

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



Katedra Farmaceutické Chemie a Farmaceutické Analýzy

Disertační práce:

**Využití LC-MS v bioanalýze antracyklinů  
a potenciálních kardioprotektiv**

(Soubor publikovaných prací doplněných komentářem)

Kandidát: Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková

Školitel: doc. PharmDr. Petra Štěrbová Ph.D.

Hradec Králové, 2021

Konzultant: doc. PharmDr. Radim Kučera Ph.D.



## Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková



## Poděkování

*Tímto bych ráda poděkovala školitelce doc. PharmDr. Petře Štěrbové, Ph.D. a konzultantovi doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za možnost být členem výzkumné skupiny Pharmaceutical analysis group. Děkuji za cenné rady, zkušenosti, trpělivost a odborné vedení po celou dobu mého doktorského studia.*

*Dále děkuji všem spoluautorům předložených publikací za spolupráci na výzkumu, především týmům doc. Roha, prof. Šimůnka a doc. Štěrby. Můj vděk mají i kolegové z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za vytvoření přátelského a příjemného pracovního prostředí a to zejména PharmDr. Petra Reimerová, Ph.D. za podporu a pomoc v začátcích mého doktorského studia a Mgr. Ondřej Horáček za psychickou podporu a věčný smysl pro humor, který povzbudil i v krušných chvílích.*

*Velké dík patří také prof. Stigu Pedersen-Bjergaardovi a Elisabeht Leere Øiestad z University of Oslo, za možnost absolvovat odbornou stáž na jejich pracovišti, za cenné rady a speciálně také za ohromnou vědeckou motivaci.*

*Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (grantové projekty GAUK 1550217 a SVV 260 547 SVV) a Grantové agentuře České republiky (č. grantu 21-16195S).*

*Na závěr bych ráda poděkovala své rodině, zejména manželovi PharmDr. Janu Bavlovičovi za trpělivost a psychickou podporu nejen v průběhu mého doktorského studia.*



## Abstrakt

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra Farmaceutické Chemie a Farmaceutické Analýzy**

**Kandidát:** Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková

**Konzultant:** doc. PharmDr. Radim Kučera Ph.D.

**Školitel:** doc. PharmDr. Petra Štěrbová Ph.D.

**Název:** Využití LC-MS v bioanalýze antracyklinů a potenciálních kardioprotektiv

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) představuje téměř ideální analytický nástroj pro bioanalýzu léčiv. Toto spojení umožňuje identifikaci a kvantifikaci léčiv s vysokou selektivitou a citlivostí a současně poskytuje informaci o struktuře testovaných látek. Nedílnou součástí bioanalytické metody je také úprava biologického vzorku před analýzou, jejíž cílem je izolace analytů, odstranění balastních látek z matrice a ideálně zakoncentrování vzorku. V současné době je při úpravě vzorku kladen důraz nejen na efektivnost, rychlost, jednoduchost a opakovatelnost metody, ale současnými trendy jsou zejména automatizace procesu, vysoká propustnost vzorků laboratoří a nízká spotřeba organických rozpouštědel, tedy dodržení principů zelené chemie.

Dexrazoxan (DEX) je jediným schváleným léčivem indikovaným pro prevenci chronické kumulativní kardiotoxicity způsobené antracykliny (ANT) – hojně užívanými protinádorovými chemoterapeutiky. Vývoj nových a účinnějších kardioprotektiv je do značné míry limitován nejasnostmi ohledně (1) principu patofyziologického mechanismu rozvoje chronické ANT kardiotoxicity, (2) mechanismu kardioprotektivního účinku DEX a (3) vztahu mezi strukturou a kardioprotektivním účinkem bisdioxopiperazinů.

Teoretická část této disertační práce se věnuje využití LC-MS instrumentace v bioanalýze léčiv, základním metodám úpravy vzorku před chromatografickou analýzou a také současným moderní trendům miniaturizace těchto základních metod a jejich uplatnění v bioanalýze. Dále jsou diskutovány validační směrnice pro bioanalýzu a na závěr jsou představeny analyzované látky. Experimentální část je pojata jako soubor čtyř publikovaných prací doplněných komentářem. Tato část je rozdělena na dva

tematické celky zabývající se: (1) bioanalytickým hodnocením nových potenciálních kardioprotektiv a (2) vývojem a optimalizací mikroextrakčních metod pro izolaci ANT z králičí plasmy.

První část experimentální práce je věnována bioanalýze nových analogů DEX a jejich proléčiv a studiu jejich kardioprotektivního potenciálu vůči ANT-indukované toxicitě. Pro hodnocení stability, bioaktivace, metabolismu a farmakokinetiky nových analogů DEX a jejich případných proléčiv byly vyvinuty a validovány nové LC-MS metody. S přispěním těchto metod jsme (1) odhalili velmi blízký vztah mezi strukturou a kardioprotektivním účinkem, (2) charakterizovali vybrané analogy DEX z hlediska stability, metabolismu a bioaktivace a (3) objevili nového slibného kandidáta pro další komplexní studium protektivního účinku na modelu chronické ANT kardiotoxicity *in vivo*.

V druhé části experimentální práce jsme se zaměřili na stanovení ANT v králičí plasmě s využitím mikroextrakčních technik na principu extrakce z kapalin do kapaliny (LPME). Byla testována LPME v 96-jamkovém uspořádání a také elektromembránová extrakce (EME). Optimalizovaná EME byla následně porovnána s konvenčními extrakčními metodami, a to proteinovou precipitací a extrakcí z kapaliny do kapaliny. EME předčila zmíněné metody ve všech testovaných parametrech, kterými byla výtěžnost, matricové efekty a přečištění vzorků od fosfolipidů. V rámci této práce jsme vyvinuli alternativní mikroextrakční metodu pro izolaci ANT z plasmy, která je rychlá, efektivní, spolehlivá a splňuje principy zelené chemie.



## Abstract

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis**

**Candidate:** Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková

**Supervisor - specialist:** doc. PharmDr. Radim Kučera Ph.D.

**Supervisor:** doc. PharmDr. Petra Štěrbová Ph.D.

**Title:** Utilization of LC-MS in bioanalysis of anthracyclines and potential cardioprotective compounds

Coupling of liquid chromatography to mass spectrometry (LC-MS) represents a near-ideal analytical tool for drug bioanalysis. This instrumentation allows identification and quantification with high selectivity and sensitivity, and provides information on the structure of tested compounds. An integral part of bioanalytical methods is the sample treatment prior to analysis, which should include isolation of the analytes, remove ballast from the matrix and ideally preconcentrate the sample. The sample treatment should be effective, quick, simple and repeatable. Current trends also emphasize process automation, high throughput and low consumption of organic solvent, which is in accordance with green chemistry.

Dexrazoxane (DEX) is the only approved, clinically used drug, preventing chronic cumulative cardiotoxicity caused by anthracycline (ANT) therapy – commonly used anticancer drugs. The development of novel and more effective cardioprotective drugs is limited by uncertainties regarding (1) information about the pathophysiological mechanism of chronic ANT cardiotoxicity (2) the mechanism of action of DEX and (3) the structure-cardioprotective activity relationship of bisdioxopiperazines.

The theoretical part of this dissertation focused on utilization of LC-MS instrumentation in drug bioanalysis, on conventional sample treatment methods, on current trends in microextraction and their application in bioanalysis. Furthermore, validation guidelines for bioanalysis are discussed and, finally, the analyzed substances are presented. The experimental part is conceived as a commentary on four published articles. This part is divided into two thematic units: (1) bioanalytical evaluation of new potential cardioprotectives – dexrazoxane analogues and (2) development and

optimization of microextraction techniques for isolation of anthracyclines from rabbit plasma.

In the first part, bioanalysis of new DEX analogues and prodrugs, and their cardioprotective potential against ANT-induced toxicity was examined. The LC-MS methods for analysis of new DEX analogues and their potential prodrugs have been developed and validated in relevant biological matrices. The methods were utilized for *in vitro* stability, bioactivation and metabolism studies, and for determination of pharmacokinetics *in vivo*. We revealed a very close structure-cardioprotective activity relationship in bisdioxopiperazine group. Furthermore, selected DEX analogs were characterized in terms of stability, metabolism and bioactivation. And finally, we discovered a promising drug candidate for further comprehensive *in vivo* examinations on chronic ANT-cardiotoxicity model.

The second part focused on determination of ANT in rabbit plasma using liquid phase microextraction methods (LPME). A 96-well LPME and electromembrane extraction (EME) were both tested. The optimized EME was subsequently compared with conventional extraction techniques, namely with protein precipitation and liquid-liquid extraction. The EME outperformed the conventional methods in all tested parameters, which included recovery, matrix effects and purification of the sample evaluated by the phospholipid content. In this work an alternative microextraction method for isolation of anthracyclines from plasma was developed. The EME proved to be fast, efficient, reliable and a green technique.

# Obsah

Poděkování.....	5
Abstrakt.....	7
Abstract.....	9
Seznam použitých zkratk.....	13
1 Úvod.....	15
2 Teoretická část.....	17
2.1 Využití LC-MS v bioanalýze léčiv.....	17
2.1.1 Klinická a forenzní toxikologie.....	19
2.1.2 Antidopingová kontrola.....	20
2.1.3 Výzkum a vývoj nových léčiv.....	21
2.1.4 Terapeutické monitorování lékových hladin.....	23
2.1.5 Bioekvivalenční studie.....	24
2.2 Úprava biologického materiálu.....	25
2.2.1 Miniaturizované techniky založené na principu SPE.....	28
2.2.2 Miniaturizované techniky založené na principu LLE.....	34
2.3 Elektromembránová extrakce.....	41
2.3.1 Princip EME.....	42
2.3.2 Důležité extrakční parametry.....	44
2.4 Validace bioanalytických chromatografických metod.....	48
2.4.1 Selektivita.....	48
2.4.2 Přenos.....	49
2.4.3 Citlivost (limit kvantifikace).....	49
2.4.4 Kalibrační křivka.....	49
2.4.5 Přesnost a preciznost.....	50
2.4.6 Výtěžnost.....	51
2.4.7 Matricové efekty.....	51

2.4.8	Stabilita .....	52
2.4.9	Test diluční integrity .....	53
2.5	Analyzované látky.....	53
2.5.1	Antracyklinová chemoterapeutika.....	53
2.5.2	Dexrazoxan a jeho analogy .....	56
3	Cíle práce .....	60
3.1	Dílčí cíle práce .....	60
4	Experimentální část – komentář k publikovaným pracím.....	61
4.1	Bioanalytické hodnocení strukturně blízkých analogů dexrazoxanu .....	61
4.2	Využití mikroextrakčních technik pro izolaci antracyklinů z plasmy .....	68
5	Závěr .....	71
6	Seznam publikací zahrnutých v disertační práci .....	73
7	Další autorské publikace nezahrnuté do disertační práce.....	75
8	Prezentace výsledků na konferencích.....	76
8.1	Přednášky .....	76
8.2	Postery.....	76
9	Získané granty .....	78
9.1	Hlavní řešitel .....	78
9.2	Členka kolektivu .....	78
10	Stáže a další odborné zkušenosti.....	79
11	Použité zdroje.....	80
	Přílohy .....	95
	Příloha č. 1 .....	96
	Příloha č. 2 .....	121
	Příloha č. 3 .....	134
	Příloha č. 4 .....	183

## Seznam použitých zkratek

ANT	atracykliny
AUC	plocha pod křivkou ( <i>area under curve</i> )
CYP	cytochrom P450
DAU	daunorubicin
DAUol	daunorubicinol
DEHP	di(ethylhexyl)fosfát
DEHPi	bis(2-ethylhexyl) fosfit
DEX	dexrazoxan
DLLME	Disperzní liquid-liquid mikroextrakce
DOX	doxorubicin
DOXol	doxorubicinol
DPX	" <i>disposable pipette tip extraction</i> "
EMA	Evropská léková agentura ( <i>European Medicines Agency</i> )
EME	elektromembránová extrakce
EPI	epirubicin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FK	farmakokinetika
GC	plynová chromatografie
HF-LPME	mikroextrakce pomocí dutého vlákna ( <i>hollow-fiber liquid phase microextraction</i> )
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením ( <i>high resolution mass spectrometry</i> )
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
IDA	idarubicin
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny ( <i>liquid-liquid extraction</i> )
LLOQ	spodní limit kvantifikace
LPME	mikroextrakce na principu extrakce z kapaliny do kapaliny ( <i>liquid phase microextraction</i> )

ME	matricový efekt
MEPS	mikroextrakce pomocí plněného sorbentu ( <i>microextraction by packed sorbent</i> )
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NPOE	2-nitrofenyl(oktyl)ether
PALME	„ <i>parallel artificial liquid membrane extraction</i> “
PP	proteinová precipitace
PVDF	polyvinylidenfluorid
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
ROS	reaktivní oxidační stres
RP	rozlišovací schopnost
RSD	relativní směrodatná odchylka
SBZ	sobuzoxan
SDME	extrakce do jediné kapky rozpouštědla ( <i>single-drop microextraction</i> )
SLE	extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená pevnou fází
SLM	" <i>supported liquid membrane</i> "
SPE	extrakce na tuhou fázi ( <i>solid-phase extraction</i> )
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi ( <i>solid-phase microextraction</i> )
SRM	skan vybraných reakcí
STAGE	" <i>S</i> Top And Go Extraction"
TBP	tributyl fosfát
TDM	monitorování lékových hladin ( <i>therapeutic drug monitoring</i> )
TEHP	tris-(2ethylhexyl) fosfát
TOF	analyzátor doby letu
TOP2	topoisomeráza II
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
WADA	světová antidopingová agentura ( <i>World Anti-Doping Agency</i> )

## 1 Úvod

Bioanalýza je subdisciplínou analytické chemie zabývající se kvantitativní analýzou exogenních a endogenních látek v biologickém materiálu. Hlavní výzvou bioanalýzy je přesné stanovení cílových analytů, jež se v biologické matrici vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (řádově ng nebo dokonce pg/ml). Stanovení těchto analytů je navíc rušeno balastními látkami (endogenními, či exogenními) v matrici, které jsou naopak přítomné ve velkém množství ( $\mu\text{g}$  až  $\text{mg/ml}$ ). Bioanalytická metoda zahrnuje pět navazujících kroků, kterými jsou odběr vzorku, příprava vzorku, separace složek směsi, detekce analytů a interpretace dat. Při vývoji selektivních a citlivých analytických metod pak hraje významnou roli zejména příprava vzorku, separace a detekce. Cílem přípravy vzorku je izolace vybraných analytů, odstranění balastních látek z matrice a ideálně zakoncentrování vzorku. Při úpravě vzorku je kladen důraz na efektivnost, jednoduchost, rychlost, opakovatelnost a vysokou propustnost vzorků laboratoří. V současné době je také brán zřetel na nízkou spotřebu organických rozpouštědel, což splňují zejména mikroextrakční techniky. Z hlediska separace a detekce je metodou volby kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS). Toto spojení díky MS detekci nabízí další úroveň separace, a to schopnost dělit analyty v ionizovaném stavu na základě jejich molekulové hmotnosti, díky čemuž je zvýšena selektivita a mnohdy i citlivost detekce. Další nespornou výhodou MS detekce je poskytnutí informací o struktuře analyzované látky. Instrumentace LC-MS je hojně využívána v oblastech klinické analýzy, antidopingové analýzy, či při vývoji léčiv.

Vývoj nových, účinnějších, bezpečnějších a levných léčiv je časově i finančně náročný multioborový proces. Lze jej rozdělit do tří částí, tzv. základní výzkum, jež zahrnuje také preklinické hodnocení, následující klinické studie, a nakonec registrace a zavedení léčiva na trh. Analytické metody jsou nedílnou součástí všech fází tohoto výzkumného procesu. Využívají se pro identifikaci a stanovení potenciálního léčiva (jeho metabolitů, či rozkladných produktů) v různých matricích za účelem hodnocení stability, farmakokinetiky, toxikokinetiky, vztahu expozice-účinek, bioekvivalence, k optimalizaci účinné dávky léčiva atd.

Klinické využití antracyklinových chemoterapeutik (ANT), jedněch z nejúčinnějších protinádorových léčiv s širokým spektrem účinku, je limitováno jejich toxickými účinky na myokard, kde závažná a obávaná je zejména chronická forma kardiotoxicity [1]. Dexrazoxan (bisdioxopiperazinový derivát, DEX) je jediné léčivo,

kteřé je schváleno pro prevenci chronické kumulativní kardiotoxicity způsobené ANT terapií [2]. Jeho klinické užití je však omezené kvůli obavám z možného vlivu na ANT protinádorovou terapii, nebo z možného zvýšeného výskytu sekundárních malignit [3, 4]. Přestože mnoho dalších studií tato tvrzení vyvrátila [5], klinické využití DEX je stále poměrně omezené [2, 6]. Vývoj nových a účinnějších kardioprotektiv je do značné míry limitován nejasnostmi ohledně (1) mechanismu kardioprotektivního účinku DEX, (2) vztahu mezi strukturou a kardioprotektivním účinkem bisdioxopiperazinů a (3) principu patofyziologického mechanismu rozvoje chronické ANT kardiotoxicity.

Tato disertační práce ve své teoretické části popisuje využití LC-MS instrumentace v bioanalýze léčiv, základní metody úpravy vzorku před chromatografickou analýzou včetně moderních trendů miniaturizace těchto metod a jejich uplatnění v bioanalýze, s důrazem na elektromembránovou extrakci. Dále jsou diskutovány validační směrnice pro bioanalýzu a na závěr jsou představeny analyzované látky. Experimentální část této disertační práce je pojata jako soubor čtyř publikovaných prací doplněných komentářem. Tato část je rozdělena na dva tematické celky zabývající se: **(1) bioanalytickým hodnocením** nových potenciálních kardioprotektiv - analogů DEX a jejich proléčiv a **(2) vývojem a optimalizací mikroextrakčních metod** pro izolaci ANT z králičí plasmy.



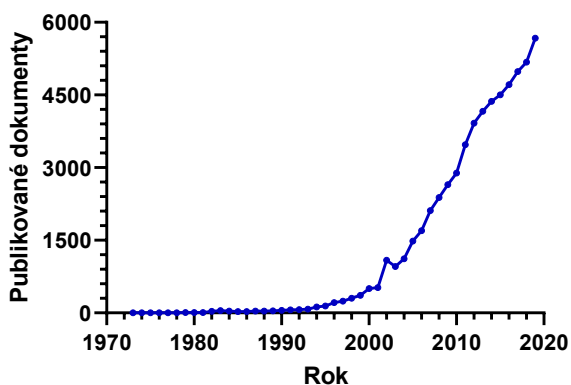
## 2 Teoretická část

### 2.1 Využití LC-MS v bioanalýze léčiv

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejvíce využívaných separačních technik. Díky širokému výběru stacionárních fází je možné rozdělit prakticky jakoukoliv směs látek v kapalném skupenství [7, 8]. Hmotnostní spektrometrie je vysoce selektivní a citlivá separační technika, jenž současně poskytuje informace o struktuře analyzované látky – molekulová hmotnost, zastoupení izotopů a případně také fragmentační spektra. V MS jsou v plynné fázi separovány ionty definované poměrem hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), na základě různých fyzikálních principů, například dle rozdílného chování v elektromagnetickém poli nebo dle různé doby letu iontu ve vysokém vakuu. Hmotnostní spektrometr se skládá z (1) ionizačního zdroje, místo, kde je látka převáděna na ionty, (2) analyzátoru, ve kterém dochází k rozdělení iontů podle  $m/z$  a (3) detektoru, jež zaznamenává intenzity jednotlivých iontů [9]. Dle rozlišovací schopnosti (RP) můžeme MS analyzátoři rozdělit na ty s nízkou rozlišovací schopností (RP < 10 000; iontová past - IT, kvadrupól) a s vysokou rozlišovací schopností, tzv. high resolution mass spektrometry (HRMS; RP > 10 000; analyzátor doby letu – TOF, nebo RP > 100 000; orbitrap a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací). HRMS analyzátoři měří hodnoty  $m/z$  se správností < 5 ppm, což umožňuje určení elementárního složení detekovaného iontu [10, 11]. Systém MS lze použít v několika skenovacích módech, a to pro skenování všech hodnot  $m/z$  (záznam celého spektra, z anglického full-scan) nebo lze sledovat intenzitu pouze jedné vybrané hodnoty  $m/z$  (záznam vybraného iontu, z anglického selected ion monitoring). Další zvýšení analytické a identifikační schopnosti představuje tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), při které jsou sledované ionty podrobeny fragmentaci a jež zahrnuje dva stupně hmotnostní analýzy (záznam prekurzorových a produktových iontů) vyskytující se v sérii za sebou. Fragmentace může probíhat buď v iontové pasti, nebo je využíváno spojení více analyzátorů za sebou, např. trojitý kvadrupól - QqQ, kde druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela. Mohou být také kombinovány různé typy hmotnostních analyzátorů (hybridní hmotnostní spektrometry) kde mezi časté patří například QqTOF či IT-TOF, nebo kombinace kvadrupólu či IT s orbitrapem. Tandemová MS tak umožňuje další skenovací módy, jako například sken vybraných reakcí (SRM, z anglického selected reaction monitoring), který je často

využíván při kvantifikaci, a další (sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů a sken neutrálních ztrát) [10].

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí představuje téměř ideální analytický nástroj poskytující vysokou selektivitu a citlivost (řádově pg až fg), umožňující měření velkého množství analytů z komplexní matrice a identifikaci eluovaných látek. Historicky bylo v rámci spojení HPLC s MS třeba vyřešit zásadní rozdíly mezi těmito technikami, a to zejména přechod analyzované látky z toku kapaliny do plynného skupenství, odstranění přebytku kapalné mobilní fáze (MF) a také překonání rozdílu tlaků v obou systémech (atmosferický tlak-HPLC a vysoké vakuum-MS) [12]. První zmínky o spojení LC-MS jsou z roku 1973, kdy při nastavení velmi nízkého průtoku MF bylo HPLC napojeno skleněnou kapilárou do chemického ionizačního zdroje a byl takto analyzován tetrapeptid [13]. V roce 1974 byla představena ionizace za atmosférického tlaku, což bylo velkým přínosem pro spojení LC-MS, jelikož tato technika umožňuje, aby se MF přímo účastnila procesu ionizace [14]. Vzhledem k tomu musí být jako složky MF použita vhodná těkavá rozpouštědla (např. methanol, acetonitril...) a těkavá aditiva a pufrů. Nejčastějšími aditivy jsou kyselina mravenčí nebo octová, mravenčan nebo octan amonný a hydroxid amonný [15]. První komerční LC-MS bylo uvedeno na trh začátkem 80. let a od té doby se tato technika stala jednou z dominujících detekčních technik chromatografické separace [12, 16].



**Obrázek 1:** Rostoucí trend v počtu publikací využívající LC-MS (1970-2019). Data byla získána z databáze Scopus, hledaným termínem bylo „LC-MS“. Nejvíce je LC-MS využíváno v oblasti chemie a biochemie (49,8 %), následuje farmakologie a toxikologie (13,5 %) a významně jsou zastoupené také odvětví medicíny (9,1 %), zemědělství (7,9 %) a životního prostředí (5,5 %).

LC-MS se stalo nepostradatelnou technikou v řadě klinických a vědeckých laboratoří, čemuž nasvědčuje rostoucí množství publikací využívající LC-MS

instrumentaci (**Obrázek 1**). V současné době v analýze léčiv převažuje využití ionizace elektrosprejem a chemická ionizace za atmosférického tlaku [15]. Mezi hlavní oblasti využití LC-MS v bioanalýze léčiv patří klinická analýza (toxikologie, monitorování lékových hladin), antidopingová analýza a velké uplatnění našla tato instrumentace i v různých fázích výzkumu a vývoje léčiv [16, 17].

### 2.1.1 Klinická a forenzní toxikologie

Podstatou klinické a forenzní toxikologie je identifikace a někdy také kvantifikace širokého spektra látek v biologických tekutinách. Sledovanými látkami jsou například léčiva, drogy, pesticidy, plyny, jedy atd. Klinická toxikologie se zabývá individuálními případy s podezřením na otravu. V případě, že není známa příčina otravy, je toxikologická analýza klíčová pro následnou léčbu pacienta. Velký důraz je kladen na rychlost analýzy, obvykle jsou požadovány výsledky do 1-2 hodin od příjmu pacienta do nemocnice. Ideální analytická metoda by tedy měla být rychlá, přesná a precizní. Současně je žádoucí, aby toxikolog znal podrobné informace o pacientovi (klinický obraz, lékový záznam, případnou historii otrav atd.), jelikož tyto detaily mohou pomoci specifikovat skupinu látek, jež mohly být příčinou otravy a zrychlit tak identifikaci a kvantifikaci [18]. Forenzní toxikologie se zaměřuje na analýzu a studium xenobiotik za účelem objasnění otázek, které se vyskytují v soudním řízení, jako například, zda byla oběť otrávena, jakou látkou, jak byla látka podána apod. Rozdíl mezi klinickou a forenzní toxikologií je tedy v zapojení soudního elementu [19].

Toxikologická analýza obvykle sestává ze tří kroků: identifikace, konfirmace a kvantifikace. První fází je screening neboli systematická toxikologická analýza. Zde jsou využity citlivé metody umožňující analýzu velkého množství vzorků, detekci širokého spektra látek a jednoznačnou identifikaci [20, 21]. Rychlými a jednoduchými metodami jsou například imunochemické techniky, nicméně citlivější, specifitější a podstatně rozsáhlejší analýzu umožňují chromatografické metody ve spojení s MS (GC-MS; LC-MS) [22]. Významnou roli v toxikologické analýze představuje také spojení LC s tandemovou HRMS jež umožňuje detekci velkého množství látek (> 1500) [23]. Analyty eluované z LC jsou ionizovány, vzniklé ionty jsou podrobeny fragmentaci a sledují se následující parametry: retenční čas,  $m/z$  a izotopická obálka molekulárního iontu a také  $m/z$  a retenční čas fragmentačních iontů. Tyto parametry jsou porovnávány s databází a pro potvrzení identifikace látky je obvykle zapotřebí, aby byly naplněny

alespoň tři až čtyři podmínky [21]. Při zvolení vhodné směsi isotopicky značených vnitřních standardů je zároveň možné identifikovanou látku současně kvantifikovat [23].

V klinické toxikologii jsou analyzovány obzvláště tělní tekutiny: plasma, sérum, krev a moč. Naopak ve forenzní analýze se kromě těchto tělních tekutin setkáme také s analýzou tkání a orgánů, ale i s alternativními vzorky jako jsou například vlasy, sliny, pot nebo kosti [19, 24].

### 2.1.2 Antidopingová kontrola

Doping je užití zakázané látky nebo metody pro zvýšení výkonu a získání výhody oproti jiným sportovcům v soutěži a nebo pro urychlení regenerace [17]. Pro dohled nad dopingem byla v roce 1999 založena světová antidopingová agentura (WADA). WADA uděluje akreditace laboratořím, pravidelně aktualizuje seznam zakázaných látek a metod (The prohibited list), vydává prohlášení a technické dokumenty, kterými se laboratoře musí řídit. Na světě je pouze 30 akreditovaných laboratoří, které jsou způsobilé pro mezinárodní dopingovou kontrolu [25]. Seznam zakázaných látek a metod se dělí na 3 části – látky a metody zakázané vždy, látky zakázané během soutěže a látky zakázané jen v některých sportech. V současné době ve výčtu zakázaných substancí najdeme cca 250 látek obrovské chemické rozmanitosti [26, 27]. Pro dopingovou analýzu se nejčastěji využívá moč, případně krev. Sběr vzorků je přísně definován, vzorky jsou odebírány pod dozorem a odebraný vzorek je rozdělen do dvou sběrných nádob (vzorek A a B) označených unikátním číselným kódem [27].

Vlastní analýza vzorku zahrnuje několik kroků. Nejprve se provede rozsáhlý screening a v případě pozitivního nálezu následuje konfirmační proces vyžadující identifikaci dané látky a jejích metabolitů. Screeningová metoda by měla být dostatečně selektivní, rychlá a citlivá a neměla by poskytovat falešně negativní ani falešně pozitivní výsledky [27]. Vzhledem k tomu, že analýza zakázaných látek vyžaduje současné stanovení velkého množství analytů o rozličných fyzikálně-chemických vlastnostech, hlavní metody v dopingové kontrole tvoří GC-MS a LC-MS. Instrumentace LC-MS nahradila mnoho imunoanalytických metod, jež jsou podstatně méně specifické. Zároveň je v některých případech výhodnější i oproti GC-MS kde je nutné náročně zpracovávat a derivatizovat vzorek. LC-MS je významná například pro stanovení peptidických látek a hormonů jako jsou syntetické insuliny, luteinizační hormon a další [28]. V praxi se z důvodu selektivity využívá LC-MS/MS nebo LC-HRMS. Tato instrumentace

je využívána jak pro metody screeningové, tak pro konfirmační. Výhodou HRMS detekce je navíc možnost retrospektivního hodnocení dat bez re-analýzy vzorku. [28, 29].

