

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**UHPLC-MS/MS ANALÝZA VYBRANÝCH LÉČIV V BIOLOGICKÉM
MATERIÁLU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

FILIP MOTYČKA

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15. 5. 2021

.....
Filip Motyčka

Na tomto místě bych rád poděkoval doc. PharmDr. Petře Štěrbové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení během vypracování diplomové práce, trpělivou spolupráci a poskytování rad nejen při výzkumné činnosti, ale také během vypracování této práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Haně Bavlovič Piskáčkové, Ph.D., za odbornou pomoc v laboratoři při vypracování diplomové práce, obrovskou ochotu a poskytování rad.

Práce vznikla za podpory SVV 260547.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
2. ÚVOD.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. Princip kapalinové chromatografie.....	11
3.1.1. Separáční módy.....	11
3.2. Instrumentace.....	15
3.2.1. Zásobníky mobilní fáze	15
3.2.2. Degaser	15
3.2.3. Vysokotlak� �rpadlo	16
3.2.4. Dávkovací za�r�zen�	16
3.2.5. Kolona a stacionární fáze.....	17
3.2.6. Detektor	19
3.3. Hmotnostn� spektrometrie.....	21
3.3.1. Iontov� zdroj.....	21
3.3.2. Hmotnostn� analyzátor	23
3.3.3. Detektor	24
3.3.4. Tandemov� hmotnostn� spektrometrie.....	25
3.4. Spojen� LC-MS	26
3.5. UHPLC	27
3.5.1. Transfer metody	27
3.6. Dexrazoxan	28
3.7. Sou�asn� HPLC-MS/MS metoda pro stanoven� DEX a ADR-925.....	29
4. CÍL PRÁCE	30
5. EXPERIMENT�LN� ČÁST	31
5.1. Chemikálie a materiál	31
5.2. P�r�prava zásobních roztoků.....	33
5.1. �prava vzorku.....	33
5.2. Optimalizace UHPLC-MS podmínek.....	33
5.3. Validace metody stanoven� DEX a ADR-925 v plasmě.....	34

6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
6.1.	Vývoj a optimalizace UHPLC-MS/MS.....	36
6.2.	Validace metody pro stanovení DEX a ADR-925 v plasmě.....	43
6.2.1.	Linearita	43
6.2.2.	Přesnost a preciznost	44
6.2.3.	Výtěžnost a matricové efekty	44
6.3.	Porovnání metod	45
7.	ZÁVĚR.....	46
8.	CITOVANÁ LITERATURA.....	47

ABSTRAKT

Bisdioxopiperazinový derivát dexrazoxan (dále jen DEX) je jediné klinicky užívané léčivo proti kardiotoxicitě způsobené antracykliny. Prvotní studie přišla s myšlenkou, že DEX je proléčivo, které je v kardiomyocytech enzymatickou hydrolyzou piperazinového kruhu aktivováno na metabolit označovaný ADR-925. Nicméně další výzkum prokázal, že skutečným mechanismem účinku je deplece topoizomerázy II β způsobené samotným DEX. Za účelem detekce DEX a jeho metabolitu byla vyvinuta bioanalytická metoda na HPLC-MS/MS systému. Tato metoda trvá 30 minut, což je na požadavky moderní bioanalýzy poměrně dlouhá doba. Cílem tohoto projektu byla snaha vyvinout a validovat rychlejší metodu využívající UHPLC-MS/MS schopnou detekovat DEX a ADR-925 v plasmě. Veškerý vývoj probíhal na UHPLC systému ve spojení s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem s ESI ionizací v pozitivním módu (obojí Shimadzu). Jako stacionární fáze byly testovány ZORBAX Bonus-RP (100 mm \times 3.0 mm, 1.8 μ m), Luna Omega Polar C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.6 μ m) a Kinetex F5 column (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m). Testované mobilní fáze byly směsi acetonitrilu či methanolu s různými koncentracemi mravenčanu amonného nebo kyselinou mravenčí při isokratické a gradientové eluci. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně Kinetex F5 s 1mM mravenčanem amonným a methanolem při gradientové eluci. Tato metoda byla částečně validována pro koncentrační rozmezí 0,5 až 100 μ M DEX i ADR-925 v plasmě.

ABSTRACT

Dexrazoxane (DEX), a bisdioxopiperazine derivative, is the only clinically used drug effective against anthracycline-induced cardiotoxicity. First studies indicated that DEX is a pro-drug bioactivated in cardiomyocytes by enzymatic hydrolysis of piperazine rings to its active metabolite – ADR-925. However, further research revealed that effective cardioprotection induced by bisdioxopiperazine compounds is more likely related to topoisomerase II β depletion induced by DEX itself. The only bioanalytical method for simultaneous determination of DEX and its metabolite was developed using HPLC-MS/MS system. Nevertheless, the analysis requires 30 min for each run, which does not accomplish requirements for modern bioanalysis. The aim of this project is to develop and validate a fast UHPLC-MS/MS method for determination of DEX and ADR-925 in plasma. The analyses were performed using an UHPLC system coupled to triple quadrupole mass spectrometer with ESI source in positive ion mode (both Shimadzu). Following stationary phases were tested: ZORBAX Bonus-RP (100 mm \times 3.0 mm, 1.8 μ m), Luna Omega Polar C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.6 μ m) and Kinetex F5 column (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m). Mixtures of acetonitrile or methanol with different concentrations of ammonium formate or formic acid were tested as mobile phase with various isocratic and gradient elutions. The best results were achieved on the column Kinetex F5 with 1mM ammonium formate and methanol as a mobile phase in a gradient mode. Method was partially validated within the concentration range from 0,5 to 100 μ M for both compounds in plasma.

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
B	magnetický sektorový analyzátor
CI	chemická ionizace
DEX	dexrazoxan
EI	elektronová ionizace
EMA	Evropská léková agentura
ESI	ionizace elektrosprejem
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
IPC	iontově párová chromatografie
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
LLOQ	dolní limit kvantifikace
m/z	poměr hmotnost/náboj
MALDI	matricí asistovaná laserová ionizace
ME	matricové efekty
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
NP	normální fáze
PEEK	polyetheretherketon
QqQ	trojitý kvadrupól
QqQ	kvadrupól
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka

SEC	molekulová vylučovací chromatografie
SF	stacionární fáze
SIL IS	izotopicky značené vnitřní standardy
SIM	selektivní záznam vybraného iontu
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

2. ÚVOD

V rámci současných trendů se ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) stala důležitou součástí farmaceutické analýzy. Tato separační metoda si získala své místo v mnoha odvětvích, kde nahradila klasickou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), především díky rychlosti samotné analýzy, vyšší citlivosti či lepší separační účinnosti. Tyto techniky jsou často využívány ve spojení s hmotnostní detekcí, což umožňuje získat kromě citlivé a selektivní kvantifikace také informace o identitě analytů. Tohoto spojení separačních metod se využívá i při analýze dexrazoxanu (DEX) v biologickém vzorku. DEX, jakožto zástupce bisdioxopiperazinů, je jediné registrované léčivo užívající se ke snížení kardiotoxicity při protinádorové léčbě u dospělých, která je navozena cytostatiky ze skupiny antracyklinů (doxorubicin, idarubicin atd.). Ačkoli přesný mechanismus účinku není stále zcela objasněn, jedná se o důležité léčivo, které je předmětem mnoha výzkumů zabývajících se stanovením koncentrace *in vivo*, například v plasmě. K tomu slouží HPLC-MS/MS metoda, která však nevyhovuje současným trendům farmaceutické analýzy.

Z tohoto důvodu bylo cílem této diplomové práce vyvinout novou, rychlejší analytickou metodu za pomoci UHPLC systému s MS/MS detekcí. Pro tuto novou metodu následně optimalizovat podmínky a poté ji validovat podle platných podmínek stanovených Evropskou lékovou agenturou (EMA).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Princip kapalinové chromatografie

Chromatografické metody jsou v dnešní době nedílnou součástí mnoha výzkumných činností. Obecně je lze charakterizovat jako separační metody, pomocí kterých je možné rozdělit směsi látek. Za objevitele je považován ruský botanik Michail S. Cvět, kterému se na počátku 20. století podařilo oddělit listová barviva za pomoci kolony naplněné oxidem vápenatým [1]. Proces chromatografické separace je založen na rozdílných fyzikálně-chemických vlastnostech látek a jejich odlišných interakcích s mobilní fází (MF) a nosičem (stacionární fází, SF). V kapalinové chromatografii je MF kapalná (směs rozpouštědel) a SF je pevná. Míra retence analytu je určena specifickými mezimolekulárními interakcemi s povrchem SF a nespecifickými interakcemi s MF v závislosti na působících silách. Mezi nejčastější interakce, které se v různé míře uplatňují při separaci, patří rozdělování analytů na základě rozdělovacího koeficientu mezi dvě nemísitelné fáze, adsorpce jednotlivých složek na povrchu sorbentu, dělení elektrolytů v iontové formě za pomoci iontoměničů, případně i separace na základě velikosti molekul analytu za použití porózní SF. Podle nich můžeme v rámci kapalinové chromatografie rozlišit několik módů separace [2, 3, 4].

3.1.1. Separační módy

Chromatografie na normálních fázích (Normal-phase – NP)

Úplně první byla separace na normálních fázích, kterou objevil již zmíněný Michail S. Cvět. V těchto systémech se používá polární SF (nejčastěji silikagel a polární chemicky vázané skupiny na silikagelovém nosiči) a MF s nižší polaritou (hexan, toluen, benzen, aceton, tetrahydrofuran atd.). Principem je interakce polárních funkčních skupin analytu s polárními skupinami SF. Čím méně polární MF použijeme, tím více bude analyt zadržován SF. Jelikož MF je v tomto módu bezvodá, má tím pádem nižší viskozitu, a to s sebou přináší výhodu v podobě nižšího zpětného tlaku na koloně. Vzhledem k časově náročně ekvilibraci a problémům s reprodukovatelností (kvůli velké citlivosti metody na polární kontaminanty MF) se však od tohoto módu ustupuje. Nejčastěji se NP využívá při analýze látek náchylných k hydrolyze a pro separaci extrémně hydrofobních látek [5, 6, 7].

Chromatografie na reverzních fázích (Reversed-phase – RP)

Daleko více využívaná je dnes separace na reverzních fázích. V tomto módu má naopak SF nepolární charakter (např. silikagel modifikovaný dlouhými uhlíkatými řetězci, aromatickými jádry, kyanoskupinou atd.) a MF polární (obvykle směs vodné složky s polárními organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou). Často se tak volí pufrы, případně roztoky slabých kyselin a bází jako vodné složky ve směsi s methanolem nebo acetonitrilem. Na rozdíl od normálních fází se při separaci uplatňují disperzní síly (hydrofobní nebo van der Waalsovy interakce). Pro lepší reprodukovatelnost, kompatibilitu s mnoha detektory, komerční dostupnost a lipofilitu většiny léčiv se reverzní fáze využívají ve zhruba 75 % HPLC analýz [4, 5, 7].

Iontově párová chromatografie (Ion-pair chromatography – IPC)

I přesto, že separace za pomoci RP je zcela nejrozšířenější, nelze ji využít pro všechny druhy analytů. Limit pro tento mód představují analyty, které jsou natolik polární, že nejsou na RP zadržovány. Pro tyto látky je vhodná iontově párová chromatografie. Přesný mechanismus není zcela objasněn, ale existují dvě možné teorie. První z nich se přiklání k tvorbě iontových párů analytu s reagentem přidaným do MF (lipofilní ion opačného náboje než analyt). Takto vzniklý iontový pár se stane hydrofobní a může interagovat s nepolární SF. Druhou teorií je takzvaný elektrostatický model, kdy se nejdříve lipofilní ionty (opět opačného náboje oproti analytu) adsorbují na povrch SF prostřednictvím alifatických řetězců a tvoří tak vazebná místa pro ionty analytu [8]. Nejčastěji užívanými iontově párovými činidly jsou alkylamoniové soli pro anionty a alkylsulfátové či alkylsulfonové soli pro kationty. Samotná separace může být vhodně ovlivněna koncentrací a lipofilitou iontově párových činidel, koncentrací organické složky MF a samotným pH MF, které ovlivňuje stupeň disociace analytů [8, 9]. Podstatnou nevýhodou tohoto módu je velmi zdlouhavá ekvilibrace kolony po změně složení MF a z tohoto důvodu není doporučováno zde využívat gradientové eluce. Náročné je i samotné vymývání iontových párů ze SF a z toho důvodu by kolony používané na IPC již neměly být následně použité v RP módu [7, 9].

Iontově výměnná chromatografie (Ion-exchange – IEC)

Další možností, jak separovat ionizované molekuly analytu je iontově výměnná chromatografie. Při ní probíhá separace vlivem elektrostatických interakcí ionizovaných

molekul analytu se SF tvořenou iontoměničem (ionizované funkční skupiny kovalentně navázané na SF – nejčastěji silikagel nebo polymery). Tyto iontoměniče nesou buď kladný náboj (anexy) nebo záporný náboj (katexy) a interagují s analytem opačného náboje. Anexy tedy slouží k separaci deprotonovaných kyselých látek a katexy k separaci protonovaných bazí. Dále se dají iontoměniče rozdělit na silné anexy (terciární aminy a kvartérní amoniové soli) a katexy (sulfonové kyseliny), které jsou zcela ionizované v celém rozsahu pH. Odlišně se chovají slabé anexy (primární a sekundární aminy) a slabé katexy (karboxylové a fosfonové kyseliny), které jsou ionizovány pouze v bazickém potažmo kyselém prostředí a mimo toto rozmezí pH je retence na těchto iontoměničích zásadně potlačena. MF musí při tomto typu separace obsahovat taktéž opačně nabitě ionty vůči SF (ve formě solí, pufrů, ionizovaných kyselin či zásad) a ty vzájemně soupeří s ionty analytu o vazebná místa iontoměničů. Tato metoda je výhodná pro separaci endogenních látek jako jsou aminokyseliny, proteiny, peptidy a polynukleotidy [7, 8, 10].

