

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



# Diplomová práce

Využití LC-MS/MS v *in vitro* transportních experimentech

2022

Šárka Salvová

# PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne 08.05.2022

.....

podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce PharmDr. Nele Váňové, Ph.D. za cenné rady, podměty a zejména za obrovskou trpělivost a pomoc během řešení diplomové práce.

A další obrovské poděkování patří rodině za trpělivost a podporu během celého mého studia.

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**Autor:** Šárka Salvová

**Vedoucí diplomové práce:** PharmDr. Nela Váňová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Využití LC-MS/MS v *in vitro* transportních experimentech

Gilteritinib, léčivo ze skupiny antineoplastik, se využívá k cílené protinádorové terapii. Řadí se k inhibitorům tyrosinkinázových receptorů. Jeho struktura je založena na pyrazinkarboxamidovém skeletu. Doposud byl chromatograficky stanovován v biologickém materiálu pouze z plazmy. V této diplomové práci byl gilteritinib stanovován z buněčného média Opti-MEM za účelem využití pro *in vitro* transportní experimenty a následně byla optimalizovaná a validovaná metoda LC-MS/MS. V průběhu vývoje a optimalizace LC-MS/MS metody byla u hmotnostního spektrometru Thermo Finnigan LCQ Advantage Max Ion Trap s narůstajícím počtem nástřiků pozorována zvyšující se suprese signálu pro gilteritinib i jeho vnitřní standard (maravirok), která dosahovala až 75 % po pouhých 30 nástřicích. Také byla viditelná kontaminace vstupu na iontransferovou kapiláru, ke které je iontový zdroj (elektrosprej) umístěn diagonálně. Dále bylo testováno, zdali jiná konstrukce iontového zdroje (ortogonální poloha elektrospreje) problém nevyřeší. Po transferu metody na chromatografický systém Shimadzu LCMS 8030 (trojitý kvadrupól) nebyla ani po 100 nástřicích zaznamenána žádná významná suprese signálu analytů, ani kontaminace. Výsledná chromatografická separace probíhala na koloně Hypersil Gold C18 (100 × 4,6 mm, 3 μm) při 40 °C v isokratickém módu, kde vodnou složku mobilní fáze tvořila 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a organickou metanol při průtoku (1:1, v/v) 0,350 ml/min. Pro analýzu byly použity následující přechody: analýza probíhala v režimu SRM s následujícími iontovými přechody: GIL  $[M+H]^+$   $m/z = 553$  (CE -27, -34) →  $m/z 436, 353$  a IS  $[M+H]^+$   $m/z = 514$  (CE -20) →  $m/z 389$ .

V případě validace metody, při které byly kladeny požadavky na selektivitu, linearitu, přesnost a preciznost, matricový efekt a stabilitu, bylo dosaženo hodnot, které splňují

podmínky směrnice Evropské lékové agentury (EMA). Metoda jako taková je připravena pro aplikaci na reálné vzorky.

# ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department:** Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

**Candidate:** Šárka Salvová

**Supervisor:** PharmDr. Nela Váňová, Ph.D.

**Title of Thesis:** Application of LC-MS/MS methods to *in vitro* transport experiments

Gilteritinib, an antineoplastic drug, is used for targeted anticancer therapy. It belongs to the group of receptor tyrosine kinase inhibitors. Its structure is based on a pyrazinecarboxamide skeleton. So far, it has been chromatographically determined in biological material only from plasma. In this diploma thesis, gilteritinib was analyzed from Opti-MEM cell medium to be used *in vitro* transport experiments. Subsequently the LC-MS/MS method was optimized and validated. During progression and optimization of the LS-MS/MS method, the Thermo Finnigan LCQ Advantage Max Ion Trap was observed that with an increasing number of injections had been shown increasing signal suppression for gilteritinib and its internal standard (maraviroc), which reached up to 75 % after only 30 sprays. Contamination of the inlet to the ion transfer capillary, to which the ion source (electrospray) is placed diagonally, was also visible. Thereafter it was tested whether another construction of the ion source (orthogonal position of electrospray) will not solve the problem. After the transfer of the method to the Shimadzu LCMS 8030 (triple quadrupole), no significant suppression of the analyte signal or contamination was observed even after 100 injections. Final chromatographic separation was performed on a Hypersil Gold C18 column (100 × 4,6 mm, 3 μm) at 40°C in isocratic mode, where the aqueous part of the mobile phase consisted of 0,1% formic acid in water and organic phase composed of methanol (1:1, v/v) at flow rate 0,350 mL/min. The following transitions were used for the analysis: analysis was performed in SRM mode with the following ionic transitions: GIL [M+H]<sup>+</sup> m/z = 553 (CE -27, -34) → m/z 436, 353 a IS [M+H]<sup>+</sup> m/z = 514 (CE -20) → m/z 389.

In the case of validation of the method, in which requirements were imposed on selectivity, linearity, accuracy and precision, matrix effect and stability, values obtained meets the requirements of the European Medicines Agency (EMA). As such, the method is ready for application to real samples.



## OBSAH

Seznam použitých zkratek .....	10
1 Teoretická část .....	12
1.1 Gilteritinib .....	12
1.1.1 Chemická struktura gilteritinibu .....	12
1.1.2 Mechanismus účinku .....	13
1.1.3 Využití ve farmakoterapii .....	14
1.1.4 Stanovení gilteritinibu v biologickém materiálu .....	14
1.2 Transportní experimenty .....	17
1.3 Chromatografie .....	17
1.3.1 Chromatografická separace.....	17
1.3.2 Instrumentace HPLC.....	19
1.3.3 Role LC-MS v bioanalýze .....	27
1.3.4 Validacionní parametry.....	27
2 Cíl práce.....	33
3 Experimentální část .....	34
3.1 Chemikálie a spotřební materiál.....	34
3.2 Přístrojové vybavení a software .....	34
3.3 Příprava roztoků .....	35
3.3.1 Zásobní a pracovní roztoky.....	35
3.3.2 Roztoky pro přípravu kalibrační přímky a validaci metody .....	35
3.3.3 Roztoky pro hodnocení matricového efektu .....	36
3.3.4 Roztoky pro stabilitu.....	37
3.3.5 Zpracování vzorků .....	37
3.4 Chromatografické metody – LC/MS.....	38





---

4	Výsledky a Diskuze .....	40
4.1	Transfer chromatografické metody z LCQ na QQQ.....	40
4.2	Validace metody.....	46
4.2.1	Selektivita a přenos vzorků mezi analýzami.....	46
4.2.2	Linearita .....	46
4.2.3	Přesnost a preciznost.....	47
4.2.4	Matricový efekt.....	49
4.2.5	Stabilita .....	49
4.2.6	Reálné vzorky .....	50
5	Citovaná literatura .....	51
6	Seznam obrázků.....	56
7	Seznam tabulek.....	57



---

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Označení	Název
<i>APCI</i>	<i>chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionisation)</i>
<i>API</i>	<i>ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure ionization)</i>
<i>APPI</i>	<i>fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure photionization)</i>
<i>B</i>	<i>magnetický analyzátor</i>
<i>CV</i>	<i>variační koeficient</i>
<i>DMSO</i>	<i>dimethylsulfoxid</i>
<i>EMA</i>	<i>Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency)</i>
<i>ESI</i>	<i>elektrosprejová ionizace (Electrospray ionisation)</i>
<i>FDA</i>	<i>Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)</i>
<i>FLT3</i>	<i>tyrosinkináza-3 podobná FMS (FMS-like tyrosin kinase 3)</i>
<i>GIL</i>	<i>gilteritinib</i>
<i>GS-MS</i>	<i>plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem</i>
<i>HCN</i>	<i>kyanovodík</i>
<i>HPLC</i>	<i>vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)</i>
<i>HPLC-UV</i>	<i>vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí ultrafialového záření SPE extrakce na pevnou fázi (Solid phase extraction)</i>
<i>ICR</i>	<i>iontová cyklotronová rezonance</i>
<i>ICH</i>	<i>Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)</i>
<i>IS</i>	<i>vnitřní standard</i>