### 2.1.3 Výzkum a vývoj nových léčiv

Výzkum a vývoj nových léčiv je časově i finančně náročný proces obvykle začínající syntézou nebo izolací nových molekul, které jsou dále podrobeny základnímu výzkumu, zahrnující mimo jiné preklinické fáze hodnocení. Dalším krokem jsou klinické studie, které jsou v případě úspěšnosti následované registrací a zavedením léčiva na trh. Typickými nástroji pro objevení nových potenciálních léčiv jsou následující postupy: (1) modifikace chemické struktury již známého léčiva, (2) farmakologický screening velké série nově syntetizovaných látek, nebo látek přírodního původu a jejich derivátů, (3) cílená syntéza látek na základě získání nových poznatků o patologickém procesu dané nemoci a (4) zjištění nového účinku u již známého léčiva [30, 31]. Bezpečnost a účinnost léčiva je mimo jiné (biologické vlastnosti, stabilita, farmaceutická formulace a další) ovlivněna také čistotou účinné látky. A právě pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení aktivní látky, jejích metabolitů nebo degradačních produktů se hojně využívá technika LC-MS (LC-UV-MS). Metodika LC-MS se uplatňuje ve všech fázích vývoje léčiv od objevu, přes preklinické a klinické hodnocení léčiva až po metabolické studie a identifikaci nečistot a degradačních produktů finálního léčivého přípravku [10].

#### *Základní výzkum a preklinické studie*

Každá nově syntetizovaná látka je nejprve kvalitativně hodnocena, tedy je určena její identita (nukleární magnetická resonance, HRMS), a ověřena její čistota (často LC-UV-MS). Dále jsou hodnoceny její chemicko-fyzikální vlastnosti, kde LC-MS je využíváno například v hodnocení rozpustnosti, permeability či chemické stability.

Mezi parametry hodnocené v raných fázích vývoje léčiv patří studie metabolické stability. Principem těchto studií je *in vitro* inkubace nového léčiva s jaterní mikrosomální frakcí, nebo s lidskými hepatocyty, následovaná identifikací a kvantifikací vznikajících metabolitů. Jako součást těchto studií je hodnocena rovněž rychlost, jakou dochází k přeměně léčiva na metabolity. Tato data jsou důležitá pro predikci chování látky v lidském organismu. V případě, že je léčivo metabolicky nestabilní je potřeba cíleně modifikovat jeho chemickou strukturu. Identifikace hlavních metabolitů je nezbytná pro odhad jejich možného farmakologického nebo toxického působení a posouzení, zda mají být dále monitorovány během následných toxikologických nebo

farmakodynamických studií [10, 32]. Počáteční metabolické studie jsou založené na LC-MS analýze vzorků z *in vitro* inkubací. Pro detekci bývají využívány zejména MS detektory s vysokým rozlišením. LC-HRMS umožňuje rychlou identifikaci, částečnou strukturní charakterizaci metabolitů (tandemová MS, identifikace fragmentů) a současně také jejich citlivou kvantifikaci [32, 33].

Dalším testem, jež je součástí farmakologického screeningu je například studium potenciálu látky inhibovat některé isoformy cytochromu P450 (CYP), což je nejčastějším důvodem vzniku lékových interakcí [34]. *In vitro* studie inhibice CYP může tedy přinést důležité poznatky pro budoucí klinické fáze vývoje léčiva. Vzhledem k tomu, že CYP jsou primárně koncentrovány v játrech, které jsou hlavním metabolickým orgánem perorálně podávaných léčiv, tak se studium inhibice CYP provádí v jaterní mikrosomální frakci. Jaterní mikrosomální frakce obsahující směs isoform CYP je inkubována společně s vhodným kofaktorem (NADPH), testovanou látkou (potenciální léčivo) a se substrátem typickým pro danou isoformu (například diklofenak pro CYP 2C9, testosteron pro CYP 3A4, fenacetin pro CYP 1A2 a další). Následně je pomocí LC-MS hodnoceno množství vzniklých metabolitů z jednotlivých substrátů (z výše uvedených příkladů tedy 4'-hydroxydiklofenak pro CYP 2C9, 6β-hydroxytestosteron pro CYP 3A4 a paracetamol pro CYP 1A2). Pokud dojde ke zjištění, že je látka inhibitorem dané isoformy CYP, stanovuje se střední inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) [35, 36].

Velmi důležitou součástí preklinického hodnocení léčiv jsou *in vivo* farmakokinetické (FK) studie. Cílem FK studií je charakterizovat parametry ADME (absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace) a nastavit takové podmínky, aby bylo dosaženo optimálních koncentrací testované látky pro požadovaný účinek a bezpečnost [17, 37]. Součástí těchto studií je identifikace metabolitů vznikajících *in vivo*. Testovaná látka a případně její metabolity mohou být stanovované v plasmě, séru nebo v plné krvi (koncentrační profil), tkáních (studium biodistribuce), moči, žluči, případně stolici (studium eliminace) [16, 38]. Vzhledem k tomu, že FK studie často vyžadují velmi nízké limity kvantifikace (v rámci ng/ml) a mnohdy současnou analýzu parentní látky a metabolitů, je hojně využívána LC-MS jakožto relativně univerzální a citlivá metoda [10, 16, 32, 34].

## *Klinické studie*

Pokud vybraná látka úspěšně prošla farmakologickým screeningem a preklinickými studiemi, včetně rozsáhlých testů toxicity, pak postupuje do klinického testování, jež sestává ze čtyř fází. V I. fázi klinického testování je hodnocené léčivo poprvé podáno člověku. Obvykle jsou vybíráni zdraví jedinci, jimž je látka podána jednorázově, nebo krátkodobě opakovaně v rámci několika dnů. V této fázi je hodnocena snášenlivost léčiva, jsou získávány informace o farmakokinetice a farmakodynamice a je stanoveno dávkovací schéma pro další fáze hodnocení [16, 31]. V II. fázi je hodnocen předpokládaný účinek léčiva při podání pacientům s danou chorobou. Zároveň jsou vyhledávány nežádoucí účinky a probíhají dílčí FK a farmakodynamické studie při opakovaném podávání léčiva [16, 31]. Následuje fáze III, tzv. rozšířená klinická studie, kdy se prokazuje terapeutická účinnost a bezpečnost nového léčiva v porovnání s již registrovaným lékem v dané indikaci. Poslední, IV. fázi je postregistrační hodnocení léčiva [31].

Zejména v prvních dvou fázích je LC-MS důležitým metodickým nástrojem, pro stanovení FK vlastností léčiva u lidských subjektů včetně identifikace metabolitů, které nebyly v preklinických fázích vývoje detekovány a ovlivnění eliminace u specifických skupin pacientů (např. renálním, či hepatálním poškozením apod.) [16, 17, 39]. Po zavedení léčiva na trh je LC-MS využíváno v aplikacích, jako je monitorování lékových hladin, nebo v případě bioekvivalenčních studií generických přípravků [16]. Obě tyto aplikace budou diskutovány v samostatných podkapitolách.

### **2.1.4 Terapeutické monitorování lékových hladin**

Terapeutické monitorování lékových hladin (TDM) umožňuje na základě měření koncentrací účinné látky a jejích metabolitů v séru, plasmě, nebo dalších biologických tekutinách individuálně nastavit dávku léčiva. TDM se využívá ve specifických případech v klinické praxi pro maximalizaci účinku a minimalizaci rizik léčby. Personalizovaná léčba je nutná například u pediatrických pacientů, u pacientů s renální nebo jaterní dysfunkcí, u léčiv s úzkým terapeutickým indexem nebo v případech, kde stanovení lékových hladin může pomoci odhalit ovlivnění enzymové aktivity genovým polymorfismem [40-42]. Typickým příkladem pro TDM jsou například některá antiepileptika [43], antineoplastika [44], imunosupresiva [45], antibiotika [46], antivirotika [47], antimykotika [48] a psychotropní látky [49]. Laboratorní techniky

používané v TDM můžeme rozdělit na specifické (chromatografické metody) a nespecifické (imunoanalytické metody). Vzhledem k výše zmíněným vlastnostem LC-MS je tato technika v oblasti TDM hojně zastoupena [43-49] a začíná se zde využívat také LC-HRMS [50-52].

### 2.1.5 Bioekvivalenční studie

Pro úspěšné schválení generického léčivého přípravku je nutné potvrdit ekvivalenci s referenčním přípravkem (reference listed drug), které má stejnou účinnou látku (pomocné látky se mohou lišit), sílu a lékovou formu. Generický přípravek je bioekvivalentní, jestliže nevykazuje významný rozdíl v rychlosti a rozsahu biologické dostupnosti v porovnání s referenčním léčivem za stejných podmínek. V bioekvivalenční studii se nejčastěji stanovuje testovaná látka v plasmě a měří se koncentrační profil látky v čase. Následně se hodnotí vybrané FK parametry: (1) rychlost absorpce, jež je obvykle hodnocena jako maximální dosažená koncentrace v plasmě, séru nebo plné krvi ( $c_{\max}$ ) v čase ( $t_{\max}$ ) (2) zatímco rozsah absorpce je obvykle definován plochou pod koncentrační křivkou ( $AUC_{0-t}$  a  $AUC_{0-\infty}$ ) [16, 53, 54]. Jako doplňkové parametry mohou být také hodnoceny rychlostní konstanta eliminace ( $\lambda_z$ ) a biologický poločas eliminace ( $t_{1/2}$ ). Pro výpočet FK parametrů musí být použitý non-kompartmentový model. Bioekvivalence je prokázána, když pro parametry  $c_{\max}$  a AUC platí, že 90% interval spolehlivosti poměru testovaná/referenční látka se nachází v akceptačním intervalu 80.00 - 125.00 %. Tento limit vychází z předpokladu, že 20% rozdíl mezi testovaným a referenčním léčivem není klinicky významný, nicméně v některých případech je nutné tento limit upravit. Pro látky s úzkým terapeutickým indexem je doporučeno snížit akceptační interval pro AUC a v některých případech i pro  $c_{\max}$  na 90.00 - 111.11 %. Naopak u vysoce variabilních přípravků je možnost limit pro  $c_{\max}$  zvýšit (dle variability v rámci subjektu až na interval 69,84 – 143,19 %), ovšem akceptační interval 80.00 - 125.00 % pro AUC by měl být dodržen [53].

Pro určení bioekvivalence dvou léčivých přípravků (v následujícím textu označených A a B) je obvykle doporučena randomizovaná „two-period, two-sequence crossover“ studie s jednorázovým podáním testovaného léčiva [53, 54]. Každému účastníkovi studie jsou postupně podány obě testovaná léčiva. Účastníci jsou náhodně rozděleni do dvou testovacích skupin, kde skupině 1 je nejprve podána látka A a následně B a u skupiny 2 naopak, tedy nejprve látka B a následně A [55]. Mezi aplikací látky A



a B musí být dostatečně dlouhý čas potřebný pro vyloučení látky tak aby následující měření nebylo ovlivněno předchozí aplikací. K eliminaci léčiva z organismu je obvykle zapotřebí minimálně pět eliminačních poločasů. Studie je obvykle prováděna na zdravých dobrovolnících, nekuřácích, kteří v minulosti nebyli závislí na alkoholu nebo drogách. Aby bylo možné provést statistické zpracování dat, musí se studie účastnit minimálně 12 subjektů [53]. Pro analýzu bioekvivalenčních studií jsou doporučené selektivní, citlivé, přesné, precizní a opakovatelné metody [53, 54]. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) je proto hojně využívána.

## 2.2 Úprava biologického materiálu

V bioanalýze jsou nejčastěji zpracovávány tělní tekutiny, jako je krev, plasma, sérum a moč, ale například také tkáň. Jedná se o velmi komplexní matrice, které obsahují velké množství interferujících látek jako jsou proteiny, soli, fosfolipidy jež mohou způsobovat nežádoucí matricové efekty. Tyto látky se ve vzorku obvykle vyskytují v mnohonásobně vyšší koncentraci než sledovaný analyt, což může mít vliv na citlivost analýzy [56]. Biologické vzorky jsou navíc ve většině případů nekompatibilní s analytickou instrumentací, například proteiny se mohou navázat na stacionární fázi a mohou snížit životnost kolony, případně ji úplně ucpat. Vhodný výběr metody úpravy vzorku představuje jednu z klíčových částí celé bioanalytické metody. Cílem úpravy vzorku není jen izolace sledovaného analytu, ale rovněž získání čistého extraktu prostého interferencí z matrice a ideální je také zakoncentrování vzorku, vzhledem k nízkým koncentracím léčiv, či metabolitů v biologickém materiálu. Jde o časově náročný proces, který mnohdy představuje až 80 % z celkové doby analýzy [56, 57].

Mezi konvenční metody úpravy vzorků využívané v bioanalytických laboratořích patří proteinová precipitace (PP), extrakce na tuhou fázi (SPE) a extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE). Nejjednodušší a velmi rozšířenou technikou je PP. Principem je odstranění proteinů ze vzorku pomocí precipitačního činidla, proto je tato metoda aplikovaná na vzorky s vysokým obsahem proteinů (plasma, sérum, plná krev). Jako precipitační činidla se používají organická rozpouštědla (methanol, acetonitril, ...), kyseliny (např. trichloroctová) a soli (síran zinečnatý v hydroxidu sodném, síran amonný, ...). Metoda je vhodná pro hydrofilní i hydrofobní látky, ale není příliš selektivní, je zde riziko vázání analytu na precipitát, a navíc po precipitaci ve vzorku

zůstanou složky matrice, které se významně podílí na matricových efektech (fosfolipidy, soli a mastné kyseliny) [56, 58].

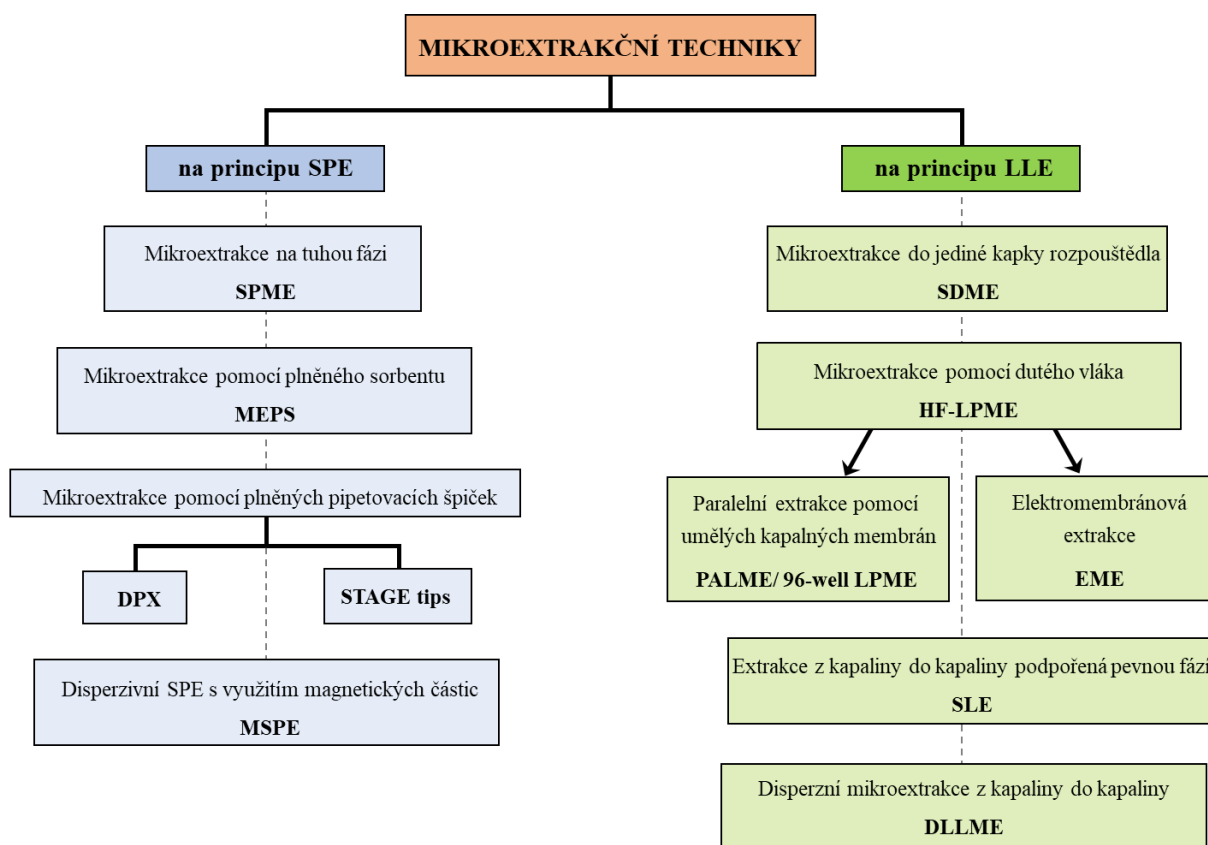
Techniky SPE a LLE jsou založené na distribuci analytu mezi dvě nemísitelné fáze. U SPE je analyt distribuován mezi kapalnou MF a pevnou stacionární fází. Stacionární fáze je tvořena sorbentem pokrytým funkčními skupinami, které interagují s analytem pomocí nepolárních, polárních nebo iontových interakcí. Výběr vhodného sorbentu je pro SPE klíčový. Používají se sorbenty o velikosti částic obvykle 40-50  $\mu\text{m}$ , které jsou chemicky obdobné jako v HPLC, tedy chemicky vázané fáze na bázi silikagelu (C8, C18, fenyl, ...), polární fáze (silikagel, oxid hlinitý, aminopropyl, diol, ...), iontově výměnné fáze, grafitový uhlík, polymerní fáze (např. HLB extrakční kolonky), ale také vícemodální sorbenty (současně obsahují jak nepolární sorbent, tak silný iontově výměnný katex nebo anex), monolity, imunosorbenty, molekulárně vtištěné polymery nebo RAM sorbenty (materiály s omezeným přístupem). Sorbent se vybírá na základě fyzikálně-chemických vlastností izolované látky. Existuje několik možností uspořádání sorbentu a to kolonky, disky, jamkové extrakční destičky, nebo pipetovací špičky. SPE je selektivní, poskytuje vysoké výtěžky a umožňuje zakoncentrování vzorku [58-60]. V případě off-line SPE je nevýhodou poměrně velká časová náročnost, kdy extrakce zahrnuje hodně kroků (kondicionace, nanesení vzorku, promytí, extrakce, případně vysušení a rekonstituce). Další nevýhodou je také vysoká cena, jelikož extrakční kolonky jsou určeny na jedno použití. Současně u SPE mohou být interferující složky matrice během extrakce odstraněny, ale v některých případech mohou být naopak zakoncentrovány společně s analytem a tak není zaručena redukce matricových efektů [57].

V případě LLE je analyt extrahován z vodného vzorku do rozpouštědla nemísitelného s vodou (toluen, ethylacetát, diethylether, hexan, ...) na základě rozdělovacího koeficientu ( $K_D$ ):

$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}} \quad (1)$$

kde  $[A]_{org}$  je koncentrace analytu v extrakčním rozpouštědle nemísitelném s vodou a  $[A]_{aq}$  je koncentrace analytu ve vodném vzorku v chemické rovnováze. V případě, že je tato soustava rozpouštědel tvořena oktanolem a vodou, uvádí se logaritmus poměru oktanol/voda – log P. Čím vyšší je hodnota log P, tím více je látka lipofilní. Vzhledem k tomu, že velká část léčiv jsou acidobazické látky je výtěžnost LLE ovlivněna hodnotou

pH, jelikož analyt přechází do organického rozpouštědla pouze v neionizované formě. Metoda LLE tak bývá obvykle účinná v odstranění solí a fosfolipidů, a tedy by měl být redukován výskyt matricových efektů. V případě následné separace pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích bývá součástí LLE obvykle také krok zahrnující vysušení extrahovaného vzorku dusíkem a následná rekonstituce v rozpouštědle kompatibilním s analytickou instrumentací, tímto krokem je možné vzorek zakoncentrovat. Jistými nevýhodami této extrakce je možná tvorba emulze na rozhraní fází, velká spotřeba organických rozpouštědel (v rámci stovek  $\mu\text{l}$  až jednotek  $\text{ml}$  na vzorek), vysoká časová náročnost, velké množství kroků prováděných operátorem a hlavní nevýhodou je problematická izolace hydrofilních látek [56-58].



**Obrázek 2:** Přehled mikroextrakčních technik diskutovaných v disertační práci.

Mezi hlavní trendy v přípravě vzorků patří: miniaturizace, automatizace, online spojení se separační technologií, snadné zpracování velké série vzorků a snižování nákladů na extrakci. Modifikací tradičních extrakčních metod jako je SPE a LLE vznikla řada miniaturizovaných technik (**Obrázek 2**). Tyto metody obvykle vedou ke snížení spotřeby vzorku a organických rozpouštědel, snadnému zakoncentrování, zvýšení selektivity, snížení počtu extrakčních kroků a v některých případech také zkrácení doby

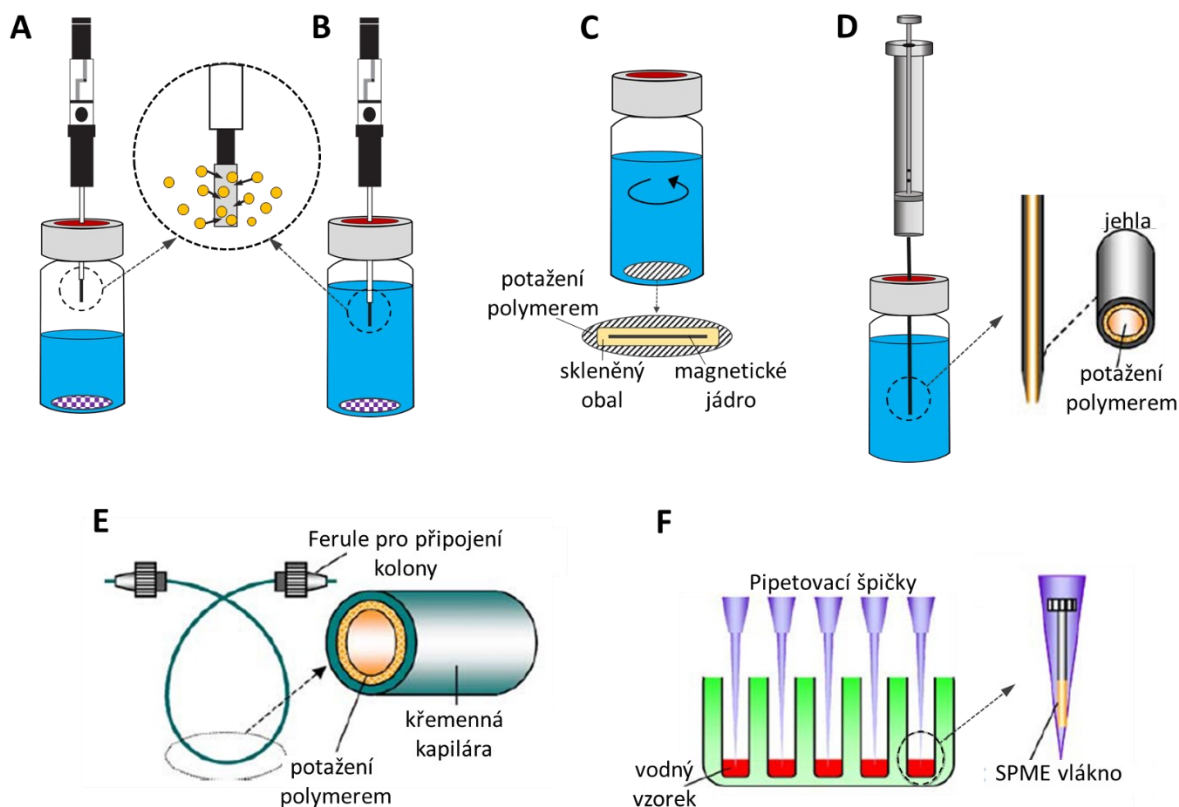
extrakce, čímž vedou k vysoké propustnosti vzorků laboratoří [61]. Snížení spotřeby vzorku je výhodné zejména v případech, kdy je dostupné pouze omezené množství analyzovaného vzorku. Příkladem může být *in vivo* analýza na myších nebo potkanech. Navíc díky nízké spotřebě organických rozpouštědel jsou mikroextrakce značně šetrnější k životnímu prostředí v porovnání s tradičními extrakčními metodami.

### 2.2.1 Miniaturizované techniky založené na principu SPE

#### *Mikroextrakce na tuhou fázi*

Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME, z anglického solid-phase microextraction) byla představena v roce 1990 Arthurem a Pawliszynem, kteří pomocí silikonového optického vlákna potaženého polyimidem extrahovali látky (polychlorované bifenyly a benzeny) z vodného roztoku s následnou termální desorpcí v plynovém chromatografu [62]. Extrakce trvala pouze dvě minuty a díky termální desorpci byla úplně eliminována organická rozpouštědla. Zpracování vzorků pomocí SPME obvykle zahrnuje 2 fáze: (1) rozdělení analytu mezi vzorek a extrakční fázi na základě rozdělovacího koeficientu a (2) desorpci analytu z extrakční fáze do analytického přístroje nebo do desorpčního roztoku. Na rozdíl od konvenčních metod je v případě SPME vzorek extrahován pouze do dosažení rovnováhy mezi vzorkem a sorbentem, a tedy do extrakční fáze přechází pouze malé množství analytu (obvykle méně než 10 %). Tato mikroextrakční metoda byla postupně modifikována a kromě původního vlákna byly použity další nosiče pro ukotvení tuhé fáze – míchadlo, kapiláry, jehla, a další (**Obrázek 3**). V komerční výrobě jsou pro potažení vlákna nejčastěji použity polymerní materiály, které jsou běžně užívané jako stacionární fáze v plynové chromatografii, mezi tyto polymery patří například polydimethylsiloxan, divinylbenzen, karboxen, nebo pro polární látky karbowax-polyethylenglykol a jsou dostupná i vlákna potažená modifikovaným silikagelem C18. Nicméně na experimentální úrovni bylo použito velké množství unikátních tuhých fází, např. polypyrrol, immunosorbenty, modifikovaný silikagel nebo molekulárně vtištěné polymery [60, 61]. Tato extrakční metoda byla původně vyvinuta pro extrakci těkavých analytů, které jsou po termální desorpci separovány pomocí plynové chromatografie. Nicméně v současné době stoupá využití spojení SPME s kapalinovou chromatografií, zejména pro analýzu netěkavých a termolabilních látek [56]. V tomto případě je analyt extrahován do desorpčního roztoku a při zvolení vhodného extrakčního módu je možné extrakci automatizovat [63, 64]. Tato metoda je poměrně hojně rozšířena a byla již použita pro extrakci analytů v oblasti

enviromentální [65-67], forenzní [68, 69] a farmaceutické [67, 70] analýzy nebo také v analýze potravin [71, 72]. Tato technika navíc umožňuje extrakci jak exogenních, tak endogenních látek *in vivo*, tedy přímo z živého organismu [73-75].



**Obrázek 3:** Mikroextrakce na tuhou fázi a související mikroextrakční techniky: (a) „head-space“ SPME, (b) „direct imersion“ SPME, (c) sorpční mikroextrakce míchadlem, (d) „in needle“ SPME, (e) „in-tube“ SPME, (f) „in-tip“ SPME, převzato a upraveno podle [61]

### *Mikroextrakce pomocí plněného sorbentu*

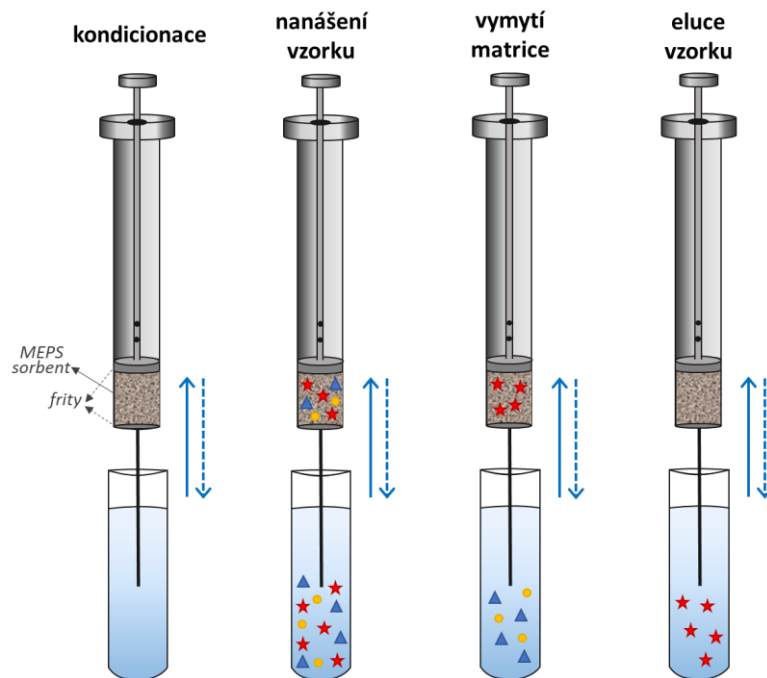
Mikroextrakce pomocí plněného sorbentu (MEPS, z anglického microextraction by packed sorbent) je miniaturizovanou verzí klasické SPE. Tuto metodu představil v roce 2004 Abdel-Rehim ze švédské laboratoře Astra-Zeneca [76]. Na rozdíl od SPE, která probíhá v plastových kolonkách (obvykle 30 a více mg sorbentu) nebo 96-jamkových destičkách (10-100 mg sorbentu), je u MEPS sorbent (1-4 mg) buď součástí skleněné stříkačky, kde je na obou stranách oddělen polyethylenovými filtry a nebo je umístěn v kartridži, která je zakomponovaná mezi jehlu a stříkačku o objemu 100, 250 nebo 500  $\mu\text{l}$  (**Obrázek 4a**). Extrakce může probíhat manuálně, poloautomaticky pomocí speciální pipety (eVol®) nebo zcela automaticky (**Obrázek 4**) [77, 78].