Molekulová vylučovací chromatografie (Size-exchange chromatography – SEC)

Molekulová vylučovací chromatografie separuje látky podle jejich velikosti. Zjednodušeně je separace založena na rychlosti průchodu analytu skrze porózní SF. Přitom se zde neuplatňují na rozdíl od ostatních módů žádné vazebné interakce. Molekuly jsou separovány po vstupu do pórů SF tak, že velké molekuly se ze sterických důvodů do pórů nedostanou a budou se eluovat rychleji než molekuly menší, které budou póry zpožděny. Nejčastěji se jako SF v tomto módu využívají polymery (např. polystyrendivinylbenzen). K zamezení jakékoli interakce analytu s polymerem se jako MF volí nejčastěji tetrahydrofuran či toluen. Při volbě vhodné MF však musíme zároveň pomýšlet na možné nežádoucí rozpouštění polymeru a ztrátě účinnosti SF. Opomenout zde nelze ani vliv teploty, která zásadně ovlivňuje viskozitu polymerů a zároveň může snadno ovlivnit detekci analytu v detektoru (nejčastěji se ve spojení s tímto módem využívá refraktometrický) [5]. Ačkoli je SEC využívána méně, má své uplatnění při separaci látek objemných molekul vzorků biologického původu, které poté mohou být dále separovány pomocí účinnějších separačních módů [5, 7].

Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic interaction chromatography – HILIC)

Částečnou modifikaci módu na NP představuje hydrofilní interakční chromatografie. Při ní se stejně jako u NP módu využívá polárních SF (v tomto případě nejčastěji silikagel

případně jeho modifikace aminopropylovou, diolovou nebo sulfoalkylbetainovou funkční skupinou), ale zároveň i polární MF. Ta je tvořena kombinací organických rozpouštědel (nejčastěji acetonitril) s vodou nebo pufrem (např. soli kyseliny mravenčí a octové). Mechanismus separace je stále předmětem diskusí a zkoumání, nicméně se předpokládá tvorba vodné vrstvy na povrchu SF, mezi níž a MF dochází k rozdělování analytů pomocí vazeb dipól-dipól. Další možností je účast vodíkových vazeb stejně jako je tomu při NP [11]. Ať už je přesný mechanismus jakýkoli, přináší s sebou tato metoda několik důležitých výhod. Je vhodná pro analýzu polárních látek, které by se při NP nedostatečně rozpouštěly v bezvodé MF a zároveň nejsou dostatečně zadržovány na RP. Další výhodou je symetrický tvar píků bazických analytů oproti separaci na RP, kde mohou často chvostovat. Vzhledem k využití organických rozpouštědel jako MF se může díky jejich nižší viskozitě použít vyšší průtoková rychlost a v neposlední řadě je tato metoda snadno spojitelná s MS detekcí, obzvláště při ionizaci elektrosprejem. I proto se tato metoda stala populární při analýze malých molekul jako jsou nukleosidy, nukleotidy, aminokyseliny, peptidy, proteiny a mnoho dalších [12, 13].

Další separační módy

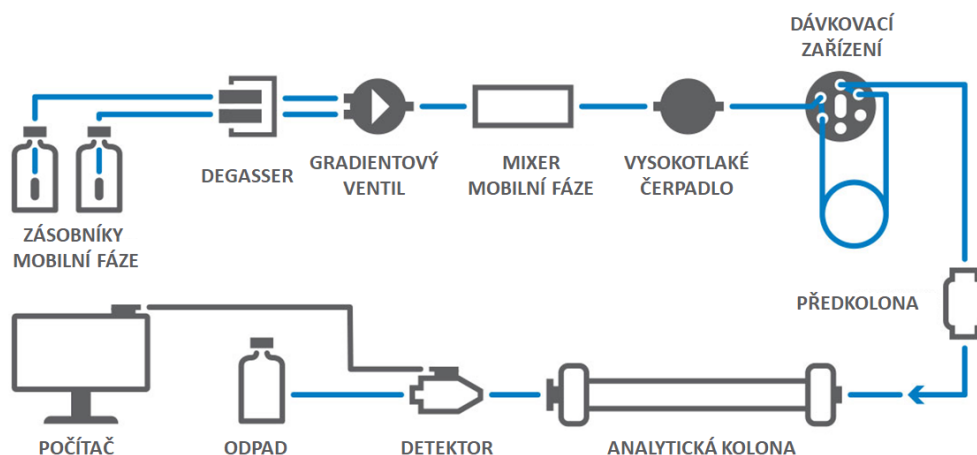
Krom výše zmíněných se můžeme setkat s chromatografií afinitní (využívající vazbu analytu na specifické ligandy ukotvené na SF), hydrofóbně interakční (využívána především pro separaci proteinů), či chirální (při využití chirálních SF nebo přídavku chirálního selektoru do MF s následnou separací na RP) [3].

Aby bylo dosaženo požadované separace konkrétních analytů je nutné zvolit separační mód, vybrat ideální SF a optimalizovat MF. MF musí být vhodná pro zvolený způsob detekce, netoxická, inertní, měla by mít dostatečný stupeň čistoty, vhodné pH, vhodnou viskozitu k zajištění minimálního zpětného tlaku v systému a neměla by narušovat, či dokonce vymývat SF [5, 14].

V současné době má kapalinová chromatografie ve farmaceutické analýze velké uplatnění vzhledem k možnosti separovat široké spektrum látek od malých molekul či iontů až po velké biomolekuly. Své dominantní postavení v oblasti analýzy léčiv si tato metoda vysloužila také pro vysoký stupeň automatizace, dobrou reprodukovatelnost napříč laboratořemi, preciznost a spolehlivost výsledků [14, 15].

3.2. Instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které mohou mít na základě odlišných požadavků na analýzu různé uspořádání, případně některé nemusí být při analýzách vůbec použity. Obecně lze ale kapalinový chromatograf popsat schématem na Obrázku 1.



Obr. 1 – Schéma kapalinového chromatografu. Převzato a upraveno z: [16]

3.2.1. Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky MF jsou nádoby z chemicky inertního materiálu, nejčastěji skla. Musí být dobře uzavřeny, aby nedošlo k unikání par ani ke kontaminaci MF okolními nečistotami. Pro zajištění vhodných podmínek pro analýzu by měly být umístěny výše než vysokotlaké čerpadlo. Lze využít jeden až čtyři zásobníky, ze kterých si pak dokáže sám systém smíchat MF v poměru dle požadavků konkrétní analýzy pomocí směšovacího zařízení. MF je před vstupem do samotného chromatografického systému nasávána přes filtry s porozitou 0,20 μm , aby došlo k zachycení tuhých částic [3, 14, 17, 18, 19].

3.2.2. Degaser

MF může obsahovat bubliny plynů, které by negativně ovlivnily výsledek analýzy např. z důvodu kolísání tlaku v systému, což vede k šumu základní linie, snížení citlivosti detekce a opakovatelnosti. Těmto komplikacím je předcházeno odplyněním MF. Pro odplynění můžeme MF ponořit do ultrazvukové lázně anebo lze využít helium k probublání MF již v zásobnících. Nejrozšířenější možností je však použití vakuového degaseru, který se skládá z polopropustné kapiláry umístěné ve vakuové komoře. Touto

kapilárou protéká mobilní fáze a rozdíly v tlacích uvnitř a vně kapiláry umožní prostup plynů přes stěnu kapiláry, čímž dochází k odplynění [3, 14, 17, 18, 19].

3.2.3. Vysokotlaké čerpadlo

Vysokotlaké pumpy umožňují průtok MF chromatografickým systémem a jejich hlavním úkolem je zajistit stabilní průtok MF kolonou. Pro dosažení opakovatelnosti analýzy musí být průtok mobilní fáze kontinuální s minimální fluktuací. Standardní HPLC systémy pracují za tlaku až 40 MPa [20]. Současným trendem je zkracování doby analýzy a nižší spotřeba MF, čehož lze dosáhnout zkrácením kolony a snížením velikosti částic, což s sebou přináší problém většího zpětného tlaku. Čerpadla musí být inertní a odolná vůči korozi, proto bývají vyrobena nejčastěji z nerezové oceli či titanu. Tato čerpadla lze rozdělit do dvou skupin podle toho, na jakém principu je založen pohyb pístů, a to na hydraulické a mechanické [3, 14, 17, 18, 19].

3.2.4. Dávkovací zařízení

Další součástí celého systému je dávkovací zařízení, které musí být schopno za vysokých tlaků dávkovat malé a přesné objemy vzorků. V minulosti se vzorek dávkoval injekčními stříkačkami přes septum, avšak tento postup se v dnešní době využívá minoritně. Dnes se setkáváme s takzvanými smyčkovými dávkovači, které využívají přepínacích ventilů (buď jednoho šesticestného nebo více třicestných). Tyto ventily umožňují nastříkat na kolonu obvykle 0,2 μ l až 2000 μ l vzorku [3]. K zamezení kontaminace mezi jednotlivými vzorky je jehla po nástřiku opláchnuta. Samozřejmostí je dnes i automatizace dávkovacího procesu za použití autosamplerů pracujících na principu přepínacího ventilu. Vzorky jsou nastříkovány ze zásobníku, který bývá nejčastěji umístěn v temperovaném prostoru a zároveň chráněn před světlem. Do tohoto zásobníku jsou vzorky vkládány v malých skleněných či plastových nádobkách označovaných jako vialky. Ty mají obvykle objem 2 ml a jsou uzavřeny víčkem s pryžovým septem, skrz které je vzorek nasáván do injektoru. V případě, že pracujeme s velmi malým množstvím vzorku, vkládají se do vialek navíc ještě inserty, které mají objem pouze v řádech stovek mikrolitrů. Autosamplery mohou pracovat více mechanismy. Prvním z nich je fixní injekční stříkačka a pohyblivý zásobník (pohyb osový nebo kruhový), druhým je fixní

zásobník a pohyblivé rameno injekční stříkačky a poslední možností je fixní zásobník i jehla, kdy vialka je roboticky dopravována mezi těmito dvěma součástmi [3, 14, 17, 21].

3.2.5. Kolona a stacionární fáze

Kolona se skládá z několika částí. První z nich je tělo kolony, kterou tvoří trubice s hladkým vnitřním povrchem. Tento plášť musí vykazovat vysokou odolnost nejen tlakovou, ale také chemickou, a proto je nejčastěji vyráběn z nerezové oceli. Někdy však ani to není nejvhodnější volba, neboť může při použití určitých mobilních fází docházet k vyluhování stopového množství železných iontů, které za určitých podmínek mohou ovlivňovat samotnou analýzu. Pro tyto případy lze použít kolony ze skla či vysokovýkonného plastu PEEK (polyetheretherketon), avšak za cenu nižší tlakové odolnosti. Další částí jsou koncovky kolony na obou stranách skládající se nejčastěji z frit zamezujících vymývání SF a ferulek s koncovými hlavicemi umožňující spojení kolony s chromatografickým systémem. Na tyto koncovky je kladen veliký důraz, protože musí zaručit dokonalou těsnost systému pracujícího při vysokém tlaku [21, 22].

V dnešní době je k dispozici obrovský výběr komerčně vyráběných kolon. Samotný výběr vhodných rozměrů kolony a typu SF je jedním z nejdůležitějších kroků při vývoji metody, ať už s ohledem na dosažení požadované účinnosti separace, nebo i na dobu chromatografické analýzy, která je přímo úměrná délce kolony a vnitřnímu průměru, a naopak nepřímo úměrná objemovému průtoku. Jednotlivé kolony se liší nejen v typu stacionární fáze, ale i v rozměrech jako délka, vnitřní průměr kolony a velikost částic. Běžně se setkáváme s kolonami o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm, délce 5 až 25 cm, které jsou plněné sorbentem o velikosti 3 μm až 5 μm [10]. Na základě charakteru stacionární fáze rozlišujeme kolony monolitické (tvořeny jedním kusem porózního materiálu vyplňující celý prostor kolony) a částicové (naplněné jednotlivými částicemi vybraného sorbentu) [21]. Dále budou podrobně probrány pouze částicové kolony, které podle chemické povahy můžeme dělit následovně:

Stacionární fáze na bázi silikagelu

Silikagel patří mezi nejrozšířenější sorbenty s širokým komerčním využitím. Jedná se o polární anorganický sorbent s povrchovými aktivními centry ve formě silanolových skupin mající slabě kyselý charakter. Jeho výhodou je odolnost vůči vysokým tlakům, vysoká účinnost separace a reprodukovatelnost výsledků. Aktivita volných silanolových

skupin je velice snadno ovlivnitelná hodnotou pH a limitující je pro tyto kolony obecně rozmezí pH 3–7 [23]. Při snížení pH pod 3 se začínají tyto skupiny hydrolyzovat, což může vést ke ztrátě navázaných ligandů a při pH vyšším než 8 dochází k rozpouštění silikagelu a vymývání samotné SF [24, 25]. Další problémem spojeným s hodnotou pH nastává při analýze bazických látek, jejichž píky mají na těchto SF tendenci chvostovat. Při $\text{pH} < 4$ vlivem protonace funkčních skupin dochází ke snížení interakcí s bazickými látkami. Oproti tomu při $\text{pH} > 6$ budou silanolové skupiny zcela ionizované a budou velice silně interagovat s protonovanými bazickými centry analytů. Tomuto nechtěnému jevu lze zamezit použitím silikagelu větší čistoty, případně přidáním slabé organické baze do MF [3, 26].