---

<i>IT</i>	<i>iontová past</i>
<i>KP</i>	<i>kalibrační křivka</i>
<i>LC-MS</i>	<i>kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Liquid chromatography–mass spectrometry)</i>
<i>LCQ</i>	<i>sférická iontová past</i>
<i>LLOQ</i>	<i>spodní mez kvantifikace (the Lower limit of quantification)</i>
<i>m/z</i>	<i>poměr hmotnosti ku náboji</i>
<i>ME</i>	<i>matricový efekt</i>
<i>MeOH</i>	<i>methanol</i>
<i>MRM</i>	<i>skan monitorování více reakcí (Multiple reaction monitoring)</i>
<i>MRV</i>	<i>maravírok</i>
<i>MS</i>	<i>hmotnostní spektrometr (Mass spectrometry)</i>
<i>MS/MS</i>	<i>tandemová hmotnostní spektrometrie</i>
<i>Q</i>	<i>kvadrupól</i>
<i>QqQ</i>	<i>trojitý kvadrupól</i>
<i>RSD</i>	<i>relativní směrodatná odchylka</i>
<i>SRM</i>	<i>skan monitorování vybraných reakcí (selected reaction monitoring)</i>
<i>SST</i>	<i>testování vhodnosti systému (system suitability testing)</i>
<i>TOF</i>	<i>analyzátor doby letu (Time of flight)</i>
<i>UHPLC</i>	<i>ultra účinná kapalinová chromatografie (Ultra performance liquid chromatography)</i>
<i>UHPLC-MS</i>	<i>ultra účinná kapalinová chromatografie s detekcí tandemovým hmotnostním spektrometrem (Ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometer)</i>
<i>ULOQ</i>	<i>horní mez kvantifikace (the Upper limit of quantification)</i>
<i>USP</i>	<i>Americký lékopis (US Pharmacopeia)</i>
<i>UV</i>	<i>ultrafialové záření (ultraviolet)</i>
<i>ZR</i>	<i>zásobní roztok</i>

---

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

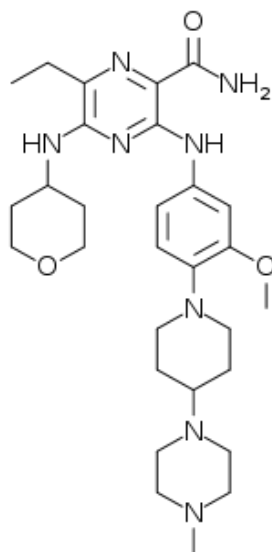
V rámci teoretické části dojde k charakterizaci stanovované látky gilteritinibu, k popisu chromatografické instrumentace a dalších dílčích kroků, důležitých pro optimalizaci a validaci používané metody.

## 1.1 GILTERITINIB

Gilteritinib je léčivo ze skupiny antineoplastik používané k cílené protinádorové terapii. Výhodou této skupiny léčiv je mechanismus účinku, jelikož se na rozdíl od klasických cytostatik zaměřují na odlišnosti mezi nádorovými a zdravými buňkami, tudíž nedochází k poškození DNA zdravých buněk. Gilteritinib se řadí k inhibitorům tyrosinkinázových receptorů, přesněji inhibuje více typů receptorových tyrosinkináz. Zároveň prokázal schopnost inhibovat signalizaci a proliferaci tyrosin kinázy 3 podobné FMS (FLT3; FMS-like tyrosin kinase 3), která je exprimovaná nezralými hematopoetickými progenitorovými buňkami. Po aktivaci těchto receptorů dochází ke genetické abnormalitě zejména u akutní myeloidní leukémie, u které se tato látka nejvíce využívá (1) (2).

### 1.1.1 Chemická struktura gilteritinibu

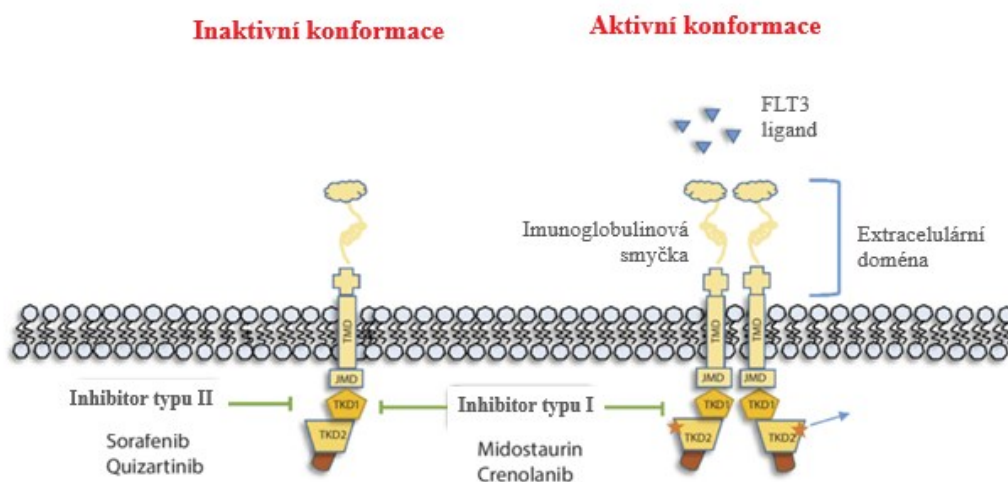
Struktura gilteritinibu (obrázek 1) je založena na pyrazinkarboxamidovém skeletu. Chemicky se jedná o 6-ethyl-3-({3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl) piperidin-1-yl] fenyl} amino)-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylamino)pyrazin-2-karboxamid s molekulovou hmotností  $552.72 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (3).



Obrázek 1 Chemická struktura gilteritinibu (3)

### 1.1.2 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku gilteritinibu, jak je již výše zmíněno, spočívá v inhibici tyrosinkinázových receptorů. Řadí se mezi FLT3 inhibitory typ I, kam mimo jiné patří i látky midostaurin, či crenolanib. Tyto látky vážou receptory jak v aktivní, tak i neaktivní konformaci (obrázek 2), v čemž se právě odlišují od inhibitorů FLT3 typu II, které vážou receptory pouze v neaktivní konformaci (4) (5).



Obrázek 2 Mechanismus účinku FLT3 inhibitorů (4)

### 1.1.3 Využití ve farmakoterapii

Gilteritinib se využívá v léčbě akutní myeloidní leukémie. Významně prodlužuje celkové přežití a poskytuje větší míru remise ve srovnání se záchrannou chemoterapií. V jedné z nejnovějších studií (přesnější studie LACEWING, fáze 3) bylo zjištěno, že kombinace gilteritinibu s azacitidinem přináší nový léčebný přístup pro pacienty s nově diagnostikovanou myeloidní leukémií s mutací FLT3 (6).

Nejen samotná léčba gilteritinibem ale i kombinace s jinými látkami bude v budoucnu možná a zároveň i s ještě většími benefity.

### 1.1.4 Stanovení gilteritinibu v biologickém materiálu

Doposud byl gilteritinib chromatograficky stanovován v biologickém materiálu pouze v plazmě. V rámci tří studií za použití rozdílných způsobů detekce byly popsány podmínky stanovení. První byla použita metoda kapalinové chromatografie ve spojení se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti (HPLC-UV; 7). V rámci druhé a třetí metody byla zvolena kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS; 8,9). Gilteritinib dosud nebyl v rámci publikovaných studií stanovován z biologického média.

#### ➤ HPLC – UV metoda

V prvním případě byl gilteritinib dokazován v lidské plazmě za pomoci HPLC s UV detekcí s látkou imatinib použitou jako vnitřní standard (IS). Zkoumané látky (gilteritinib a imatinib) byly získány od firmy Toronto Research Chemicals Inc. Sorbent chromatografické kolony byl tvořen částicemi oktadecylovaného silikagelu (od firmy Shiseido, Tokio, Japonsko) s rozměry 250 × 4.6 mm a velikostí částic 5 μm. Gilteritinib byl isokraticky separován během 10 minut pomocí mobilní fáze skládající se z acetonitrilu a 0,5% fosforečnanu draselného (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3,5) v poměru 28:72 (v/v) při průtoku 1,0 ml/min a detekován při 250 nm (7).

Zásobní roztoky gilteritinibu a imatinibu byly připravovány o koncentraci 0,1 mg/ml a rozpuštěny v methanolu. Poté bylo zapotřebí dosáhnout pracovních roztoků o koncentracích 5, 10, 20, 100, 200 a 500 μg/ml, zatímco imatinib byl zředěn methanolem na přípravu roztoku o koncentraci 1 μg/ml. Veškeré roztoky byly skladovány při teplotě -60°C. Kalibrační rozsah pro gilteritinib v plazmě byl 25-2500 ng/ml a metoda v něm byla validována (7).