**Obrázek 4:** Mikroextrakce pomocí plněného sorbentu (a) manuální – sorbent umístěn ve stříkačce nebo v kartridži na jehle, (b) poloautomatizovaná pomocí pipety eVol a (c) plně automatizovaná. Převzato a upraveno podle [77, 79].

Vlastní extrakce se skládá ze shodných kroků jako klasická SPE: (1) aktivace sorbentu, kdy je sorbent dvakrát promytý organickým rozpouštědlem a následně dvakrát promytý vodou, případně 0,1% kyselinou mravenčí; (2) nanášení vzorku v jednom, nebo více cyklech v závislosti na koncentraci cílového analytu (3) vymytí interferujících složek matrice, nejčastěji se aplikuje voda, nebo 0,1% kyselina mravenčí v jednom až dvou promývacích cyklech (4) a nakonec eluce analytu vhodným organickým rozpouštědlem. Proces extrakce se však od SPE liší směrem toku rozpouštědel používaných při extrakci, kde v případě klasické SPE jsou roztoky vždy eluovány jedním směrem (shora dolů), zatímco u MEPS proudí roztoky oběma směry, jelikož jsou do stříkačky nasávány a následně zpět vypouštěny pohybem pístu nahoru a dolů (**Obrázek 5**). Z tohoto důvodu jsou v případě MEPS klíčovými kroky promývání a eluce vzorku. Analyt může být eluován velmi malým objemem rozpouštědla, výsledkem je vysoké zakonzentrování vzorku a možnost eluát přímo nastříknout na analytickou kolonu, tedy on-line spojení MEPS se separační technikou. V případě manuální extrakce je ovšem nutná jistá zručnost, jelikož efektivita extrakce je ovlivněna rychlostí pohybu pístu stříkačky. Příliš rychlé nasávání a vysávání rozpouštědel může vést k nedostatečné adsorpci analytu k sorbentu, což vede k nízké výtěžnosti a špatné opakovatelnosti extrakce [58]. Pro MEPS jsou komerčně dostupné podobné sorbenty jako pro SPE (silikagel, C2, C8, C18 a C8+SCX), proto jsou podmínky SPE snadno adaptovatelné na techniku MEPS jednoduchým snížením množství rozpouštědel dle hmotnostního rozdílu sorbentů mezi SPE a MEPS.

Další výhodou je možnost mnohonásobného použití jedné kartridže plněné sorbentem pro extrakci 100 a více vzorků na základě typu matrice. Cenové náklady jsou tímto ve srovnání s SPE, kde je extrakční kolonka určena pouze pro jedno použití, redukovány a současně je MEPS výrazně ekologičtější extrakční metoda. Pro minimalizaci přenosu mezi jednotlivými vzorky je MEPS sorbent po každé extrakci několikrát promyt methanolem, acetonitrilem nebo jiným vhodným rozpouštědlem [57, 58, 77-79]. V případě viskózních a komplexních matric, jako například plasma, sérum nebo plná krev je ovšem životnost kartridže nižší vzhledem k riziku ucpaní sorbentu. Tomu je možné předejít naředěním vzorku, případně vysrážením proteinů pomocí methanolu nebo acetonitrilu nebo centrifugací vzorku [80-82]. Stejně jako výše zmíněná SPME se MEPS využívá v oblastech farmaceutické [83, 84], forenzní [85, 86] enviromentální analýzy [87, 88] i v analýze potravin [89, 90].

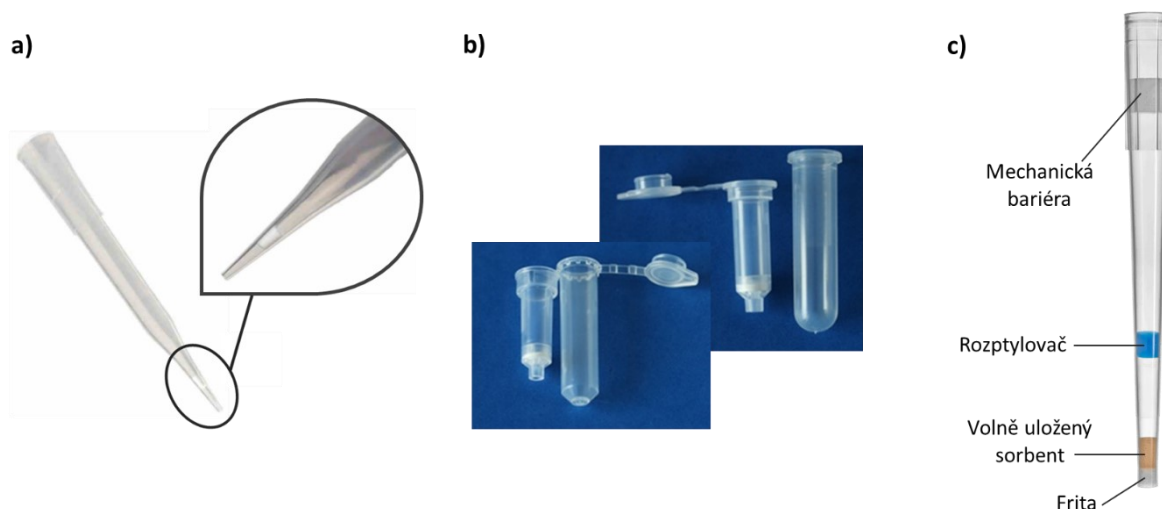


**Obrázek 5:** Průběh mikroextrakce pomocí plněného sorbentu. Převzato a upraveno podle [77].

### *Mikroextrakce pomocí plněných pipetovacích špiček*

Společným parametrem následujících dvou mikroextrakcí je umístění sorbentu do pipetovacích špiček. Jedná se o miniaturizovanou verzi klasické SPE - tzv. STop And Go Extraction (STAGE tips, **Obrázek 6a**) nebo miniaturizovanou disperzní SPE - tzv. disposable pipette tip extraction (DPX). Tyto dvě techniky se ovšem liší způsobem uložení sorbentu ve špičce a dále také způsobem nanášení vzorku. Při STAGE tips extrakci je špička (objem 10  $\mu$ l až 1 ml) naplněna vrstvou sorbentu, vzorek i jednotlivá

rozpouštědla jsou nanášeny vrchním koncem špičky a tok rozpouštědel je dán hnací silou, kterou je buď tlak či odstředivá síla aplikovaná prostřednictvím centrifugy. Využití centrifugace pro extrakci vede ke zlepšení preciznosti a opakovatelnosti, není zde však možnost automatizace, jelikož centrifugu není možné propojit s chromatografickým systémem. Navíc, po každém centrifugačním cyklu je nutné manuálně doplnit roztok pro další krok extrakce. Další nevýhodou je nízká kapacita špičky, která je dána množstvím sorbentu, proto tato metoda není vhodná pro kvantitativní stanovení vysoce koncentrovaných analytů. Další komplikací je časté ucpávání sorbentu, kdy v případě biologických materiálů, jako je plasma nebo sérum je nutné vzorek před extrakcí naředit, nebo lépe deproteinovat [91, 92]. Naopak výhodou této extrakční metody je možnost vlastní přípravy extrakčních špiček přímo v laboratoři. Jedná se o velmi snadný postup, kdy se využívá komerčně vyráběných SPE disků, ze kterých je jehlou Hamiltonovy stříkačky sorbent vyříznut a přenesen do špičky. Je tedy možné optimalizovat množství sorbentu pro danou extrakci, případně špičku naplnit vlastní kombinací sorbentů vhodných pro extrakci vybrané směsi analytů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [92, 93]. Na stejném principu, je založena i spin column  $\mu$ SPE (SC- $\mu$ SPE), jež využívá centrifugaci jako hnací sílu. Zde je sorbent ve formě disku umístěn v miniaturních plastových kolonkách které jsou vloženy do odpadních zkumavek, do kterých jsou sbírána jednotlivá rozpouštědla, či eluát (**Obrázek 6b**) [91]. Bylo publikováno několik studií, kde byly extrahovány léčiva z biologického materiálu pomocí STAGE tips [92] nebo SC- $\mu$ SPE [94], nicméně své využití našly tyto extrakční metody zejména v oblastech proteomiky a metabolomiky [95-98].



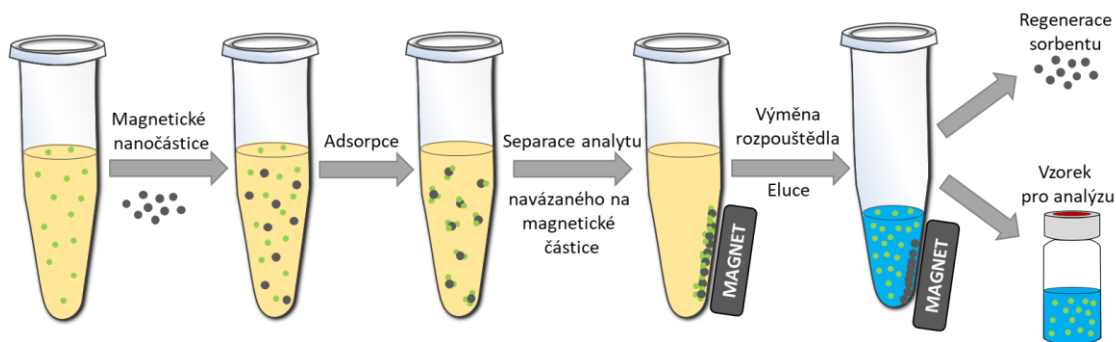
**Obrázek 6:** Mikro-SPE v uspořádání (a) STAGE tip, (b) „spin column“ a (c) DPX. Převzato a upraveno podle: [99-101].



V případě DPX je sorbent (1-100 mg) volně uložen ve špičce (200  $\mu$ l – 5 ml), mezi fritou (spodní část špičky) a mechanickou bariérou (horní část špičky) (**Obrázek 6c**). Při nasávání vzorku do špičky dochází k dynamickému míchání vzorku se sorbentem, což vede k rychlému dosažení rovnováhy mezi stacionární fází a analytem. Pro ještě větší účinnost této extrakce může být součástí špičky tzv. rozptylovač („disperger“), který pomáhá zvýšit kontakt mezi roztokem vzorku a částicemi sorbentu [102]. Jedná se o časově velmi rychlou extrakci (v rámci jednotek minut), je dostupný široký výběr stacionárních fází (reverzní fáze, silikagel, iontově výměnné fáze, mix-mode fáze, hybridní SPE fáze i fáze na bázi grafitového uhlíku) a další výhodou DPX je nízká spotřeba rozpouštědel i vzorku. Navíc je celý proces automatizovatelný a je možné i přímé on-line spojení s chromatografickou metodou [99, 103]. Tato extrakce byla použita například v oblastech analýzy enviromentální [104], forenzní [103] či potravin [105-107].

#### *Disperzivní $\mu$ -SPE s využitím magnetických částic*

Další extrakční metodou, založenou na principu disperzní extrakce na tuhou fázi je SPE s využitím magnetických částic (**Obrázek 7**). Sorbentem jsou core-shell částice, tvořené magnetickým jádrem, potaženým vrstvou silikagelu, který může být dále modifikován, grafenu, polymeru atd. Pro tvorbu jader se využívají mikro nebo nano částice z materiálů se supraparamagnetickými vlastnostmi, což znamená, že částice jsou přitahovány magnetickým polem, ale po odstranění pole si magnetismus nezachovávají a dále se neshlukují. Tyto vlastnosti splňuje železo, nikl, kobalt a jejich oxidy, nejčastěji se využívá  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [108, 109]. Jedná se o velmi rychlou a efektivní extrakci, jelikož sorbent tvořený malými částicemi s velkým povrchem je rozptýlen ve vzorku ve formě suspenze, čímž je rychle dosažena rovnováha mezi analytem a sorbentem, který navíc před extrakcí nevyžaduje aktivaci a kondicionaci. Následně je sorbent pomocí vnějšího magnetického pole odseparován, promyt a analyt je extrahován pomocí vhodného rozpouštědla. Sorbent může být po desorpci vzorku regenerován a opakovaně použit pro další extrakce. Důležitými parametry extrakce, které vyžadují optimalizaci jsou pH vzorku, množství a typ sorbentu a objem rozpouštědla pro promytí a desorpci vzorku [109-112]. Touto metodou je možné extrahovat látky z biologického materiálu [113], z komplexních matic jako jsou potraviny [114] a své využití našla i v enviromentální analýze [115], nebo biotechnologiích, kde umožňuje například izolaci a přečištění DNA [116].

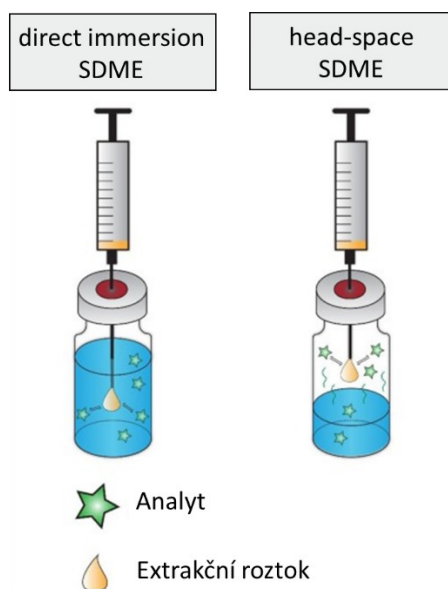


**Obrázek 7:** Průběh disperzivní  $\mu$ -SPE s využitím magnetických částic.

## 2.2.2 Miniaturizované techniky založené na principu LLE

### *Extrakce do jediné kapky rozpouštědla*

V roce 1996 byla představena první miniaturizovaná LLE do jediné kapky rozpouštědla (single-drop microextraction, SDME) [117, 118]. Při této metodě je analyt extrahován pasivní difuzí z vodného roztoku do kapky ( $< 10 \mu\text{l}$ ) organického rozpouštědla nemísitelného s vodou. Kapka je zpravidla ukotvena na jehle mikrostříkačky, do níž je po extrakci zpět nasáta. Extrakce může probíhat ve dvou módech: (1) přímé ponoření kapky do vzorku (tzv. „direct immersion“ DI-SDME) a (2) tzv. headspace extrakce (HS-SDME), kdy je kapka umístěna v prostoru nad vzorkem a mohou tak být extrahovány těkavé látky (**Obrázek 8**). Pro dosažení vysoké



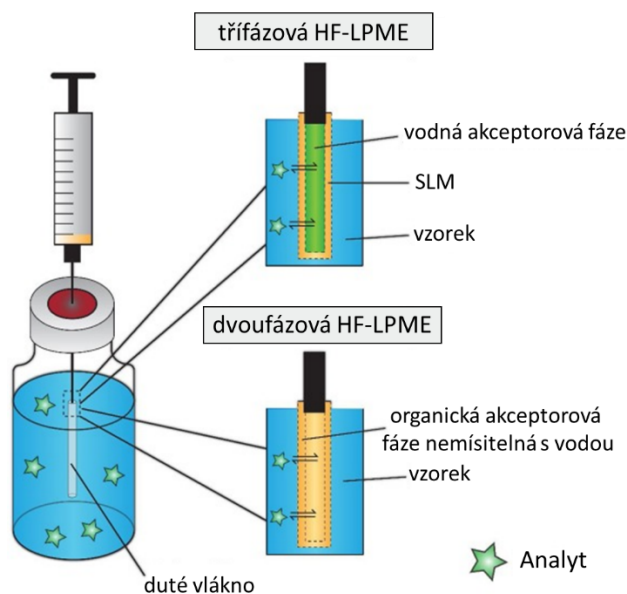
**Obrázek 8:** Extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME) v uspořádání „direct immersion“ a „head-space“. Převzato z: [119].

účinnosti extrakce je nezbytné míchání vzorku během extrakčního procesu. Jedná se o poměrně jednoduchou extrakci, která nevyžaduje speciální instrumentaci. Vzhledem k problematické stabilitě kapky je ovšem tato metoda poměrně málo robustní. Z tohoto důvodu není SDME příliš využívána v oblasti bioanalýzy [119-121]. SDME je však stále předmětem experimentálních studií a ve snaze zlepšit robustnost metody jsou například testována nová rozpouštědla poskytující stabilnější kapku [122]. V nedávné studii byla publikována SDME v 96-jamkovém uspořádání umožňující semi-automatickou paralelní úpravu vzorků [123].

### *Mikroextrakce pomocí dutého vlákna*

Mikroextrakci pomocí dutého vlákna (HF-LPME, z anglického hollow fiber liquid phase microextraction) představil v roce 1999 Pedersen-Bjergaard a Rasmussen [124]. Organická vrstva (nemísitelná s vodou) je v tomto případě ukotvena v mikropórech dutého polypropylenového vlákna a tvoří takzvanou kapalnou membránu (SLM, z anglického „supported liquid membrane“). Vlákno je ponořeno do kapalného vzorku a látky jsou extrahovány pasivní difúzí dovnitř dutého vlákna, které je naplněno akceptorovým roztokem. Akceptorový roztok může být, buď organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou (tzv. dvoufázová HF-LPME), nebo vodný roztok, pak se jedná o tzv. třífázovou HF-LFME (**Obrázek 9**). Dvoufázová extrakce je vhodná pro extrakci lipofilních analytů a následnou analýzu pomocí GC. Zatímco třífázová HF-LPME je přímo kompatibilní s LC na reverzních fázích nebo kapilární elektroforézou [119, 120, 125].

Jedním z klíčových parametrů extrakce je vhodná volba organického rozpouštědla pro SLM. To by mělo splňovat následující požadavky: (1) nemísitelné s vodou, aby nedocházelo k úniku do vzorku nebo v případě třífázového uspořádání do akceptorového roztoku, (2) mělo by být dostatečně hydrofobní, aby docházelo k rovnoměrnému rozložení v pórech hydrofobní membrány (3) v případě třífázového uspořádání by rozpouštědlo nemělo být příliš těkavé, aby nedocházelo ke ztrátám během extrakce, jsou tedy doporučována rozpouštědla s vysokým bodem varu a za (4) by mělo být dostatečně selektivní pro daný typ extrakce. Mezi často používaná rozpouštědla patří například 1-oktanol, dihexyl ether, dodecyl acetát nebo isopentyl benzen. Vzhledem k tomu, že extrakce probíhá pasivní difúzí, je hnací silou pH gradient, proto je nezbytné optimalizovat pH donorového a akceptorového roztoku. Dalšími parametry, které musí být optimalizovány jsou rychlost míchání a délka extrakce [125, 126].



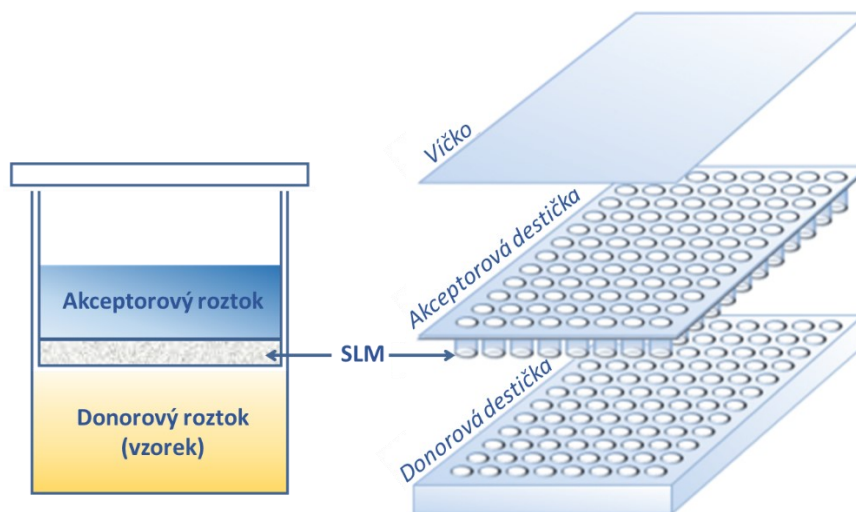
**Obrázek 9:** Mikroextrakce pomocí dutého vlákna (HF-LPME) ve dvoufázovém a třífázovém provedení. Obrázek převzat z: [119].

Při vhodně zvolených podmínkách třífázová HF-LPME poskytuje vysoce přečištěný extrakt: (1) nabitě molekuly ve vzorku nepřejdou do organické vrstvy SLM, (2) silně hydrofobní látky jsou zadrženy v lipofilní SLM a za (3) membrána dutého vlákna působí současně jako bariéra pro velké molekuly, jako jsou například proteiny. Současně při extrakci dochází k obrovskému zakoncentrování vzorku, vzhledem k velkému objemovému rozdílu mezi vzorkem a akceptorovým roztokem. Při extrakci je použito minimální množství organických rozpouštědel (desítky  $\mu\text{l}$ ). Jistou nevýhodou však může být doba extrakce, kdy k dosažení rovnováhy je zapotřebí obvykle 30-45 minut. V porovnání s předchozí technikou SDME, která je rovněž časově náročná, je HF-LPME mnohem robustnější a je tedy vhodná i pro extrakci látek z biologických materiálů. Nicméně, vybavení potřebné pro tuto extrakci není komerčně dostupné, což limituje použití HF-LPME v rutinní klinické laboratoři, proto je tato metoda využívána spíše na akademické úrovni [127]. Tento problém byl vyřešen modifikací metody, kdy duté vlákno bylo nahrazeno plochou membránou uspořádanou ve formě 96-jamkové filtrační destičky - tzv. „parallel artificial liquid membrane extraction“ (PALME). Veškeré vybavení pro provedení této extrakce je komerčně dostupné a díky 96-jamkovému uspořádání navíc metoda umožňuje vysokou propustnost vzorků laboratoří [128]. Další modifikací HF-LPME je její kombinace s elektrickým polem – tzv. elektromembránová extrakce. Tato technika bude podrobně diskutována v kapitole 2.3.

PALME je třífázová forma HF-LPME využívající k extrakci plochou membránu v takzvaném „sandwichovém“ formátu. Organický solvent je ukotven na filtrační membránu (0,45  $\mu\text{m}$ , polyvinyliden fluorid), která je součástí akceptorové destičky. Vzorek je extrahován z donorové 96-jamkové destičky, která je těsně uzavřena akceptorovou 96-jamkovou filtrační destičkou do jejíchž jamek je následně napipetován akceptorový roztok. Tento systém je uzavřen víčkem, aby nedocházelo k odpařování akceptorového roztoku během extrakce, a je třepán po celou dobu extrakce (**Obrázek 10**). PALME nabízí možnost úpravy velké série vzorků, snadnou manipulaci, a tedy snížení potenciálních chyb, které by operátor mohl do extrakce zanést. Jistou limitací však může být objem donorové fáze (vzorku). Objem je limitován jednak velikostí jamek donorové destičky (0,5 ml) ale i faktem, že je nutné do jamky ještě částečně ponořit akceptorovou destičku, a tak maximální objem donorové fáze je 250  $\mu\text{l}$ . Na druhou stranu, by objem donorové fáze neměl být menší než 200  $\mu\text{l}$ , jelikož pro vlastní extrakci je nutný kontakt mezi vzorkem a membránou [128]. V případě extrakce z biologického materiálu je donorová fáze obvykle tvořena směsí vzorku a pufru, který upravuje pH vzorku tak, aby analyty byly v neionizované formě a mohl penetrovat do hydrofobní SLM. Naproti tomu akceptorový roztok musí mít takové pH, aby extrahované analyty byly ionizované a nehrozila zpětná extrakce do SLM. Pro vytvoření neutrálního prostředí je nejčastěji používán fosfátový pufr, zatímco kyselého prostředí je dosahováno pomocí roztoků kyseliny chlorovodíkové či mravenčí, bazické prostředí je naopak tvořeno ředěnými roztoky hydroxidu sodného [126, 129].

Výběr vhodného organického rozpouštědla pro SLM je rovněž klíčový pro extrakci. Pro bazické analyty se nejčastěji používá dodecylacetát, dihexyl ether, isopentyl benzen a nebo n-hexadekan. Pro extrakci kyselých látek je nejčastěji zvolen dihexyl ether, isopentyl benzen nebo 2,2-dimethyl-1-propyl benzen. Tato organická rozpouštědla jsou vhodná pro extrakci nepolárních nebo nanejvýš slabě polárních látek ( $\log P$  alespoň 1,5 - 2,0). Přejít do polárnějších látek do relativně nepolární SLM je však značně omezen, což vede k nízké efektivitě extrakce [129]. Pro zvýšení účinnosti extrakce polárních látek jsou v LPME používány dva přístupy: (1) přidavek hydrofobního iontově-párového činidla do vzorku nebo (2) přidavek iontového nosiče do SLM. Při extrakci polárních bazických látek je možné použít iontově-párové činidlo, jež s analytem vytvoří hydrofobní komplex. Ten je extrahován do hydrofobní SLM a následně na rozhraní fází mezi SLM a akceptorovým roztokem dojde k uvolnění analytu z komplexu a výměnu za

proti-iont (proton) z akceptorového roztoku. Hnací silou jsou v tomto případě protony, a tak je pro vysokou extrakční výtěžnost nutné použít silně kyselý akceptorový roztok [130]. Jako iontový nosič přidaný do SLM byl úspěšně použit di(ethylhexyl)fosfát (DEHP), kdy pomocí přídavku 15 % DEHP do 2-nonanolu byly extrahovány látky s log P -0.3 až 1.3 s výtěžností až 80 % [131].



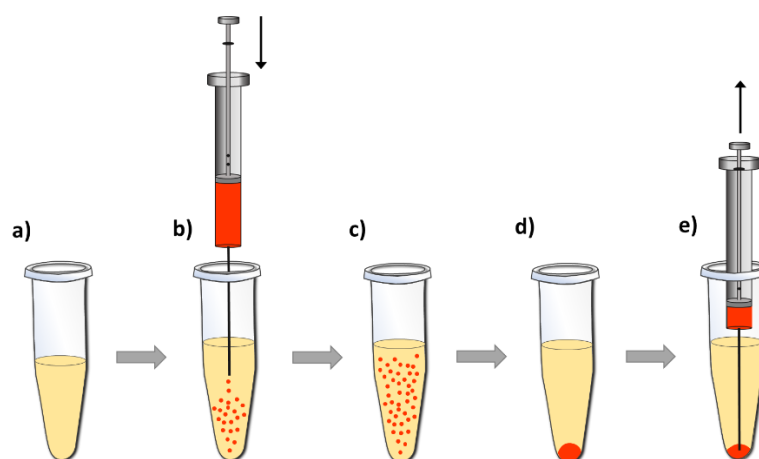
**Obrázek 10:** Mikroextrakce z kapaliny do kapaliny v 96-jamkovém „sandwichovém“ formátu (PALME). Převzato a upraveno podle [132], [128].

Jistou nevýhodou metody zůstává dlouhý extrakční čas (obvykle 30-60 min), nicméně možnost současné extrakce až 96 vzorků tuto nevýhodu do jisté míry kompenzuje. PALME poskytuje vysoce přečištěný extrakt a tato technika je velmi efektivní v odstraňování fosfolipidů, jež jsou častou příčinou nežádoucích matricových efektů. Výsledný extrakt je navíc přímo kompatibilní s LC na reverzních fázích a je možné ho přímo nastříknout na chromatografickou kolonu bez dalších kroků, které jsou typické pro klasickou LLE (odpaření a rekonstituce vzorku) [131, 133]. Tato metoda byla v bioanalýze použita například pro extrakci nových psychoaktivních látek (methylon, pentedron,...) [134] či benzodiazepinů a Z-drugs [132] z plné krve nebo nesteroidních antiflogistik [135] a antidepresiv [136] z plasmy.