Samotný silikagel je vhodný pro separace na normálních fázích, avšak pro další separační módy (RP, IEC, SEC) se využívá modifikovaný silikagel, jehož volné hydroxylové skupiny umožňují substituci různými funkčními skupinami [25]. Navázání chemických ligandů má v tomto případě i přínos v tom, že zamezuje vymývání samotné SF z nosiče. Setkat se můžeme s navázanými alkylovými řetězci různé délky přes siloxanový můstek (Si-O-Si). Výběr vhodné délky řetězce závisí na polaritě analytů. Pro polární látky jsou vhodnější krátké řetězce a pro nepolární naopak dlouhé. Obecně se délka řetězce pohybuje od C_2 – C_{30} . Právě tato vazba je náchylná k hydrolytickému štěpení zmíněnému výše. Další možnou modifikací je navázání nitrilové, aminové, diolové nebo fluorované funkční skupiny, čehož se využívá u separace na normálních i reverzních fázích i v módu HILIC. U takto chemicky modifikovaných silikagelových stacionárních fází hrají důležitou roli volné silanolové skupiny. Ty mohou nespecificky reagovat s MF, což je při použití modifikovaného silikagelu nežádoucí [27]. Pro omezení vlivu těchto interakcí se používá maskování volných Si-OH skupin, což se běžně označuje termínem „end-capping“. Na tyto skupiny jsou navázány např. objemné alkylové substituenty a ty poté stericky brání interakcím s analytem [3, 24, 26].

Stacionární fáze na bázi kovových oxidů

Jedná se o polární anorganické sorbenty s lepší chemickou stabilitou oproti silikagelu. Do praxe se dostal oxid hlinitý, oxid titaničitý a nejvíce využívaný je oxid zirkoničitý. Díky jejich větší odolnosti mají kolony delší životnost, s čímž jsou spojené i menší náklady na samotnou analýzu. Zároveň jsou více flexibilní při vývoji nových metod, neboť umožňují pracovat v širším rozsahu pH (pro Al_2O_3 pH 3–13, ZrO_2 pH 1–14) i za vyšších teplot (SiO_2 do 60–70 °C, ZrO_2 až 200 °C) [25, 28]. I zde se v praxi často setkáváme s jejich

chemickými modifikacemi různými funkčními skupinami pro uplatnění při separaci na reverzní fázi či v HILIC módu [25, 28, 29].

Polymerní stacionární fáze

Z důvodu nízké chemické stability silikagelu se vyvinuly polymerní stacionární fáze, které jsou nejčastěji tvořené polystyrendivinylybezenem. Jejich předností je stabilita v celém rozsahu pH a vysoká teplotní odolnost. Nevýhodou u těchto sorbentů je omezení maximálního pracovního tlaku na 20 MPa a jejich tendence ke srážení či bobtnání při vyšším obsahu organického rozpouštědla v MF [3]. Tento nežádoucí jev se o to více projeví při použití gradientové eluce a může vést ke ztrátě efektivity či zvýšení tlaku [26]. Navíc v porovnání se silikagelem dosahují tyto stacionární fáze menší chromatografické účinnosti při analýze stejně velkých částic z důvodu jejich možné difúze do mikropórů [5, 26].

Hybridní stacionární fáze

Hybridní stacionární fáze jsou složeny z anorganického silikagelu a organického polymeru spojených hydrolyticky odolnou Si-C vazbou. Touto kombinací je dosaženo spojení vysoké účinnosti a mechanické odolnosti silikagelu s chemickou a teplotní odolností polymeru (stabilita v širokém rozsahu pH). Stejně jako silikagel může být tento typ SF modifikován různými ligandy [26].

Stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku

Grafitický uhlík je syntetický materiál vhodný k separaci vysoce polárních látek, neboť je ještě více hydrofobní než alkylovaný silikagel. Využít ho lze při NP i RP separacích, ale často se uplatňuje při separacích chirálních pro svoji planární strukturu. Mezi výhody patří vysoká teplotní odolnost (až 200°C) a stabilita v celém rozsahu pH [5, 26].

3.2.6. Detektor

Poslední částí celého chromatografického systému je detektor. Toto zařízení zaznamenává pomocí snímače přítomnost sledovaného analytu v MF, následně tento signál zesílí a převede na záznam. Aby bylo možné správně interpretovat výsledky měření, je zapotřebí, aby detektor měl dostatečně vysokou citlivost, široký dynamický rozsah, univerzálnost, spolehlivost a zároveň, aby detekce signálu nebyla závislá na

experimentálních podmínkách, jako je složení mobilní fáze, teplota či průtok. Žádný detektor však nemůže splňovat všechny výše uvedené požadavky, a proto je nutné vybrat pro každou analýzu vhodný detektor [3, 17, 30]. Vybírat v současnosti můžeme z detektoru spektrofotometrického, fluorescenčního, vodivostního, elektrochemického, refraktometrického a hmotnostně spektrometrického. Dále budou podrobněji popsány pouze ty detektory, které jsou ve farmaceutické analýze používány nejčastěji. Hmotnostně spektrometrickému detektoru bude věnována samostatná kapitola, neboť byl využíván při provádění analýze.

Spektrofotometrický detektor

Tento typ je vůbec nejpoužívanějším detektorem ve farmaceutické analýze [14]. Funguje na principu absorpce záření v širokém rozmezí vlnových délek v UV i VIS oblasti. Kvantitativní stanovení analytu se v tomto případě řídí Lambert-Beerovým zákonem. Spektrofotometrické detektory lze ještě dále rozdělit dle způsobu detekce na detektory s fixní vlnovou délkou (v moderní praxi již nejsou využívány), s programovatelnou vlnovou délkou a s diodovým polem (snímající celé spektrum). Posledně zmiňované detektory s diodovým polem představují obrovskou výhodu, neboť dokážou najednou proměřit celé spektrum vlnových délek bez přerušení samotné separace, čehož lze využít u analytů s rozdílným UV maximem. Záření je po průchodu přes měrnou celu za pomoci difrakční mřížky rozkládáno tak, aby na každou z fotodiod (těch bývá zpravidla 512 až 1024) dopadl zářivý tok o dané vlnové délce zeslabený absorpcí eluátu. Každá z těchto fotodiod je propojena s kondenzátorem, na kterém dochází k vybíjení úměrnému intenzitě dopadajícího záření a měří se proud potřebný k opětovnému nabití kondenzátoru. Nevýhodou tohoto typu detekce oproti klasickým UV-VIS detektorům může být větší šum a větší náchylnost ke změnám jako fluktuace výkonu lampy [3, 17, 31].

Fluorescenční detektor

Vysoce selektivní a citlivý detektor fungující na principu měření emisního záření, jež vzniká na základě absorpce excitačního elektromagnetického záření. Podmínkou je, aby analyt vykazoval fluorescenci, případně aby bylo možné ho vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Omezením zde jsou nároky na ostatní složky přicházející na detektor, neboť nesmí samy o sobě vykazovat fluorescenci, případně fluorescenci analytu zhasět [30, 31].

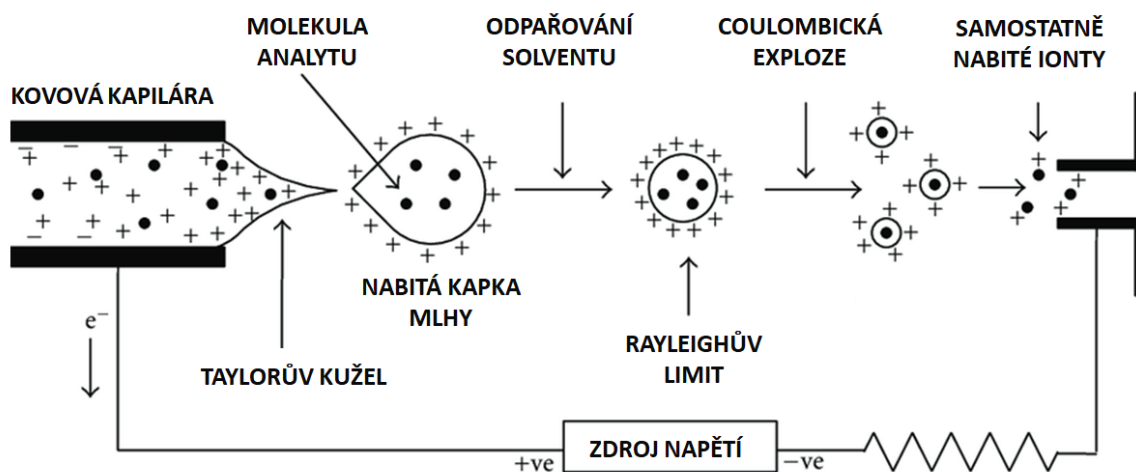
3.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je vysoce selektivní a velmi často využívanou separační technikou založenou na separaci iontů v plynné fázi, kdy jsou nejprve neutrální molekuly v iontovém zdroji převedeny na ionty, ty následně analyzátor dle jejich poměru hmotnost/náboj (m/z) rozdělí a detektor je převede na elektrický signál, který je zaznamenán pomocí počítače [32]. Jednotlivé součásti hmotnostně spektrometrického detektoru mohou fungovat na rozdílných principech a záleží na požadavcích konkrétní analýzy, jaké kombinace iontového zdroje, analyzátoru a detektoru bude nejvhodnější.

3.3.1. Iontový zdroj

Ionizace probíhá buď ve vakuu při elektronové nebo chemické ionizaci (EI, *electron ionization*; CI, *chemical ionization*), anebo za atmosférického tlaku (API, *atmospheric pressure ionization*), kam patří ionizace elektrosprejem (ESI, *electrospray ionization*), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) a fotoionizace (APPI, *atmospheric pressure photoionization*). Především poslední dvě techniky jsou při spojení LC-MS nejvyužívanější [3].

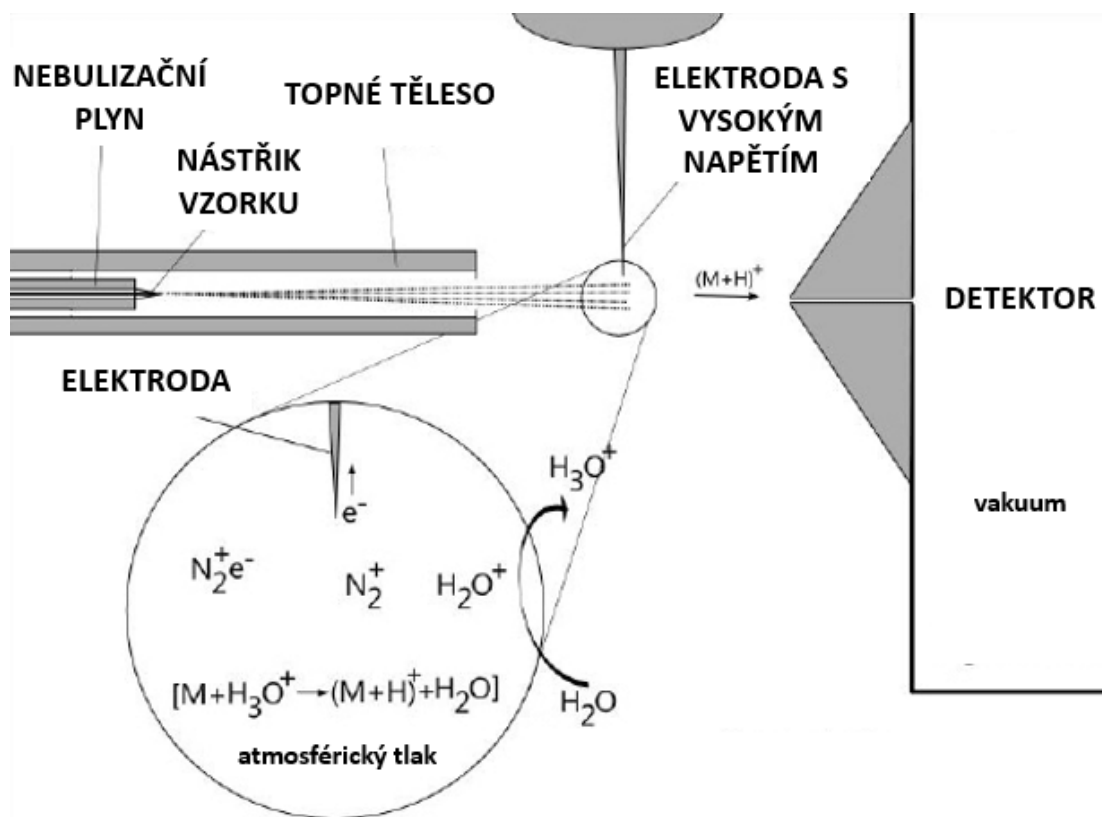
Při ESI je analyt přiváděn do iontového zdroje skrz kovovou kapiláru, která má elektrický potenciál několik jednotek kilovolt. Na konci této kapiláry dochází za pomoci horkého plynu k tvorbě ionizovaných jemných kapek mlhy o velikosti v řádu nanometrů. Z proudících kapek se postupně odpařuje kapalina, čímž dochází k zesilování náboje až do okamžiku označovaného jako Rayleighův limit, kdy dojde vlivem odpuzivých sil k tzv. Coulombické explozi a prostorovému „naředění“ náboje. Výsledkem jsou samostatně nabitě ionty, jak lze vidět na Obrázku 2.



Obr. 2 – Schéma ionizace elektrosprejem. Převzato a upraveno z: [33]

ESI je vhodná pro velké množství sloučenin s vysokou či střední polaritou a rozdílnou molekulovou hmotností. V případě využití této ionizační techniky je riziko častého výskytu matricových efektů, což je jev, kdy interferující látky z matrice (soli, proteiny, fosfolipidy, ...) mohou ovlivňovat ionizaci a může tak dojít k zesílení (enhancement) nebo potlačení (suprese) signálu sledovaného analytu. Tyto matricové efekty musí být brány v potaz při kvantitativní analýze, neboť mohou zásadně ovlivnit citlivost a reprodukovatelnost analýzy případně linearitu odpovědi detektoru [34, 35, 36].

Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku dochází opět k nástřiku analytu ve formě jemné mlhy a kapalina se rychle odpaří. Dále vzorek projde elektrodou s vysokým napětím, kdy dojde nejprve k ionizaci rozpouštědla a následně vzniklé reaktivní ionty předají náboj molekulám analytu. Zjednodušené schéma lze vidět na Obrázku 3.



Obr. 3 – Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku. Převzato a upraveno z: [37]

Tento postup ionizace je využíván u sloučenin nízké až střední polarity a molekulové hmotnosti do 1500 Da. Oproti ESI lze využít vyšší průtoky MF a dosavadní studia naznačují, že by v porovnání s ESI měl být menší výskyt matricových efektů [34, 36].

3.3.2. Hmotnostní analyzátor

Za iontovým zdrojem je umístěn analyzátor, který vzniklé ionty rozděljuje. Setkat se můžeme s analyzátozem typu kvadrupólu (Q), iontové pasti (IT), magnetického sektorového analyzátoru (B), analyzátoru doby letu (TOF), orbitální pasti nebo iontové cyklotronové rezonance (FT-ICR) [32].

Analyzátor typu kvadrupólu se skládá ze čtyř rovnoběžných válcových tyčí uvnitř vakuové komory, na které je přivedeno stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí, vytvářející uvnitř oscilující elektrické pole. Na základě různé stability oscilací (danou hodnotou m/z) jsou analyty separovány na ty, které díky stabilnější trajektorii letu projdou skrz a ty, které se zachytí na tyčích kvadrupólu. Díky spolehlivosti, odolnosti, relativní cenové dostupnosti a rychlému záznamu spekter je kvadrupól velmi často využívaným

typem analyzátoru ve farmaceutické analýze nejen samostatně, ale především v tandemové spektrometrii, která bude probrána dále.

Na podobném principu funguje i analyzátor typu iontové pasti. Donedávna byla nepoužívanější trojrozměrná iontová past skládající se z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod. Pod napětím jsou ionty zachyceny mezi elektrodami a na základě poměru m/z selektivně propouštěny. V současné době je však populárnější lineární 2D iontová past. Ta se od kvadrupólu liší tím, že má elektrody na obou koncích a je tedy schopna ionty udržet. Oproti 3D má tento typ pasti lepší kapacitu a schopnost pracovat jak v módu pasti, tak i kvadrupólu.

Magnetický sektorový analyzátor využívá zakřivení dráhy letu iontů při průchodu magnetickým polem tvaru kruhové výseče. Čím nižší hodnota m/z , tím bude dráha letu více zakřivena a iont proletí rychleji. Pro dosažení většího rozlišení se často magnetický sektor propojuje s elektrostatickým sektorem, což vede ke dvojitě fokusaci iontů. Tím lze dosáhnout podstatně vyšší rozlišovací schopnosti v porovnání s předchozími typy analyzátorů, avšak důvodem jejich nepříliš časté aplikace při analýze jsou obrovské rozměry a nízká rychlost záznamu.

Na nejjednodušším principu pracuje analyzátor doby letu. Ten separuje ionty na základě jejich odlišné doby letu v oblasti bez elektromagnetického pole. Ionty s menší hodnotou m/z mají větší zrychlení, a tedy i větší rychlost. Nesmírnou výhodou tohoto analyzátoru je práce v širokém rozsahu m/z hodnot a vysoká rychlost záznamu.

Pro zlepšení parametrů jednotlivých analyzátorů (rozlišení, rozsah, rychlost záznamu) je dnes poměrně populární jejich spojení za vzniku tzv. hybridních analyzátorů. Mezi nejčastěji používaný hybridní analyzátor patří QqTOF, který umožňuje měřit s vysokým rozlišením, stejně jako Orbitrap a FT-ICR [14, 34, 38, 39, 40].

3.3.3. Detektor

Ionty prošlé skrze analyzátor jsou v posledním kroku pomocí detektoru transformovány na signál, který zpracovává počítač. Mezi nepoužívanější detektory patří Faradayova klec (zaznamenává proud, který vzniká při srážce iontů se stěnou klece), elektronásobič (po srážce iontu s povrchem jsou generovány sekundární elektrony, které jsou znásobeny a zaznamenávány) a fotonásobič (srážka iontu s povrchem generuje fotony, které jsou znásobeny a zaznamenávány). Oproti ostatním analyzátorům nemusí být Orbitrap

a FT-ICR spojené s detektorem, neboť jsou schopné díky Fourierovy transformaci převést signál rovnou na hmotnostní spektrum [32, 34].

3.3.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie

Při analýze komplexních vzorků nemusí být rozlišovací schopnost MS dostačující, neboť látky z matrice s podobnou hodnotou m/z by mohly interferovat s pozorovanými ionty. Z tohoto důvodu se zavedla do praxe tandemová hmotnostní spektrometrie poskytující detailnější informace o analyzovaném vzorku díky propojení dvou a více hmotnostních analyzátorů. Podle volby analyzátoru rozlišujeme tandemovou MS v čase (tandem-in-time) a prostoru (tandem-in-space). Při tandem-in-time analýze se využívá analyzátorů typu IT nebo FT-ICR umožňujících provést všechny kroky na jednom analyzátoru. Naopak při analýze tandem-in-space dochází k zapojení více analyzátorů za sebe, jako je to u trojitého kvadrupólu (QqQ), QqTOF, dvojitého magnetického a případně dalších hybridních analyzátorů. U nich lze první hmotnostní analyzátor využít k základnímu skenu v celém studovaném rozsahu (full-scan) nebo k selektivnímu záznamu vybraného iontu na základě jeho m/z (SIM). Následně se podrobí ionty v kolizní cele fragmentaci, pro kterou se nejčastěji využívá srážek s těžkým inertním plynem (krypton, xenon), čímž získáme takzvané produktové ionty. Hmotnostní spektrum těchto produktových iontů následně změří další hmotnostní spektrometr, u něhož lze opět využít jak full-scanu, tak SIM záznamu. Jelikož máme pro každý analyzátor dvě možnosti záznamu, můžeme získat jejich kombinací čtyři výsledné záznamy [38, 41, 42]:

- *Sken produktových iontů* – sken obsahující pouze produktové ionty ze selektivně vybraného prekurzoru, sloužící k objasnění struktury analytu (kombinace SIM + full-scan)
- *Sken prekurzorových iontů* – sken obsahující spektrum všech prekurzorových iontů, z nichž mohl vzniknout určitý fragment, používaný k identifikaci strukturně blízkých látek ve směsi (kombinace full-scan + SIM)
- *Sken neutrálních ztrát* – sken monitorující všechny prekurzory, které při kolizi ztratí stejnou hmotu, používán pro selektivní identifikaci strukturně velmi blízkých látek (full-scan + full-scan)

- *Selektivní záznam jedné nebo více reakcí* – sken sledující fragmentaci vybraného iontu, používaný ke kvantitativní analýze analytů ve složitých směsích (SIM + SIM)

3.4. Spojení LC-MS

Propojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, jakožto dvou separačních technik, znamenalo pro farmaceutickou analýzu obrovský přínos. Díky tomuto spojení není nutné kompletně separovat všechny analyty v matrici vzorku, ale lze sledovat pouze vybrané látky, čímž se značně zkracuje doba analýz, což umožňuje snadnější separace velmi komplexních vzorků. Právě takové vzorky jsou předmětem analýz v oblastech bioanalýzy. Samotné separační techniky však nejsou spolu kompatibilní, což zpočátku představovalo obrovskou výzvu. LC totiž pracuje s analyty v kapalně fázi za atmosférického tlaku, zatímco MS vyžaduje fázi plynnou a vysoké vakuum. Další problém představuje množství MF protékající při LC, jelikož takové množství kapaliny by zahltilo MS a znehodnotilo odezvy detektorů. Tyto problémy se podařilo vyřešit objevením ionizačních technik prováděných za atmosférického tlaku (ESI, APPI, APCI, MALDI). Kombinací vlivu tepla, tlaku a nebulizace dochází k vypaření nežádoucích složek eluátu při zachování analyzované struktury, současně jsou běžně nenabitě analyty z LC ionizovány, aby mohly být následně detekovány pomocí MS. Důležitou podmínkou k uplatnění tohoto spojení je i volba vhodných MF, které musí být těkavé včetně použitých pufrů a jiných pH modifikátorů. Vybírat lze například z kyseliny mravenčí nebo octové a jejich solí s amoniakem, triethylaminu či uhličitanů [32, 41, 43]. Již výše byl zmíněn důležitý vliv matricových efektů na analýzu při ESI, kterému je třeba u LC-MS analýz předcházet. ME mohou být do značné míry kompenzovány použitím vnitřního standardu (IS), což je látka s velmi podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako stanovovaný analyt, který je ve stejném množství přidán do všech vzorků i standardů. Následné vyhodnocení výsledků probíhá na základě poměru ploch analytu k IS. Touto metodou dochází k zásadnímu zvýšení přesnosti, správnosti a spolehlivosti celé chromatografické analýzy. Dříve dominantně používané strukturální analogy vystřídali izotopicky značené IS označované jako SIL IS, jejichž výhodou je shodný retenční čas, a tudíž jsou s analytem i současně ionizovány [32, 43, 44].

3.5. UHPLC

Moderní analytické metody se neustále zdokonalují a ani oblast chromatografických metod nezůstává v tomto trendu pozadu. Jedním ze zásadních trendů modernizace metod je zkrácení celkové doby analýzy a další důležité aspekty jako účinnost či citlivost však musí být oproti původním metodám zachovány, ideálně zlepšovány. Vývoj instrumentace umožňující použití vyšších tlaků v kapalinové chromatografii, tzv. ultra-vysokoúčinná kapalinové chromatografie (UHPLC) tyto požadavky spolehlivě splnila a předčila tak standartní HPLC analýzu. UHPLC využívá sorbenty s velikostí částic pod 2 μm a tlaky v přístroji tedy dosahují podstatně vyšších hodnot v porovnání s HPLC a to až 100 MPa i více. Použití sorbentů s menšími částicemi představuje pro separaci mnoho výhod:

- Kratší doba analýzy
- Zvýšení separační účinnosti
- Zvýšení citlivosti
- Dávkování velmi malých objemů vzorku
- Možnost využití kratších kolon s menšími průměry
- Snížení spotřeby mobilní fáze, díky nižším průtokům MF

Opomenout však nelze fakt, že zvýšení tlaků vedlo k vyšším nárokům na materiál, ze kterého se tyto UHPLC systémy konstruují, což zvedlo náklady nejen na jejich výrobu, ale i samotný provoz a také ke zkrácení životnosti samotných kolon [45]. Zmenšení velikosti částic sorbentu zvyšuje riziko ucpání kolony a z tohoto důvodu je nutné při UHPLC analýze používat vzorky a chemikálie o vyšší čistotě, což s sebou opět nese další finanční zátěž [3, 45, 46, 47].

3.5.1. Transfer metody

Transfer chromatografické metody je velmi často řešená otázka v mnoha laboratořích. Primárním záměrem těchto převodů bývá buď transfer metody na stejné zařízení v jiné laboratoři nebo převod na jiný systém, kterým může být ve snaze docílit zrychlení analýzy právě UHPLC. Při prostém porovnání těchto dvou analytických metod za stejných podmínek je zřejmé, že při využití menších částic stacionární fáze a zachování stejné délky kolony nám UHPLC poskytne více teoretických pater a lepší rozlišení. Nicméně

při převodu metody je většinou rozlišení originální HPLC metody dostačující, a proto se často volí kratší kolony, díky nimž jsme schopni docílit rychlejší separace. Jelikož délka kolony hraje roli prakticky ve všech chromatografických výpočtech, je nutné při tomto přenosu metody změnit objem nástřiku, objemový průtok a upravit gradientový profil [3, 48, 49].

Díky zmenšení rozměrů kolony se sníží i její celkový objem, který je třeba zohlednit v objemu nastříkovaného vzorku. Pokud bychom tento objem nesnížili, docházelo by k rozmývání píků a snižování citlivosti samotné metody. V tomto případě platí jednoduchý vztah, kdy dávkovaný objem by měl představovat 1–5 % objemu kolony [3, 48, 49].

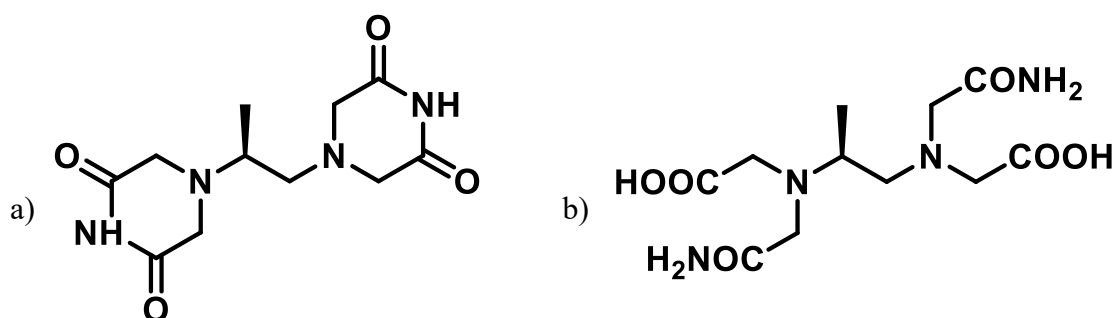
Nastavení průtoku hraje důležitou roli v zajištění lineární rychlosti neboli vzdálenosti dosahující mobilní fáze za časovou jednotku, a následně zachování účinnosti. Se zmenšením průměru kolony tedy musí dojít ke snížení průtoku mobilní fáze. Roli zde však nehraje délka kolony, ale pouze velikost částic a průměr [3, 48, 49].

Na závěr optimalizace metody lze upravit v případě využití gradientové eluce samotný gradient. Zde je zapotřebí upravit počátek každého gradientového kroku, aby docházelo k interakcím fáze ve stejnou dobu [3, 48, 49].