Roztok standardu gilteritinibu (10  $\mu$ l) byl přidán k 200  $\mu$ l plazmy a promíchán po dobu 1 minuty. Poté byla tato směs smíchána s 10  $\mu$ l IS a 800  $\mu$ l vody, vortexována po dobu 30 sekund a aplikována do předem připravených SPE kolonek. SPE kolonka byla promyta 1 ml vody a 60% methanolem. Analyty byly eluovány 1 ml 100% methanolu a vakuově odpařeny do sucha při teplotě 80 °C pomocí rotační odparky. Vysušené zbytky byly poté rekonstituovány 20  $\mu$ l methanolu a poté byl objem 10  $\mu$ l nastříknut do HPLC systému (7).

### ➤ LC – MS metody

Ve druhém případě šlo o stanovení gilteritinibu v myší plazmě za pomoci ultrarychlé kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (UHPLC – MS) typu trojného kvadrupólu (Waters Acquity). V tomto případě byl jako vnitřní standard použit pirfenidon. Metoda byla validována v kalibračním rozsahu 1-500 ng/ml gilteritinibu, kde dolní mez kvantifikace (LLOQ) byla stanovena na 1 ng/ml. Intra denní a inter denní přesnost byly menší než 10,6 % a přesnosti byly v rozmezí od -14,5 % do 11,1 %. Stanovovaný analyt byl stabilní po celou dobu testu i během skladování vzorků plazmy. Gilteritinib společně s flukonazolem a itrakonazolem byly poskytnuty firmou Beijing Sunflower and Technology Development Co., Ltd (Peking, Čína). Chromatografická separace se uskutečnila na koloně Acquity BEH C18 s rozměry 50 mm  $\times$  2,1 mm a velikostí částic 1,7  $\mu$ m. Jako mobilní fáze byla použita 0,1% kyselina mravenčí ve vodě (rozpouštědlo A) společně s acetonitrilem (rozpouštědlo B) s průtokovou rychlostí 0,40 ml/min (8).

Lineární gradient eluce byl dodržen podle nastavených podmínek:

Tabulka 1 Lineární gradient

Čas eluce	Složení mobilní fáze
0-0,5 min	10 % složky B
0,5-1 min	10-90 % složky B
1-2 min	90 % složky B
2-2,1 min	90-10 složky B
2,1-3 min	re-ekvilibrace kolony

Vzorky byly udržovány při teplotě 10 °C v autosampleru, kdežto teplota termostatu kolony byla 40 °C. Hmotnostně-spektrometrické stanovení bylo provedeno za použití elektrosprejové ionizace (ESI), která pracovala v pozitivním módu. Byl zvolen a použit režim monitorování více reakcí (MRM – multiple reaction monitoring), ve kterém byl iontový přechod gilteritinibu  $m/z$  553.1 → 436.0 a IS  $m/z$  186.0 → 92.0. Napětí na vstupním kuželu (cone voltage) a kolizní energie byly 30 V a 30 eV pro gilteritinib a 20 V a 25 eV pro IS (8).

Standardní zásobní roztoky s koncentrací 1,00 mg/ml obou látek (tudíž jak gilteritinibu, tak IS) byly připraveny rozpuštěním sloučenin v methanolu. Všechny roztoky byly uskladněny při teplotě -20 °C (8).

Vzorky plazmy byly upraveny precipitací, kdy 100 µl plazmy bylo společně s 20 µl IS míchány po dobu 1 minuty. Poté byly vzorky smíchány s 300 µl acetonitrilu. Každá zkumavka byla důkladně promíchána a centrifugována při 13,000 g po dobu 10 minut za dodržení teploty 4 °C (8).

Posledním krokem bylo přenesení 100 µl získaného supernatantu do vialky a poté byl objem 2.0 µl nadávkován do systému UPLC-MS/MS k analýze (8).

Ve třetím případě šlo o popis vývoje a validace analytické metody pro stanovení gilteritinibu v myší plazmě a její následně implementace ve farmakokinetických studiích. Byly připraveny zásobní roztoky gilteritinibu a vnitřního standardu (isotopově značený gilteritinib) o koncentraci 10 mg/ml, které byly naředěny v acetonitrilu. Následně byla připravena kalibrační křivka, která byla sestavena pomocí koncentrací v rozmezí od 5 do 500 µg/ml. Všechny roztoky byly uloženy při teplotě -20 °C až do následné analýzy (9).

K izolaci gilteritinibu ze vzorků myší plazmy byla použita jednokroková extrakce rozpouštědlem (acetonitril). Zmrazené vzorky plazmy byly rozmrazeny při laboratorní teplotě, objem 5 µl rozmraženého vzorku byl přenesen do 0,5 ml zkumavky. Přidalo se 40 µl vnitřního IS a 55 µl acetonitrilu. Po vortexovém míchání po dobu 30 s byly vzorky centrifugovány a následně 60 µl vzorku bylo přeneseno na 96 jamkovou destičku (Thermo Scientific) a 5 µl bylo nastříknuto na kolonu (9).

Metoda byla prováděna pomocí UHPLC-MS/MS za pozitivní ionizace elektrosprejem na Thermo Scientific Quantiva (trojitý kvadrupól). Teplota autosampleru byla udržována při



teplotě 4 °C a byly prováděny separace na koloně Accucore aQ (50 mm × 2.1 mm, dp=2.6 μm, Thermo Fisher Scientific) s ochranou kolonou C18 AQUASIL 2,1 mm × 10 mm, dp=3 μm, Thermo Fisher Scientific) (9).

Objem nástřiku byl 5 μl. Separace probíhala v gradientovém režimu s použitím rozpouštědla A (0,1% kyselina mravenčí ve vodě) a rozpouštědla B (0,1 kyselina mravenčí v acetonitrilu). 2,5minutový gradientový program při použitém průtoku 0,4 ml/min byla nastavena následovně (% v/v): 0–0,5 min (10 % B); 0,5–1,5 min (10 % až 95 % B); 1,5–2,0 min (95 % B); 2,0–2,5 min (10 % B) (9).

## 1.2 TRANSPORTNÍ EXPERIMENTY

Transportní experimenty se běžně používají jako *in vitro* modely pro predikci absorpce léčiva přes membránu, případně pro hodnocení interakcí mezi studovaným léčivem a membránovým transportérem. Vybrané buněčné linie (např. Ca co-2, MDCKII) jsou kultivovány v monovrstvě na semipermeabilní membráně insertu, který je vložený do vhodného pufru nebo živného média. V rámci experimentu je poté léčivo aplikováno na apikální stranu monovrstvy buněk (donorový kompartment) a po inkubaci v určitých časových intervalech se stanovuje koncentrace léčiva na bazolaterální straně (akceptorový kompartment), nebo se stanovuje úbytek léčiva v donorovém kompartmentu. Za účelem stanovení přesné koncentrace léčiva ve vybraném kompartmentu je třeba použít vysoce selektivní a citlivé metody, mezi které LC-MS bezesporu patří (10) (11).

## 1.3 CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je v dnešní době nejvyužívanější metoda v rámci analýzy léčiv. Jedním z hlavních důvodů, proč se tato metoda aplikuje, je možnost získat data o dokazovaných látkách nejen v rámci kvalitativního hodnocení, ale i kvantitativního. V současnosti se nejvíce využívá HPLC, zejména pak LC-MS (12).

### 1.3.1 Chromatografická separace

Chromatografická separace je proces, který je založen na separaci molekul mezi stacionární a mobilní fází na základě rozdílné distribuce. Rozeznáváme základní dva módy chromatografické separace, normální a reverzní chromatografický mód. Stacionární fáze, nepohyblivá složka chromatografického systému, v rámci normálních

fázích je nejčastěji vyrobena na bázi oxidu křemičitého (silikagel) nebo z jiného materiálu vysoké polaroty, jako je např. oxid hlinitý nebo zirkoničitý (12).

Stacionární fáze musí splňovat požadavky, ke kterým se řadí chemická inertnost, tepelná stabilita. Nesmí docházet k reakcím s mobilní fází ani k jejímu rozpouštění (12).