#### *Disperzní liquid-liquid mikroextrakce*

Disperzní liquid-liquid mikroextrakci (DLLME) představil v roce 2006 Rezaee *et al.* [137]. Při této extrakci je kromě vodného vzorku a extrakčního činidla (nemísitelného s vodou) použité ještě disperzní činidlo, které slouží jako tzv. most mezi

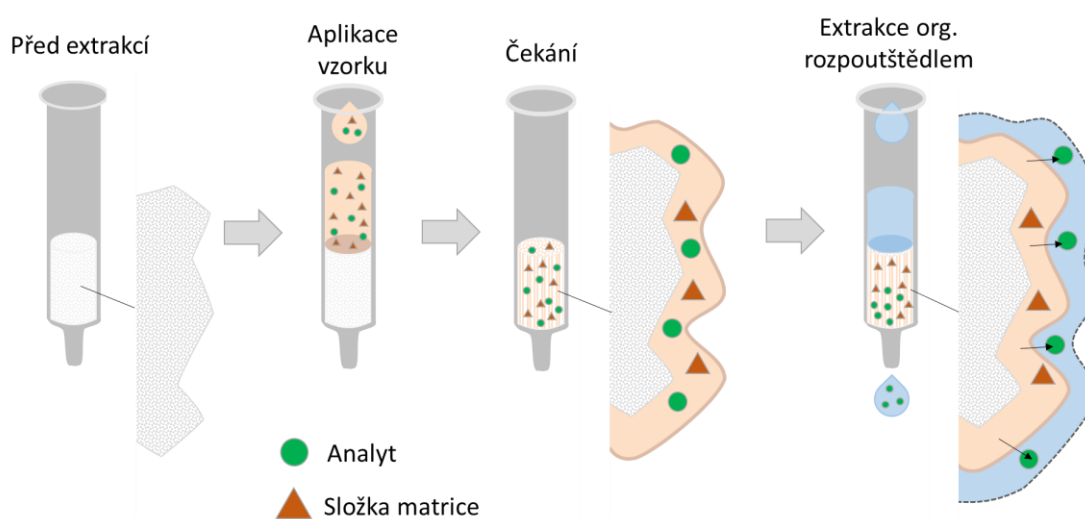
vzorkem a extrakčním činidlem, vzhledem k jeho mísitelnosti s oběma výše zmíněnými roztoky. Extrakce probíhá v kónických zkumavkách, kde směs extrakčního a disperzního činidla je rychle aplikována do vzorku pomocí stříkačky, čímž dojde ke vzniku disperzního roztoku (**Obrázek 11**). Extrakce navíc může být podpořena mícháním nebo prostřednictvím ultrazvuku. Díky malým kapkám extrakčního činidla dochází k extrakci na velkém povrchu, díky čemu je rychle dosažena extrakční rovnováha. Následně je směs centrifugována, organická fáze je odebrána a buď přímo analyzována (například GC nebo LC na normálních fázích) nebo dále zpracována (odpaření a rekonstituce ve vhodném rozpouštědle) [119, 120, 137, 138]. Pro extrakci jsou obvykle využívána extrakční činidla s vyšší hustotou, než je voda, například dichlormethan, chloroform nebo bromobenzen a současné studie zmiňují například také iontové kapaliny [139]. Přestože se jedná o mikroextrakční techniku, tak je při DLLME stále poměrně velká spotřeba rozpouštědel a extrakce obvykle probíhá z většího objemu vzorku (5 – 10 ml). Pro vznik disperze je nezbytné, aby množství disperzního činidla (obvykle 0,5 – 2 ml) převyšovalo objem extrakčního činidla (obvykle 20 – 100  $\mu$ l). Množství disperzního činidla je klíčový parametr, který musí být optimalizován. V případě malého objemu není extrakční činidlo dostatečně dispergované ve vodném roztoku, čímž dojde ke snížení extrakční účinnosti. Naopak nadbytek disperzního činidla může zvýšit mísitelnost extrakčního činidla s vodným vzorkem což snižuje výtěžnost extrakce, jelikož dojde k částečné ztrátě extrakčního činidla [120, 138]. DLLME se uplatňuje zejména v oblastech enviromentální analýzy a analýzy potravin. Uplatnění v bioanalýze je malé a převažují extrakce z moči [119, 120].



**Obrázek 11:** Průběh disperzní liquid-liquid mikroextrakce: (a) vzorek, (b) rychlá aplikace disperzního a extrakčního činidla stříkačkou, (c) disperzní roztok, (d) sedimentované extrakční činidlo, (e) odběr organické fáze s extrahovanou látkou. Převzato a upraveno podle: [140].

### *Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená pevnou fází*

Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená pevnou fází („supported liquid extraction, SLE) je modifikací klasické LLE a probíhá v kolonkách, jež jsou naplněny inertním sorbentem s velkou plochou, nejčastěji křemelinou. Extrakce je tvořena dvěma kroky: (1) nejprve je vzorek nanesen na kolonku, dojde k adsorpci vodného vzorku na křemelinu a vznikne tzv. vodná stacionární fáze obsahující extrahovaný analyt, tento krok obvykle trvá 5 až 10 minut, (2) následně je na kolonku aplikováno extrakční činidlo (organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou) a analyt je z vodné vrstvy extrahován a eluován z kolonky. Organické rozpouštědlo snadno interaguje s vodným vzorkem, jež je na křemelinu naadsorbováno ve formě tenkého filmu a je tak velmi rychle dosaženo extrakční rovnováhy (**Obrázek 12**). Výsledný eluát může být přímo analyzován pomocí plynové chromatografie, nebo kapalinové chromatografie na normálních fázích. V případě kapalně chromatografie na reverzních fázích je organický extrakt odpařen do sucha a rekonstituován ve vhodném rozpouštědle [141, 142]. Při nastavení vhodných podmínek extrakce je tato metoda velmi efektivní v odstraňování fosfolipidů z biologické matrice [143]. SLE představuje jednoduchou extrakční metodu, poskytující vysokou extrakční účinnost v krátkém čase. Na rozdíl od klasické LLE, při SLE nehrozí tvorba emulze na rozhraní fází. SLE je navíc dostupná i v 96-jamkovém formátu a další nespornou výhodou je možnost automatizace [141]. SLE byla použita v bioanalýze pro extrakci analytů z různých biologických matric jako například moč [142], plasma [144], krev [145], vlasy [146], nebo nádorová tkáň [147].



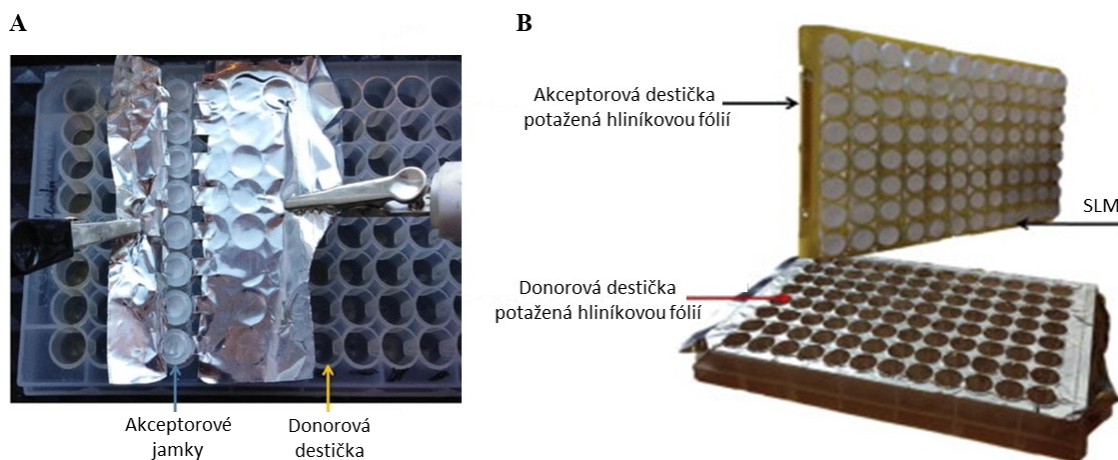
**Obrázek 12:** Princip extrakce z kapaliny do kapaliny podpořené tuhou fází (SLE). Převzato a upraveno podle: [141].



## 2.3 Elektromembránová extrakce

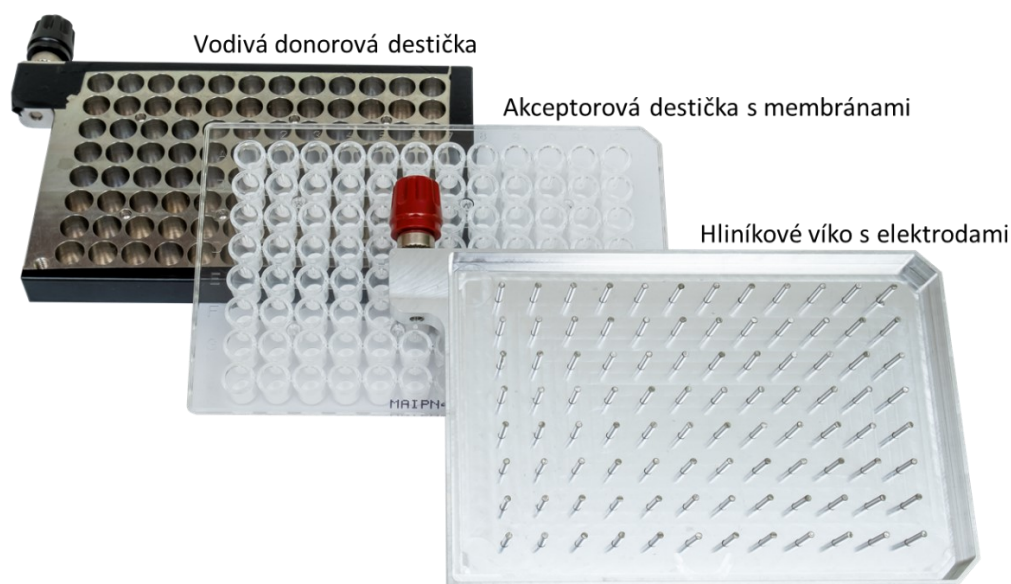
Elektromembránová extrakce (EME) byla představena poprvé v roce 2006 Pedersen-Bjergaardem a Rasmussenem pod názvem elektromembránová izolace. Tuto techniku použili k extrakci pěti nepolárních bazických látek (pethidin, nortriptylin, methadon, haloperidol a loperamid) z plasmy a moči a během pouhých 5 minut dosáhli výtěžností 70-79 % [148]. EME vychází z konceptu HF-LPME ke kterému je přidána elektrokinetická složka podporující přenos hmoty, což vede k účinnější extrakci a je tak kompenzována hlavní nevýhoda HF-LPME, tedy dlouhý extrakční čas. Od uvedení EME v roce 2006 byla EME aplikována na extrakci z různých biologických matric jako jsou plasma [149], plná krev [150], sliny [151], moč [150] a mateřské mléko [152]. Princip EME byl realizován v mnoha konfiguracích, například „drop-to-drop“ EME [153], nano-EME [154] nebo on-chip EME [155]. V roce 2014 bylo představeno EME v 96-jamkovém uspořádání [156], kde extrakce probíhá přes SLM ukotvenou na ploché membráně.

Eibak *et al.* jež jako první představil EME v 96-jamkovém formátu použil komerčně vyráběnou 96-jamkovou destičku jako donorovou, zatímco akceptorová destička byla vyrobena poměrně složitě (**Obrázek 13**). Polypropylenová membrána byla teplem přitavena na pás osmi mikrozkušavek (tzv. strip tubes) běžně užívaných pro metodu polymerázové řetězové reakce (PCR). Následně byla spodní část zkumavek uříznuta a ukotvena lepidlem na stojan na pipetovací špičky mající 96 pozic. Vodivost destiček byla zprostředkována potažením jamek hliníkovou fólií [156].



**Obrázek 13:** Paralelní EME v 96-jamkové destičce, (a) pilotní uspořádání a (b) 96-jamkové provedení. Obrázky převzaty z: [156, 157].

Další řešení EME v 96-jamkovém formátu představil Drouin *et al.* v roce 2017, jež použil komerční filtrační destičku (PVDF membrána o tloušťce 100-145  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ ) jako donorovou destičku. Vodivost byla zajištěna díky tyčovým elektrodám z nerezové oceli, jež byly ponořené do každé jamky se vzorkem. Akceptorová destička, s možností opakovaného použití byla vyrobena pomocí 3-D tisku z PEEK (PolyEtherEther Keton) materiálu. Byla tvořena dvěma částmi, které se šrouby těsně spojovaly a mezi něž se vkládala hliníková folie k zajištění vodivosti akceptorové destičky [158]. Další provedení využívá výše zmíněnou komerčně vyráběnou filtrační destičku jako akceptorovou, zatímco donorová destička, určená k opakovanému použití, je vyrobená z nerezové oceli. Vodivost v akceptorové destičce s membránami je pak zajištěna hliníkovým víčkem s tyčovými elektrodami (**Obrázek 14**) [159, 160].

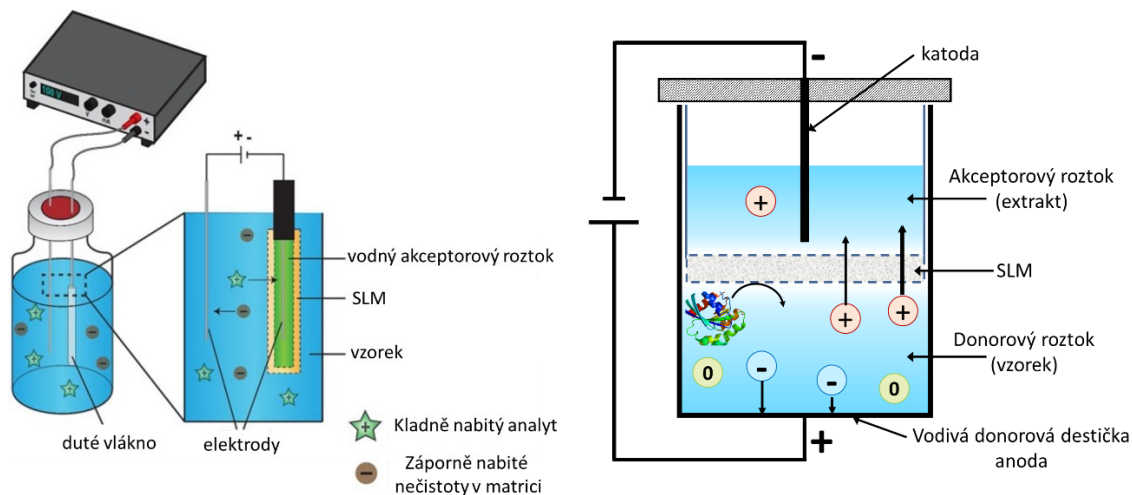


**Obrázek 14:** Zařízení pro elektromembránovou extrakci v 96-jamkovém uspořádání.

### 2.3.1 Princip EME

EME vznikla modifikací HF-LPME, přidáním elektrokinetické složky, tedy v původním EME uspořádání je porézní duté vlákno ponořeno do organického rozpouštědla, které představuje SLM. Vnitřek vlákna je poté naplněn vodným akceptorovým roztokem a vlákno je ponořené do roztoku vzorku. Následně jsou do vzorku a do akceptorového roztoku uvnitř vlákna vloženy elektrody a vkládané stejnosměrné napětí zprostředkovává přenos nabitého analytu ze vzorku přes organický roztok-SLM do akceptorového roztoku (**Obrázek 15**) [148]. Vzorek je během extrakce míchán, aby byla redukována mezní vrstva, která se tvoří na rozhraní mezi vzorkem

a SLM, čímž je zvýšena extrakce [161]. Hnací silou celé extrakce je elektrokinetická migrace, zatímco pasivní difuze hraje pouze vedlejší roli, což platí zejména pro kratší extrakční časy pohybující se od 5 do 15 min [148, 161].



**Obrázek 15:** Elektromembránová extrakce (a) v uspořádání „hollow fiber“ a (b) v 96-jamkovém uspořádání. Zapojení elektrod odpovídá extrakci bazických látek. Obrázek (a) převzatý z: [119]

V EME systému, vzorek, SLM a akceptorový roztok představují elektrický obvod, ve kterém je SLM hlavním zdrojem elektrického odporu. Proud procházející EME systémem odráží tok analytů a také iontů z matrice přes SLM a se zvýšením proudu se zvyšuje transport přes SLM. Vysoký systémový proud však může narušit stabilitu systému kvůli probíhající elektrolýze, což vede ke změně pH akceptorového roztoku a také tvorbě bublinek ve vzorku i akceptorovém roztoku v důsledku tvorby  $O_2$  na anodě a  $H_2$  na katodě. Je tedy potřeba volit vhodné organické roztoky pro SLM a optimalizovat výši vkládaného napětí [148, 161].

Teoretický model toku iontů přes membránu v ustáleném stavu ( $J_i$ ) byl popsán a experimentálně ověřen v roce 2007. Teoretické poznatky odvozené od Nernstovo-Planckovy rovnice byly pro EME modifikovány na základě podobnosti s iontoforetickým transportem léčiv přes kůži [162]:

$$J_i = \frac{-D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln \chi}\right) \left(\frac{\chi - 1}{\chi - \exp(-v)}\right) (c_{ih} - c_{io} \exp(-v)) \quad (2)$$

kde  $D_i$  je difúzní koeficient iontu,  $h$  je tloušťka SLM,  $\chi$  je poměr celkové koncentrace iontů mezi vzorkem a akceptorovým roztokem,  $c_i$  je koncentrace analytu v mezifázi mezi

vzorkem a SLM,  $c_{i0}$  je koncentrace v mezifázi mezi SLM a akceptorovým roztokem a  $v$  je bezrozměrná hnací síla definovaná jako:

$$v = z_i F \Delta\varphi / RT \quad (3)$$

kde  $z_i$  je iontový náboj,  $F$  je Faradayova konstanta,  $\Delta\varphi$  je rozdíl elektrického potenciálu napříč SLM,  $R$  je plynová konstanta a  $T$  je absolutní teplota, která má vliv také na difúzní koeficient [163]:

$$D_i = kT / 6\pi\eta R \quad (4)$$

kde  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $\eta$  je viskozita organického rozpouštědla a  $R$  zde představuje poloměr molekuly analytu.

Jak vyplývá z rovnic (3) a (4) hodnocení vlivu teploty ( $T$ ) na tok iontů přes membránu je komplikovanější, jelikož teplota jednak ovlivňuje hnací sílu ( $v$ ), ale také má vliv na difúzní koeficient ( $D_i$ ). Provedené experimenty však prokázaly, že vliv teploty na hnací sílu je zanedbatelný v porovnání s vlivem na difúzní koeficient [162]. Navíc, přestože by zvýšení teploty mohlo být výhodné pro extrakci, není doporučeno používat vyšší než laboratorní teplotu, především kvůli stabilitě SLM a celého EME systému [164]. Z rovnice (2) tedy vyplývá, že tok analytu přes SLM je ovlivněn difúzním koeficientem v SLM ( $D_i$ ), tloušťkou SLM ( $h$ ), poměrem koncentrací iontů mezi vzorkem a akceptorovým roztokem ( $\chi$ ), a vloženým napětím. Významnou roli hraje také distribuční koeficient, jelikož ovlivňuje koncentrace analytu v mezifázích mezi SLM a vzorkem ( $c_i$ ) nebo extraktem ( $c_{i0}$ ). Při vývoji EME je tedy nutné výše zmíněné parametry optimalizovat.

### 2.3.2 Důležité extrakční parametry

#### *Složení donoru a akceptoru*

Vzhledem k tomu, že analyty jsou extrahovány v iontové formě, je potřeba patřičně upravit pH vzorku a akceptorové fáze. Důležitá je optimalizace pH zejména u akceptorového roztoku, jelikož v případě nevhodně zvoleného pH může docházet k re-extrakci analytu zpět do SLM, případně k jeho zadržení v SLM. Naproti tomu pH vzorku nehraje v účinnosti extrakce tak zásadní roli [148, 165, 166]. Toto tvrzení podporují i úspěšně provedené extrakce přímo z plasmy a krve bez jakékoliv úpravy, kde bylo dosaženo dobré výtěžnosti během krátkých extrakčních časů [167, 168]. Naopak je důležité zmínit, že při extrakci biologických vzorků může být účinnost ovlivněna

viskozitou nebo vazbou analytu na přítomné proteiny [167]. Proto jsou tyto biologické matrice před extrakcí obvykle ředěny [169, 170]. Co se objemů obou fází týče, tak EME v klasickém HF-LPME uspořádání umožňuje vysoké zakoncentrování analytů, vzhledem k výrazně rozdílným objemům vzorku (stovky  $\mu\text{l}$  až  $\text{ml}$ ) a akceptorové fáze (desítky  $\mu\text{l}$ ) [148]. Zatímco v 96-jamkovém uspořádání je objem vzorku dán velikostí jamky donorové destičky a objem akceptoru se obvykle pohybuje od 50 do 100  $\mu\text{l}$  [160, 171, 172].

### *„Supported Liquid Membrane“*

Výběr vhodného organického rozpouštědla pro SLM je jedním z klíčových parametrů v EME. Mezi vlastnosti, které by mělo organické rozpouštědlo splňovat patří nízká rozpustnost ve vodě (nemísitelnost s vodou) a vysoký bod varu, aby byla SLM stabilní a nedocházelo ke ztrátám vlivem odpařování nebo úniku do vzorku. Dále by mělo být dostatečně hydrofóbní, aby docházelo k rovnoměrnému rozprostření na membráně, která je většinou hydrofobního charakteru (polypropylen, nebo polyvinylidenfluorid, PVDF). Současně by ale mělo mít dostatečnou afinitu k analytu a umožňovat silné molekulární interakce (H-vazby a/nebo interakce dipól-dipól) pro usnadnění přenosu analytu ze vzorku do SLM. Jsou upřednostňovány rozpouštědla s nižší viskozitou, jelikož tok iontů přes membránu ( $J_i$ ) je nepřímo úměrný viskozitě organického rozpouštědla, jak je patrné z rovnice (2) a (4) [163, 164]. Z rovnice (2) také vyplývá, že důležitým parametrem je tloušťka SLM vrstvy, která je dána tloušťkou membrány, na kterou je organický roztok ukotven. Účinnější extrakce bude dosaženo při použití tenčích SLM, jelikož tok analytu přes membránu je nepřímo úměrný její tloušťce (rovnice 2) [164]. V případě EME v 96-jamkovém uspořádání se množství organického rozpouštědla tvořícího SLM pohybuje v rozmezí 2-5  $\mu\text{l}$  a bylo zjištěno, že použité množství nemá vliv na účinnost extrakce [119].

Byla testována řada organických rozpouštědel ze skupin nitroaromatických etherů a dalších etherů, benzenů, alkoholů, ketonů, aldehydů, alkylovaných fosfátů, nitrilů, esterů a dalších. Při výběru vhodného rozpouštědla může být nápomocný Kamlet-Taftův solvatochromní model, který charakterizuje rozpouštědla na základě jejich polarity, solvatační síly a solvatochromních efektů. Kamlet a Taft popisují vlastnosti rozpouštědel podle tří interakcí: (1) parametr dipolarity/polarizovatelnosti rozpouštědla ( $\pi^*$ ) udávající míru působení interakcí dipól-dipól, (2) parametr  $\alpha$  („hydrogen bonding acidity“), jež udává schopnost rozpouštědla působit jako donor vodíkových vazeb a (3) parametr  $\beta$

(„hydrogen bonding basicity“) udávající schopnost rozpouštědla působit jako akceptor vodíkových vazeb [173-176].

Pro extrakci bazických nepolárních látek je jednoznačně nejpoužívanějším organickým rozpouštědlem 2-nitrofenyl(oktyl)ether (NPOE) [157, 163, 169, 172, 177, 178]. Toto rozpouštědlo splňuje výše zmíněné parametry jako je vysoký bod varu (351 °C), velmi nízká rozpustnost ve vodě ( $6 \times 10^{-3}$  g/l) a zároveň má vysoké hodnoty  $\pi^*$  a  $\beta$  a tedy efektivně interaguje s protonovanými molekulami analytu díky interakcím dipól-dipól a vodíkovým vazbám [163]. Mezi alternativní rozpouštědla používané pro extrakci bazických látek patří například 2-nitrofenyl(pentyl)ether, který by měl být účinnější pro extrakci polárních bazických látek [179], 2-nonanon nebo 2-oktanon [180] a dále také benzenové deriváty 1-ethyl-2-nitrobenzen [150, 167] a 1-isopropyl-4-nitrobenzen. V případě polárnějších bazických látek se pro zvýšení účinnosti extrakce využívá přídavku iontově-párových činidel a aditiv nejčastěji do NPOE. Mezi nejčastější aditiva patří DEHP [159], tris-(2ethylhexyl) fosfát (TEHP) a tributyl fosfát (TBP) [181]. Zmíněné rozpouštědla tvoří komplexy s kladně nabitými analyty, DEHP pomocí iontových interakcí, zatímco TEHP a TBP pomocí vodíkových vazeb [163]. Pro extrakci polárních bazických látek ( $\log P$  -0,4 až 1,3) byl také úspěšně použit čistý bis(2-ethylhexyl) fosfit (DEHPi) [182]. DEHPi je neiontové rozpouštědlo a má velmi vysoké hodnoty  $\pi^*$  a  $\beta$ , s polárními analyty tedy interaguje pravděpodobně vodíkovými vazbami [181]. Extrakce kyselých látek je podstatně méně prozkoumaná a množství vhodných organických rozpouštědel je značně omezené. Nejčastěji se využívají alifatické alkoholy, jako 1-oktanol a 1-nonanol, které jsou však v porovnání s NPOE méně stabilní při kontaktu s biologickými matricemi [183]. Pro extrakci polárnějších kyselých látek byl testován přídavek různých aminů a úspěšná byla extrakce s přídavkem cetyltrimethyl ammonium bromidu [184].

### *Extrakční napětí*

Zvýšením extrakčního napětí dojde ke zvýšení rozdílu potenciálů ( $\Delta\varphi$ ) a jak vyplývá z rovnice (2) dojde ke zvýšení toku iontů přes membránu. Nicméně, při optimalizaci extrakčního napětí je nutné brát v potaz stabilitu systému. Během extrakčního procesu je monitorován systémový proud, jelikož měřený proud reflektuje tok analytů a iontů matrice přes membránu. Jak bylo řečeno výše v kapitole (2.3.1), při použití příliš vysokého napětí bude v systému probíhat elektrolyza, přičemž tvorba

bublinek v donorové i akceptorové fázi povede ke snížení opakovatelnosti extrakce mezi vzorky. Vedle toho může docházet ke zvýšení pH u katody a naopak poklesu pH u anody, což je významné zejména u delších extrakčních časů [148, 164, 166]. Napětí je potřeba optimalizovat pro každé konkrétní organické rozpouštědlo ukotvené na membráně, jelikož to je hlavní zdroj elektrického odporu v EME systému, jak bylo řečeno výše. Vedle toho, však může mít vliv na odpor systému také složení donorové a akceptorové fáze, proto by napětí mělo být optimalizováno pro celý extrakční systém. Vzhledem k výše zmíněným limitacím je v případě EME v 96-jamkovém formátu doporučeno použít pouze takové napětí, které generuje co nejnižší proudy, ideálně do 10  $\mu\text{A}$ /jamku, nejvíce však 50 až 100  $\mu\text{A}$ /jamku [159, 183]. Použité napětí navíc může určovat selektivitu extrakce, kdy v případě nižších hodnot budou účinněji extrahovány látky s větší afinitou k vybrané SLM [185].

### *Třepání*

Míchání EME systému během extrakce je velmi důležitým parametrem ovlivňujícím extrakční účinnost, což bylo jasně demonstrováno již v první studii zaměřené na EME, kde extrakční účinnost pěti modelových analytů byla zvýšena z 8-10 % (bez třepání) na 70-79% při optimálně nastavené rychlosti třepání (1200 ot/min) [148]. Tento jev lze vysvětlit tvorbou užší mezní vrstvy na rozhraní vzorku a SLM v případě, kdy je vzorek míchán [148, 161, 166]. Pro většinu extrakcí je rychlost obvykle volena v rozsahu 500-1000 ot/min. Při nižších rychlostech klesá přenos analytu ze vzorku do SLM a naopak při vyšších rychlostech dochází k tvorbě bublin, které mohou částečně potlačit kontakt mezi vzorkem a SLM a v obou případech tak dochází k poklesu účinnosti extrakce [186].

### *Extrakční čas*

V porovnání s extrakčními technikami, kde je hnací silou pasivní difúze, jako je například HF-LPME nebo PALME, kde jsou extrakční časy obvykle mezi 45-60 minutami [132, 135, 187, 188] nebo dokonce až 120 min [134, 136], je doba extrakce při EME výrazně kratší (5 - 20 min) [157, 167, 180-182]. Extrakční čas je optimalizován podle časové křivky, jež představuje závislost výtěžnosti na extrakčním čase a obvykle je zvolen čas, jež odpovídá době potřebné pro dosažení rovnovážného stavu. Rovnovážný stav ne vždy představuje 100 % výtěžnost a paradoxně při delších extrakčních časech může naopak docházet k poklesu výtěžnosti [171, 182]. Tyto jevy

mohou být způsobeny potlačením přenosu analytů přes SLM v důsledku jejich vysoké koncentrace v akceptorovém roztoku, případně může docházet ke zpětné extrakci do SLM [148, 166]. Zpětná extrakce do SLM je obvykle důsledkem poklesu pH akceptorového roztoku způsobeným probíhající elektrolýzou [182]. Pokles může být také způsoben částečnou degradací membrány, kdy vlivem delší doby extrakce dojde k částečnému rozpuštění membrány do vzorku nebo naopak proniknutí vody do membrány [164].