3.6. Dexrazoxan

Dexrazoxan (DEX, (S)-4-[2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)-propyl]piperazin-2,6-dion, Obrázek 4a) je bílá až téměř bílá krystalická látka řadící se dle chemické struktury do skupiny bisdioxopiperazinů. Jedná se o jediné registrované léčivo užívané ke snížení kardiotoxicity protinádorové léčby u dospělých, navozené skupinou cytostatik nazývaných antracykliny (např. doxorubicin, idarubicin atd.) [50]. DEX v této indikaci snižuje kardiotoxicitu těchto látek až o 80 % [51]. Kromě výše zmíněného je DEX užíván proti antracyklinové extravazaci a v obou případech se podává pacientům ve formě infuzí [50, 52]. Ačkoli byl DEX poprvé uveden do praxe již před desítky let, jeho přesný mechanismus účinku je stále předmětem mnoha studií. Prvotní studie přisuzovaly klíčovou roli chelatačním vlastnostem ADR-925 (Obrázek 4b), což je metabolit vznikající enzymatickou hydrolyzou, strukturou podobný EDTA. Tato úvaha se opírá o skutečnost, že riziko srdečního selhání se zvyšuje působením oxidačního stresu. Tohoto procesu se přímo účastní ionty železa, které tvoří s antracykliny komplex. Tento komplex může být za přítomnosti redoxního systému redukován a v této formě poté reagovat

s kyslíkem či peroxidem vodíku za tvorby volných radikálů [53]. Přímě aplikovaný metabolit ADR-925 však nemá kardioprotektivní účinek jako samotný DEX [54] a zároveň zablokování enzymatické hydrolýzy nevede k vymizení kardioprotekce [55]. Tyto skutečnosti vedly k dalšímu zkoumání mechanismu účinku a novější studie ukazují, že mechanismus účinku DEX bude spíše souviset s inhibicí topoisomerázy II β , enzymu účastnícího se štěpení řetězce DNA [50, 51, 56, 57].



Obr. 4 – Strukturní vzorec a) dexrazoxanu, b) ADR-925

3.7. Současná HPLC-MS/MS metoda pro stanovení DEX a ADR-925

Objasnění příčiny kardiotoxicity antracyklinů, stejně jako mechanismu účinku DEX zůstává stále předmětem studií, při kterých je analytická metoda pro současné stanovení DEX a jeho metabolitu ADR-925 nedílnou součástí mnoha *in vitro* i *in vivo* experimentů. ADR-925 je vysoce polární a je tedy slabě zadržován na reverzní fázi oproti výrazně lipofilnějšímu DEX. V roce 2012 Kovaříková *et al.* publikovala HPLC-MS/MS metodu pro současné stanovení DEX a ADR-925 [58]. Tato metoda byla vyvinuta na HPLC systému se současnou MS detekcí využívající iontovou past (LCQ Advantage, Thermo Finnigan). Jako stacionární fáze byla použita kolona Synergi Polar-RP (150 mm × 3 mm, 4 μ m; Phenomenex). Mobilní fáze se skládala z methanolu a z 2mM mravenčanu amonného bez úpravy pH s 5% methanolem, byla použita gradientová eluce. Průtok mobilní fáze byl stanoven na 0,15 ml/min, teplota termostatu na 25 °C a nástřik vzorku byl 10 μ l. Pro zamezení degradace vzorku byl autosampler nastaven na 4 °C. Délka analýzy byla 30 minut, což pro aktuální standardy moderní analýzy, která se za téměř deset let obrovsky posunula, není dostačující a z tohoto důvodu je žádoucí tuto metodu modifikovat a přizpůsobit současným nárokům [58].

4. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo:

1. Vývoj nové, rychlejší a citlivější metody pro stanovení dexrazoxanu a jeho metabolitu ADR-925 v plasmě za pomoci UHPLC-MS/MS systému
2. Validace nově vyvinuté UHPLC-MS/MS metody

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Chemikálie a materiál

Chemikálie

- Methanol, LC-MS, Merck, Německo
- Acetonitril, LC-MS, Merck, Německo
- Ultračistá voda (Mili-Q purifikační systém) Merck Millipore, Německo
- Kyselina mravenčí, Merck, Německo
- Mravenčan amonný, Merck, Německo
- Dimethylsulfoxid, Merck, Německo

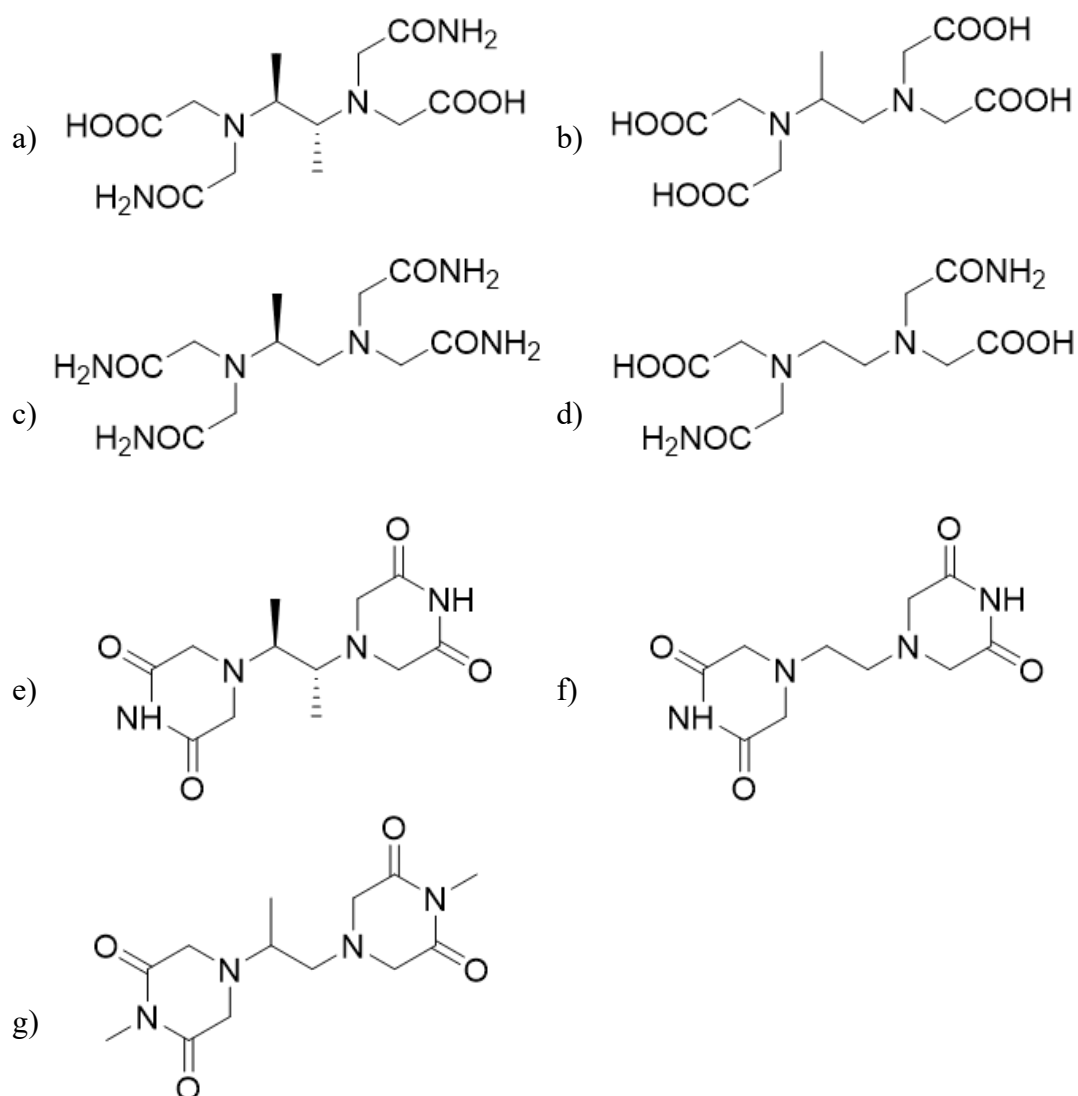
Standardy analytů

- Dexrazoxan, Sigma-Aldrich, Německo
- ADR-925, syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a následně charakterizován za pomoci NMR a MS

Vnitřní standardy (IS)

- *meso-N,N'*-bis(karbamoylmethyl)-2,3-diaminobutan-*N,N'*-dioctová kyselina (JAS-OM), syntetizována na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a následně charakterizován za pomoci NMR a MS
- 1,2-diaminopropan-*N,N,N',N'*-tetraoctová kyselina (PDTA), Sigma-Aldrich, Německo
- (propan-1,2-diylidinitrilo)tetraacetamid (4AMD), syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a následně charakterizován za pomoci NMR a MS
- diamid kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTAm), syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a následně charakterizován za pomoci NMR a MS

- 4,4'-(1,2-dimethyl-1,2-ethandiyl)bis-2,6-piperazindion (JAS-2), syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a následně charakterizován za pomoci NMR a MS
- 1,2-bis(3,5-dioxopiperazin-1-yl)ethan (ICRF-154), syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a následně charakterizován za pomoci NMR a MS
- 4,4'-(propan-1,2-diyl)bis(1-methylpiperazin-2,6-dion) (DMET), syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a následně charakterizován za pomoci NMR a MS
- Chemické struktury IS jsou uvedeny na Obrázku 5.



Obr. 5 – Strukturní vzorec a) JAS-OM, b) PDTA, c) 4AMD, d) EDTAm, e) JAS-2, f) ICRF-154, g) DMET

Ostatní

- Čistá králičí plasma (s heparinem jako antikoagulantem), ITEST plus, Česká republika

5.2. Příprava zásobních roztoků

Pro vývoj chromatografické metody byly připravovány zásobní roztoky analytů o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním příslušné navážky pevné substance. Jako rozpouštědlo pro DEX byl zvolen čistý methanol, pro ADR-925 směs methanolu a vody (1:1, v/v). V případě IS byla navážena pevná substance a poté rozpuštěna v potřebném objemu rozpouštědla tak, aby byl připraven roztok o následující koncentraci – JAS-OM (1 mg/ml), PDTA (0,5 mg/ml), 4AMD (0,5 mg/ml), EDTAm (0,25mg/ml), JAS-2 (1 mg/ml), ICRF-154 (0,25 mg/ml), DMET (0,25 mg/ml). Tyto navážky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (ICRF-154, JAS-2), směsi methanolu a vody (1:1, v/v) (EDTAm, JAS-OM, PDTA, 4AMD) a čistém methanolu (DMET).

5.1. Úprava vzorku

Vzorky k analýze byly připravovány v mikrozkušnicích Eppendorf, do kterých byla nejdříve pipetována plasma (50 μ l), poté roztoky standardů (2 μ l) a IS (2 μ l). K precipitaci plasmy byl použit ledový methanol v poměru 1:5 (v/v) a celá práce probíhala v ledovém bloku. Zkušnicí byly následně protřepány po dobu 30 s na Wizard Advanced IR Vortex mixéru (Velp Scientifica, Itálie) a centrifugovány za pomoci centrifugy IEC CL31R Multispeed (Thermo, USA) při 4 °C po dobu 10 minut na 10 000 otáček za minutu. Vzniklý supernatant byl odebrán a filtrován (PVDF membrána, velikost pórů 0,22 μ m) do vialek s inserty.

5.2. Optimalizace UHPLC-MS podmínek

Analýza byla prováděna na UHPLC systému Nexera X2 propojeného s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu LCMS-8030 (obojí Shimadzu, Japonsko) s ESI v pozitivním módu. Všechna data byla zpracována pomocí LabSolution softwaru (Shimadzu, Japonsko). Testovány byly kolony Zorbax Bonus-RP (100 mm \times 3.0 mm, 1.8 μ m, Agilent, USA), Luna Omega Polar C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.6 μ m, Phenomenex, USA) a Kinetex F5 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m, Phenomenex, USA).

Pro optimalizaci složení mobilní fáze byly na kolonu nastříkovány standardní roztoky jednotlivých analytů o koncentraci 5 µg/ml. Byla porovnána odezva detektoru, hodnocena symetrie píku a čas analýzy. Jako MF byly zkoušeny směsi vody, kyseliny mravenčí (o koncentracích 0,01%, 0,1%, 0,25%, 0,5% a 1,0%), nebo mravenčanu amonného (o koncentracích 1mM, 2mM, 5mM) jako vodné složky (MF A) s methanolem nebo acetonitrilem jako organické složky (MF B). Pro zjištění vhodného podílu organické části MF byly vzorky nejdříve měřeny isokratickou elucí s 30 % a 50 % B. Následně byla zkoušena gradientová eluce 5-90 % B (pozvolný gradient na 10 minut) a poté individuálně upravovaný časový průběh gradientu pro optimalizaci metody. S využitím optimalizovaných podmínek byla hodnocena linearita pro stanovení obou analytů v plasmě v koncentračním rozmezí 1 až 100 µmol/l. Pro tento účel byly připraveny vzorky plasmy s přídatkem potřebného množství pracovních roztoků (koncentrace 25 až 2500 µmol/l).

5.3. Validace metody stanovení DEX a ADR-925 v plasmě

Vyvinutá analytická metoda byla validována pro současné stanovení DEX a ADR-925 v plasmě podle parametrů Evropské lékové agentury (EMA) pro validaci bioanalytických metod [59]. Validovány byly parametry jako linearita, přesnost a preciznost, matricové efekty a výtěžnost.

Při zjišťování linearity metody byly použity pracovní zásobní roztoky o koncentracích 5 až 2500 µmol/l, jež byly připraveny naředěním zásobního roztoku příslušným rozpouštědlem. Linearita byla měřena na deseti hladinách 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 a 100 µmol/l. Vzorky plasmy byly připraveny přídatkem pracovních roztoků k prázdné plasmě, každý vzorek byl nastříknut třikrát a výsledky byly vyhodnoceny za použití lineární regrese.