Vytváří se fázové rozhraní, které je podmíněno rovnováhou distribuujících látek mezi fázemi. Lze ho také popsat za pomoci rozdělovací konstanty  $K_D$ ,

$$K_D = \frac{C_s}{C_m}$$

kde  $c_s$  značí koncentraci složky ve stacionární fázi a  $c_m$  v mobilní fázi. Čím je konstanta látky větší, tím větší je retence látky (13).

#### **1.3.1.1 Reverzní stacionární fáze**

V rámci HPLC analýz léčiv se stále nejčastěji využívají reverzní fáze a řadí se mezi nejoblíbenější režim vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Primárním důvodem využívání je zejména snadnější použití než v případě normálních fází. Mezi další důvody se zařazuje možnost aplikací pro široký rozsah molekul. Umožňuje oddělení jak nepolárních, tak i polárních i iontových sloučenin (14).

Za normální situace silikagel reprezentuje fázi polární, avšak v případě reverzních fází je za potřebí, aby se polarita změnila. Stacionární fáze v reverzním uspořádání má nepolární charakter. Mobilní fáze poté představuje fázi polární, nejčastěji jde o směs vodné složky (voda, vodné roztoky kyselin či bazí, nebo pufrů) s polárními organickými rozpouštědly (např. ACN, MeOH) (12).

Na povrchu silikagelu dochází ke změnám, kdy se připojí uhlovodíkové řetězce typicky s počtem uhlíků 8–18. Nejčastěji se používá oktadecylsilan (C18) nebo oktylsilan (C8) jako stacionární fáze navázána na vysoce čistý, sférický silikagel. Krátké alkylové řetězce (C2, C4) a fenylové řetězce jsou užívány příležitostně a dlouhé řetězce (jako jsou řetězce s 30 uhlíky) jsou využívány jen zřídka a pouze pro specializované aplikace (14).

Povrch stacionární fáze je schopen interagovat pouze slabými disperzními silami. Téměř se zde nevyskytují aktivní adsorpční centra schopná polárních interakcí. Slabé disperzní síly, tj. nespecifické mezimolekulové interakce analyt-adsorbent jsou ovšem slabší než polární interakce. Polární interakce mezi polárními molekulami mobilní fáze a analytu

zeslabují nespecifické interakce mezi molekulami analytů a stacionární fází a způsobují rychlejší eluci takových analytů. Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla v obráceném pořadí, než je tomu u normálních fází (12).

Pro dostatečnou retenci nepolárních a semipolárních organických analytů na reverzních fázích je zpravidla dosaženo při zastoupení organické složky mobilní fáze v rozmezí 20-80 %. Často se také využívá gradientové eluce pro rychlejší nalezení optimálních separačních podmínek. S tímto přístupem je možné dosáhnout široké škály separací (14).

### 1.3.2 Instrumentace HPLC

Každý kapalinový chromatograf se skládá z několika základních částí, kde každá zastává svou funkci. První částí jsou zásobníky mobilní fáze společně s vysokotlakým čerpadlem, které slouží k uchovávání a transportu mobilní fáze. Pokud dochází v chromatografu ke gradientové eluci, je zde nainstalován směšovač, který je umístěn před vysokotlakým čerpadlem. V případě odstranění bublinek plynu v mobilní fázi je používán odplyňovač. Další nedílnou součástí je autosampler, sloužící k dávkování vzorku (12).

K separaci analyzovaných látek slouží chromatografická kolona, která je uložena v termostatu, jenž udržuje požadovanou teplotu po celou dobu analýzy. Po separaci látek je nutné látky detekovat pomocí vhodného detektoru. V neposlední řadě je potřeba celý tento systém propojit s počítačem společně s příslušným softwarem, který umožňuje záznam dat a jejich následné vyhodnocení (12) (15) (16).

Níže dojde k přiblížení vybraných částí systému.

#### 1.3.2.1 Vysokotlaká čerpadla

Vysokotlaká čerpadla u HPLC systému poskytují konstantní tok mobilních fází na kolonu pod vysokým tlakem. Pulzní tok je udržován nejčastěji v rozmezí 0,1-1 ml/min, pod tlakem do 400 barů (6000 psi) (17).

Průtoková část se skládá z kovů a jiných materiálů nebo z polymerů kompatibilních s HPLC rozpouštědly. Vnitřní dráha toku bývá konstruována z biokompatibilních materiálů, např. titan, tantal a materiály odolné proti korozi (17).

Mezi nejvyžívanější typy čerpadel se v současnosti řadí reciproční pumpy, které se skládají z pístu obaleného těsněním, napojeného na hnací motor za pomoci hřídele, hlavy pumpy a pojistných ventilů (12) (15).

Mechanismus systému během plnicí fáze je založen na vzniku podtlaku, který vzniká pohybem pístu v hlavě pumpy. Následně dochází k uzavření výstupního ventilu a ve stejném momentě se otevře vstupní ventil, čímž dochází k nasátí mobilní fáze do pumpy. Během druhé fáze, označované jako ejekční, je píst zatlačen do hlavy pumpy a uzavírá vstupní ventil. Po otevření výstupního ventilu mobilní fáze opouští prostor pumpy (12) (15).

Využívají se pumpy s jednou hlavou („single piston pump“) nebo se dvěma paralelními hlavami („dual piston pump“). Předností pumpy s jednou hlavou je zejména kompaktnost, nízkonákladové a kontinuální dodání mobilní fáze, přičemž slabinou pulzní tok vznikající znovuoobením cyklu za pomoci hlavice (12) (15) (17).

Komponenty tvořící čerpadlo jako celek jsou vyrobeny z inertních materiálů, jedná se například o nerez či keramické písty. Nedostatky jednopístového mechanismu vedly k rozvoji čerpadla se dvěma paralelními hlavami, které poskytuje kombinovaný tok s výrazně menší pulzací. Tento typ čerpadel se podařilo obnovit u některých UHPLC čerpadel, jako je například model Shimadzu AD (17) (18).

Nedílnou součástí je odpadní ventil, sloužící k odvodu mobilní fáze do odpadu. Využívá se pro proplach pump pomocí nové mobilní fáze, čehož se využívá při výměně mobilní fáze (12) (15).

### **1.3.2.2 Dávkovač vzorků – autosampler**

Dávkování vzorku je primární krokem analýzy vzorku. Pokud by došlo k nedokonalému dávkování, docházelo by k rozmývání píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení (12).

V současnosti vzorky mohou být nastříkovány buď manuálně nebo efektivněji pomocí automatického dávkovače, tzv. autosamplery, který umožňuje provoz sériových analýz bez asistence operátora (12) (15).

Autosampler přivádí přesný alikvot roztoku vzorku na HPLC kolonu pod vysokotlakým prouděním. Jedná se o velmi sofistikované automatizační zařízení, schopné velké přesnosti a vysoké spolehlivosti (19).

Kromě zřejmých požadavků, jakými jsou například odolnost vůči vysokému tlaku či kompatibilita s HPLC rozpouštědly, je mezi nejdůležitějšími požadavky zařazena

---

přesnost a reprodukovatelnost vzorkovacího objemu ( $<0,5$  % RSD). Mezi další kritéria patří chemická inertnost materiálu a fakt, že by dávkovač neměl významně přispívat k mimokolonovým objemům v systému (12) (15) (19).

Dávkovací ventily bývají elektricky či pneumaticky ovládané. Typický objem nástřiku se pohybuje v rozmezí 1-1000  $\mu$ l z vialek, které jsou umístěné v zásobníku vzorků. Samotné vialky jsou uzavřeny pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Vnitřní část septa je pokryta teflonem, který slouží k zamezení styku vzorku s pryžovým septem. Nejčastější objem činí 1,5-2 ml a mohou se uzavírat za pomoci šroubovacího uzávěru. Vyrobeny jsou nejčastěji ze skla, či plastu. V případě omezeného množství vzorku se vkládají do vialek tzv. inserty, které umožňují nástřik menších objemů vzorku (12) (19).

Existuje několik druhů konstrukčního řešení dávkovače: může být jehla dávkovače fixní a pohybovat se pouze zásobník vzorku, či naopak zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko jehly, nebo poslední možností je fixace jak zásobníku, tak i injekční stříkačky (12).