## 2.4 Validace bioanalytických chromatografických metod

Validační proces slouží k ověření, že vyvinutá metoda je vhodná k zamýšleným účelům a poskytuje spolehlivé výsledky s definovanou jistotou. Pro validaci bioanalytických metod existují doporučené postupy (směrnice) dané buď Evropskou lékovou agenturou (EMA, Guideline on Bioanalytical Method Validation, 2011) [189] nebo Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Bioanalytical method validation guidance for industry, 2018) [190]. Validační parametry a kritéria těchto směrnic jsou velmi podobné, jen s drobnými odlišnostmi. V případě plné validace chromatografických metod jsou hodnoceny validačními parametry: selektivita, přenos, citlivost (spodní limit kvantifikace, LLOQ z anglického „lower limit of quantification“), kalibrační křivka, přesnost, preciznost, matricové efekty, výtěžnost, stabilita a v případě potřeby také test diluční integrity. Obě směrnice navíc ještě kladou důraz na správnou charakterizaci a skladování referenčních standardů a klíčových reagensů [189, 190].

### 2.4.1 Selektivita

Během vývoje metody je potřeba ověřit, že měřený signál detektoru je skutečně námi sledovaný analyt. Selektivita se ověřuje analýzou vzorků prázdné matrice (tzv. blank), kde se sleduje odezva detektoru v retenčních časech analytů a vnitřních standardů. Dle obou směrnic by mělo být analyzováno 6 vzorků prázdné matrice pocházející z různých zdrojů. V případě obou směrnic by množství interferujících látek nemělo přesáhnout 20 % pro analyty na LLOQ a 5 % u vnitřních standardů. EMA připouští použít méně vzorků pro sledování selektivity v případě méně obvyklé matrice [189, 190].



#### 2.4.2 Přenos

Během analytické metody může dojít k přenosu mezi vzorky. Směrnice FDA pouze uvádí, že by tento děj měl být úplně odstraněn a v případě, že to není možné, tak by měl být hodnocen z hlediska vlivu na přesnost stanovených koncentrací. Naproti tomu směrnice EMA přesně uvádí postup, jak přenos mezi vzorky hodnotit a uvádí i možné limity. Při hodnocení přenosu je po vzorcích obsahujících vysokou koncentraci sledovaných analytů, například kalibrační vzorek o nejvyšší koncentraci nastříkovaný vzorek prázdné matrice, ve kterém je hodnocena odezva detektoru pro sledované analyty. Přičemž signál ve vzorku prázdné matrice by v retenčních časech analytů neměl být vyšší než 20 % LLOQ a u vnitřních standardů vyšší než 5 %. V případě, kdy je přenos mezi vzorky nevyhnutelný, je dle směrnice EMA doporučeno zvolit vhodné pořadí vzorků během měření a případně vkládat nástřiky prázdné matrice za vzorky, u kterých se očekává vysoká koncentrace. Celý proces by měl být validován tak, aby přenos neměl vliv na přesnost a preciznost měření [189, 190].

#### 2.4.3 Citlivost (limit kvantifikace)

Limit kvantifikace je nejnižší koncentrační bod, který lze spolehlivě kvantifikovat, obvykle to bývá nejnižší bod kalibrační křivky. Tato koncentrace musí splňovat kritéria jako přesnost a preciznost, jež budou specifikovány dále. Dle směrnice EMA by navíc analytický signál LLOQ měl být 5× vyšší než signál ve vzorku prázdné matrice a dle FDA 5× vyšší než signál v tzv. nulovém vzorku, což je prázdná matrice s přidavkem vnitřních standardů [189, 190].

#### 2.4.4 Kalibrační křivka

Součástí validace je ověření odezvy detektoru v předem definovaném koncentračním rozsahu. Všechny kalibrační vzorky by měli být připraveny ve stejné biologické matrici jako reálné vzorky. Směrnice FDA pak ve výjimečných případech připouští využít náhradní matrici, například při nedostatku nebo nedostupnosti prázdné matrice, ovšem tato možnost musí být dostatečně odůvodněna a vhodnost náhradní matrice zvalidována. Kalibrační křivka musí být tvořena přinejmenším šesti body a koncentrační odezva by měla být proložena nejjednodušším možným modelem. Následně obě směrnice vyžadují zpětné přepočítání koncentrací z kalibrační křivky na základě zvoleného modelu, kde minimálně 75 % kalibračních standardů a alespoň šest bodů musí odpovídat  $\pm 15\%$  (v případě LLOQ  $\pm 20\%$ ) nominální koncentrace. FDA

směrnice dále požaduje, aby kalibrační křivka byla opakovatelná, směrnice EMA dokonce uvádí, že musí být zaznamenány minimálně 3 kalibrační křivky. Dále by se dle EMA měl s každou kalibrační křivkou současně měřit i vzorek prázdné matrice a nulový vzorek. Kalibrační křivka, ideálně čerstvě připravená, by se měla měřit s každým analytickým cyklem, EMA dále připouští možnost použít již dříve připravenou kalibrační řadu skladovanou za předem definovaných podmínek doložených stabilitními daty [189, 190].

#### 2.4.5 Přesnost a preciznost

Přesnost může být definována jako vztah mezi stanovenou a nominální koncentrací vyjádřenou v procentech. Zatímco preciznost popisuje blízkost výsledků stanovení jednotlivých vzorků o stejné koncentraci a je vyjádřena jako variační koeficient. Přesnost a preciznost jsou hodnoceny měřením tzv. vzorků kontroly kvality (QC, z anglického quality control samples), které se připravují přidavkem známého množství standardu do prázdné matrice. QC vzorky by měly být připraveny nezávisle na kalibračních vzorcích, tedy s použitím jiných zásobních a pracovních roztoků. Analyzované QC vzorky jsou vyhodnoceny metodou kalibrační křivky a stanovené koncentrace jsou porovnány vůči nominálním koncentracím. Průměr těchto hodnot na každé koncentrační hladině pak vyjadřuje přesnost, zatímco relativní směrodatná odchylka zase preciznost. Přesnost a preciznost by měla být hodnocena na 4 hladinách (LLOQ, nízké, střední a vysoké kalibrační hladině). Směrnice EMA navíc přesně specifikuje dané koncentrační hladiny, kde nízká hladina představuje maximálně trojnásobek LLOQ, střední je 30-50 % a vysoká je alespoň 75 % kalibračního rozsahu. Přesnost a preciznost je hodnocena jednak v rámci jednoho analytického cyklu (tzv. within-run) a také v rámci více analytických cyklů (tzv. between-run). Přičemž „between-run“ přesnost a preciznost musí být hodnocena alespoň ze tří cyklů, jež jsou dle EMA měřené minimálně ve dvou různých dnech, dle FDA je specifikováno, že jsou měřeny v rámci několika dnů. Validační kritéria se u obou směrnic shodují a to, že přesnost musí být  $\pm 15\%$  (v případě LLOQ  $\pm 20\%$ ) nominální koncentrace a variační koeficient, tedy preciznost, nesmí být vyšší než 15 %, respektive 20 % pro LLOQ [189, 190].

#### 2.4.6 Výtěžnost

Výtěžnost je jediný parametr, který směrnice EMA vůbec nezmiňuje. Naopak dle FDA by měl být tento parametr testován na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině, počet QC vzorku na koncentrační hladinu směrnice neuvádí. Výtěžnost se hodnotí jako poměr analytické odpovědi QC vzorku (vzorek matrice s přidavkem známého množství standardu před extrakcí) ku analytické odpovědi vzorku připraveného přidáním stejného množství standardu do extraktu z prázdné matrice a uvádí se v procentech. Směrnice FDA nevyžaduje, aby výtěžnost byla 100 %, ale je požadováno, aby hodnoty pro jednotlivé analyty i vnitřní standardy byly konzistentní a opakovatelné [190].

#### 2.4.7 Matricové efekty

Významnou komplikací kvantitativního LC-MS stanovení je výskyt matricových efektů, který je častý zejména při ionizaci elektrosprejem. Současná eluce komponentů matrice (fosfolipidy, soli, peptidy, ...) a analytu může ovlivňovat proces ionizace a způsobovat tak výrazné matricové efekty, tedy snížení nebo zvýšení intenzity signálu [57, 143]. Hodnocení matricových efektů (ME) je podrobně popsáno ve směrnici EMA, zatímco FDA je pouze zmiňuje v podkapitole selektivita a specificita metody, kde uvádí, že by mělo být zajištěno, aby se ME ve validované metodě nevyskytovaly [190].

Dle EMA by se měly ME zjišťovat na nízké (maximálně 3x vyšší koncentrace než LLOQ) a vysoké koncentrační hladině (blízko horního limitu kvantifikace). Pro hodnocení by měla být použita matrice alespoň ze 6 různých zdrojů. Směrnice doporučuje hodnocení ME tzv. metodou post extrakčního přidavku, jež se počítá dle následující rovnice:

$$ME = \frac{A_{SpE}}{A_{Std}} \times 100 \quad (5)$$

kde  $A_{SpE}$  reprezentuje plochu píku ze vzorku připraveného přidavkem známého množství standardu do extraktu z prázdné matrice a  $A_{Std}$  představuje plochu píku vzorku standardu o stejné koncentraci bez přítomnosti matrice. Validační směrnice následně hodnotí tzv. ME normalizovaný na vnitřní standard (IS-normalizovaný ME), jež je dán poměrem ME analytu ku ME vnitřního standardu. Variační koeficient IS-normalizovaného ME spočítaný ze šesti individuálních vzorků by neměl být více než 15 %. Pokud metoda post extrakčního přidavku není možná (například v případě on-line extrakcí), je nutné

variabilitu ověřit alespoň extrakcí ze spikovaných matric získaných ze 6 různých zdrojů, kde variační koeficient detekovaných ploch nesmí přesáhnout 15 % [189].

#### 2.4.8 Stabilita

Je nezbytné zajistit, aby žádný krok od odběru přes zpracování až po analýzu vzorku neovlivnil koncentraci stanovovaných analytů. Proto je potřeba sledovat stabilitu testovaných látek v preanalytické a analytické části metody. Hodnocení stability je prováděno na nízké a vysoké koncentrační hladině a studie by měla simulovat veškeré běžné postupy při zacházení se vzorkem i při jeho analýze (tedy použití stejných matric, stejný laboratorní materiál, stejné operační postupy atd). FDA umožňuje ve výjimečných případech použít vhodnou náhradní matici, přičemž toto rozhodnutí musí být dostatečně odůvodněno. Při hodnocení stability je vždy stanovena koncentrace v QC vzorcích oproti čerstvě připravené kalibrační křivce. Stanovená koncentrace by měla odpovídat  $\pm 15\%$  nominální koncentrace. Jak směrnice EMA, tak FDA doporučují hodnotit následující stability:

- **Stabilita zásobních a pracovních roztoků analytů a vnitřních standardů;** V případě pracovních roztoků není nutné testovat stabilitu na všech koncentračních úrovních.
- **Krátkodobá stabilita analytů v testované matici,** která simuluje předpokládané manipulační podmínky se vzorkem. Příkladem může být stabilita za laboratorní teploty nebo v ledovém bloku.
- **Dlouhodobá stabilita analytů v matici při podmínkách skladování** (obvykle při  $-20$  nebo  $-80$  °C). Doba tohoto experimentu by měla odpovídat předpokládané době od sběru vzorků po poslední analýzu.
- **Stabilita analytu během rozmrazovacího cyklu;** QC vzorky v biologické matici jsou zamražené na požadovanou skladovací teplotu, následně je vzorek rozmražen při laboratorní teplotě (nebo při jiné zvolené teplotě pro zpracovávání vzorků), analyzovány a opět zmraženy. Tento cyklus by měl být dle FDA opakován 3×, dle EMA by měl počet rozmrazovacích cyklů odpovídat nebo převyšovat plánované zacházení se vzorkem. Mezi rozmrazovacími cykly by měl být vzorek uložen v mrazáku minimálně 12 hodin.
- **Extrakční stabilita** provedená během zpracovávání vzorku zaručí, že nedochází k rozkladu analytů během extrakčního procesu. Dle FDA tato stabilita zahrnuje

také dobu od zpracování vzorku po nastříknutí na kolonu, tedy částečně zahrnuje i stabilitu v autosampleru.

- **Stabilita v autosampleru**

#### 2.4.9 Test diluční integrity

Test diluční integrity se provádí v případě, kdy v reálných vzorcích očekáváme vyšší koncentrace analytů, než je validovaný kalibrační rozsah. V takovémto případě je nutné vzorky naředit (obvykle prázdou maticí), aby odezva detektoru byla ve validovaném rozsahu. Pro test diluční integrity se připraví vzorek matrice s přídatkem známého množství standardu (alespoň 5 pro každé ředění) o koncentraci vyšší, než je kalibrační rozsah a následně se vzorek ředí prázdou maticí. U takto připravených vzorků se pak hodnotí přesnost a preciznost, která musí splňovat výše zmíněná kritéria  $\pm 15\%$  [189, 190].

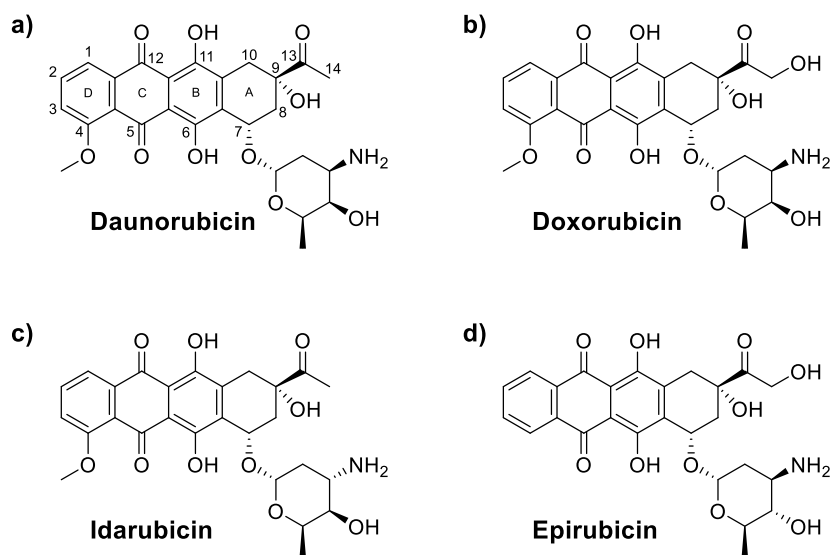
### 2.5 Analyzované látky

#### 2.5.1 Antracyklinová chemoterapeutika

Antracykliny (ANT) patří mezi nejúčinnější protinádorová léčiva využívaná v terapii jak hematologických malignit, tak solidních tumorů. První ANT (daunorubicin, DAU a doxorubicin, DOX) byly izolovány v roce 1939 z bakterie *Streptomyces peucetius* jako antibakteriální agens a v 60. letech byla objevena protinádorová účinnost daunorubicinu [191, 192]. Semisyntetickými deriváty přírodních ANT jsou epirubicin (EPI, derivát DOX) a idarubicin (IDA, derivát DAU, **Obrázek 16**).

Molekula ANT je tvořena (1) aglykonovou částí, která sestává ze čtyř spojených šestičlenných cyklů s chinonovými skupinami na kruhu C a hydrochinonovými na kruhu B, methoxy skupina v pozici C-4 (kruh D) a krátkým postranním řetězcem v pozici C-9 (kruh A) s karbonylem v pozici C-13 a (2) cukernou částí (daunosamin), která je glykosidickou vazbou připojena na C-7 kruhu A (**Obrázek 16**). Jediný rozdíl mezi DAU a DOX je ukončení postranního řetězce, kterým je v případě DAU methyl a u DOX je to alkohol (**Obrázek 16**) [191]. Tento minimální rozdíl má však značný vliv na spektrum indikací, zatímco DOX se používá na léčbu celé řady solidních nádorů (karcinom prsu, vaječníků, štítné žlázy,...), hematologických malignit (akutní leukémie, Hodgkinova choroba a neHodgkinův lymfom,...) či sarkomu měkkých tkání nebo kostí [193], tak DAU je terapeuticky indikován pouze na akutní myeloidní leukémii [194].

Epirubicin je epimerem DOX (ekvatoriální polohy hydroxylové skupiny na C-4' cukru daunosaminu) a jeho terapeutická indikace je podobná DOX [195]. Derivát DAU, Idarubicin, jež se používá k léčbě akutních leukémií zase postrádá methoxy skupinu v pozici C-4 na D kruhu aglykonu [1, 196].

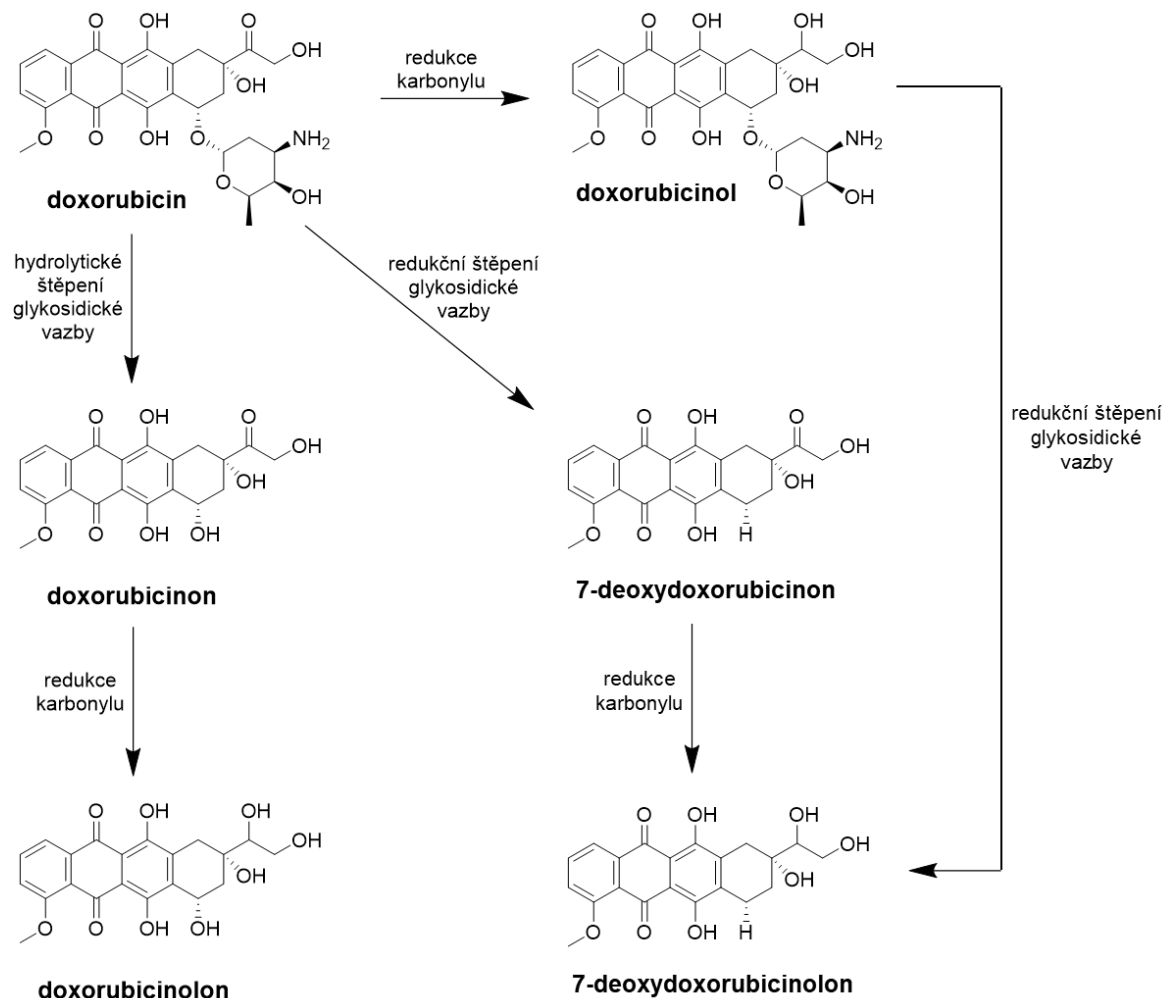


**Obrázek 16:** Struktury klinicky užívaných ANT: **(a)** daunorubicin, **(b)** doxorubicin, **(c)** idarubicin a **(d)** epirubicin.

I přes dlouhodobé a časté využití ANT v klinické praxi není jejich mechanismus protinádorového účinku zcela objasněn. Bylo navrženo několik možných mechanismů, prvním byla interkalace DNA, dále také přímá membránová vazba, nebo tvorba volných radikálů vedoucí k poškození DNA či peroxidaci lipidů. Dnes je protinádorový účinek ANT připisován interakci s topoisomérázou II $\alpha$  (TOP2A) [1, 191]. Topoisoméráza je enzym podílející se na proliferaci buněk, zachování struktury DNA a segregace chromozomů během DNA replikace. Tento enzym je vysoce exprimován v rychle se dělících, tedy i v nádorových, buňkách. ANT patří do skupiny tzv. TOP2 jedů, což jsou látky, jež stabilizují reakční meziprodukt, ve kterém jsou řetězce DNA štěpeny a kovalentně navázány na tyrosinové zbytky TOP2, případně brání opětovnému uzavření DNA, čímž je zablokována replikace DNA a následně dochází k indukci apoptózy buňky [1, 191].

Stejně jako u jiných chemoterapeutik, je závažným vedlejším efektem léčby myelosuprese, nicméně v případě ANT je dalším nežádoucím účinkem kardiotoxicita. Klinicky významná a obávaná je chronická forma kardiotoxicity, která se projevuje s odstupem měsíců nebo let od ukončení chemoterapie. Chronická forma kardiotoxicity

představuje ireverzibilní poškození myokardu, jež se manifestuje jako kardiomyopatie a může vyústit až v městnavé srdeční selhání [1, 191, 197]. Rozvíjí se po opakované expozici myokardu antracyklinům a je závislá na celkové kumulativní dávce. Například některé studie ukazují, že vysoké dávky DOX vedou k rozvoji kardiomyopatie u přibližně 50-60 % pacientů [197, 198]. Kardiotoxicita je tak limitujícím faktorem v léčbě antracyklinovými chemoterapeutiky.



**Obrázek 17:** Schématické znázornění metabolismu DOX, nejpoužívanějšího ANT. Sekundární alkoholový metabolit doxorubicinol a 7-deoxydoxorubicinolon patří mezi hlavní metabolity detekované v plasmě [199].

Patofyziologický mechanismus kardiotoxicity není zcela objasněn, je zde však několik teorií: (1) Tradiční hypotéza vychází z předpokladu, že ANT vzhledem k chinonové skupině, jež obsahují ve své struktuře, tvoří tzv. reaktivní formy kyslíku (ROS), které dále produkují za katalýzy železnatými ionty extrémně toxické a reaktivní hydroxylové radikály, jež způsobují oxidační stres v kardiomyocytech. Tyto patologické

změny následně vedou k apoptóze nebo nekróze srdečních buněk [1]. I když je tato hypotéza nejvíce rozšířena, podání různých antioxidantů jako prevence ANT-indukované kardiotoxicity nevykazovalo protektivní působení, což tuto ROS-hypotézu zpochybňuje [2]. (2) Další teorií je narušení homeostázy vápníku, na kterém se významně podílí sekundární alkoholový metabolit (**Obrázek 17**) [199-201]. Přetížení vápníkem pak může vést k poškození sarkomér a tedy ke snížení kontraktility myokardu [1, 191]. Studie s DOX na zvířatech navíc ukázaly, že se tento metabolit doxorubicinol (DOXol) cíleně akumuluje v srdci a při pitvě pacientů léčených DOX byly také nalezeny vysoké koncentrace DOXol v srdci [2]. (3) Nicméně současné studie nejvíce podporují hypotézu, že v kardiotoxicitě ANT hraje důležitou roli jejich interakce s topoisomérázou II $\beta$  (TOP2B) [1, 2, 202].

Vzhledem k rozsáhlému užití ANT bylo vyvinuto několik strategií, jak předcházet rozvoji kardiotoxicity. Nejjednodušší a nejrozšířenější je dodržení maximální kumulativní dávky ANT. Ke snížení kardiotoxicity vede také použití liposomální lékové formy, kdy je ANT enkapsulován v lipidové částici lékové formy a je tak chráněn před degradací v plasmě. Tento přístup vede k cílenějšímu působení v nádorové tkáni a nižší akumulaci látky v myokardu. Další možností jak předcházet poškození myokardu je současné podání ANT společně s kardioprotektivním léčivem DEX [2].

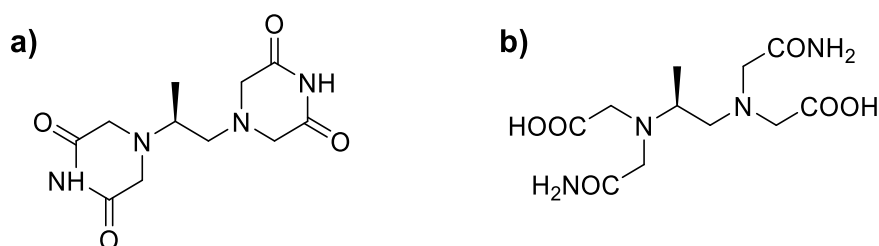
### 2.5.2 Dexrazoxan a jeho analogy

#### *Dexrazoxan*

Dexrazoxan (DEX, ICRF-187, pravotočivý enantiomer razoxanu, **Obrázek 18a**) je jediné léčivo, které bylo schváleno pro klinické užití při prevenci ANT-indukované chronické kardiotoxicity. DEX patří do skupiny bisdioxopiperazinů. Byl objeven v 60. letech a studován pro jeho potenciální protinádorové účinky [203]. Následně při studiích, které doprovázely výzkum protinádorové aktivity derivátů bisdioxopiperazinu byl objeven kardioprotektivní potenciál DEX [204]. Kardioprotektivní účinek DEX byl dále prokázán jak v experimentálních studiích [205, 206], tak i v randomizované klinické studii [207]. Nicméně vzhledem k obavám z možného ovlivnění protinádorového účinku ANT, či z teoretického zvýšení výskytu sekundárních malignit zůstává užití DEX klinicky omezeno na prevenci kardiomyopatie při podávání vysokých kumulativních dávek DOX (> 300 mg/m<sup>2</sup>) nebo EPI (> 540 mg/m<sup>2</sup>) zejména u pacientek s pokročilým karcinomem prsu [2, 6].



Kardioprotektivní účinek DEX byl tradičně přisuzován jeho metabolitu – ADR-925 (**Obrázek 18b**) jež díky chelataci iontů může chránit před poškozením buněk ANT-indukovaným oxidačním stresem (viz ROS-hypotéza výše) [208, 209]. Nicméně, tato teorie byla zpochybněna neúspěšnými studiemi, jež testovali kardioprotektivní potenciál dalších chelátorů železa, často mnohem silnějších, než ADR-925 [1]. Současné studie, se přiklání k tomu, že mechanismus kardioprotekce DEX je více komplexní a není omezen pouze na chelataci iontů železa v kardiomyocytech. Hlavní pozornost je věnována především studiu významu interakce DEX s TOP2, zejména pak s její isoformou TOP2B přítomnou v myokardu [210-212]. Tato hypotéza je podpořena například studií, kde u myši, se specifickou delecí genu *Top2b* v kardiomyocytech, nevedlo opakované podávání DOX k rozvinutí srdečního selhání [202]. Ve snaze objasnit mechanismus účinku, sledovat vztah mezi strukturou a účinkem bisdioxopiperazinů a také vyvinout účinnější kardioprotektivní agens byla syntetizována řada analogů DEX a ADR-925, jež byly podrobeny *in vitro* a *in vivo* experimentům sledujícím jejich kardioprotektivní potenciál [213-216].