K ověření přesnosti a preciznosti metody byly vybrány hladiny 0,2, 0,5, 1, 50 a 100 µmol/l a pro každou hladinu bylo připraveno pět vzorků plasmy testovaných metodou „within-run“ v rámci jednoho dne. Přesnost byla vyjádřena v % z poměru stanovené koncentrace měřeného vzorku vypočtené na základě kalibrační křivky s výchozí koncentrací a preciznost vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) mezi jednotlivými vzorky na dané hladině.

Matricové efekty byly hodnoceny metodou standardního přídatku, kdy byly porovnány plochy píků roztoku standardu bez matrice a vzorku připraveného přídatkem standardu

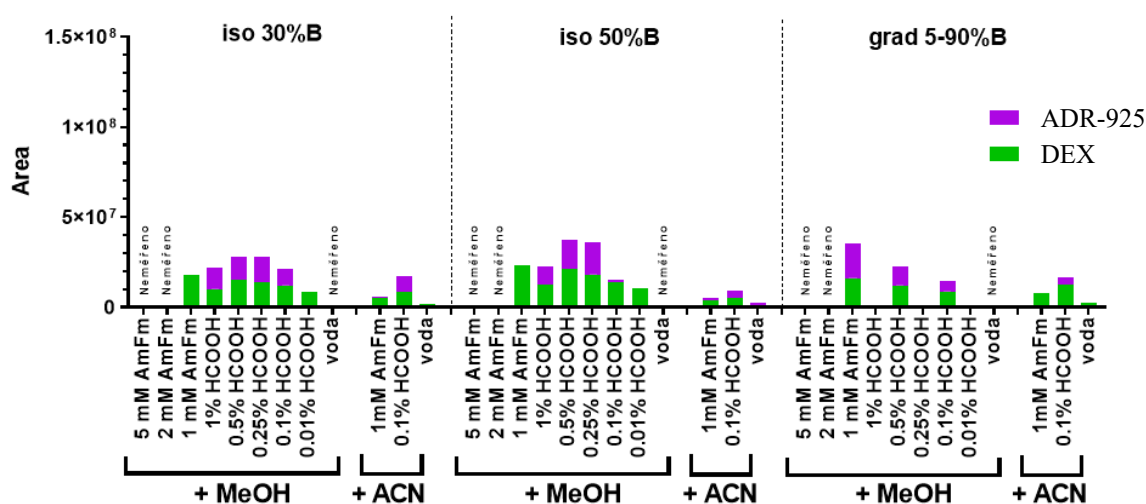
po precipitaci plasmy a jejich hodnota byla vyjádřena v procentech. Matricové efekty byly hodnoceny na nízké a vysoké koncentrační hladině (1 a 75 $\mu\text{mol/l}$). Na těchto koncentracích byla zároveň ověřena výtěžnost analytické metody porovnáním ploch píků vzorků, které byly připraveny s předem precipitovanou plasmou proti vzorkům s plasmou před precipitací.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

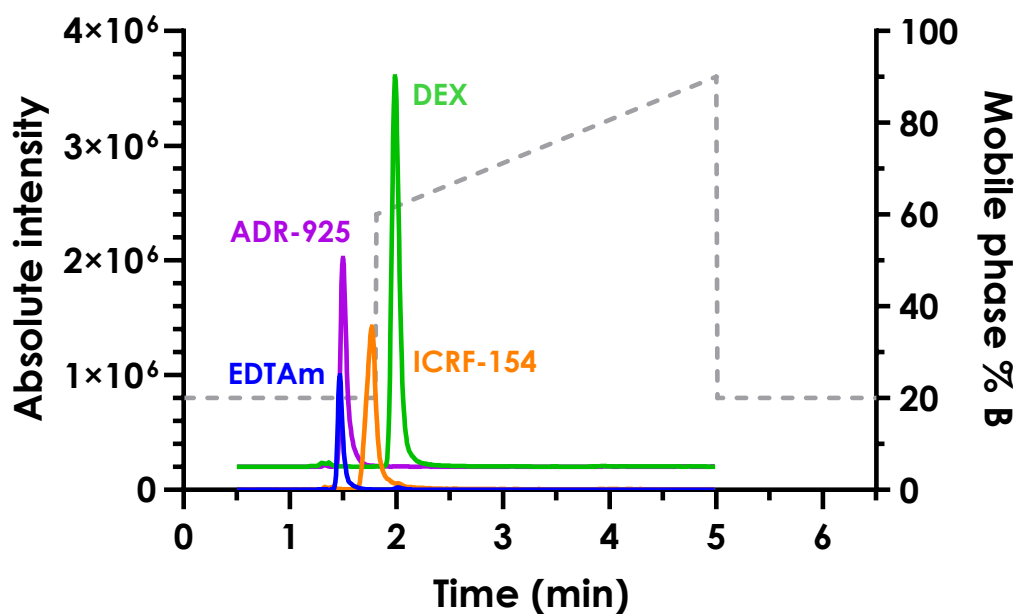
6.1. Vývoj a optimalizace UHPLC-MS/MS

Pro vývoj nové UHPLC metody pro současné stanovení DEX a ADR-925 byly na základě stávající metody [58] vybrány výše zmíněné tři kolony (Zorbax Bonus-RP, Luna Omega Polar a Kinetex F5). Nejprve byly zkoušeny různé směsi MF shodně při isokratické eluci s 30 %, 50 % B a gradientové eluci 5-90 % B, aby je bylo možné mezi sebou porovnat a zjistit vliv organické složky na analýzu na dané koloně. Byla hodnocena a porovnávána odezva detektoru pro oba analyty. Následně pro nejlepší složení MF byl vyvinut gradient vhodný pro separaci standardních roztoků analytů. S využitím těchto optimalizovaných podmínek byly pro každou kolonu vybrány nejvhodnější IS a poté byla hodnocena linearita pro stanovení DEX a ADR-925 v plasmě.

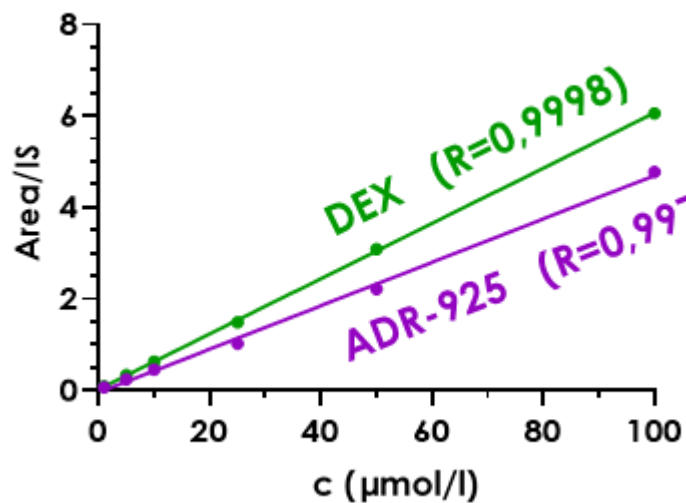
První testovanou kolonou byla Zorbax Bonus-RP, u které byla k optimalizaci vybrána 0,25% kyselina mravenčí (MF A) s methanolem (MF B) na základě výsledků na Obrázku 6. Pro toto složení MF byl optimalizován následující gradient: 0,0–1,8 min (20 % B), 1,8–5,0 min (60 %–90 % B), 5,0–6,5 min (20% B). Jako IS byly pro tuto kolonu zvoleny ICRF-154 a EDTAm. Za těchto podmínek byl získán reprezentativní chromatogram (Obrázek 7). Dále byla hodnocena linearita metody pro stanovení DEX a ADR-925 v plasmě v rozsahu koncentrací 1–100 μM (Obrázek 8).



Obr. 6 – Odezvy analytů na koloně Zorbax Bonus-RP při různém složení MF

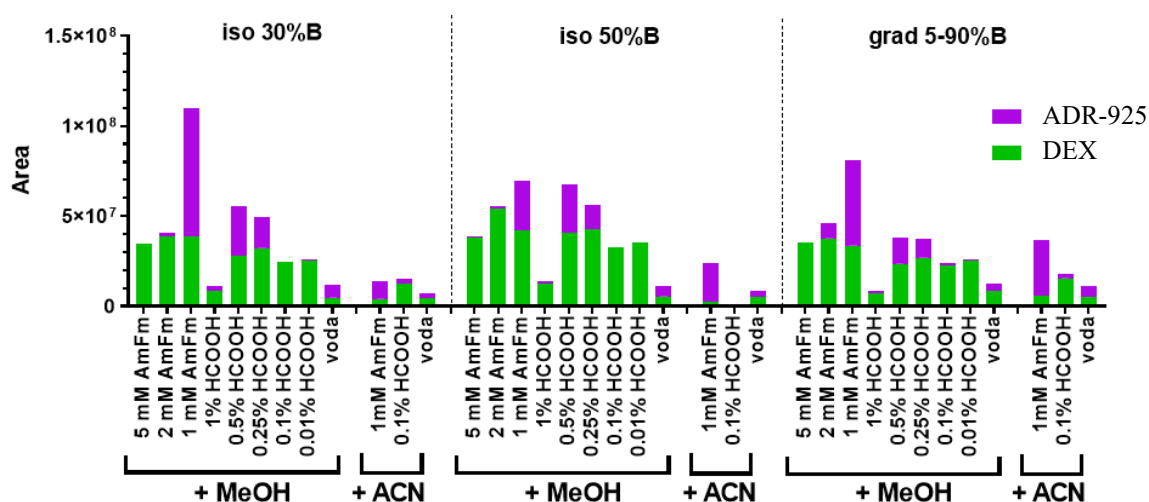


Obr. 7 – Reprezentativní chromatogram analýzy standardů DEX, ADR-925 se zobrazeným gradientem a IS na koloně Zorbax Bonus-RP (použitý gradient je znázorněn přerušovanou čarou)

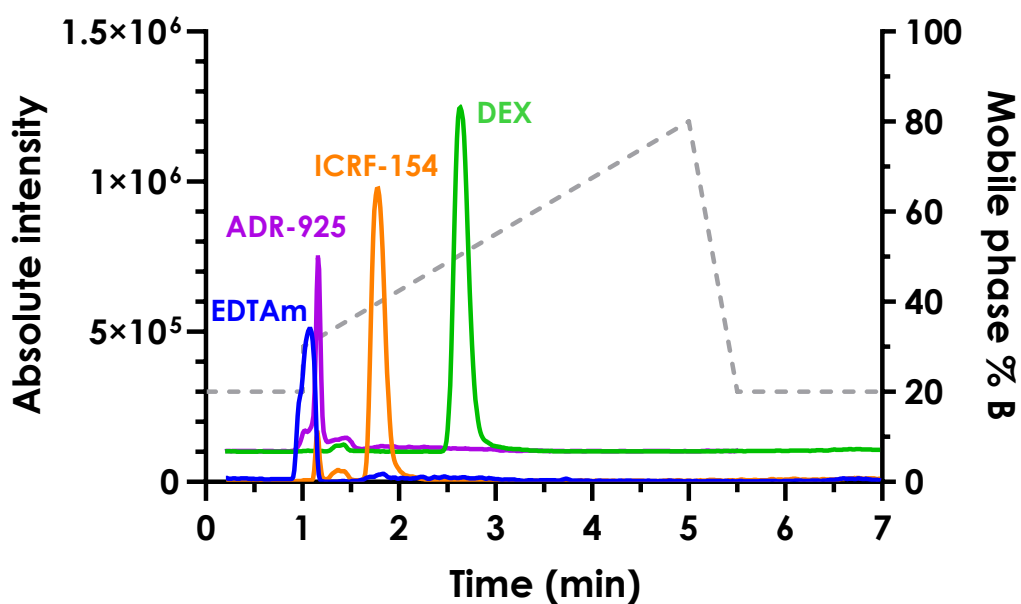


Obr. 8 – Ověření linearity metody pro analýzu DEX a ADR-925 v plasmě na koloně Zorbax Bonus-RP

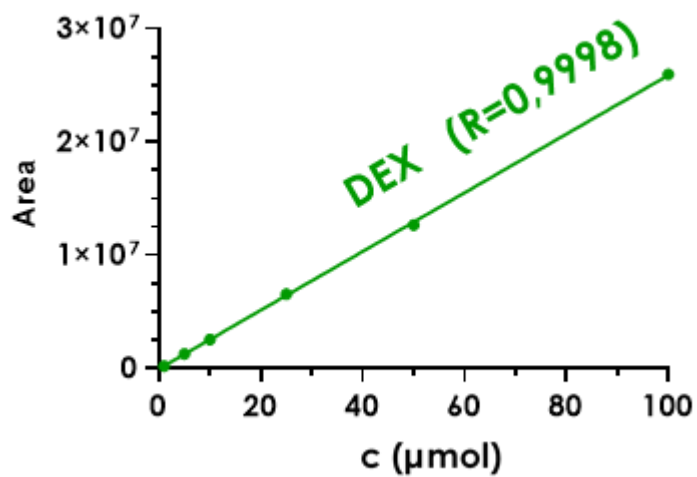
Druhou testovanou kolonou byla Luna Omega Polar C18, pro níž byla jako MF vybrána směs 1mM mravenčanu amonného (MF A) s methanolem (MF B). Pro tuto MF byla odezva detektoru a tvary píků analytů nejlepší jak při isokratické, tak i gradientové eluci, jak lze vidět na Obrázku 9. V rámci optimalizace byl vyvinut následující gradient: 0,0–1,0 min (20 % B), 1,0–5,0 min (20 %–80 % B), 5,0–5,5 min (80 %–20 % B), 5,5–7,0 min (20 % B). ICRF-154 a EDTAm se stejně jako na předchozí koloně eluovaly nejlépe, a proto byly zvoleny za IS. Reprezentativní chromatogram s finálním podobou gradientu je na Obrázku 10. Problém u této kolony byl s tvarem píku ADR-925, u kterého docházelo k potlačení signálu. Metoda se tudíž ukázala být nevhodná, neboť odezva detektoru nebyla lineární. Kalibrační křivka pro DEX v plasmě je znázorněna na Obrázku 11.