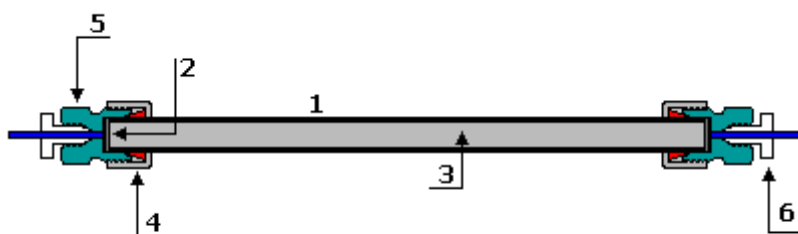
Neoddělitelnou součástí je dávkovací smyčka s 6ti cestným otočným ventilem. V rámci nástřiku vzorku dochází ke dvěma fázím. Během první plnicí fáze je smyčka naplněna vzorkem a mobilní fáze protéká mimo smyčku. Po otočení ventilu dojde k nástřiku vzorku (12) (15).

Důležitými součástmi autosampleru jsou promývací port, který zajišťuje snížení přenosu vzorku mezi jednotlivými analýzami nebo detektor netěsností (19).

### 1.3.2.3 Chromatografická kolona

Klíčovou částí HPLC systému je chromatografická kolona. Jedná se o trubici, či kapiláru, která je rovnoměrně vyplněná stacionární fází a obalená pláštěm. Mezi požadavky patří chemická inertnost, odolnost vůči vysokým tlakům a v neposlední řadě hladký povrch pláště kolony. Mezi nejčastější používané materiály k výrobě plášťů kolon se řadí nerezová ocel, plasty či sklo (20).

Umístěna je v kolonovém prostoru, který udržuje konstantní teplotu během analýz, jelikož kolísání teploty může mít vliv na retenční časy a tím ovlivnit selektivitu analýz (12) (15).



Obrázek 3 Popis chromatografické kolony (20)

Jednotlivé části kolony jsou vyznačeny čísly na obrázku 3. Kolona se skládá z kovového pláště 1), který uzavírá porézní kovová fritta 2), zabraňující uvolnění stacionární fáze 3) a současně umožňující plynulý tok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou obaleny ochranným kroužkem 4) s koncovou hlavicí, v které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem 6) (12) (20).

Nejčastěji používané konvenční HPLC analytické kolony jsou o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm, délce 10 až 300 mm a plněné náplněmi o velikosti částic 1 až 10  $\mu\text{m}$  (10  $\mu\text{m}$  se používají výjimečně, zejména u starších lékopisných metod) (12).

Kolony jsou spojeny s dávkovačem a detektorem pomocí kovových nebo polyetherketonových kapilár a hydraulických spojek (12).

#### 1.3.2.4 Detektory

Detektory, uložené za kolonou, v HPLC systému zaznamenávají rozdílné signály vůči čisté mobilní fázi a mobilní fází obsahující zkoumaný analyt. Ideální detektor by měl splňovat následující požadavky: vysoká citlivost, univerzálnost, specifita, linearita, signál nezávislý na složení mobilní fáze, na změně teploty a průtoku (12).

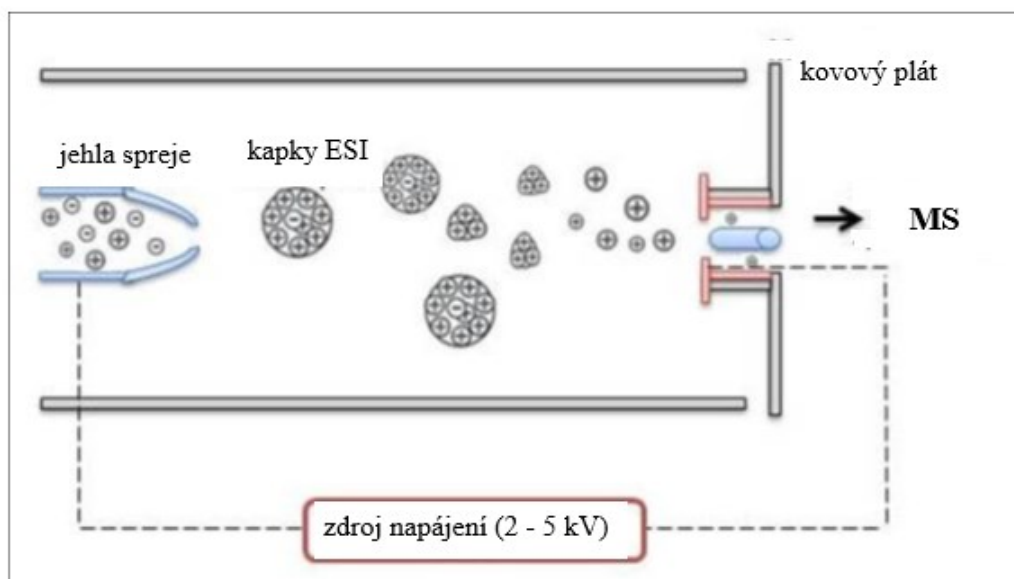
V dnešní době existuje rozmanitá škála detektorů, které jsou využívány zejména pro zajištění citlivosti a selektivity chromatografické analýzy. Mezi nejrozšířenější typy detektorů, zejména v bioanalýze, patří spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické a hmotnostní (21).

V současnosti se rutinně využívá pro kvantifikaci léčiv v bioanalytických aplikacích převážně spojení HPLC systému s hmotnostním spektrometrem (MS). Tyto detektory pracují na principu převodu molekuly analytů do ionizovaného (nabitého) stavu a následně je detekují na základě poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ), případně lze tyto nabitě molekuly dále štěpit a detekovat vzniklé fragmenty (12).

V rámci převodu molekul analytů do ionizovaného stavu se využívají v současnosti techniky ionizace za atmosférického tlaku (API), které zahrnují ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI) (12).

V průběhu elektrosprejové ionizace dochází při průchodu sprejovací kapilárou působením silného elektrického napětí ke vzniku aerosolu tvořeného analytem a mobilní fází. Odpařováním mobilní fáze dochází k nárůstu hustoty náboje a při překročení povrchového napětí kapky a dochází k tzv. coulombovské explozi a ke vzniku velkého množství menších a stabilnějších kapek a následnému uvolnění iontů analytu (22) (23).

Na obrázku 4 je znázorněn výše zmíněný průběh ionizace pomocí ESI. ESI je považován za „měkký“ zdroj ionizace, jelikož předává analytu relativně málo energie a dochází jen k malé fragmentaci. Řadí se mezi nejrozšířenější zdroje iontů pro neutrální, mírně polární a nízkomolekulární molekuly (22) (23).



Obrázek 4 Ionizace elektrosprejem (22)

Celý MS systém se skládá z několika základních částí. Jedná se o zdroj ionizace, analyzátor a detektor. Mezi další části patří vakuový systém, sonda pro zavádění vzorků, iontová optika a počítač, který slouží k ladění přístroje a zejména sběru a zpracování dat (12).

Jednotlivé MS detektory se také dělí podle typů analyzátorů, mezi které patří kvadrupól (Q), trojitý kvadrupól (QqQ), iontová past (IT), orbitální past, analyzátor doby letu (TOF), magnetický analyzátor (B) a iontová cyklotronová rezonance (ICR) (12).

#### 1.3.2.5 Analyzátoři

Hmotnostní analyzátor bývá často nazýván srdcem MS, umístěn je za iontovým zdrojem a před detektorem. Mezi jeho nejdůležitější funkce patří rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  a jejich následné urychlení a fokusace. Rozdělují se podle pěti základních principů: zakřivení dráhy letu v magnetickém či elektrickém poli (nebo jejich kombinací; B), různá stabilita oscilací v rámci střídavého napětí (Q, QqQ, IT), různá doba letu iontů (TOF), různé absorpce energie v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (ICR) a podle rozdělení iontů na základě různé frekvence oscilací (orbitrap) (12).