**Obrázek 18:** Struktura (a) dexrazoxanu a (b) jeho metabolitu ADR-925.

#### *Analogy dexrazoxanu*

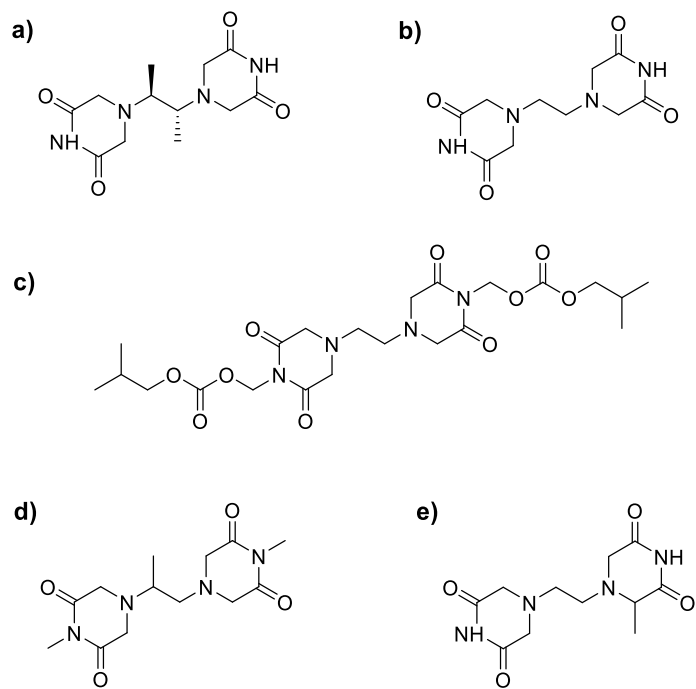
Tato práce se zaměřuje na studium kardioprotektivního účinku blízkých strukturálních analogů DEX a to na látky s kódovým označením ICRF-154, ICRF-193, GK-627 a GK-580. Zatímco ICRF-193 obsahuje navíc metylovou skupinu v poloze C-2 na spojovacím řetězci (**Obrázek 19a**), ICRF-154 se od DEX liší naopak chybějícím methylem na spojovacím řetězci (**Obrázek 19b**). Látka GK-627 obsahuje metylovou skupinu na obou imidových dusících (**Obrázek 19d**) a u GK-580 byla metylová skupina ze spojovacího řetězce přenesena na uhlík C3 dioxopiperazinového kruhu (**Obrázek 19e**).

ICRF-154, nebo přesněji jeho proléčivo sobuzoxan (SBZ, MST-16, **Obrázek 19c**), je jediným bisdioxopiperazinovým derivátem, schváleným a klinicky

užívaným v protinádorové terapii v Japonsku [217, 218]. Štěpením esterových vazeb se ze SBZ uvolňuje účinná látka ICRF-154 a současně dochází k uvolnění formaldehydu a oxidu uhličitého [219]. Protinádorová aktivita je spojována s inhibicí TOP2 zprostředkované látkou ICRF-154 [211]. Vzhledem k úzké strukturální podobnosti ICRF-154 s DEX a jeho schopnosti inhibovat TOP2B [212, 214] bylo proléčivo SBZ zkoumáno pro potenciální kardioprotektivní účinek proti ANT-indukované toxicitě [212]. Srovnatelný cytoprotektivní efekt proti ANT-indukované toxicitě *in vitro* byl pozorován pro SBZ a DEX [212]. Touto studií byla opět podpořena hypotéza předpokládající, že kardioprotektivní účinek DEX je zprostředkován inhibicí TOP2B. Dále zde byl ukázán velmi úzký vztah mezi strukturou a kardioprotektivním účinkem DEX a jeho analogů.

ICRF-193 se jeví jako další slibný kardioprotektivní kandidát, jelikož dle *in vitro* studií je nejen silnější inhibitor TOP2B v porovnání s DEX, ale vykazuje také vyšší účinnost ochrany proti ANT-indukovanému poškození kardiomyocytů [214]. ICRF-193 má ve své molekule dvě chirální centra a vzhledem k symetrické struktuře se tato látka může vyskytovat ve formě dvou diastereoizomerů, buď jako R,S (*meso*-forma, ICRF-193) nebo ve směsi dvou enantiomerů S,S a R,R (racemát). Přičemž inhibici TOP2 vykazuje pouze *meso*-forma [220]. Další výzkum látky ICRF-193, zejména *in vivo* studie, jsou však limitované jeho velmi špatnou rozpustností ve vodných roztocích. Tuto překážku je ovšem možné řešit, stejně jako v případě ICRF-154, přípravou vhodného proléčiva.

Látka GK-627, jež je také známá pod kódovým označením ICRF-239, byla v minulosti testovaná pro potenciální kardioprotektivní účinek na *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity na potkanech, kde projevila mírnou protekci (slabší v porovnání s DEX) [221]. Potenciální kardioprotektivní účinek látky GK-580 zatím nebyl hodnocen *in vitro* ani *in vivo*.



**Obrázek 19:** Struktury analogů DEX: **(a)** ICRF-193 **(b)** ICRF-154, **(c)** sobuzoxan, **(d)** GK-627 a **(e)** GK-580.

## 3 Cíle práce

Tato disertační práce je rozčleněna na dva bloky. První část je věnována bioanalytickému hodnocení analogů DEX s využitím LC-MS metod, jež bylo zaměřeno na studium stability, bioaktivace, metabolismu a farmakokinetiky. Tyto experimenty byly součástí systematického vývoje nových léčiv s kardioprotektivním účinkem a dále také součástí studia mechanismu cytoprotektivního působení proti ANT-indukované toxicitě. Druhá část je pak věnována stanovení antracyklinů v plasmě se zaměřením na využití mikroextrakčních technik.

### 3.1 Dílčí cíle práce

- Vývoj, optimalizace a validace LC-MS metod pro analýzu strukturně blízkých analogů dexrazoxanu a pro stanovení farmakokinetických profilů těchto analogů v plasmě po podání králíkům
- Vývoj, optimalizace a validace LC-MS metod pro analýzu nových proléčiv analogů DEX v biologickém materiálu
- Aplikace vyvinutých metod do studia stability, bioaktivace a metabolismu proléčiv *in vitro* a *in vivo* za podmínek studia kardioprotekce
- Vývoj mikroextrakční metody pro izolaci antracyklinů (doxorubicin, daunorubicin a jeho metabolit daunorubicinol) z králičí plasmy

## 4 Experimentální část – komentář k publikovaným pracím

### 4.1 Bioanalytické hodnocení strukturně blízkých analogů dexrazoxanu

V této části práce jsme se zaměřili na využití LC-MS/MS pro hodnocení nových analogů DEX *in vitro* a *in vivo* s cílem přispět k objasnění vztahu struktura-kardioprotektivní účinek ve skupině bisdioxopiperazinů, což je jeden ze základních předpokladů budoucího cíleného vývoje nových a účinnějších kardioprotektiv.

V první studii byly syntetizovány dvě série nových analogů DEX a byl hodnocen jejich kardioprotektivní účinek na modelu ANT-indukované kardiotoxicity *in vitro* a *in vivo*. U analogů první série byla provedena alkylace imidů na obou dioxopiperazinových kruzích, druhá série byla založena na alkylaci jednoho 2,6-dioxopiperazinového kruhu v poloze 3 (zavedení methylu/ethylu). Protektivní účinek vůči ANT-indukované kardiotoxicitě byl u všech šesti strukturně blízkých analogů DEX nejprve studován *in vitro* na neonatálních kardiomyocytech. Bylo zjištěno, že žádný z těchto analogů nevykazuje očekávaný kardioprotektivní účinek, což bylo překvapivé zejména u látky GK-627 (ICRF-239), u které byl v minulosti pozorován protektivní efekt na modelu *in vivo* ANT-indukované kardiotoxicity na potkanech [221]. Kardioprotektivní účinek dvou strukturně nejbližších analogů z každé série, tedy GK-627 a GK-580 (**Obrázek 19d, e**) byl poté zkoumán také *in vivo* na modelu chronické ANT toxicity u králíka. V souladu s výsledky *in vitro* experimentů však bylo zjištěno, že žádný z těchto analogů nevykazuje ani zde signifikantní kardioprotektivní účinek. Obě studované látky proto byly podrobeny FK studiím, aby bylo prokázáno, že absence protektivního účinku není způsobena neočekávanými rozdíly ve FK analogů v porovnání s DEX (**příloha 1**). Cílem práce naší výzkumné skupiny bylo tedy vyvinout vhodnou LC-MS metodu pro analýzu GK-627 a GK-580 a jejich metabolitů a použít ji pro stanovení profilu koncentrací těchto látek v králičí plasmě.

Při optimalizaci podmínek stanovení nových analogů jsme vycházeli z LC-MS/MS metody, jež byla dříve vyvinuta na našem pracovišti pro analýzu DEX a jeho metabolitu ADR-925 v králičí plasmě [222]. Analýza byla provedena na HPLC Prominence LC-20A (Shimadzu, Japonsko) on-line spojeným s MS detekcí (iontová past, LCQ Advantage Max, Thermo Scientific, USA). Mezi hlavní komplikace stanovení analogů DEX a jejich metabolitů se dvěma otevřenými cykly patří: 1) chelatační

vlastnosti metabolitu, což má za následek nesymetrický tvar píků a nízké opakovatelnosti nástríků a 2) rozdílná polarita analytů, kdy vysoce polární otevřený metabolit je málo zadržován na klasických reverzních fázích. Pro zabránění vzniku chelátových komplexů byl chromatografický systém před začátkem měření promytý 2mM EDTA, po čemž následovalo vymytí EDTA z kolony MF, aby nedošlo ke kontaminaci MS. Pro separaci látek byla použita kolona Synergi Polar-RP (150 × 3 mm, 4 μm; Phenomenex, USA), jež díky speciální povrchové úpravě (tzv. polární „edcapping“) umožňuje použít 100% vodné MF a také zvýšit retenci polárních látek. Eluce probíhala v gradientovém módu, kde jako složky MF byly využity 5% methanol ve 2mM mravenčanu amonném (složka A) a methanol (složka B). Analyty byly detekovány v SRM módu a jedna analýza trvala 30 minut. Pro analýzu GK-580 a jeho otevřeného metabolitu (GK-580<sub>met</sub>) byl pouze upraven gradient a složení MF A (pouze 2mM mravenčan amonný). Analýza v tomto případě trvala rovněž 30 min. V případě stanovení GK-627 a GK-627<sub>met</sub> byla metoda převedena na UHPLC (Nexera X2) ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu (LCMS-8030, obojí Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Vzhledem k tomu, že není komerčně dostupná kolona Synergi Polar-RP pro UHPLC analýzu, byla použita kratší HPLC kolona s menšími částicemi (Synergi Polar-RP 100 × 3 mm, 2,5 μm). Tímto způsobem se podařilo délku analýzy zkrátit na 20 minut. Vzorky plasmy byly upraveny jednoduše proteinovou precipitací s použitím methanolu jako precipitačního činidla. Obě metody byly částečně validovány dle validační směrnice Evropské lékové agentury, validační parametry jsou shrnuté v **tabulkách 1 a 2**. Následně byly metody použity pro stanovení koncentračních profilů jednotlivých analytů v plasmě získaných po podání GK-580, GK-627 nebo DEX králíkům (**příloha 1**).

V plasmě byly kromě parentních látek detekovány také předpokládané otevřené metabolity (obdobné jako ADR-925). V našich studiích jsme zjistili, že se plasmatické koncentrační profily testovaných látek a DEX významně neliší. To do značné míry vylučuje hypotézu, že by za selhání kardioprotektivního účinku mohla být zodpovědná rozdílná farmakokinetika. Proto jsme se s kolegy z Katedry biochemických věd zaměřili na hodnocení farmakodynamických vlastností, a to, vzhledem k navrhovaným mechanismům účinku, na potenciál analogů interagovat s ionty železa a schopnost inhibovat TOP2B (**příloha 1**). Přestože ani jedna z parentních testovaných látek (GK-580 a GK-627) nebyla schopná vyvézt železo z komplexu s daunorubicinem, jejich otevřené metabolity (GK-580<sub>met</sub> a GK-627<sub>met</sub>) byly v chelataci srovnatelně účinné jako metabolit

dexrazoxanu ADR-925. Z čehož vyplývá, že rozdíl v kardioprotektivním potenciálu mezi DEX a jeho analogy nelze vysvětlit různými chelatačními vlastnostmi jejich metabolitů.

**Tabulka 1:** Validační parametry LC-MS/MS analýzy GK-580 a jeho metabolitu v králičí plasmě.

<b>GK-580</b>					
Linearita: 5-300 $\mu\text{M}$ ( $R \leq 0,9966$ )					
koncentrační hladina ( $\mu\text{M}$ )	"within-run"		"between-run"		Výtěžnost (%)
	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	
5	89,7	6,2	96,0	12,0	94,8
100	91,5	2,4	99,3	7,7	89,0
300	102,9	4,6	108,4	3,9	90,0
<b>GK-580<sub>met</sub></b>					
Linearita: 5-300 $\mu\text{M}$ ( $R \leq 0,9966$ )					
koncentrační hladina ( $\mu\text{M}$ )	"within-run"		"between-run"		Výtěžnost (%)
	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	
5	101,8	4,0	99,9	10,6	96,9
100	103,3	2,0	96,0	2,0	80,7
300	98,6	5,4	91,7	5,5	90,8

**Tabulka 2:** Validační parametry LC-MS/MS analýzy GK-627 a jeho metabolitu v králičí plasmě.

<b>GK-627</b>					
Linearita: 10-400 $\mu\text{M}$ ( $R \leq 0,9966$ )					
koncentrační hladina ( $\mu\text{M}$ )	"within-run"		"between-run"		Výtěžnost (%)
	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	
10	96,8	11,4	96,2	10,2	98,0
50	110,3	3,9	105,2	7,2	96,3
400	104,6	8,2	105,8	9,1	98,9
<b>GK-627<sub>met</sub></b>					
Linearita: 10-400 $\mu\text{M}$ ( $R \leq 0,9966$ )					
koncentrační hladina ( $\mu\text{M}$ )	"within-run"		"between-run"		Výtěžnost (%)
	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	Přesnost (%)	Preciznost (RSD)	
10	113,2	6,1	114,8	8,3	97,8
50	96,4	10,3	92,9	7,3	101,8
400	100,1	7,6	102,0	6,3	104,1

Narozdíl od DEX však ani jedna látka nevykazovala interakci s TOP2B. Tato zjištění tedy podporují hypotézu, že u této skupiny látek je schopnost interakce s TOP2B jeden z klíčových předpokladů pro jejich kardioprotektivní potenciál. Tato studie dále prokázala velmi těsný vztah struktura-kardioprotektivní účinek ve skupině bisdioxopiperazinů a proto byl další výzkum zaměřen na analogy s co nejmenší obměnou chemické struktury DEX (**příloha 2 a 3**).

Strukturně velmi blízkým analogem DEX je látka ICRF-154 (**Obrázek 19b**). Tato látka je velmi špatně rozpustná ve vodě, a proto je v klinické praxi užíváno její proléčivo sobuzoxan (SBZ). SBZ je perorálně podávané protinádorové léčivo, jež je v Japonsku registrované pro léčbu hematologických malignit [217, 218]. Jak látka ICRF-154, tak její proléčivo SBZ vykazují inhibici vůči TOP2B, přičemž střední inhibiční koncentrace látky ICRF-154 je asi 5× vyšší v porovnání s DEX [212, 214, 223]. Navíc u obou látek byl sledován protektivní efekt proti ANT-indukované toxicitě *in vitro* [212, 214]. Přestože, toto léčivo již prošlo klinickými studiemi a je v Japonsku užíváno v praxi, nejsou dostupné přesné informace o aktivaci sobuzoxanu a jeho dalším metabolismu, zejména za podmínek hodnocení jejich kardioprotektivního potenciálu. Za účelem hodnocení *in vitro* bioaktivity/metabolismu sobuzoxanu byla vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda pro současné stanovení sobuzoxanu, aktivní látky ICRF-154 a předpokládaného otevřeného metabolitu (EDTA-diamid). Stabilitní studie byly provedeny v biologických materiálech (buněčné médium, pufr, kardiomyocyty a plasma) relevantních pro plánované kardioprotektivní experimenty (**příloha 2**).

S ohledem na předchozí zkušenost s analýzou DEX a jeho derivátů byl při vývoji metody kladen důraz na zkrácení analýzy, což do značné míry komplikovala velmi odlišná polarita stanovovaných látek. Kromě reverzních fází s polární povrchovou úpravou (Synergi Polar, Zorbax SB-Aq), byla testována také stacionární fáze na bázi grafitického uhlíku (Hypercarb). Přestože stacionární fáze na bázi grafitického uhlíku zvýšila retenci polárního EDTA-diamidu, lipofilní proléčivo SBZ bylo na koloně velmi silně zadrženo, což vedlo ke zhoršení symetrie píku a nežádoucímu prodloužení analýzy. Uspokojivá retence polárního EDTA-diamidu a akceptovatelná doba analýzy všech tří látek (13 min) byla dosažena na koloně Zorbax SB-Aq (3 × 100 mm, 1.8 μm, Agilent, USA) za použití MF tvořené 1mM mravenčanem amonným (složka A) a methanolem (složka B) v gradientovém módu. Vzhledem k předpokládané nízké stabilitě SBZ v biologických matricích byly pro zpracování vzorku voleny rychlé a jednoduché postupy, a to ředění (pro pufr a buněčné médium) a proteinová precipitace



(pro kardiomyocyty a plasmu). Stabilitní testy navíc ukázaly, že pro zvýšení post preparativní stability SBZ je potřeba vzorek okyselit kyselinou mravenčí. Vyvinutá metoda byla validována dle EMA doporučení ve všech výše zmíněných maticích a použita pro hodnocení chemické stability, aktivace a metabolismu SBZ a také pro studium penetrace SBZ do kardiomyocytů (**příloha 2**).

V našich studiích jsme zjistili, že SBZ se rozkládá v buněčném médiu za současného vzniku malého množství otevřeného metabolitu (EDTA-diamidu), zatímco aktivní forma ICRF-154 nebyla detekována. Příčinou mohla být velmi špatná rozpustnost vznikajícího ICRF-154 ve vodných roztocích, nebo také přítomnost dalších rozkladných produktů. Žádný z potenciálních meziproductů se nám však nepodařilo detekovat. Stejný profil byl získán při inkubaci SBZ v pufru, z čehož lze usuzovat, že složky média nijak neurychlují aktivaci SBZ. Dále jsme odhalili, že SBZ rychle proniká do kardiomyocytů, kde je aktivován na ICRF-154, jež se dále rozkládá na EDTA-diamid. Vzhledem k tomu, že srdeční buňky nezrychlovaly aktivaci SBZ v buněčném médiu, je SBZ aktivován spíše v důsledku chemického rozkladu, nikoli metabolismu. V plasmě byl SBZ velmi rychle aktivován na ICRF-154 (v rámci několika minut) a následně docházelo k jeho přeměně na EDTA-diamid.

Jako další slibný kandidát pro studium kardioprotektivního účinku a velmi blízký analog DEX byla vybrána látka s kódovým označením ICRF-193 u níž byla v porovnání s DEX identifikována výrazně vyšší účinnost jak v inhibici TOP2B ( $IC_{50}$  7× nižší než DEX) tak v protekci proti ANT-indukované kardiotoxicitě *in vitro* [214]. ICRF-193 je podobně jako ICRF-154 kvůli symetrii molekuly, velmi špatně rozpustný ve vodných roztocích, což znemožňuje jeho podání do organismu a další výzkum *in vivo*. Jedním z přístupů, jak zvýšit rozpustnost je příprava farmaceuticky přijatelného proléčiva, jež neovlivní kardioprotektivní potenciál původní látky. Tento koncept byl úspěšně využit u látky ICRF-154 zmíněné výše. A tedy na základě stejného principu, byly nasyntetizovány tři proléčiva látky ICRF-193 (**příloha 3**). Aby bylo možné sledovat aktivaci proléčiv v buněčném médiu (jež je relevantní pro *in vitro* experimenty), byla vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda pro současné stanovení proléčiv, ICRF-193 a předpokládaného otevřeného metabolitu (ICRF-193<sub>met</sub>).

Vývoj metody, byl stejně jako v předchozích případech komplikován rozdílnou polaritou látek, tedy rozdílným retenčním chováním velmi polárního metabolitu, a naopak lipofilního proléčiva na chromatografické koloně. Pro separaci byly testovány reverzní stacionární fáze s polárním „endcappingem“ a to Zorbax SB-Aq a Luna Omega Polar

a také kolona s povrchově porézními částicemi Kinetex F5. Kolona Zorbax SB-Aq, jež byla použita pro separaci SBZ, ICRF-154 a EDTA-diamidu neposkytovala symetrické píky (píky výrazně chvostovaly), na koloně Kinetex F5 byla silně zadržována všechna proléčiva, což vedlo k dlouhému času analýzy a chvostujícímu píku proléčiv. Nejlepší separace byla dosažena na koloně Luna Omega Polar, kde docházelo k uspokojivé retenci polárního metabolitu ICRF-193<sub>met</sub>, bylo dosaženo symetrických píků a času analýzy do 10 minut. V tomto případě se jako největší komplikace ukázalo nastavení analytických podmínek pro současné stanovení všech analytů. Přestože methanol v MF poskytoval intenzivnější MS signál ICRF-193 a ICRF-193<sub>met</sub>, pro dosažení symetrických píků proléčiv bylo nezbytné použít jako složku MF acetonitril, jakožto silnější eluční činidlo. Výrazné zlepšení tvaru píku proléčiv bylo rovněž pozorováno po přidavku kyseliny mravenčí, což ovšem současně vedlo ke snížení MS signálu látky ICRF-193<sub>met</sub>. Nicméně, jako v případě SBZ, bylo pro zvýšení stability proléčiv nutné vzorek okyselit. Jako kompromis byly vzorky okyselovány na celkovou koncentraci 0,5 % kyseliny mravenčí. Vzhledem k omezené stabilitě proléčiv byly vzorky buněčného média jednoduše ředěny směsí methanol : voda (20:80 v/v) a okyseleny kyselinou mravenčí. Vyvinutá metoda pro analýzu všech tří proléčiv, ICRF-193 a metabolitu ICRF-193<sub>met</sub> byla částečně zvalidována z hlediska selektivity, přenosu a linearit. Metoda byla použita pro hodnocení aktivace GK-667, GK-678 a GK-691 v buněčném médiu *in vitro*.

Všechna proléčiva byla velmi rychle (v rámci desítek minut) přeměněna na aktivní formu ICRF-193, která byla dále degradována na ICRF-193<sub>met</sub>. U proléčiva s kódovým označením GK-667 byla v průběhu 48 hodinového stabilitního experimentu stanovena nejvyšší AUC aktivní látky ICRF-193 a to díky rychlému dosažení její maximální koncentrace, ale také kvůli nejnižší konverzi na neaktivní metabolit ICRF-193<sub>met</sub>. Vedle studia aktivace, byla hodnocena také vlastní toxicita a cytoprotektivní potenciál všech proléčiv proti ANT-indukované toxicitě *in vitro* (**příloha 3**). Na základě výsledků všech těchto experimentů byla pro další vývoj vybrána látka GK-667.

V další fázi studie jsme adaptovali a plně validovali UHPLC-MS/MS metodu pro současné stanovení GK-667, ICRF-193 a ICRF-193<sub>met</sub> v dalších relevantních biologických matricích: (1) v buněčném médiu a odpovídajícím pufru pro hodnocení bioaktivace za podmínek relevantních pro cytoprotektivní *in vitro* studie (2) v neonatálních potkaních kardiomyocytech pro hodnocení penetrace GK-667 do buněk a (3) v králičí plasmě, pro simulaci *in vitro* uvolňování ICRF-193 v krevním oběhu a také pro analýzu vzorků z *in vivo* experimentů po podání GK-667 králíkovi (**příloha 3**).

Analýzou vzorků z těchto *in vitro* experimentů jsme zjistili, že přestože byla rychlost rozkladu GK-667 v pufru srovnatelná s rozkladem v médiu, množství stanoveného ICRF-193 bylo signifikantně nižší. To naznačuje, že specifické složky buněčného kultivačního média (např. aminokyseliny nebo glukóza) pravděpodobně neovlivňují rozklad GK-667, ale mohou urychlovat uvolňování ICRF-193. Vzhledem k rychlému rozkladu GK-667 v mediu nebylo proléčivo detekováno uvnitř kardiomyocytů, nicméně stanovené intracelulární koncentrace ICRF-193 byly dostačující pro navození cytoprotektivního účinku proti ANT-indukované toxicitě. Rozklad GK-667 i ICRF-193 v plasmě *in vitro* byl signifikantně rychlejší v pozorování s buněčným médiem, což naznačuje, že složky plasmu urychlují metabolismus těchto látek.

Jako poslední krok této studie bylo nutné stanovit základní FK parametry GK-667 *in vivo*, aby bylo prokázáno, že FK není překážkou dalšího vývoje této látky. Při analýze vzorků z pilotních *in vivo* experimentů po podání GK-667 králíkovi bylo zjištěno, že UHPLC-MS/MS metoda vyvinutá pro analýzu vzorků z *in vitro* experimentů není dostatečně citlivá a koncentrace aktivní látky ICRF-193 bylo možné sledovat pouze do třetí, respektive páté hodiny a pak byly hodnoty pod limitem kvantifikace (0,2  $\mu\text{M}$ ). Proto jsme se zaměřili na zvýšení citlivosti metody. Vzhledem k tomu, že jsme prokázali, že proléčivo je v organismu velmi rychle aktivováno, při úpravě metody jsme cílili jen na stanovení aktivní látky ICRF-193 a metabolitu ICRF-193<sub>met</sub>.

V prvním kroku jsme se zaměřili na modifikaci úpravy biologického vzorku. Byla testována SPE, jakožto extrakční metoda umožňující zakoncentrování vzorku. Vzhledem k vysoké polaritě metabolitu však byla optimalizace této metody poměrně komplikovaná. Pro extrakci ICRF-193 se ukázal jako ideální HLB sorbent. Kolonka byla aktivována a kondicionována methanolem a vodou, následně byla nanášena plasma (100  $\mu\text{l}$ ), vzorek byl promyt 0,25% kyselinou mravenčí (400  $\mu\text{l}$ ) a eluce probíhala do methanolu (300  $\mu\text{l}$ ). Za těchto podmínek bylo pro ICRF-193 dosaženo výtěžnosti 98,7 % a limit kvantifikace pro tuto látku byl snížen na 0,02  $\mu\text{M}$ . Nicméně tento sorbent nebyl vhodný pro retenci polárního ICRF-193<sub>met</sub>, kdy ke ztrátám analytu docházelo již při nanášení vzorku na kolonku a zbytek analytu byl vymyt při promývacím kroku. Pro extrakci obou látek bylo nezbytné použít vícemodální sorbent (Hypersep Verify AX – C8+anex). Zde byla aktivace a kondicionace provedena acetonitrilem a vodou, následně byl nanášen vzorek (100  $\mu\text{l}$ ), jež byl promyt vodou (300  $\mu\text{l}$ ) a na eluci byl použit acetonitril s přídavkem 10 % kyseliny mravenčí (500  $\mu\text{l}$ ). Extrakt byl následně odpařen pod proudem dusíku a rekonstituován ve 200  $\mu\text{l}$  směsi acetonitril : voda (20:80 v/v). I přes využití silně

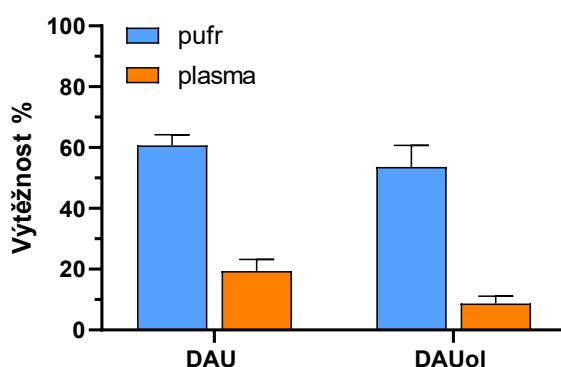
okyseleného acetonitrilu bylo dosaženo jen necelých 50 % výtěžnosti pro ICRF-193<sub>met</sub>, jež byl silně navázaný na iontoměničovém sorbentu. Výtěžnost ICRF-193 byla srovnatelná s předchozí extrakcí (99,8 %). Touto metodou bylo dosaženo snížení limitu kvantifikace pro ICRF-193 na 0,05  $\mu\text{M}$ .

Následně se nám naskytl možnost měření na novém přístroji (Agilent 1290 Infinity II LC s trojitým kvadrupólem LC/MS 6400), a proto byla původní analytická metoda převedena na tento citlivější přístroj. Byla zachována kolona Luna Omega Polar i její rozměry, došlo ovšem k úpravě složení MF, kdy acetonitril byl nahrazen methanolem, a mírné úpravě gradientu. Díky této instrumentaci bylo možné i s jednoduchou proteinovou precipitací dosáhnout limitu kvantifikace pro oba analyt 0,01  $\mu\text{M}$ . Tato metoda tedy byla validována dle doporučení Evropské lékové agentury a použita pro analýzu vzorků z *in vivo* farmakokinetických experimentů (**příloha 3**). Naměřená data jsme využili k výpočtu základních FK parametrů. V porovnání s DEX vykazovala látka ICRF-193 kratší eliminační poločas, a naopak vyšší plasmatickou clearance. Na základě srovnání s účinnými koncentracemi *in vitro* se dá předpokládat, že stanovené plasmatické koncentrace ICRF-193 by měly být dostatečné pro navození kardioprotektivního účinku na našem *in vivo* modelu. Tato studie tedy jasně prokázala, že se proléčivo GK-667 jeví ve všech ohledech jako slibný kandidát pro další komplexní studie protektivního účinku na modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka *in vivo*.

