacology and central nervous system – mediated effects*. *The Ochs. J.*, 2013; 13(2): 214-223.
- [7] HORÁK, Ladislav. *Praktická proktologie*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-3595-5.
- [8] MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [9] VANŽURA M., VIŠŇOVSKÝ P.: *Nebezpečí zneužívání benzodiazepinů*. 37, 2002, s. 101-106. Dostupné z: <https://www.adzpo.sk/images/articles/adzpo-2002-37-2-101-106.pdf>, zobrazeno 22. 5. 2020.
- [10] CLARK, K. D., ZHANG, CH., ANDERSON J. L. Sample Preparation for Bioanalytical and Pharmaceutical Analysis. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**(23), 11262-11270.
- [11] MEDVEDOVICI, A., BACALUM, E., DAVID, V. Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques. *Biomed. Chromatogr.*, 2018, **32**(1): e4137.
- [12] NOVÁKOVÁ, L., VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta*. 2009, **656**(1-2), 8-35.
- [13] HANSEN, S. H., PEDERSEN-BJERGAARD, S. ed. *Bioanalysis of Pharmaceuticals. Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015. ISBN 9781118716823.

- [14] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha, 2013. ISBN 9788026042440.
- [15] LI, W., ZHANG, J., TSE, F. L. S. ed. *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols and Regulations*. Hoboken: Wiley, 2013. ISBN 9781118159248.
- [16] JIANG, H., CAO, H., ZHANG, Y., FAST, D. M. Systematic evaluation of supported liquid extraction in reducing matrix effect and improving extraction efficiency in LC–MS/MS based bioanalysis for 10 model pharmaceutical compounds. *J. Chromatogr. B* [online]. 2012, **891-892**, 71-80. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.02.031. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023212001213>
- [17] WATSON, D. G. *Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 3rd ed. New York: Ch. Livingst. Elsevier, 2012. ISBN 978-0-7020-4621-6.
- [18] SILVA, C., CAVACO, C., PERESTRELO, R., PEREIRA, J., CÂMARA, J. *Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine*. *Metabolites* [online]. 2014, **4**(1), 71-97. DOI: 10.3390/metabo4010071. ISSN 2218-1989. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2218-1989/4/1/71>
- [19] MCMASTER, M. C. *LC/MS: a practical user's guide*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2005. ISBN 978-0-471-65531-2.
- [20] KAZAKEVICH, Y. V., LOBRUTTO, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 978-0-471-68162-5.
- [21] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [22] [https://www.brainkart.com/article/Instrumentation---High-Performance-Liquid-Chromatography-\(HPLC\)_30945/](https://www.brainkart.com/article/Instrumentation---High-Performance-Liquid-Chromatography-(HPLC)_30945/), zobrazeno 15. 10. 2019.
- [23] <https://www.mpip-mainz.mpg.de/3250439/HPLC>, zobrazeno 16. 10. 2019.
- [24] TINNER, H., KISELEWSKY, M. *Ion Pair Chromatography*. Reporter US Vol 28. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/ion-pair-chromatography.html>, zobrazeno 11. 1. 2020.
- [25] BUSZEWSKI, B., NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—A powerful separation technique. *Anal. and Bioanal. Chem.*, 2012, **402**(1), 231-247. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5308-5>.

- [26] FANALI, S. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. Waltham: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-12-415807-8.
- [27] CRAWFORD SCIENTIFIC. *The Theory of HPLC: Chromatographic Parameters*. ChromAcademy, 2018. Dostupné z: https://nanopdf.com/download/the-theory-of-hplc-chromatographic-parameters_pdf#modals, zobrazeno 21. 10. 2019.
- [28] NOVÁKOVÁ, L., SVOBODA, P., PAVLÍK, J. Ultra-high performance liquid chromatography. In: FANALI, S., HADDAD, P. R., POOLE, C. F., RIEKKOLA MARJALIISA. (Eds) *Handbooks in Separation Science. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition*. 2nd Ed., Elsevier Inc., Oxford 2017. ISBN 978-0-12-805393-5.
- [29] ROBINSON, J. W., FRAME, E. M. S., FRAME, G. M. *Undergraduate instrumental analysis*. Seventh edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, [2014]. ISBN 978-1-4200-6135-2.
- [30] MCMASTER, M. C. *HPLC, a practical user's guide*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 978-0-471-75401-5.
- [31] DE HOFFMANN, E., STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03311-1.
- [32] GROSS, J. H. *Mass Spectrometry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011 [cit. 2019-12-15]. DOI: 10.1007/978-3-642-10711-5. ISBN 978-3-642-10709-2.
- [33] <https://www.semanticscholar.org/paper/Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry%3A-A-to-the-Banerjee-Mazumdar/6f7d52eebbd578d8c6778927f43b402428eachbd5#extracted>, Figure 6, zobrazeno 23. 2. 2020.
- [34] https://www.researchgate.net/figure/APCI-Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionization-ionization-source-to-LC-MS-Adapted-from_fig3_321277853, zobrazeno 23. 2. 2020.
- [35] <http://mass-spectro.com/appi>, Figure 1, zobrazeno 23. 2. 2020.
- [36] BRENTON, A.G., GODFREY, A.R. *Accurate mass measurement: terminology and treatment of data*. J Am Soc Mass Spectrom. 2010, 21(11), 1821-1835. DOI: 10.1021/jasms.8b03637.
- [37] FRIEDECKÝ, D., LEMR, K. *Hmotnostní spektrometrie – zdroj analytických informací*. Klin. Biochem. Metab. 2012, 20(41)(4), 210-215.
- [38] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. Mass Spectrometry Group, 2020, Univerzita Pardubice. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/04_MS_analyzatory_cast1.pdf a https://holcapek.upce.cz/teaching/05_MS_analyzatory_cast2.pdf, zobrazeno 18. 5. 2020.