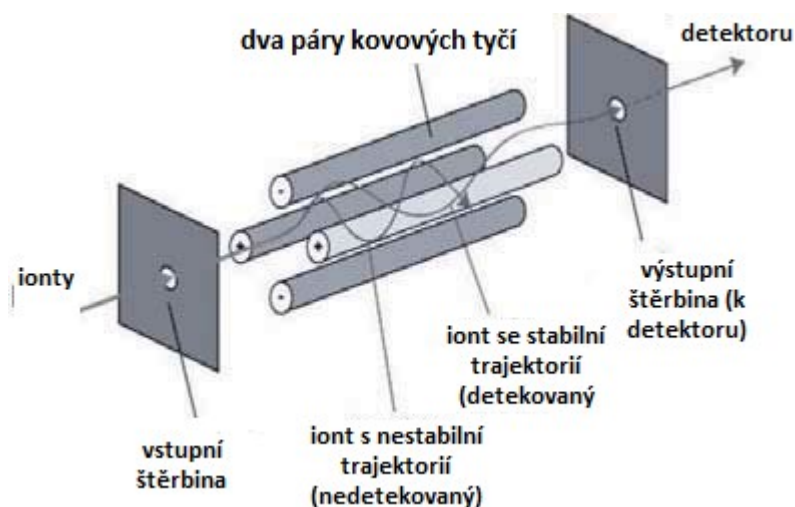
Níže dojde k zaměření na kvadrupól, trojitý kvadrupól a iontovou past.

### ➤ Kvadrupól

Kvadrupól patří mezi konstrukčně nejjednodušší typy hmotnostních analyzátorů. Předností je jeho robustnost a nízké pořizovací náklady. Nevýhodou je však nízké (jednotkové) rozlišení, nižší rozsah měřených  $m/z$  a správnost určení hmoty (22).

Kvadrupól se skládá ze dvou párů kovových tyčí, kde na každý protilehlý pár je vloženo buď kladné nebo záporné stejnosměrné napětí a zároveň je na všechny kladeno střídavé (vysokofrekvenční) napětí. Určitou kombinací stejnosměrného a střídavého napětí dochází k přenosu úzkého pásma hodnot  $m/z$  (je charakteristická pro konkrétní  $m/z$ ), které vytvoří hmotnostní spektrum. Kvadrupólový analyzátor neumožňuje fragmentaci iontů (22) (23).

Na obrázku 5 je vyobrazen kvadrupólový analyzátor.

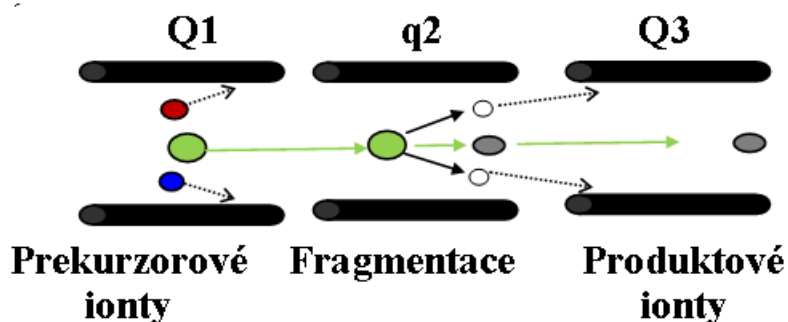


Obrázek 5 MS spektrometr s kvadrupólem (24)

### ➤ Trojitý kvadrupól

Trojité kvadrupól (zobrazen na obrázku 6) je variantou kvadrupólu, který vznikne v případě umístění kolizní cely mezi dva kvadrupólové hmotnostní analyzátoři. Jedná se o příklad tandemové MS, jenž umožňuje fragmentaci iontů, čímž je dosažena zvýšena

specifická. Jsou zde umístěny tři kvadrupóly za sebou. V prvním kvadrupólu ( $Q_1$ ) dochází k selekci prekurzorového iontu, který je následně v druhém ( $Q_2$ ) fragmentován a vzniklé produktové ionty jsou separovány a monitorovány ve třetím kvadrupólu ( $Q_3$ ) (22) (25). V prvním a druhém kvadrupólu probíhá proces selektivního monitorování více reakcí (selective reaction monitoring; SRM nebo multiple reaction monitoring; MRM), který spočívá ve sledování konkrétních fragmentací mezi prekurzorovým a produktovým iontem pro specifickou detekci velkého počtu cílených analytů. Hojně se tak využívá zejména v kvantitativních LC-MS analýzách, ale skenováním vzniklých produktových iontů dostáváme také informaci o struktuře analytu, která umožňuje potvrzení identity (22).



Obrázek 6 Schéma trojitého kvadrupólu (25)

### ➤ Iontová past

Hmotnostní analyzátor typu iontová past se skládá z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod, na které je vkládáno (stejně jako v případě kvadrupólu) stejnosměrné a vysokofrekvenční napětí. Ionty jsou poté selektovány z pasti na základě hodnot poměrů  $m/z$ . Do pasti je přiváděn inertní plyn (helium), který indukuje fragmentaci. Na rozdíl od trojitého kvadrupólu tak dochází k tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS) v čase, nikoliv v prostoru. Největší předností pastí je schopnost fragmentovat a izolovat ionty i několikrát za sebou ( $MS^n$ ), což umožňuje podrobnější hmotnostního spektra pro daný analyt a tím získat podrobnější informaci o jeho struktuře. Nevýhodou IT je opět nízké (jednotkové) rozlišení (22) (23) (26) (27).

### 1.3.3 Role LC-MS v bioanalýze

Spojení LC-MS je klíčové pro analýzu reálných vzorků, a proto patří mezi metodu první volby jako spojení separační techniky se specifickým detektorem. MS detektor může provést potvrzení identity analytu na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů (12).

Mezi hlavní výhody se řadí např. možnost analýzy složitých směsí, menší spotřeby vzorků než při off-line provedení, vyšší kvalita spektrálních dat či lepší spolehlivost kvantitativní analýzy díky izotopicky značeným IS. On-line spojení kapalinové chromatografie s MS detekcí tak může poskytnout lepší selektivitu a citlivost (12).

LC-MS využívající zejména měkké ionizační techniky lze aplikovat na mnohem širší škálu biologických molekul než GS-MS a nachází tak větší uplatnění v experimentálních i klinických aplikacích (23).

Spojení kapalinové chromatografie s MS detekcí se proto využívá v mnoha oblastech bioanalýzy. Za zmínku stojí terapeutické monitorování léčiv a toxikologie, kde dokáže poskytnout větší důvěru v identifikaci a detekovat širší škálu léku či toxinů v rámci jedné analýzy (23).

V dalších oblastech se využívá pro analýzu steroidů v oblasti biochemie, měření hladin vitamínu D a jeho metabolitů, či v rámci biochemického screeningu pro genetické poruchy. Vzhledem k tomu, že citlivost MS se neustále zlepšuje, budou testy LC-MS stále zajímavější jako potenciální náhrady stávajících imunitestů (23).

### 1.3.4 Validační parametry

Validace analytické metody je proces, kdy je experimentálně ověřeno, že daná metoda nebo systém jsou vhodné ke svému zamýšlenému účelu. Během validace je důležité dodržovat pokyny, které jsou definovány různými autoritami, např. Evropskou lékovou agenturou pro léčivé přípravky (EMA), která se zaměřuje zejména na validaci bioanalytických metod. Pro validaci bioanalytických metod existuje i další směrnice, vydaná Americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Poslední směrnici vydaná Mezinárodní konferencí pro harmonizaci (ICH), sloužící zejména k hodnocení substancí a léčivých přípravků v rámci stanovování pomocí analytických metod (28) (29) (31).

V případě, že naměřené hodnoty splňují akceptační kritéria pro jednotlivé parametry uvedené v příslušné validační směrnici, může být daná metoda považována za spolehlivou a plně validovanou. Po samostatném ověření metody by součástí validačního protokolu mělo být také nastavení podmínek pro testování vhodnosti systému (SST, system suitability test). Potřeba validace analytických laboratoří pramení z předpisů jako je, správná výrobní praxe, dobrá laboratorní praxe, správná klinická práce a kvalita a akreditační standardy (28).

Vybrané validační parametry pro LC-MS metodu stanovení léčiva z biologického materiálu jsou uvedeny v následujících kapitolách.

#### **1.3.4.1 Dolní limit kvantifikace (LLOQ – Lower limit of quantification)**

Jedná se o nejnižší možnou koncentraci analytu ve vzorku, která je kvantifikována spolehlivě, s přijatelnou precizností a přesností, zároveň je považována za nejnižší kalibrační standard (30).