#### 4.2 Využití mikroextrakčních technik pro izolaci antracyklinů z plasmy

Jako součást vývoje nových potenciálních léčiv chránících proti ANT kardiotoxictě je důležité sledovat, zda nová látka neovlivňuje farmakokinetiku ANT, což by mohlo vést k ovlivnění jejich protinádorového účinku. Pro získání této informace je nezbytná analytická metoda pro stanovení ANT v plasmě. Vzhledem k tomu, že pro analýzu ANT je v literatuře dostupná řada konvenčních extrakčních technik jsme se v naší práci ubírali směrem moderních trendů a zaměřili jsme se na mikroextrakční metody. Pro izolaci ANT z králičí plasmy jsme testovali mikroextrakční techniky založené na principu extrakce z kapaliny do kapaliny PALME a EME. Nejprve jsme se zaměřili na extrakci PALME, vzhledem k jednoduchosti a komerční dostupnosti veškerého vybavení pro extrakci. Při výběru vhodných podmínek byly extrahovány DAU a jeho metabolit daunorubicinol (DAUol) z vodného pufru. Jako optimální organické rozpouštědlo pro SLM bylo vybráno DEHPi s přídavkem THEP (20 %), donorová fáze

byla tvořena fosfátovým pufrům o pH 8.0 (250  $\mu$ l) a jako akceptorová fáze byla zvolena 0,5M kyselina mravenčí (100  $\mu$ l), extrakce probíhala při třepání 950 ot/min po dobu 60 minut. Metodou PALME bylo dosaženo extrakčních výtěžků okolo 60 % pro DAU i DAUol při extrakci z čistého pufru, nicméně při extrakci z plasmy byla tato výtěžnost signifikantně nižší (**Obrázek 20**). Příčinou mohla být buď vyšší viskozita vzorku nebo silná vazba ANT na plasmatické proteiny. S cílem zvýšit extrakční účinnost a zkrátit extrakční čas jsme se rozhodli otestovat EME.



**Obrázek 20:** Výtěžnost daunorubicinu (DAU) a dauorubicinolu (DAUol) z pufru a plasmy metodou PALME (n=3). Extrakce z plasmy probíhala za stejných podmínek, jen donorová fáze byla tvořena směsí 100  $\mu$ l plasmy a 150  $\mu$ l fosfátového pufru (pH 8.0).

Vedle DAU a jeho metabolitu jsme se zaměřili také na možnosti extrahovat DOX - nejčastěji používaný ANT v klinické praxi. Podmínky pro extrakci DAU, DAUol a DOX z pufru a králičí plasmy byly systematicky optimalizovány (**příloha 4**). Nejprve v rámci extrakcí ANT z pufru bylo vybráno organické rozpouštědlo pro SLM a optimalizováno pH donorové a akceptorové fáze. Optimalizace dalších parametrů, jež zahrnovala úpravu složení donorového pufru, velikost napětí, intenzitu třepání a extrakční čas, již probíhala při extrakcích z plasmy. Při optimalizovaných podmínkách byly analyty extrahovány z 50  $\mu$ l plasmy smíchané se 185  $\mu$ l pufru (pH 3.0) přes SLM tvořenou DEHPi do 50  $\mu$ l 500mM kyseliny octové. Extrakce byla provedena při třepání 1050 ot/min, po dobu 25 minut a na elektrody bylo vkládáno napětí 20 V jež bylo po dvou minutách extrakce zvýšené na 35 V. V rámci optimalizovaných podmínek bylo, na rozdíl od PALME, dosaženo téměř shodné výtěžnosti z pufru i plasmy. Pro analýzu vzorků byla využita UHPLC-MS/MS metoda (Agilent 1290 Infinity II LC s trojitým kvadrupólem LC/MS 6400). Separace byla provedena na koloně Kinetex C18 (2.1  $\times$  100 mm, 1,7  $\mu$ m, Phenomenex, USA) s MF sestávající z 0.025% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B) v gradientovém módu. Metoda byla validována v koncentračním

rozmezi 0,25 – 1000 ng/ml podle doporučení Evropské lékové agentury. V rámci validace byly hodnoceny následující parametry: selektivita, přenos, linearita, přesnost, preciznost, výtěžnost, matricové efekty a stabilita. Navíc bylo hodnoceno také množství fosfolipidů v extraktech jednoduchou metodou využívající sken prekurzorových iontů poskytujících fragment  $m/z$  184.

Optimalizovaná mikroextrakční technika byla porovnána s konvenčními extrakčními metodami LLE a PP z hlediska výtěžnosti, matricových efektů a množství fosfolipidů ve vzorku. Ve srovnání s těmito metodami EME poskytovala nejvyšší výtěžnost (více než 80 % pro testované ANT), minimální matricové efekty a ve vzorku bylo detekováno jen zanedbatelné množství fosfolipidů v porovnání s extrakty po PP a LLE. Na závěr byla testována spolehlivost EME analýzou reálných vzorků plasmy z pilotních FK studií DAU na králíkovi. Byly stanoveny shodné koncentrace DAU i jeho metabolitu DAUol v plasmě při použití EME a referenční LLE (**příloha 4**). Touto studií jsme prokázali, že EME je jednoduchá, rychlá a opakovatelná technika vhodná pro extrakci ANT z plasmy a zároveň, že se jedná o alternativní metodu poskytující velmi čistý extrakt ve srovnání s rutinně používanými konvenčními extrakčními technikami.

## 5 Závěr

Disertační práce se zabývá vývojem LC-MS metod pro analýzu ANT a nových potenciálních kardioprotektiv a izolací těchto látek z biologických materiálů. V teoretické části je popsáno spojení kapalinové chromatografie s MS detekcí a využití této instrumentace v bioanalýze léčiv. Dále jsou popsány metody zpracování biologických vzorků, kde je velký důraz kladen na mikroextrakční techniky odvozené od LLE a SPE. Speciální část je věnovaná EME a to principům extrakce a optimalizaci důležitých extrakčních parametrů. Pozornost je věnovaná také validaci bioanalytických metod a závěr teoretické práce poskytuje informace o analyzovaných látkách.

První tematický blok experimentální práce je věnován komentáři 3 publikací, které jsou zaměřené na studium kardioprotektivního potenciálu nových analogů DEX. V rámci těchto prací byly vyvinuty a validovány nové LC-MS metody pro analýzu nových analogů DEX v různých biologických matricích. Tyto metody byly použity pro hodnocení stability, bioaktivity a metabolismu studovaných látek *in vitro* a také pro stanovení FK profilu testovaných látek v plasmě *in vivo*. S pomocí těchto metod jsme prokázali, že absence kardioprotektivního účinku strukturně blízkých analogů DEX (GK-580 a GK-627) u králíka není způsobena odlišným farmakokinetickým chováním, a proto byl další výzkum věnován farmakodynamickým parametrům. Na základě těchto poznatků byl zjištěn velmi blízký vztah struktura-kardioprotektivní účinek v bisdioxopiperazinové skupině. Pro další studium tedy byly vybrány dva analogy (ICRF-154 a ICRF-193) s minimální obměnou chemické struktury DEX. Obě studované látky vykazovaly velmi špatnou rozpustnost ve vodě, což znemožňuje jejich podání *in vivo*. V případě ICRF-154 je proto v klinické protinádorové terapii využíváno proléčivo sobuzoxan, které tuto komplikaci překonává. Stejný přístup, tedy příprava proléčiv, byl zvolen i pro zvýšení rozpustnosti analogu ICRF-193, jež vykazuje silnější kardioprotektivní efekt vůči ANT-indukované toxicitě *in vitro*. V rámci této práce byly připraveny tři proléčiva ICRF-193 (GK-667, GK-678 a GK-691). Oba analogy DEX a jejich proléčiva byly s využitím UHPLC-MS/MS detailně hodnocené z hlediska aktivity, stability a metabolismu. Látka ICRF-193 a její proléčiva byly rovněž testovány z hlediska cytoprotekce a toxicity. Kromě toho bylo proléčivo GK-667 podáno králíkovi *in vivo* a byly stanovené základní FK parametry. V této práci jsme prokázali, že nové proléčivo GK-667 je vhodným kandidátem, pro další komplexní studie protektivního účinku na modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka *in vivo*.

V druhém tematickém bloku je diskutována jedna publikace, která je zaměřena na mikroextrakci ANT z králičí plasmy s následnou UHPLC-MS/MS analýzou. Byly testovány dvě mikroextrakční techniky, a to jednoduchá PALME a následně EME. Tato práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci extrakčních podmínek EME a následné srovnání této mikroextrakce s konvenčními extrakčními technikami. EME v porovnání s PP a LLE poskytovala vyšší extrakční výtěžnost a na rozdíl od konvenčních metod byly detekovány minimální matricové efekty a zanedbatelné množství fosfolipidů v analyzovaném vzorku. Analýzou reálných vzorků odebraných po aplikaci ANT králíkům bylo prokázáno, že EME je spolehlivá metoda, poskytující srovnatelné výsledky jako konvenční LLE. V rámci této práce tak byla vyvinuta rychlá, efektivní a spolehlivá mikroextrakční metoda pro stanovení ANT v plasmě.



## 6 Seznam publikací zahrnutých v disertační práci

1) Kollárová-Brázdová P., Jirkovská A., Karabanovich G., Pokorná Z., Roh J., Jirkovský E., **Bavlovič Piskáčková H.**, Reimerová P., Mazurová Y., Adamcová M., Skalická V., Štěrbová-Kovaříková P., Šimůnek T., Štěřba M. *Investigation of close dexrazoxane derivatives reveals topoisomerase II $\beta$  interaction as a pre-requisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity.* J Pharmacol Exp Ther 2020; 373(3):402-415

IF<sub>2019</sub> = 3,561 (Q1)

Podíl autorky: experimentální práce (vývoj LC-MS metod, analýza vzorků z farmakokinetických studií) a zpracování analytických dat, podíl na tvorbě textu publikace.

2) Reimerová P., Jirkovská A., **Bavlovič Piskáčková H.**, Karabanovich G., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P. *UHPLC-MS/MS method for analysis of sobuzoxane, its active form ICRF-154 and metabolite EDTA-diamide and its application to bioactivation study.* Sci Rep 2019; 9:4524

IF<sub>2019</sub> = 3.998 (Q1)

Podíl autorky: podíl na experimentální práci (částečný podíl na validaci LC-MS metody, podíl na hodnocení stability bioaktivačních studií v buněčném médiu, ADS pufru a plazmě), podíl na tvorbě textu publikace.

3) **Bavlovič Piskáčková H.**, Jansová H., Kubeš J., Karabanovich G., Váňová N., Kollárová-Brázdová P., Melnikova J., Jirkovská A., Lenčová-Popelová O., Chládek J., Roh J., Šimůnek T., Štěřba M., Štěrbová-Kovaříková P. *Development of water-soluble pro-drugs of bisdioxopiperazine topoisomerase II $\beta$  inhibitor ICRF 193 as potential cardioprotective agents against anthracycline cardiotoxicity.* Sci Rep 2021; 11: 4456

IF<sub>2019</sub> = 3.998 (Q1)

Podíl autorky: experimentální práce (vývoj a validace LC-MS metody, studium stability a bioaktivace *in vitro*, analýza vzorků z *in vivo* farmakokinetické studie) a zpracování a interpretace analytických dat, hlavní podíl na tvorbě textu publikace.

4) **Bavlovič Piskáčková H.**, Øiestad E.L., Váňová N., Lengvarská J., Štěrbová-Kovaříková P., Pedersen-Bjergaard S. *Electromembrane extraction of anthracyclines from plasma: Comparison with conventional extraction techniques*. *Talanta* 2021; 223: 121748 IF<sub>2019</sub> =

#### **5.339 (Q1)**

Podíl autorky: návrh designu experimentu, experimentální práce (vývoj a optimalizace extrakčních podmínek elektromembránové extrakce, optimalizace LC-MS metody pro měření fosfolipidového profilu, validace, analýza reálných vzorků z pilotní *in vivo* farmakokinetické studie) a zpracování a interpretace analytických dat, hlavní podíl na tvorbě textu publikace.

## 7 Další autorské publikace nezahrnuté do disertační práce

1) Jirkovská A., Karabanovich G., Kubeš J., Skalická V., Melnikova I., Korábečný J., Kučera T., Jirkovský E., Nováková L., **Bavlovič Piskáčková H.**, Škoda J., Štěrba M., Austin C.A., Šimůnek T., Roh J. *Structure-activity relationship study of dexrazoxane analogues reveals ICRF-193 as the most potent bisdioxopiperazine against anthracycline toxicity to cardiomyocytes due to its strong topoisomerase II $\beta$  interactions*. J. Med. Chem. (2021) “in press” (přijat 5. Března 2021)

**IF<sub>2019</sub> = 6.205 (Q1)**

3) Reimerová P., Stariat J., **Bavlovič Piskáčková H.**, Jansová H., Roh J., Kalinowski D.S., Macháček M., Šimůnek T., Richardson D.R., Štěrbová-Kovaříková P. *Novel SPME fibers based on a plastic support for determination of plasma protein binding of thiosemicarbazone metal chelators: a case example of DpC, an anti-cancer drug that entered clinical trials*. Anal Bioanal Chem 2019; 411:2383–2394

**IF<sub>2019</sub> = 3.637 (Q1)**

3) **Bavlovič Piskáčková H.**, Kollárová-Brázdová P., Kučera R., Pedersen Bjergaard S., Štěrbová-Kovaříková P. *The first direct electromembrane extraction of analytes from animal tissues: A fundamental study and application on anthracyclines as model analytes*. (manuskript v recenzním řízení)

4) Jirkovský E., Jirkovská A., **Bavlovič Piskáčková H.**, Skalická V., Pokorná Z., Karabanovich G., Brázdová P., Kubeš J., Lenčová-Popelová O., Mazurová Y., Adamcová M., Lyon A.R., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P., Štěrba M. *Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II $\beta$  and not metal chelation*. (manuskript v recenzním řízení)

## 8 Prezentace výsledků na konferencích

### 8.1 Přednášky

**Hana Bavlovič Piskáčková**, Petra Kollárová-Brázdová, Martin Štěrba, Radim Kučera, Petra Štěrbová-Kovaříková: *Direct electromembrane extraction of anthracyclines from tissue samples*, 11. Postgraduální a 9. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 27.-28. 1. 2021

**Hana Bavlovič Piskáčková**, Elisabeth L. Øiestad, Nela Váňová, Júlia Lengvarská, Petra Štěrbová, Stig Pedersen-Bjergaard: *Electromembrane extraction of anthracyclines from plasma with main focus on matrix effects*, 21. Škola hmotnostní spektrometrie, Srní, 13.-18. 9. 2020 – cena za 2. nejlepší přednášku v sekci Mláďí vpřed

**Hana Bavlovič Piskáčková**, Petra Brázdová, Martin Štěrba, Petra Štěrbová-Kovaříková: *UHPLC-MS/MS in an investigation of novel cardioprotective agent JAS-2*, 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 23.-24. 1. 2019

**Hana Piskáčková**, Petra Reimerová, Jaroslav Roh, Galina Karabanovich, Petra Štěrbová-Kovaříková: *UHPLC-MS/MS of a novel dexrazoxane analogue – JAS-2 and its prodrug*, 8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 24. – 25.1.2018

Galina Karabanovich, **Hana Piskáčková**, Hana Jansová: *Analýza a in vitro studie JAS-2 a jeho proléčiva*. Pravidelný seminář - UNCE – Centrum pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém, Kuks, 10.11.2017

### 8.2 Postery

**Hana Bavlovič Piskáčková**, Adam Reguli, Hana Jansová, Petra Brázdová, Martin Štěrba, Petra Štěrbová-Kovaříková: *Analysis of compounds with distinct polarities in biological matrices: a case example of JAS-2*, 48<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2019), Milán, Itálie, 16.-20. 6. 2019 – Best poster award finalist

**Hana Piskáčková**, Petra Reimerová, Anna Jirkovská, Veronika Skalická, Petra Brázdová, Martin Štěrba, Petra Kovaříková-Štěrbová: *Bioanalytical evaluation of a novel dexrazoxane analogue JAS-2 and its prodrug - in vitro and (pilot) in vivo studies*, 15<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (CECE 2018), Brno, 15.-17. 10. 2018

**Hana Piskáčková**, Petra Reimerová, Anna Jirkovská, Veronika Skalická, Petra Kovaříková-Štěrbová: *UHPLC-MS/MS analysis of a novel dexrazoxane analogue JAS-2 and its prodrug - an "in vitro" study*, 11<sup>th</sup> International Symposium on Drug Analysis and 29<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (DA-PBA 2018), Lovain, Belgique, 9.-12. 9. 2018

**Hana Piskáčková**, Petra Reimerová, Jaroslav Roh, Galina Karabanovich, Petra Štěrbová-Kovaříková: *UHPLC-MS/MS Analysis of a novel cardioprotective agent JAS-2*, Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2018, Olomouc, 29.1.-1.2.2018

**Hana Piskáčková**, Petra Reimerová, Jaroslav Roh, Jana Sedláková, Petra Štěrbová-Kovaříková: *Development of an UHPLC-MS/MS method for analysis of a novel cardioprotective agent JAS-2 and its metabolite*, 14<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (CECE 2017), Veszprém, Maďarsko, 8.-11.10.2017 – Best poster award

**Hana Piskáčková**, Jan Bureš, Petra Reimerová, Galina Karabanovich, Jaroslav Roh, Eduard Jirkovský, Martin Štěrba, Petra Kovaříková: *Bioanalytical evaluation of new analogues of cardioprotective drug – Dexrazoxane*, 45<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2017), Praha, 18.-22.6.2017

## 9 Získané granty

### 9.1 Hlavní řešitel

**2017-2019** – Grantová agentura Univerzity Karlovy (1550217): „Využití UHPLC-MS/MS pro studium osudu nových kardioprotektiv v srdečních buňkách a organismu“

### 9.2 Členka kolektivu

**2021** – Grantová agentura České republiky (21-16195S): „Využití chemické biologie pro studium antracyklinové kardiotoxicity a farmakologické kardioprotekce se zaměřením na topoisomerasu II beta“

**2018 – 2020** – Grantová agentura České republiky (18-08169S): „Studium jednotlivých isoform topoisomerasy II v protinádorovém a kardiotoxickém působení antracyklinů a jejich modulací bisdioxopiperaziny“

**2017 a 2018** – Grantová agentura Univerzity Karlovy (344615): „Komplexní analytická a bioanalytická studie sobuzoxanu - nového protinádorového léčiva“

## 10 Stáže a další odborné zkušenosti

**18. 11. 2019 - 17. 4. 2020** pětíměsíční odborná stáž na **Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo, Norsko**, Školitelé: prof. Stig Pedersen-Bjergaard a assoc. prof. Elisabeth Leere Øiestad, Náplň stáže: Izolace léčiv z plasmy pomocí mikroextrakčních technik na principu liquid-liquid extrakce (PALME a elektromembránová extrakce).

**23.-27. 10 2017** TOX-OER - Intensive Learners Meeting Pharmaco/Toxicokinetics, Porto, Portugalsko, Náplň stáže: studium toxiko-farmakokinetiky

## 11 Použité zdroje

1. Sterba, M., et al., *Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(8): p. 899-929.
2. Cai, F., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: Preventive strategies and treatment*. *Mol Clin Oncol*, 2019. **11**(1): p. 15-23.
3. Swain, S.M., et al., *Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(4): p. 1318-1332.
4. Tebbi, C.K., et al., *Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(5): p. 493-500.
5. Reichardt, P., et al., *Risk-benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling*. *Future Oncol*, 2018. **14**(25): p. 2663-2676.
6. *Souhrn údajů o přípravku Cardioxane*. 19.12.2018 [cited 2021 25.2.]; Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0238021&tab=text> s. [Zobrazeno 1. 3. 2021]
7. Guillarme, D. and J.-L. Veuthey, *Theory and Practice of UHPLC and UHPLC-MS*, in *Handbook of Advanced Chromatography /mass Spectrometry Techniques*. 2017. p. 1-38.
8. McMaster, M.C., *LC/MS: A Practical User's Guide*. 2005. 165.
9. Gross, J.H., *Mass spectrometry: A textbook: Second edition*. *Mass Spectrometry: A Textbook: Second Edition*. 2011. 1-753.
10. Beccaria, M. and D. Cabooter, *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. *Analyst*, 2020. **145**(4): p. 1129-1157.
11. Xian, F., C.L. Hendrickson, and A.G. Marshall, *High resolution mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2012. **84**(2): p. 708-19.
12. Novaková, L. and M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2013.
13. Baldwin, M.A. and McLafferty, F.W., *Liquid Chromatography Mass Spectrometry Interface .1. Direct Introduction of Liquid Solutions into a Chemical Ionization Mass-Spectrometer*. *Organic Mass Spectrometry*, 1973. **7**(9): p. 1111-1112.
14. Horning, E.C., et al., *Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream*. *J Chromatogr Sci*, 1974. **12**(11): p. 725-9.
15. Linden, R., M.V. Antunes, and J.L. Costa, *Mass spectrometry for the quantification of drugs in biosamples*, in *Methods of Therapeutic Drug Monitoring Including Pharmacogenetics*. 2020. p. 47-79.
16. Unger, S., et al., *Roles of LC-MS Bioanalysis in Drug Discovery, Development, and Therapeutic Drug Monitoring*, in *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*. 2013. p. 1-13.
17. Prabhu, G.R.D., et al., *Mass spectrometry | Clinical analysis by mass spectrometry*, in *Encyclopedia of Analytical Science*. 2019. p. 318-333.
18. Klein-Schwartz, W., *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th Edition*. *The Annals of pharmacotherapy*, 2012. **46**.
19. Jickells, S. and A. Negrusz, *Clarke's analytical forensic toxicology*. *Annales de Toxicologie Analytique*, 2009. **20**: p. 233-234.



20. Kohler, I. and D. Guilleme, *Multi-target screening of biological samples using LC-MS/MS: Focus on chromatographic innovations*. *Bioanalysis*, 2014. **6**(9): p. 1255-1273.
21. Oberacher, H. and K. Arnhard, *Compound identification in forensic toxicological analysis with untargeted LC-MS-based techniques*. *Bioanalysis*, 2015. **7**(21): p. 2825-2840.
22. Kahl, K.W., J.Z. Seither, and L.J. Reidy, *LC-MS-MS vs ELISA: Validation of a Comprehensive Urine Toxicology Screen by LC-MS-MS and a Comparison of 100 Forensic Specimens*. *J Anal Toxicol*, 2019. **43**(9): p. 734-745.
23. Klont, F., et al., *SWATH data independent acquisition mass spectrometry for screening of xenobiotics in biological fluids: Opportunities and challenges for data processing*. *Talanta*, 2020. **211**: p. 120747.
24. Fernandez-Lopez, L., et al., *Postmortem analysis of quetiapine and pregabalin in human bone*. *Leg Med (Tokyo)*, 2020. **46**: p. 101717.
25. World Anti-Doping Agency. *WADA, Accredited Laboratories*. Dostupné z: <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories/accredited-laboratories#region-africa> [Zobrazeno 5.6.2020].
26. World Anti-Doping Agency *WADA, Prohibited List January 2020*. Dostupné z: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada\\_2020\\_english\\_prohibited\\_list\\_0.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_prohibited_list_0.pdf) [Zobrazeno 5.6.2020].
27. Protti, M., R. Mandrioli, and L. Mercolini, *Perspectives and strategies for anti-doping analysis*. *Bioanalysis*, 2019. **11**(3): p. 149-152.
28. Thevis, M., et al., *Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: possibilities and limitations*. *J Chromatogr A*, 2013. **1292**: p. 38-50.
29. Abushareeda, W., et al., *High resolution full scan liquid chromatography mass spectrometry comprehensive screening in sports antidoping urine analysis*. *J Pharm Biomed Anal*, 2018. **151**: p. 10-24.
30. U.S.Food and Drug Administration. *The Drug Development Process - Step 1: Discovery and Development*. 2018; Dostupné z: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-1-discovery-and-development>. [Zobrazeno 20.2.2021]
31. Starobová, O.L., L. Nováková J. Šulcová A., *Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci*. 2006, ISSN 1801-6103
32. Zhuo, X. and N. Zheng, *Drug metabolism | metabolite isolation and identification*, in *Encyclopedia of Analytical Science*. 2019. p. 232-239.
33. King, L., A. Kotian, and M. Jairaj, *Introduction of a routine quan/qual approach into research DMPK: Experiences and evolving strategies*. *Bioanalysis*, 2014. **6**(24): p. 3337-3348.
34. Korfmacher, W.A., *Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery*. *Drug Discov*, 2005. **10**(20): p. 1357-1367.
35. Zambon, S., S. Fontana, and M. Kajbaf, *Evaluation of cytochrome p450 inhibition assays using human liver microsomes by a cassette analysis /LC-MS/MS*. *Drug Metab Lett*, 2010. **4**(3): p. 120-128.
36. Peng, Y., et al., *A comprehensive assay for nine major cytochrome P450 enzymes activities with 16 probe reactions on human liver microsomes by a single LC/MS/MS run to support reliable in vitro inhibitory drug-drug interaction evaluation*. *Xenobiotica*, 2015. **45**(11): p. 961-77.

37. Reichel, A. and P. Lienau, *Pharmacokinetics in drug discovery: an exposure-centred approach to optimising and predicting drug efficacy and safety*, in *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2016. p. 235-260.
38. Jirkovsky, E., et al., *Pharmacokinetics of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane and Its Active Metabolite ADR-925 with Focus on Cardiomyocytes and the Heart*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018. **364**(3): p. 433-446.
39. Meng, M. and P.K. Bennett, *Method development, validation, and sample analysis for regulated quantitative bioanalysis using LC-MS/MS*, in *LC-MS in Drug Bioanalysis*. 2012. p. 33-66.
40. Junaid, T., et al., *Therapeutic Drug Monitoring*, in *Clinical Pharmacy Education, Practice and Research*. 2019. p. 425-436.
41. Usman, M., et al., *Forensic toxicological analysis of hair: a review*. *Egyptian J Forensic Sci*, 2019. **9**(1).
42. Wu, A.H.B. and K.L. Lynch, *Therapeutic drug monitoring to support clinical pharmacogenomics*, in *LC-MS in Drug Bioanalysis*. 2012. p. 127-141.
43. Shibata, M., et al., *Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring*. *Biomed Chromatogr*, 2012. **26**(12): p. 1519-28.
44. Gao, S., et al., *Rapid and sensitive liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the analysis of paclitaxel, docetaxel, vinblastine, and vinorelbine in human plasma*. *Ther Drug Monit*, 2014. **36**(3): p. 394-400.
45. Said, R., et al., *Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC-MS/MS allowing automated sample work-up and analysis*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012. **897**: p. 42-9.
46. Barco, S., et al., *Volumetric adsorptive microsampling-liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of four antibiotics in human blood: Method development, validation and comparison with dried blood spot*. *J Pharm Biomed Anal*, 2017. **145**: p. 704-710.
47. Yamada, E., et al., *Determination of abacavir, tenofovir, darunavir, and raltegravir in human plasma and saliva using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. *J Pharm Biomed Anal*, 2015. **114**: p. 390-7.
48. Decosterd, L.A., et al., *Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-N-oxide, anidulafungin, and caspofungin*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(12): p. 5303-15.
49. Ramírez Fernández, M.D.M., S.M.R. Wille, and N. Samyn, *Quantitative method validation for the analysis of 27 antidepressants and metabolites in plasma with ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Ther Drug Monit*, 2012. **34**(1): p. 11-24.
50. Deltombe, O., et al., *Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography - high resolution mass spectrometry method for the quantification of total and free teicoplanin in human plasma*. *Clin Biochem*, 2019. **65**: p. 29-37.
51. Tanna, S., et al., *Volumetric absorptive microsampling (VAMS) coupled with high-resolution, accurate-mass (HRAM) mass spectrometry as a simplified alternative to dried blood spot (DBS) analysis for therapeutic drug monitoring of cardiovascular drugs*. *Clin Mass Spectrom*, 2018. **10**: p. 1-8.