Obr. 9 – Odezvy analytů na koloně Luna Omega Polar C18 při různém složení MF

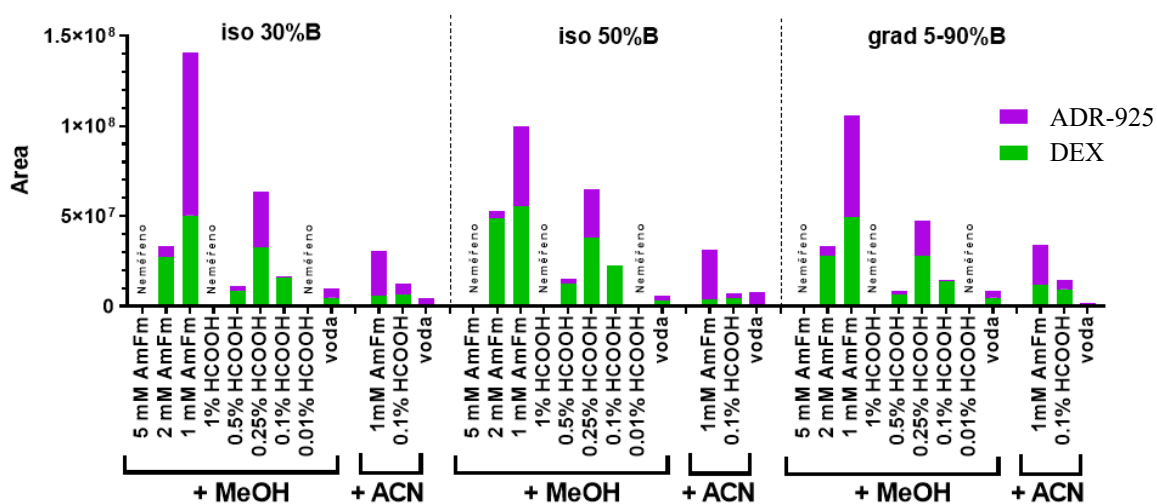


Obr. 10 – Reprezentativní chromatogram analýzy standardů DEX, ADR-925 se zobrazeným gradientem a IS na koloně Luna Omega Polar (použitý gradient je znázorněn přerušovanou čarou)

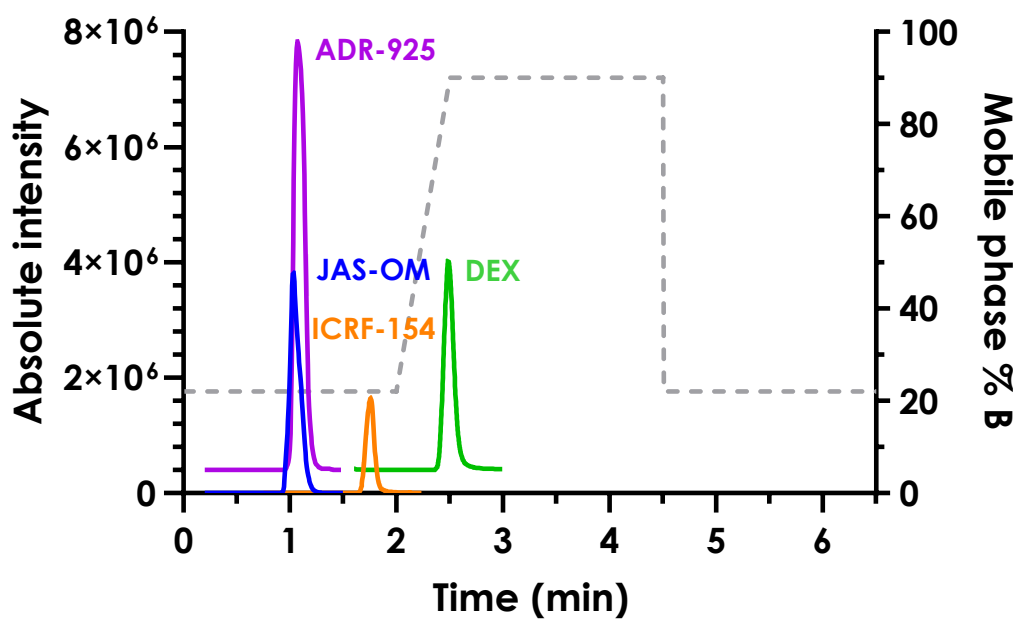


Obr. 11 – Ověření linearity metody pro analýzu DEX a ADR-925 v plasmě na koloně Luna Omega Polar C18

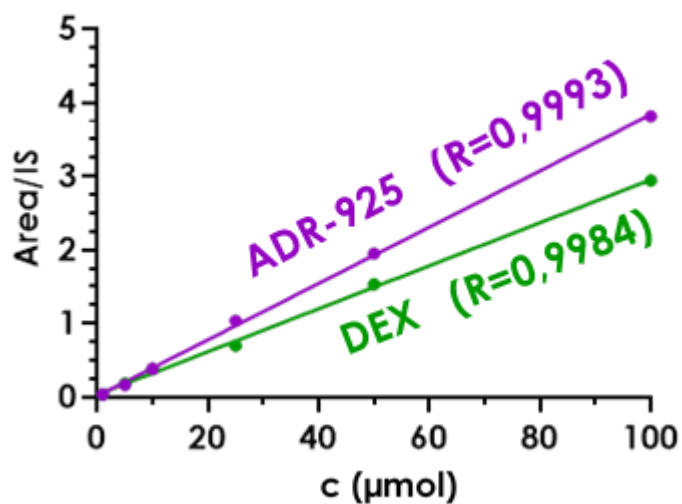
Poslední testovanou kolonou byla Kinetex F5, na které byly vybírány optimální podmínky analýzy stejným způsobem jako u předchozích kolon. Kombinace 1mM mravenčanu amonného (MF A) s methanolem (MF B) byla vybrána jako nejvhodnější MF vzhledem ke tvarům píků i odezvě detektoru při všech výchozích typech elucí (obrázek 12). Nejlepší separace bylo dosaženo při následujícím gradientu: 0,0–2,0 min (20 % B), 2,0–2,5 min (20 %–90 % B), 2,5–4,5 min (90 % B), 4,5–6,5 min (20 % B). Oproti výše zmíněným kolonám byl vybrán jiný IS pro ADR-925, konkrétně JAS-OM. Pro DEX byl nejideálnější IS opět ICRF-154. Na Obrázku 13 je ukázán reprezentativní chromatogram za optimalizovaných podmínek analýzy. Vyhodnocení linearity metody na této koloně je zobrazeno na Obrázku 14.



Obr. 12 – Odezvy analytů na koloně Kinetex F5 při různém složení MF

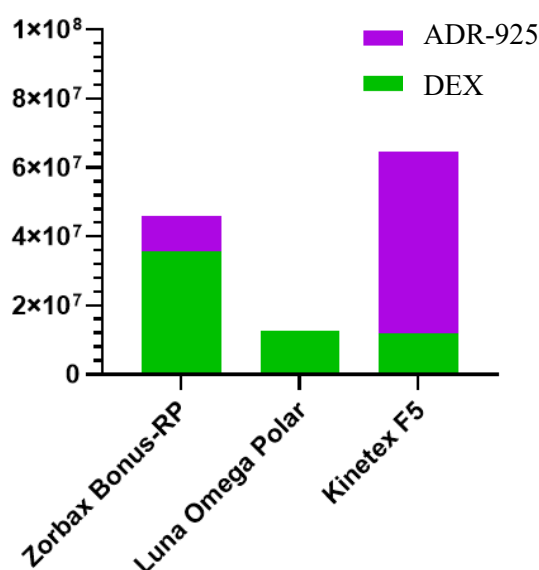


Obr. 13 — Reprezentativní chromatogram analýzy standardů DEX, ADR-925 se zobrazeným gradientem a IS na koloně Kinetex F5 (použitý gradient je znázorněn přerušovanou čarou)



Obr. 14 – Ověření linearity metody pro analýzu DEX a ADR-925 v plasmě na koloně Kinetex F5

Pro přehlednost byly všechny tři optimalizované metody porovnány opět z hlediska odezvy detektoru při nástřiku obou analytů v koncentracích 50 μM . Jak již bylo diskutováno dříve, u kolony Luna Omega Polar C18 docházelo ke značnému potlačení signálu ADR-925 (Obrázek 15). Dalším důležitým faktorem pro volbu nejlepší metody byly parametry jako čas analýzy a faktor symetrie pro každý analyt (Tabulka 1). Časy všech tří analýz byly takřka srovnatelné – pro kolony Zorbax Bonus-RP a Kinetex F5 shodně 6,5 minuty, pro kolonu Luna Omega Polar 7,0 minut. Značných rozdílů však dosahoval faktor symetrie (Tabulka 1).



Obr. 15 – Srovnání odezvy detektorů optimalizovaných metod pro DEX a ADR-925 ($c = 50 \mu\text{M}$)

Tab. 1 – Přehled symetrie píků (výpočet dle Českého lékopisu 2017) a časů analýzy jednotlivých metod

	Symetrie DEX	Symetrie ADR-925	Čas analýzy (min)
Zorbax Bonus-RP	1,38	1,90	6,5
Luna Omega Polar	1,31	0,92	7,0
Kinetex F5	1,19	1,44	6,5

Z těchto získaných dat je patrné, že nejlepší výsledky separace poskytla kolona Kinetex F5 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 mm). Jako MF byla vybrána směs methanolu (MF B) s 1mM mravenčanem amonným (MF A) s průtokem 0,22 ml/min a následujícím

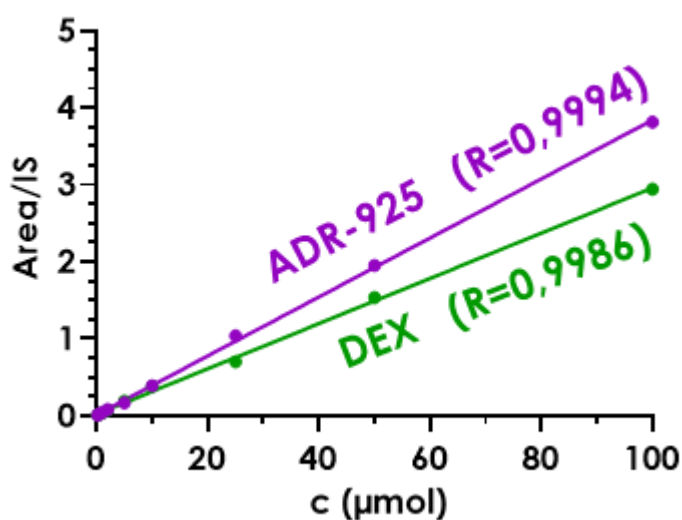
gradientem: 0,0–2,0 min (20 % B), 2,0–2,5 min (20 %–90 % B), 2,5–4,5 min (90 % B), 4,5–6,5 min (20 % B). Jako IS byly zvoleny ICRF-154 pro DEX a JAS-OM pro ADR-925. Jelikož vzorky byly připravovány s methanolem a byla zvolena MF s nízkým podílem organické fáze, docházelo u ADR-925 ke špatné odezvě detektoru. Z toho důvodu byl stanoven nástřikový objem vzorku na 0,5 μ l, neboť při takovém objemu měl ADR-925 vhodný tvar píku.

6.2. Validace metody pro stanovení DEX a ADR-925 v plasmě

Tato nová UHPLC-MS/MS metoda byla dále validována v souladu s doporučeními pro validaci bioanalytických metod, které stanovuje EMA [59]. V rámci této validace byly stanoveny parametry zmíněné dále.

6.2.1. Linearita

Linearita byla hodnocena v koncentračním rozmezí (0,2–100 μ mol/l) pro DEX i ADR-925 v plasmě. Metodou lineární regrese byla sestrojena kalibrační křivka (Obrázek 16) s korelačními koeficienty $R_{\text{DEX}} = 0,9986$, $R_{\text{ADR-925}} = 0,9994$ a rovnicemi $y = 0,0293x + 0,0254$ pro DEX, $y = 0,0383x + 0,0116$ pro ADR-925.



Obr. 16 – Vyhodnocení linearity metody

6.2.2. Přesnost a preciznost

Na základě odezvy detektoru při analýze nízkých koncentrací byla jako dolní limit kvantifikace (LLOQ) zvolena koncentrace 0,5 $\mu\text{mol/l}$. Relativní směrodatná odchylka těchto pěti vzorků byla použita k vyjádření přesnosti. Všechny získané výsledky splňují limit $\pm 20\%$ původní koncentrace pro LLOQ a $\pm 15\%$ původní koncentrace pro ostatní vzorky, jak je patrné z Tabulky 2.