#### **1.3.4.2 Linearita**

Linearita analytické metody je její schopnost poskytovat výsledky (odezvy detektoru), které jsou přímo nebo za pomoci přesně definovaných matematických funkcí, úměrné koncentraci analytů ve vzorcích v daném rozmezí (28) (30).

Pro každý analyt stanovovaný danou analytickou metodou se připravuje právě jedna kalibrační křivka. Ideálním případem by měla být situace, při které je znám očekávaný rozsah koncentrací analytu v reálném vzorku, a zároveň by tyto koncentrace měly být pokryty definovaným rozsahem kalibrační křivky. Nejnižší hodnotou kalibrační křivky je zpravidla LLOQ a nejvyšší hodnotou se označuje jako horní mez kvantifikace (ULOQ; upper limit of quantification) (30).

Kromě kalibračního standardu s nulovou koncentrací analytu by mělo být zachyceno minimálně dalších šest úrovní kalibrační koncentrace. V rámci vyhodnocování kalibrační křivky je nutné uvádět parametry této křivky, čímž jsou sklon a průsečík s osou y (v případě lineární regrese). Kromě těchto parametrů by se neměly zpětně vypočtené koncentrace kalibračních standardů (dle rovnice kalibrační křivky) odlišovat více jak o 15 % od požadovaných koncentrací, kromě LLOQ, kde tato hodnota může být v rozmezí  $\pm 20\%$  (30).

Kalibrační křivka by měla být přednostně připravována za použití čerstvých standardů/vzorků, ale je povoleno použití dříve připravovaných vzorků, pokud splňují podmínky pro stabilitu (30).

#### 1.3.4.3 Přesnost

Přesnost v rámci analytických měření popisuje těsnost shody naměřené hodnoty k hodnotě, která je akceptována jako konvenční skutečná hodnota nebo akceptována jako referenční hodnota (30).

Nejčastěji je de definována následujícím vzorcem a udává se v procentech (30).

$$\text{Přesnost [\%]} = \frac{\text{stanovená hodnota} \times 100}{\text{referenční hodnota}}$$

Měla by být vyhodnocena pro hodnoty kontrolních vzorků v rámci jednoho cyklu/dne (*the within run accuracy*) a v různých cyklech/dnech (*the between-run accuracy*) (30).

##### ➤ Přesnost v rámci jednoho cyklu (*the within run accuracy*)

Stanovuje se analýzou minimálně 5 vzorků na jeden cyklus měření s minimem 4 požadovaných koncentrací, který pokrývají kalibrační křivku. Jedná se o nejnižší možnou koncentraci (LLOQ), trojnásobek LLOQ (což splňuje 30-50 % rozsahu kalibrační křivky) a alespoň 75 % horního rozsahu kalibrační křivky. Stanovená koncentrace by měla být v rozmezí  $\pm 15$  % předepsaných hodnot, kromě LLOQ, která by měla splňovat požadavek do rozmezí  $\pm 20$  % od nominální hodnoty (30).

##### ➤ Přesnost v různých cyklech (*the between-run accuracy*)

Pro ověření přesnosti mezi cykly měření, LLOQ, nízké, střední a vysoké hodnoty kontrolních vzorků by měly být analyzovány minimálně pomocí 3 cyklů v rámci alespoň dvou různých dnů. Stanovená koncentrace by měla být v rozmezí  $\pm 15$  % předepsaných hodnot, kromě LLOQ, kde by neměla překročit hodnotu  $\pm 20$  % (30).

#### 1.3.4.4 Preciznost

Preciznost definuje blízkost opakovaných měření analytu za předem definovaných podmínek. Popsána je variačním koeficientem (CV). Preciznost by měla být prokázána pro LLOQ, ale zároveň i pro nízké, střední a vysoké koncentrace analytu v rámci jednoho cyklu i více cyklů při zachování stejných podmínek měření (30).

➤ **Preciznost v rámci jednoho cyklu (*within-run precision*)**

Pro ověření preciznosti by mělo být v rámci jednoho cyklu stanoveno minimálně 5 vzorků pro jednotlivou koncentraci definující stupně LLOQ, nízké, střední a nejvyšší hodnoty kontrolních vzorků v rámci jednoho dne. Hodnota variačního koeficientu nesmí přesáhnout  $\pm 15\%$  u všech hodnot, kromě LLOQ, kde hodnota nesmí přesáhnout  $\pm 20\%$  (30).

➤ **Preciznost v různých cyklech (*between-run precision*)**

Pro ověření preciznosti pro jednotlivé koncentrační hladiny se hodnotí alespoň 3 cykly analyzované alespoň během dvou různých dnů. Hodnota CV mezi jednotlivými cykly by neměla přesáhnout hodnotu  $\pm 15\%$  u všech hladin, kromě LLOQ, která nesmí překročit hodnotu  $\pm 20\%$  (30).

#### **1.3.4.5 Matricový efekt**

V případě, že dochází vlivem složení biologické matrice ke změně odezvy detektoru na základě ovlivnění ionizace analytu, hovoříme o matricovém efektu (ME). Vzhledem k tomu, že se v drtivé většině případů jedná o jev nežádoucí, je potřeba jej nějakým způsobem popsat či kvantifikovat. Vyskytnout se může jak snížená (tzv. *ion suppression*), či zvýšená odezva (*ion enhancement*) (30) (31).

Pro každý zkoumaný analyt (včetně IS) se hodnotí matricový efekt s použitím plochy píku analytu ve vzorku za přítomnosti matrice a plochy píku analytu ve vzorku bez obsahu matrice (standard analytu v rozpouštědle). ME normalizovaný na IS se poté vypočítá vydělením hodnot ME analytu a ME pro IS a vyjádří se jako CV (%) pro 6 šarží matrice. Hodnota CV by neměla být větší než 15 %. Stanovení by mělo být provedeno alespoň pro dvě koncentrační hladiny (nízká a vysoká) (30).

V případě obtížného získání matrice lze použít méně než 6 šarží, ale musí to být dostatečně odůvodněné (30).

#### **1.3.4.6 Selektivita**

Americký lékopis (USP) definuje selektivitu jako schopnost analytické metody přesně měřit analyt i za přítomnosti interferencí. Selektivita je schopnost metody rozlišovat a měřit analyty a IS i za přítomnosti dalších komponentů, které jsou obsaženy ve vzorku/matrici (28) (30).

Selektivitu lze zlepšit jednak nastavením optimálních chromatografických podmínek (teplota kolony, složení mobilní fáze atd.), výběrem detektoru a také vhodným postupem pro úpravu vzorku. Jedním možným způsobem ověření selektivity je nepřítomnost odezvy v blankové biologické matrici. Druhou možností je kontrola, zda průsečík kalibrační křivky není výrazně odlišný od nuly (28).

V případě ověření selektivity za pomoci odezvy, by měla být prokázána pomocí minimálně 6 jednotlivých vzorků. Přítomnost rušících komponentů je akceptována, pokud odezva je menší než 20 % LLOQ pro analyty a pro IS platí podmínka menší než 5 %. Nesmí být opomenuta ani jakákoli možná interference způsobená metabolity léčiva, či degradačních metabolitů, která by měla být také analyzována (30).

#### **1.3.4.7 Přenos mezi vzorky (Carry-over)**

Nežádoucí jev, při kterém dochází k výskytu signálu analytu ve slepém vzorku po analýze vzorků s vysokou koncentrací analytu. Měl by být vyřešen a minimalizován již během vývoje metody. Tento jev může zapříčinit např. kontaminace v autosampleru (30).

Přenos mezi vzorky během validace by měl být posouzen nástřikem slepých vzorků po vzorcích s vysokou koncentrací nebo kalibračního standardu horní hranici kvantifikace. Carry-over ve slepém vzorku by neměl přesáhnout hodnotu 20 % hodnoty LLOQ, ani hodnotu 5 % hodnoty pro IS. Pokud by byl pro danou metodu sledován významný carry-over, došlo by k ovlivnění přesnosti a preciznosti (30).

#### **1.3.4.8 Stabilita**

V rámci hodnocení stability se zjišťuje, zda podmínky skladování a případně jednotlivé kroky přípravy vzorku a jeho uchování před vlastní analýzou negativně neovlivňují koncentraci analytu ve vzorku (30).