52. Wagmann, L., et al., *Method development for quantitative determination of seven statins including four active metabolites by means of high-resolution tandem mass spectrometry applicable for adherence testing and therapeutic drug monitoring*. Clin Chem Lab Med, 2020. **58**(5): p. 664-672.
53. European Medicine Agency., *Guideline on the investigation of bioequivalence*. 2010; Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf) [Zobrazeno 15.10.2020]
54. U.S. Food and Drug Administration, *Guidance for industry: Bioequivalence studies with pharmacokinetic endpoints for drugs submitted under ANDA draft guidance*. 2013; Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/87219/download>, [Zobrazeno 14.10.2020]
55. Evans, S.R., *Clinical trial structures*. J Exp Stroke Transl Med, 2010. **3**(1): p. 8-18.
56. Pedersen-Bjergaard, S., A. Gjelstad, and T.G. Halvorsen, *Sample Preparation*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Chromatography and Mass Spectrometry*. 2015. p. 73-122.
57. Novakova, L., *Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis*. J Chromatogr A, 2013. **1292**: p. 25-37.
58. Novakova, L. and H. Vlckova, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation*. Anal Chim Acta, 2009. **656**(1-2): p. 8-35.
59. Poole, C., et al., *Extraction for analytical scale sample preparation (IUPAC Technical Report)*. Pure Appl Chem, 2016. **88**(7): p. 649-687.
60. Saito, Y. and K. Nakagami, *Sample preparation for the analysis of drugs in biological fluids*, in *Handbook of Analytical Separations*. 2020. p. 1-13.
61. Kataoka, H., *Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis*. Anal Bioanal Chem, 2010. **396**(1): p. 339-64.
62. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers*. Anal Chem, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
63. da Silva, L.F., D.A. Vargas Medina, and F.M. Lanças, *Automated needle-sleeve based online hyphenation of solid-phase microextraction and liquid chromatography*. Talanta, 2021. **221**.
64. Ishizaki, A. and H. Kataoka, *A sensitive method for the determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream and sidestream smokes of combustion cigarettes and heated tobacco products by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2019. **1075**: p. 98-105.
65. Kaziur-Cegla, W., et al., *Optimization and validation of automated solid-phase microextraction arrow technique for determination of phosphorus flame retardants in water*. J Chromatogr A, 2020. **1626**: p. 461349.
66. Wang, Y., et al., *A polymeric solid-phase microextraction fiber for the detection of pharmaceuticals in water samples*. J Chromatogr A, 2020. **1623**: p. 461171.
67. Gorynski, K., A. Kiedrowicz, and B. Bojko, *Development of SPME-LC-MS method for screening of eight beta-blockers and bronchodilators in plasma and urine samples*. J Pharm Biomed Anal, 2016. **127**: p. 147-55.
68. De Giovanni, N. and D. Marchetti, *A Systematic Review of Solid-Phase Microextraction Applications in the Forensic Context*. J Anal Toxicol, 2020. **44**(3): p. 268-297.

69. Li, F. and B. Musselman, *High-Throughput Extraction and Detection of Drugs in Urine: Parallel Sampling with Solid-Phase Microextraction (SPME) Fibers Coupled with Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry (DART-MS) Detection*, in *Methods in Molecular Biology*. 2018. p. 97-106.
70. Terzopoulou, Z., et al., *Preparation of molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for the selective removal and extraction of the antiviral drug abacavir in environmental and biological matrices*. *Anal Chim Acta*, 2016. **913**: p. 63-75.
71. Khaled, A., J.R. Belinato, and J. Pawliszyn, *Rapid and high-throughput screening of multi-residue pharmaceutical drugs in bovine tissue using solid phase microextraction and direct analysis in real time-tandem mass spectrometry (SPME-DART-MS/MS)*. *Talanta*, 2020. **217**: p. 121095.
72. Wang, S., et al., *Molecularly imprinted polymers prepared from a single cross-linking functional monomer for solid-phase microextraction of estrogens from milk*. *J Chromatogr A*, 2020. **1627**: p. 461400.
73. Bessonneau, V., et al., *In vivo solid-phase microextraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring blood eicosanoids time profile after lipopolysaccharide-induced inflammation in Sprague-Dawley rats*. *J Chromatogr A*, 2015. **1424**: p. 134-8.
74. Napylov, A., et al., *In Vivo Solid-Phase Microextraction for Sampling of Oxylipins in Brain of Awake, Moving Rats*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020. **59**(6): p. 2392-2398.
75. Riboni, et al., *Recent Advances in In Vivo SPME Sampling*. *Separations*, 2020. **7**(1).
76. Abdel-Rehim, M., *New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004. **801**(2): p. 317-21.
77. Moein, M.M., A. Abdel-Rehim, and M. Abdel-Rehim, *Microextraction by packed sorbent (MEPS)*. *TrAC*, 2015. **67**: p. 34-44.
78. Pereira, J.A.M., et al., *Current trends on microextraction by packed sorbent - fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications*. *Analyst*, 2019. **144**(17): p. 5048-5074.
79. Moein, M.M., R. Said, and M. Abdel-Rehim, *Microextraction by packed sorbent*. *Bioanalysis*, 2015. **7**(17): p. 2155-2161.
80. Moein, M.M., et al., *Solid Phase Microextraction and Related Techniques for Drugs in Biological Samples*. *J Anal Methods Chem*, 2014. **2014**: p. 1-24.
81. Abdel-Rehim, M., *Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial*. *Anal Chim Acta*, 2011. **701**(2): p. 119-28.
82. Yang, L., R. Said, and M. Abdel-Rehim, *Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017. **1043**: p. 33-43.
83. Alves, V., et al., *An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine*. *J Chromatogr A*, 2015. **1408**: p. 30-40.
84. Locatelli, M., et al., *Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine*. *J Chromatogr A*, 2014. **1367**: p. 1-8.

85. Ares, A.M., et al., *A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC-MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid*. *Talanta*, 2017. **174**: p. 454-461.
86. Sergi, M., et al., *Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids*. *J Chromatogr A*, 2013. **1301**: p. 139-46.
87. Grueiro Noche, G., et al., *Determination of chlorobenzenes in water samples based on fully automated microextraction by packed sorbent coupled with programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem*, 2013. **405**(21): p. 6739-48.
88. Sanchez Mdel, N., et al., *Microextraction by packed sorbent and salting-out-assisted liquid-liquid extraction for the determination of aromatic amines formed from azo dyes in textiles*. *Talanta*, 2014. **119**: p. 375-84.
89. Kaur, R., et al., *Simple and rapid determination of phthalates using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometry quantification in cold drink and cosmetic samples*. *J Sep Sci*, 2016. **39**(5): p. 923-31.
90. Perestrelo, R., C.L. Silva, and J.S. Camara, *Quantification of furanic derivatives in fortified wines by a highly sensitive and ultrafast analytical strategy based on digitally controlled microextraction by packed sorbent combined with ultrahigh pressure liquid chromatography*. *J Chromatogr A*, 2015. **1381**: p. 54-63.
91. Seidi, S., et al., *Micro solid-phase extraction (pipette tip and spin column) and thin film solid-phase microextraction: Miniaturized concepts for chromatographic analysis*. *TrAC*, 2019. **118**: p. 810-827.
92. Vlčková, H., et al., *Micro-SPE in pipette tips as a tool for analysis of small-molecule drugs in serum*. *Bioanalysis*, 2017. **9**(11): p. 887-901.
93. Svačinová, J., et al., *A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction*. *Plant Methods*, 2012. **8**(1).
94. Mompo-Rosello, O., et al., *Extraction of beta-blockers from urine with a polymeric monolith modified with 1-allyl-3-methylimidazolium chloride in spin column format*. *Talanta*, 2020. **214**: p. 120860.
95. Abdallah, N.M.A., A.M. Zaki, and S.A. Abdel-Salam, *Stability of MERS-CoV RNA on spin columns of RNA extraction kit at room temperature*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2020. **98**(4): p. 115182.
96. Sayed, I.M., et al., *Enhancement of the Molecular and Serological Assessment of Hepatitis E Virus in Milk Samples*. *Microorganisms*, 2020. **8**(8).
97. Dimayacyac-Esleta, B.R., et al., *Rapid High-pH Reverse Phase StageTip for Sensitive Small-Scale Membrane Proteomic Profiling*. *Anal Chem*, 2015. **87**(24): p. 12016-23.
98. Rappsilber, J., Y. Ishihama, and M. Mann, *Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics*. *Anal Chem*, 2003. **75**(3): p. 663-670.
99. DPX Technologies. *INTip SPE vs Traditional SPE*. 2019; Dostupné z: <https://dpxtechnologies.com/intip-spe-vs-traditional-spe/>. [Zobrazeno 20.10.2020]
100. AFFINISEP, *AttractSPE™Disks: Spinnable, Automatable High throughput HTS Micro-SPE for Microextraction*. p. 1-26.

101. Ja-Hely Science, H., Future. *Gel Extraction PCR Product Cleanup 2ml Nucleic Acid Purification Column DNA spin column without cap*. Dostupné z: [http://www.hely-ware.com/Other\\_filters/2ml%20Nucleic%20Acid%20Purification%20Column.html](http://www.hely-ware.com/Other_filters/2ml%20Nucleic%20Acid%20Purification%20Column.html). [Zobrazeno 1.3.2021]
102. Brewer, W.E., *Dispersive pipette extraction tip and methods for use*, in U. S. Patent US20150011016A1. 2015.
103. Mozaner Bordin, D.C., et al., *A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. J Anal Toxicol, 2014. **38**(1): p. 31-8.
104. Guan, H. and K. Stewart, *Determination of Explosives in Water Using Disposable Pipette Extraction and High Performance Liquid Chromatography*. Anal Lett, 2014. **47**(8): p. 1434-1447.
105. Guan, H., W.E. Brewer, and S.L. Morgan, *New approach to multiresidue pesticide determination in foods with high fat content using disposable pipette extraction (DPX) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(22): p. 10531-8.
106. Li, Z., et al., *Multiresidue analysis of 58 pesticides in bean products by disposable pipet extraction (DPX) cleanup and gas chromatography-mass spectrometry determination*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(19): p. 4788-98.
107. Mastrianni, K.R., et al., *Analysis of 10 beta-agonists in pork meat using automated dispersive pipette extraction and LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018. **1084**: p. 64-68.
108. Li, X.-S., et al., *Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation*. TrAC, 2013. **45**: p. 233-247.
109. Wierucka, M. and M. Biziuk, *Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples*. TrAC, 2014. **59**: p. 50-58.
110. Khezeli, T. and A. Daneshfar, *Development of dispersive micro-solid phase extraction based on micro and nano sorbents*. TrAC, 2017. **89**: p. 99-118.
111. Madej, K. and W. Piekoszewski, *Modern Approaches to Preparation of Body Fluids for Determination of Bioactive Compounds*. Separations, 2019. **6**(4).
112. Kepekci Tekkeli, Ş.E. and Z. Durmus, *Magnetic solid phase extraction applications combined with analytical methods for determination of drugs in different matrices review*. J Chil Chem Soc, 2019. **64**(2): p. 4448-4458.
113. Jamshidi, S., M.K. Rofouei, and G. Thorsen, *Using magnetic core-shell nanoparticles coated with an ionic liquid dispersion assisted by effervescence powder for the micro-solid-phase extraction of four beta blockers from human plasma by ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection*. J Sep Sci, 2019. **42**(3): p. 698-705.
114. Jangju, A., et al., *Application of zein-modified magnetite nanoparticles in dispersive magnetic micro-solid-phase extraction of synthetic food dyes in foodstuffs*. J Sep Sci, 2017. **40**(6): p. 1343-1352.
115. Ma, J., et al., *Magnetic solid-phase extraction of heterocyclic pesticides in environmental water samples using metal-organic frameworks coupled to high performance liquid chromatography determination*. J Chromatogr A, 2018. **1553**: p. 57-66.
116. Ernst, C., et al., *Improved DNA extraction and purification with magnetic nanoparticles for the detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol, 2019. **230**: p. 45-48.

117. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*. Anal Chem, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
118. Liu, H. and P.K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop*. TrAC, 1996. **15**(9): p. 468-475.
119. Hansen, F., E.L. Oiestad, and S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 2020. **189**: p. 113446.
120. Chormey, D.S., et al., *Liquid phase microextraction strategies and their application in the determination of endocrine disruptive compounds in food samples*. TrAC, 2020. **128**.
121. Tang, S., et al., *Single-drop microextraction*. TrAC, 2018. **108**: p. 306-313.
122. An, J., K.L. Rahn, and J.L. Anderson, *Headspace single drop microextraction versus dispersive liquid-liquid microextraction using magnetic ionic liquid extraction solvents*. Talanta, 2017. **167**: p. 268-278.
123. Mafra, G., et al., *Single drop microextraction in a 96-well plate format: A step toward automated and high-throughput analysis*. Anal Chim Acta, 2019. **1063**: p. 159-166.
124. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Anal Chem, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
125. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. TrAC, 2004. **23**(1): p. 1-10.
126. Pedersen-Bjergaard, S., *Microextraction with supported liquid membranes*, in *Liquid-Phase Extraction*. 2019. p. 241-263.
127. Gjelstad, A., *Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction*. TrAC, 2019. **113**: p. 25-31.
128. Gjelstad, A., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction: Micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): p. 1377-1385.
129. Gjelstad, A., et al., *High-throughput liquid-liquid extraction in 96-well format: Parallel artificial liquid membrane extraction*. LC-GC North America, 2017. **35**(3): p. 192-196.
130. Tung, S.H., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction*. J Chrom Sci, 2006. **44**(6): p. 308-316.
131. Pilarova, V., et al., *One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017. **1043**: p. 25-32.
132. Vardal, L., et al., *Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, 2018. **410**(20): p. 4967-4978.
133. Ask, K.S., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma*. J Pharm Biomed Anal, 2016. **129**: p. 229-236.
134. Vardal, L., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017. **1048**: p. 77-84.

135. Roldan-Pijuan, M., S. Pedersen-Bjergaard, and A. Gjelstad, *Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**(10): p. 2811-9.
136. Olsen, K.N., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction of psychoactive analytes: A novel approach in therapeutic drug monitoring*. *Bioanalysis*, 2018. **10**(6): p. 385-395.
137. Rezaee, M., et al., *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. *J Chromatogr A*, 2006. **1116**(1-2): p. 1-9.
138. Sajid, M. and K. Alhooshani, *Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review*. *TrAC*, 2018. **108**: p. 167-182.
139. Zhou, G.S., et al., *Hydrophilic interaction chromatography combined with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination of underivatized neurotransmitters in dementia patients' urine samples*. *Anal Chim Acta*, 2020. **1107**: p. 74-84.
140. Jain, R. and R. Singh, *Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016. **75**: p. 227-237.
141. Majors, R.E., *Supported liquid extraction: The best-kept secret in sample preparation*. *LC GC Europe*, 2012. **25**(8): p. 430-435.
142. Wong, J.K.Y., et al., *A high-throughput and broad-spectrum screening method for analysing over 120 drugs in horse urine using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry*. *Drug Test Anal*, 2020. **12**(7): p. 900-917.
143. Jiang, H., et al., *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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012. **891-892**: p. 71-80.
144. Liang, X., et al., *Simultaneous determination of itraconazole, hydroxy itraconazole, keto itraconazole and N-desalkyl itraconazole concentration in human plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016. **1020**: p. 111-9.
145. Ong, R.S., et al., *Simultaneous analysis of 29 synthetic cannabinoids and metabolites, amphetamines, and cannabinoids in human whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry – A New Zealand perspective of use in 2018*. *Drug Test Anal*, 2020. **12**(2): p. 195-214.
146. Voegel, C.D., et al., *Simultaneous quantification of steroid hormones and endocannabinoids (ECs) in human hair using an automated supported liquid extraction (SLE) and LC-MS/MS – Insights into EC baseline values and correlation to steroid concentrations*. *Talanta*, 2021. **222**.
147. Nguyen, L., et al., *Quantitative analysis of PD 0332991 in xenograft mouse tumor tissue by a 96-well supported liquid extraction format and liquid chromatography/mass spectrometry*. *J Pharm Biomed Anal*, 2010. **53**(3): p. 228-34.
148. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. *J Chromatogr A*, 2006. **1109**(2): p. 183-90.
149. Rezazadeh, M., et al., *One-way and two-way pulsed electromembrane extraction for trace analysis of amino acids in foods and biological samples*. *Anal Chim Acta*, 2013. **773**: p. 52-9.
150. Strieglerova, L., P. Kuban, and P. Bocek, *Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively*



- coupled contactless conductivity detection*. J Chromatogr A, 2011. **1218**(37): p. 6248-55.
151. Seidi, S., et al., *Electromembrane extraction of levamisole from human biological fluids*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(5): p. 585-593.
  152. Asadi, S., H. Tabani, and S. Nojavan, *Application of polyacrylamide gel as a new membrane in electromembrane extraction for the quantification of basic drugs in breast milk and wastewater samples*. J Pharm Biomed Anal, 2018. **151**: p. 178-185.
  153. Petersen, N.J., et al., *Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(9): p. 1496-502.
  154. Payan, M.D., et al., *Nano-electromembrane extraction*. Anal Chim Acta, 2013. **785**: p. 60-6.
  155. Petersen, N.J., et al., *On-chip electro membrane extraction*. Microfluid Nanofluidics, 2010. **9**(4-5): p. 881-888.
  156. Eibak, L.E., et al., *Parallel electromembrane extraction in the 96-well format*. Anal Chim Acta, 2014. **828**: p. 46-52.
  157. Eibak, L.E., et al., *Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(2): p. 431-40.
  158. Drouin, N., et al., *Development of a New Extraction Device Based on Parallel-Electromembrane Extraction*. Anal Chem, 2017. **89**(12): p. 6346-6350.
  159. Hansen, F.A., et al., *Electromembrane extraction of highly polar bases from biological samples – Deeper insight into bis(2-ethylhexyl) phosphate as ionic carrier*. Anal Chim Acta, 2020. **1115**: p. 23-32.
  160. Vardal, L., et al., *Electromembrane extraction with solvent modification of the acceptor solution: improved mass transfer of drugs of abuse from human plasma*. Bioanalysis, 2019. **11**(8): p. 755-771.
  161. Gjelstad, A., et al., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. J Chromatogr A, 2007. **1157**(1-2): p. 38-45.
  162. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation*. J Chromatogr A, 2007. **1174**(1-2): p. 104-11.
  163. Huang, C.X., A. Gjelstad, and S. Pedersen-Bjergaard, *Organic solvents in electromembrane extraction: recent insights*. Rev in Anal Chem, 2016. **35**(4): p. 169-183.
  164. Huang, C., et al., *Mass transfer in electromembrane extraction-The link between theory and experiments*. Journal of Separation Science, 2016. **39**(1): p. 188-197.
  165. Nojavan, S. and A.R. Fakhari, *Electromembrane extraction combined with capillary electrophoresis for the determination of amlodipine enantiomers in biological samples*. J Sep Sci, 2010. **33**(20): p. 3231-8.
  166. Balchen, M., et al., *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. J Chromatogr A, 2007. **1152**(1-2): p. 220-5.
  167. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions*. Anal Bioanal Chem, 2009. **393**(3): p. 921-8.
  168. Eibak, L.E., et al., *Kinetic electro membrane extraction under stagnant conditions--fast isolation of drugs from untreated human plasma*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(31): p. 5050-6.
  169. Yu, X., et al., *Electromembrane extraction of chlorprothixene, haloperidol and risperidone from whole blood and urine*. J Chromatogr A, 2020. **1629**: p. 461480.

170. Vårdal, L., et al., *Electromembrane extraction with solvent modification of the acceptor solution: Improved mass transfer of drugs of abuse from human plasma*. *Bioanalysis*, 2019. **11**(8): p. 755-771.
171. Hansen, F.A. and S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction of streptomycin from biological fluids*. *J Chromatogr A*, 2021. **1639**: p. 461915.
172. Restan, M.S., et al., *Towards exhaustive electromembrane extraction under stagnant conditions*. *Anal Chim Acta*, 2020. **1104**: p. 1-9.
173. Taft, R.W. and M.J. Kamlet, *The Solvatochromic Comparison Method. 2. The  $\alpha$ -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities*. *J Am Chem Soc*, 1976. **98**(10): p. 2886-2894.
174. Kamlet, M.J. and R.W. Taft, *The Solvatochromic Comparison Method. I. The  $\beta$ -Scale Of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities*. *J Am Chem Soc*, 1976. **98**(2): p. 377-383.
175. Kamlet, M.J., J.L. Abboud, and R.W. Taft, *The Solvatochromic Comparison Method. 6. The  $\pi^*$  Scale of Solvent Polarities I*. *J Am Chem Soc*, 1977. **99**(18): p. 6027-6038.
176. R., S. Kamlet-Taft solvent parameters. duben 2020; Dostupné z: <http://www.stenutz.eu/chem/solv26.php>, [Zobrazeno 28.2.2021]
177. Huang, C., et al., *Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: a new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma*. *J Chromatogr A*, 2014. **1326**: p. 7-12.
178. Tabani, H., et al., *Electrically assisted liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for quantification of propranolol enantiomers in human body fluids*. *Chirality*, 2014. **26**(5): p. 260-7.
179. Drouin, N., S. Rudaz, and J. Schappler, *New supported liquid membrane for electromembrane extraction of polar basic endogenous metabolites*. *J Pharm Biomed Anal*, 2018. **159**: p. 53-59.
180. Seip, K.F., et al., *Electromembrane extraction of peptides--fundamental studies on the supported liquid membrane*. *J Sep Sci*, 2011. **34**(23): p. 3410-7.
181. Huang, C., A. Gjelstad, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction with alkylated phosphites and phosphates as supported liquid membranes*. *J Membr Sci*, 2017. **526**: p. 18-24.
182. Huang, C., et al., *Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis(2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane*. *Anal Chim Acta*, 2016. **934**: p. 80-7.
183. Pedersen-Bjergaard, S., C. Huang, and A. Gjelstad, *Electromembrane extraction-Recent trends and where to go*. *J Pharm Anal*, 2017. **7**(3): p. 141-147.
184. Koruni, M.H., et al., *An all-in-one electro-membrane extraction: development of an electro-membrane extraction method for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs with a wide range of polarities*. *J Chromatogr A*, 2014. **1361**: p. 95-9.
185. Petersen, N.J., et al., *Electromembrane extraction from biological fluids*. *Anal Sci*, 2011. **27**(10): p. 965-972.
186. Huang, C., et al., *Electromembrane extraction for pharmaceutical and biomedical analysis - Quo vadis*. *J Pharm Biomed Anal*, 2015. **113**: p. 97-107.
187. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. *J Chromatogr A*, 2008. **1184**(1-2): p. 132-42.

188. Khan, W.A., et al., *Hollow fiber-based liquid phase microextraction followed by analytical instrumental techniques for quantitative analysis of heavy metal ions and pharmaceuticals*. J Pharm Anal, 2020. **10**(2): p. 109-122.
189. European Medicines Agency., *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011; Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf), [Zobrazeno 15.1.2021]
190. U.S. Food and Drug Administration, *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018; Dostupné z: [Zobrazeno 15.1.2021]
191. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(2): p. 185-229.
192. Cochran, T.R., et al., *Anthracycline, Trastuzumab, and Cardiovascular Toxicity, in Comprehensive Toxicology: Third Edition*. 2018. p. 432-446.
193. *Souhrn údajů o přípravku Doxorubicin Teva*. 30.5.2020; Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0139065&tab=texts>, [Zobrazeno 26.2.2021]
194. *Souhrn údajů o přípravku Vyxeos Liposomal*. 23. 8. 2021; Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0238217&tab=texts>, [Zobrazeno 26.2.2021]
195. *Souhrn údajů o přípravku Epimedac*. 9. 4. 2020; Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0113438&tab=texts>. [Zobrazeno 26.2.2021]
196. *Souhrn údajů o přípravku Idarubicin Accord*. 13.2.2019; Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0242258&tab=texts>. [Zobrazeno 26.2.2021]
197. Lipshultz, S.E., et al., *Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(12): p. 697-710.
198. Schaupp, C.M., et al., *Metabolism of doxorubicin to the cardiotoxic metabolite doxorubicinol is increased in a mouse model of chronic glutathione deficiency: A potential role for carbonyl reductase 3*. Chem Biol Interact, 2015. **234**: p. 154-61.
199. Sakai-Kato, K., et al., *Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites*. Chem Pharm Bull, 2012. **60**(3): p. 391-396.
200. Maudens, K.E., et al., *Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(30): p. 3907-15.
201. Olson, R.D., et al., *Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3585-9.
202. Zhang, S., et al., *Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Nat Med, 2012. **18**(11): p. 1639-42.
203. Creighton, A.M., K. Hellmann, and S. Whitecross, *Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines [23]*. Nature, 1969. **222**(5191): p. 384-385.
204. Herman, E.H., et al., *Prevention of the Cardiotoxic Effects of Adriamycin and Daunomycin in the Isolated Dog Heart*. Proc Soc Exp Biol Med, 1972. **140**(1): p. 234-239.
205. Jirkovský, E., et al., *Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane each show different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits*. Toxicology, 2013. **311**(3): p. 191-204.

206. Herman, E.H., et al., *A review of the preclinical development of dexrazoxane*. Prog Pediatr Cardiol, 2014. **36**(1-2): p. 33-38.
207. van Dalen, E.C., et al., *Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines*. Cochrane Database Syst Rev, 2011. **2011**(6).
208. Hasinoff, B.B., et al., *Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines*. Curr Med Chem, 1998. **5**(1): p. 1-28.
209. Šimůnek, T., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 154-171.
210. Jirkovská-Vávrová, A., 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*. Toxicol. Res., 2015. **4**(4): p. 1098-1114.
211. Tanabe, K., et al., *Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives*. Cancer Res, 1991. **51**(18): p. 4903-8.
212. Vavrova, A., et al., *Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76676.
213. Bures, J., 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**: p. 1-10.
214. Hasinoff, B.B., D. Patel, and X. Wu, *A QSAR study that compares the ability of bisdioxopiperazine analogs of the doxorubicin cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) to protect myocytes with DNA topoisomerase II inhibition*. Toxicol Appl Pharmacol, 2020. **399**: p. 115038.
215. Herman, E.H., et al., *Comparison of the protective effect of ICRF-187 and structurally related analogues against acute daunorubicin toxicity in Syrian golden hamsters*. Res Comm in Chem Pathol Pharmacol, 1985. **48**(1): p. 39-55.
216. Jirkovska-Vavrova, A., 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*. Toxicol Res, 2015. **4**(4): p. 1098-1114.
217. Lu, D.Y. and T.R. Lu, *Anticancer activities and mechanisms of bisdioxopiperazine compounds probimane and MST-16*. Anticancer Agents Med Chem, 2010. **10**(1): p. 78-91.
218. Narita, T., et al., *Antitumor activity of MST-16, a novel derivative of bis(2,6-dioxopiperazine), in murine tumor models*. Cancer Chemother Pharmacol, 1990. **26**(3): p. 193-7.
219. Narita, T., et al., *Antitumor activities and schedule dependence of orally administered MST-16, a novel derivative of bis(2,6-dioxopiperazine)*. Cancer Chemother Pharmacol, 1991. **28**(4): p. 235-40.
220. Snapka, R.M., et al., *Inhibition of topoisomerase II by ICRF-193, the meso isomer of 2,3-bis(2,6-dioxopiperazin-4-yl)butane: Critical dependence on 2,3-butanediyl linker absolute configuration*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(4): p. 543-549.
221. Herman, E.H., et al., *Comparison of the protective effects against chronic doxorubicin cardiotoxicity and the rates of iron (III) displacement reactions of ICRF-187 and other bisdiketopiperazines*. Cancer Chemother Pharmacol, 1997. **40**(5): p. 400-408.
222. Kovarikova, P., 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.* J Pharm Biomed Anal, 2013. **76**: p. 243-51.
223. Hasinoff, B.B., et al., *A QSAR study comparing the cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory effects of bisdioxopiperazine analogs of ICRF-187 (dexrazoxane).* Biochem Pharmacol, 1995. **50**(7): p. 953-958.



# Přílohy

# Příloha č. 1

Kollárová-Brázdová P., Jirkovská A., Karabanovich G., Pokorná Z., Roh J., Jirkovský E., **Bavlovič Piskáčková H.**, Reimerová P., Mazurová Y., Adamcová M., Skalická V., Štěrbová-Kovaříková P., Šimůnek T., Štěrba M.

*Investigation of close dexrazoxane derivatives reveals topoisomerase II $\beta$  interaction as a pre-requisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity.*

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2020; 373(3):402-415

**IF<sub>2019</sub> = 3,561 (Q1)**



## Příloha č. 2

Reimerová P., Jirkovská A., **Bavlovič Piskáčková H.**, Karabanovich G., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P.

*UHPLC-MS/MS method for analysis of sobuzoxane, its active form ICRF-154 and metabolite EDTA-diamide and its application to bioactivation study.*

Scientific Reports 2019; 9:4524

**IF<sub>2019</sub> = 3.998 (Q1)**

## Příloha č. 3

**Bavlovič Piskáčková H.**, Jansová H., Kubeš J., Karabanovich G., Váňová N., Kollárová-Brázdová P., Melnikova J., Jirkovská A., Lenčová-Popelová O., Chládek J., Roh J., Šimůnek T., Štěrba M., Štěrbová-Kovaříková P.

*Development of water-soluble pro-drugs of bisdioxopiperazine topoisomerase II $\beta$  inhibitor ICRF 193 as potential cardioprotective agents against anthracycline cardiotoxicity.*

Scientific Reports 2021; 11: 4456

**IF<sub>2019</sub> = 3.998 (Q1)**

## Příloha č. 4

**Bavlovič Piskáčková H., Øiestad E.L., Váňová N., Lengvarská J., Štěřbová-Kovařiková P., Pedersen-Bjergaard S.**

*Electromembrane extraction of anthracyclines from plasma: Comparison with conventional extraction techniques.*

Talanta 2021; 223: 121748

**IF<sub>2019</sub> = 5.339 (Q1)**