Tab. 2 – Vyhodnocení přesnosti a preciznosti metody

Analyt	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Preciznosti (%)	Přesnost (RSD)
ADR-925	0,5	105,8	8,1
	1	106,2	5,0
	50	91,7	5,5
	100	90,1	6,4
DEX	0,5	87,3	4,9
	1	96,5	9,2
	50	100,3	8,4
	100	97,5	10,5

6.2.3. Výtěžnost a matricové efekty

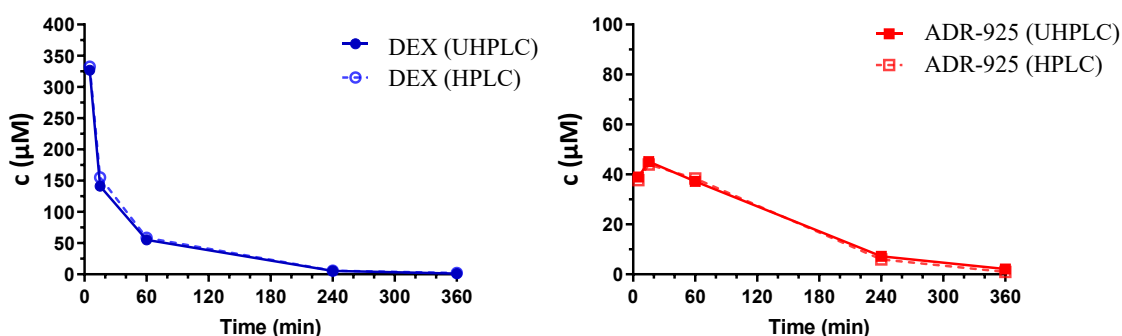
Pro tuto novou metodu byla výtěžnost a matricové efekty měřeny po dvou vzorcích na koncentračních hladinách 1 a 75 $\mu\text{mol/l}$. Limity stanovující EMA pro matricové efekty jsou $\pm 15\%$ od původní hodnoty při šesti různých vzorcích. K výtěžnosti metody EMA žádné limity nevydává. Výsledky získané z analýzy jsou uvedeny v Tabulce 3. Hodnoty v ní uvedené vyjadřují normalizované hodnoty (IS započítané do výsledků).

Tab. 3 – Vyhodnocení výtěžnosti a matricových efektů metody

c ($\mu\text{mol/l}$)	ADR-925		DEX	
	Výtěžnost (%)	Matricové efekty (%)	Výtěžnost (%)	Matricové efekty (%)
1	74,5	84,0	74,1	89,7
75	66,0	91,0	72,6	99,1

6.3. Porovnání metod

Poté, co byla nová UHPLC-MS/MS metoda validována, byla porovnána s původní HPLC-MS/MS metodou na šestihodinovém farmakokinetickém modelu po intravenózní aplikaci DEX (30 mg/kg) králíkovi. Jak je patrné na Obrázku 17, bylo oběma metodami dosaženo téměř shodných výsledků. Obrovským přínosem nové metody je především zkrácení času analýzy z původních 30 minut na 6,5 minut. Dále s sebou tato metoda přináší vyšší citlivost (původně 1 μM , nově 0,5 μM) i menší spotřebu vzorku (původní nástřik vzorku 10 μl , nově 0,5 μl).



Obr. 17 – Porovnání původní HPLC-MS/MS analýzy s novou UHPLC-MS/MS analýzou na farmakokinetickém modelu po i.v. podání králíkovi

Oproti původní metodě nebyla při vývoji UHPLC-MS/MS analýze hodnocena stabilita, neboť úprava vzorku zůstala stejná. Dlouhodobá stabilita vzorku byla stanovena na 5 dní při -70°C a postpreparativní stabilita v autosampleru na 24 hodin [58]. Především postpreparativní stabilita je značně limitující pro množství analyzovaných vzorků. Zkrácení času analýzy umožňuje měřit v jedné sérii přes 200 vzorků oproti původním 48 vzorkům.

V rámci porovnání metody lze zmínit také již dříve vyvinuté UHPLC-MS/MS metody pro stanovení strukturních analogů DEX, konkrétně JR-311 a GK-580 s GK-627 [60, 61]. Pro všechny zmíněné metody byl shodně zvolen methanol v kombinaci s mravenčanem amonným jako ideální MF. Výhodou metody vyvinuté v rámci této práce ovšem zůstává čas analýzy. Metoda pro analog GK-580 byla vyvinuta s gradientem na 30 minut (stejně jako původní HPLC-MS/MS metoda pro DEX), metody pro JR-311 a GK-627 s gradientem na 20 minut a nová UHPLC-MS/MS metoda s 6,5 minutovým gradientem.

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalézt optimální podmínky pro současné stanovení dexrazoxanu a jeho polárního metabolitu ADR-925 v plasmě s využitím UHPLC-MS/MS instrumentace. Výchozím bodem pro moji práci byla stávající HPLC-MS/MS metoda, kterou publikovala Kovaříková *et al.* v roce 2012 [58]. Na základě obecně známých pravidel k přenosu HPLC metody na UHPLC byly vybrány tři konkrétní kolony, které by potenciálně mohly požadované analyty dostatečně separovat. Pro nově vyvinutou metodu byla nakonec zvolena kolona Kinetex F5 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 mm, Phenomenex, USA), MF ve složení 1mM mravenčan amonný (MF A) s methanolem (MF B), průtok 0,22 ml/min a gradient: 0,0–2,0 min (20 % B), 2,0–2,5 min (20 %–90 % B), 2,5–4,5 min (90 % B), 4,5–6,5 min (20 % B). Jako IS byly zvoleny strukturní analogy ICRF-154 pro DEX a JAS-OM pro ADR-925. Nástříkový objem vzorku byl stanoven na 0,5 µl.

Kromě optimalizace nové UHPLC-MS/MS metody bylo cílem diplomové práce tuto metodu i validovat podle doporučení Evropské lékové agentury (EMA) pro validaci bioanalytických metod [59]. V rámci validace byla stanovena linearita metodou lineární regrese, přesnost, preciznost a matricové efekty. Tyto parametry splnily požadavky validační směrnice EMA.

Nově vyvinutá metoda byla nakonec testována při analýze reálného vzorku (po podání králíkovi) v rámci 6h farmakokinetického modelu. Tato analýza prokázala, že nová UHPLC-MS/MS metoda a původní HPLC-MS/MS metoda jsou stejně spolehlivé.

8. CITOVANÁ LITERATURA

- [1] Fallon, A.; Booth, R.F.G.; Bell, L.D. The Origins and development of liquid chromatography. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1987. ISBN 978-0-444-80862-2.
- [2] Coskun, O. Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. **2016**, 3(2), 156–160.
- [3] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [4] https://www.waters.com/waters/en_CZ/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_CZ [zobrazeno 3. 9. 2020]
- [5] Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons. New Jersey 2007. ISBN 978-0-470-08795-4.
- [6] https://www.waters.com/waters/en_US/Separation-Modes/nav.htm?cid=10009385&locale=en_US [zobrazeno 8. 1. 2021]
- [7] Jandera, P. Comparison of various modes and phase systems for analytical HPLC. *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*. Elsevier Science B.V., Amsterdam 2000. ISBN 978-0-080-54109-9.
- [8] Moldoveanu, S. C., David, V. Retention Mechanisms in Different HPLC Types. *Essentials in modern HPLC separations*. Elsevier. Waltham 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [9] García-Alvarez-Coque, M. C., Ramis-Ramos, G., Ruiz-Angel, M. J. Liquid Chromatography/Ion Pair. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. Elsevier. Amsterdam 2019. ISBN 978-0-08-101984-9.
- [10] Dong, W. M. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons. New Jersey 2006. ISBN 978-0-471-97310-2.
- [11] Hemström, P., Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, **2006**, 29, 1784–1821.
- [12] Buszewski, B., Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**, 402(1), 231–247.

- [13] McCalley, D. V. *Hydrophilic Interaction Chromatography*. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/hydrophilic-interaction-chromatography-0> [zobrazeno 8. 1. 2021]
- [14] Hansen, S. H., Pedersen-Bjergaard S. *Bioanalysis of pharmaceuticals*. John Wiley & Sons. Chichester 2015. ISBN 978-1-118-71682-3.
- [15] Dong, M. W. *The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities*. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities> [zobrazeno 3. 9. 2020]
- [16] <https://www.idex-hs.com/literature-tools/educational-materials/hplc-center> [zobrazeno 3. 9. 2020]
- [17] Shackman, J. G., General Instrumentation. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier. Waltham 2013. ISBN 978-0-12-415807-8
- [18] Campíns-Falcó, P., Herráez-Hernández, R., Serra-Mora, P. Liquid Chromatography—Instrumentation. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Elsevier. Waltham 2005. ISBN 978-0-128-09345-0.
- [19] Belenkii, B. G., Vilenchik, L. Z., *Modern Liquid Chromatography of Macromolecules*. Elsevier. Amsterdam 2000. ISBN 978-0-444-42075-6
- [20] Broeckhoven, K., Desmet, G. The future of UHPLC: towards higher pressure and/or smaller particles? *Trends in Analytical Chemistry*, **2014**, *63*, 65–75.
- [21] <http://www.hplc.cz/> [zobrazeno 26. 5. 2020]
- [22] Majors, R. E. *Column Pressure Considerations in Analytical HPLC*. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/column-pressure-considerations-analytical-hplc> [zobrazeno 8. 1. 2021]
- [23] McCalley, D. V. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*. **2000**, *902*, 311–321.
- [24] <https://www.crawfordscientific.com/technical/chromatography-blog/hplc-chromatography-tips/hplc-columns/silica-for-hplc-stationary-phases> [zobrazeno 6. 9. 2020]
- [25] Nawrocki et al. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *Journal of Chromatography A*. **2004**, *1028*, 1–30.

- [26] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. *The Column. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition*. John Wiley & Sons. New Jersey 2010. ISBN 978-0-470-50818-3.
- [27] <https://www.silicycle.com/faq/what-is-endcapping> [zobrazeno 9. 1. 2021]
- [28] Nawrocki, J., Carr, P. W. *Metal Oxides as HPLC stationary phases*. Dostupné z: http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_ksiazka/Chapters/chapter16.pdf [zobrazeno 9. 1. 2021]
- [29] Borges, E. M. Silica, Hybrid Silica, Hydride Silica and Non-Silica Stationary Phases for Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*. **2015**, *53*, 580–597.
- [30] Kalužíková, B. Analytické hodnocení vybraných léčiv s využitím UHPLC I. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2017.
- [31] <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html> [zobrazeno 26. 5. 2020]
- [32] de Hoffman, E., Stroobant, V. *Mass spectrometry: Principles and Applications, Third Edition*. John Wiley & Sons. Chichester 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [33] Banerjee, S., Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*. **2012**, str. 7.
- [34] Šesták, V. Analytické a bioanalytické hodnocení nových protinádorových léčiv. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2017.
- [35] Konermann et al. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*. **2013**, *85*, 2–9.
- [36] Awad, H., Khamis, M. M., El-Aneed, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy*. **2015**, *50:2*, 158–175.
- [37] do Nascimento, R. F. *Advances in Chromatographic Analysis*. str. 13. Avid Science. 2017. ISBN 978-93-86337-51-1
- [38] Haag, A. M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*. Springer. 2016. ISBN 978-3319414461.

- [39] – Jandera, P. Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B. Molekulová spektroskopie v organické analýze. Univerzita Pardubice. Pardubice 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
- [40] – Friedecký, D., Lemr, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. **2012**, 3, 152–157.
- [41] McMaster, M. C. *LC/MS: A Practical User's Guide*. John Wiley & Sons. New Jersey 2005. ISBN: 978-0471655312.
- [42] de Hoffmann, E. Tandem mass spectrometry: a Primer. *Journal of Mass Spectrometry*, **1996**, 31, 129–137.
- [43] Xu, Q. A. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*. John Wiley & Sons. New Jersey 2013. ISBN 978-0-470-93842-3.
- [44] Tan, A., Awaiye, K. Use of Internal Standards in LC-MS Bioanalysis. *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations, First Edition*. John Wiley & Sons. New Jersey 2013. ISBN 978-1118671276.
- [45] Chawla, G., Ranjan, Ch. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*. **2016**, 3, 1–16.
- [46] Nováková, L. Matysová, L., Solich, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. **2006**, 68(3), 908–918.
- [47] <https://www.ukessays.com/essays/sciences/review-of-ultra-high-performance-liquid-chromatography-and-high-performance-liquid-chromatography.php> [zobrazeno 9. 1. 2021]
- [48] Franz, H., Fabel, S. *A universal tool for method transfer from HPLC to UHPLC*. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/TN-75-HPLC-UHPLC-Universal-Tool-Method-Transfer-TN70828-EN.pdf> [zobrazeno 24. 5. 2020]
- [49] <https://www.chromservis.eu/g/uhplc?lang=CZ> [zobrazeno 24. 5. 2020]
- [50] Souhrn údajů o přípravku Cardioxane. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0238021&tab=texts>. [zobrazeno 26. 5. 2020]
- [51] Deng et al. Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both TOPII isoforms. *BMC Cancer*. **2014**, 14:842, 1–11.
- [52] Souhrn údajů o přípravku Savene. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0027450&tab=texts>. [zobrazeno 26. 5. 2020]

- [53] Štěřba et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. **2013**, *18(8)*, 899–929.
- [54] Brian et al. The Metabolites of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane Do Not Protect Myocytes from Doxorubicin-Induced Cytotoxicity. *Molecular Pharmacology*. **2003**, *64(3)*, 670–678.
- [55] Schroeder, P. E., Patel, D., Hasinoff, B. B. The Dihydroorotase Inhibitor 5-Aminoorotic Acid Inhibits the Metabolism in the Rat of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane and Its One-Ring Open Metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*. **2008**, *36(9)*, 1780–1785.
- [56] Vávrová et al. Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Toxicology Research*. **2015**, *4(4)*, 1098–1114.
- [57] Vávrová et al. Catalytic Inhibitors of Topoisomerase II Differently Modulate the Toxicity of Anthracyclines in Cardiac and Cancer Cells. *PLoS ONE*. **2013**, *8(10)*, 1–13.
- [58] Kovaříková et al. Development of LC–MS/MS method for the simultaneous analysis of the cardioprotective drug dexrazoxane and its metabolite ADR-925 in isolated cardiomyocytes and cell culture medium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2013**, *76*, 243–251.
- [59] Guideline on bioanalytical method validation. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf [Zobrazeno 1.5.2021]
- [60] Bures et al. Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite. *Toxicology*. **2017**, *392*, 1–10.
- [61] Investigation of Structure-Activity Relationships of Dexrazoxane Analogs Reveals Topoisomerase IIb Interaction as a Prerequisite for Effective Protection against Anthracycline Cardiotoxicity