- [39] https://www.researchgate.net/figure/The-Orbitrap-FT-mass-analyzer-In-the-Orbitrap-ions-oscillate-around-a-central_fig9_306542804, zobrazeno 19. 5. 2020.
- [40] Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2011. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
- [41] Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry, Food and Drug Administration, 2018. Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/70858/download>
- [42] KAZA, M., KARAŻNIEWICZ-ŁADA, M., KOSICKA-NOWORZYŃ, K., SIEMIĄTKOWSKA, A., RUDZKI, P. (2018). *Bioanalytical method validation: new FDA Guidance vs. EMA Guideline. Better or worse?* J. of Pharm. and Biomed. Anal. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.12.030.
- [43] SEKK s. r. o., Divize EHK. *Plán EHK 2020*. <http://www.sekk.cz>, 2020. Dostupné z: https://www.sekk.cz/eqa/2020_plan_EHK.pdf, zobrazeno 26. 6. 2020.
- [44] HIEMKE, C., N. BERGEMANN, H. CLEMENT, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry* [online]. 2018, **51**(01/02), 9-62. DOI: 10.1055/s-0043-116492. ISSN 0176-3679. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0043-116492>.
- [45] BASSAN, D.M., ERDMANN, F., KRÜLL, R. *Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS*. *Anal. and Bioanal. Chem.* [online]. 2011, **400**(1), 43-50. DOI: 10.1007/s00216-011-4784-y. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-4784-y>.
- [46] PILLI, N.R., NARAYANASAMY, S., XU, L. et al. *A high-throughput bioanalytical assay to support pharmacokinetic interaction study of oxycodone and diazepam in Sprague Dawley rats*. *RSC Advances* [online]. 2020, **10**(2), 886-896. DOI: 10.1039/C9RA05785D. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9RA05785D>.
- [47] ALBU, F., GEORGITA, C., TACHE, F., MUTIHAC, L., MEDVEDOVICI, A., DAVID, V. *Considerations on MS/MS Detection of Bromazepam after Liquid Chromatographic Separation from Plasma Samples: Application to a Bioequivalence Study*. *J. of Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* [online]. 2007, **30**(18), 2699-2715. DOI: 10.1080/10826070701560603. ISSN 1082-6076. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826070701560603>.
- [48] FURUGEN, A., NISHIMURA, A., KOBAYASHI, M., UMAZUME, T., NARUMI, K., ISEKI, K. *Quantification of eight benzodiazepines in human breastmilk and plasma by liquid-liquid extraction and liquid-chromatography tandem mass spectrometry: Application to evaluation of alprazolam transfer into breastmilk*. *J. of Pharm. and Biomed. Anal.* [online].

2019, **168**, 83-93. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.02.011. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708518319435>.

[49] BUGEY, A., RUDAZ, S., STAUB, C. *A fast LC-APCI/MS method for analyzing benzodiazepines in whole blood using monolithic support*. J. Chromatogr. B [online]. 2006, **832**(2), 249-255. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.01.009. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002320600050X>.

[50] ZHANG, L., WU, P., JIN, Q., HU, Z., WANG, J. *Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. B [online]. 2018, **1072**, 305-314. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.11.035. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023217310206>.

[51] SIVSIVADZE, K., M. JOKHADZE, P. TUSHURASHVILI, T. MURTAZASHVILI a N. IMNADZE. *Development of LC-MS/MS method for determination of the olanzapine in human plasma*. Georg. Medic. News [online]. 2017, (263), 118-125. ISSN 15120112.

[52] CUDJOE, E., PAWLISZYN, J. *A new approach to the application of solid phase extraction disks with LC-MS/MS for the analysis of drugs on a 96-well plate format*. J. of Pharm. and Biomed. Anal. [online]. 2009, **50**(4), 556-562. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.07.014. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708508003889>.