Stabilita analytu ve studované matrici je hodnocena pomocí kontrolních vzorků s nízkou a vysokou koncentrací, které jsou analyzovány nejen ihned po přípravě, ale i poté co jsou uchovávány za předem definovaných skladovacích podmínek. Kontrolní vzorky se analyzují proti kalibrační křivce, získané z čerstvě připravených vzorků kalibračních standardů. Zjištěné koncentrace analytů by v rámci sledovaného časového intervalu neměly poklesnout o více než 15 % počáteční koncentrace, abychom mohli látku označit jako stabilní (30).



---

Kromě stability v biologické matrici je důležité stanovit stabilitu analytu (včetně IS) zásobních a pracovních roztoků. Nejčastěji se hodnotí: krátkodobá stabilita, dlouhodobá stabilita, stabilita při opakovaném rozmrazování a zamrazování a také stabilita již upraveného vzorku při laboratorní teplotě a stabilita v autosampleru (30).

Stabilita při zmrazování a rozmrazování (*freeze-thaw stability*) během které jsou kontrolní vzorky zamrazeny a následně při laboratorní teplotě rozmrazeny, dochází k situaci, kdy po dokončení rozmrazení se vzorky zanalyzují a znovu zmrazí za stejných podmínek (30).

Dlouhodobá stabilita (*long-term stability*) analyzuje vzorky uložené v mrazáku za dodržení stejných podmínek po celou dobu uchování, než dojde k samotné analýze samotného vzorku. Doba, po kterou je dlouhodobá stabilita hodnocena by měla odpovídat době skladování reálného vzorku (30).

Stabilita při laboratorní teplotě a stabilita v autosampleru sleduje stabilitu analytu v již zpracovaném vzorku a hodnotí, zda nedochází k degradaci analytu vlivem pracovního postupu a při uchování v autosampleru, než dojde k analýze (30).





## 2 CÍL PRÁCE

Cílem práce byl vývoj, optimalizace a validace LC-MS/MS metody pro stanovení léčiva gilteritinib z kultivačního média a následná aplikace metody na vzorky, pocházející z *in vitro* transportních experimentů.

---

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 CHEMIKÁLIE A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

V rámci experimentální části byly použity následující chemikálie a spotřební materiál.

Seznam použitých chemikálií: zásobní roztoky gilteritinibu (GIL; 20 mmol/l) a maraviroku (MRV; 10 mmol/l) v dimethylsulfoxidu (DMSO) byly poskytnuty Katedrou farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK, Opti-MEM buněčné médium – Gibco (Rockville, MD, USA), MeOH (LC-MS grade) – J.T. Baker (Phillipsburg, USA), kyselina mravenčí – VWR (Leuven, Belgie) a ultračistá voda získaná pomocí Millipore purification system od Merck – Millipore (Darmstadt, Německo).

Jako spotřební materiál byly využity plastové mikrozkušavky (1,5 ml) a pipetovací špičky (0,1 – 10  $\mu$ l, 2–200  $\mu$ l, 50–1000  $\mu$ l) od Eppendorf (Hamburk, Německo), vialky (1,5 ml) a inserty (300  $\mu$ l) – VWR (Leuven, Belgie), víčka na vialky (PTFE/S) – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

Analýza probíhala na koloně – Hypersil Gold C18 (100  $\times$  4,6 mm, 3  $\mu$ m) + předkolonový filtr OPTI-GUARD (1 mm guard column C18) od Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA).

### 3.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A SOFTWARE

Během přípravy vzorků byla použita třepačka (vortex) – Wizard IR Infrared Vortex Mixer (VELP Scientifica, Usmate, Itálie) a pro dávkování přesně daných objemů byly využity manuální automatické pipety: 0,5 – 10  $\mu$ l, 2–20  $\mu$ l, 20–200  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l (Eppendorf, Hamburk, Německo).

Analýzy vzorků probíhaly na LC-MS ve spojení s iontovou pastí, konkrétně šlo o Shimadzu Prominence HPLC systém skládající se z: DGU-20A Prominence Degasser, LC-20AT Liquid Chromatography Pump, CTO-20A Prominence Column Oven, and SIL-20A Prominence Autosampler (Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Detektor Thermo Finnigan LCQ Advantage Max Ion Trap hmotnostní spektrometr vybaven ESI zdrojem (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).



Jako druhý byl využit UHPLC-MS s trojným kvadrupólem. Jednalo se o Shimadzu Nexera X2 UHPLC systém skládající se z: DGU-20A<sub>5</sub> Prominence Degasser, LC-30AD Nexera Liquid Chromatography Pump, CTO-30A Nexera Column Oven, SIL-30AC Nexera Autosampler a LCMS-8030 hmotnostní detektor vybaven ESI zdrojem (Shimadzu, Kjóto, Japonsko).

Pro validační výpočty byly použity programy Excel MS Office (Microsoft, Redmond, USA) a GraphPad Prism 9.3.1. (GraphPad Software, San Diego, USA).

### 3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

#### 3.3.1 Zásobní a pracovní roztoky

Analyzované látky GIL a MRV byly rozpuštěny v DMSO. Dosažená koncentrace jednotlivých látek byla GIL 20 mmol/l a MRV 10 mmol/l. Tyto připravené roztoky sloužily jako zásobní a byly uchovávány v mrazáku při -20 °C.

V dalším kroku bylo zapotřebí připravit i roztoky pracovní. Pracovní roztok GIL (analyzovaná látka) o požadované koncentraci 10 μmol/l byl připraven v Opti-MEM médiu. K přípravě 1 ml roztoku bylo využito 0,5 μl zásobního roztoku GIL, ke kterému bylo následně přidáno 999,5 μl Opti-MEM média. Pracovní roztok MRV (IS) o požadované koncentraci též 10 μmol/l byl připraven v 70% MeOH (v/v). K přípravě 1 ml roztoku bylo využito 1 μl zásobního roztoku MRV, ke kterému bylo přidáno 999 μl rozpouštědla 70% MeOH (v/v). Pracovní roztoky byly připravovány v den potřeby, případně uchovávány v mrazáku při -20 °C.

#### 3.3.2 Roztoky pro přípravu kalibrační přímky a validaci metody

##### ➤ Kalibrační křivka

Jednotlivé roztoky GIL pro sestavení kalibrační křivky v Opti-MEM médiu byly připraveny pomocí pracovního roztoku o koncentraci 10 μmol/l. K měření kalibrační křivky (KP) bylo nutné připravit jednotlivé koncentrační hladiny. Jednotlivé koncentrace GIL v roztoku byly 10, 20, 50, 120, 250, 370 a 500 nmol/l. Příprava těchto koncentračních hladin je popsána v tabulce 2.

Roztok IS o koncentraci 200 nmol/l byl připraven v 70% MeOH (v/v) ředěním příslušného pracovního roztoku tak, že 100 μl MRV (10 μmol/l) bylo doplněno rozpouštědlem do 5 ml.

Tabulka 2 Příprava kalibračních hladin do kalibrační křivky pro kvantifikaci gilteritinibu (GIL)

analyt	koncentrační hladiny	koncentrace [nmol/l]	rozpouštědlo (opti-MEM) [ $\mu$ l]	pracovní roztok GIL [ $\mu$ l]
<b>GIL</b>	L1	10	999	1
	L2	20	998	2
	L3	50	995	5
	L4	120	988	12
	L5	250	975	25
	L6	370	963	37
	L7	500	950	50

Po přípravě sedmi koncentračních hladin bylo jednotlivé koncentrace nutné smíchat s IS. Do insertu ve vialce bylo napipetováno 50  $\mu$ l z každé připravené koncentrační hladiny s 50  $\mu$ l IS a kalibrační standard byl řádně promíchán na vortexu. Poté už bylo vše připravené k samotné analýze.

#### ➤ Přesnost a preciznost

V rámci validace metody bylo nutné ověřit přesnost a preciznost metody. Pro jejich stanovení byly na základě validační směrnice pro bioanalytické metody dle EMA vybrány koncentrační hladiny, 10, 20, 120 a 370 nmol/l, jejichž příprava vycházela z přípravy KP (tabulka 2). Pro výpočet „*within-run*“ přesnosti a preciznosti byla každá koncentrační hladina změřena pětkrát (n=5) v rámci jednoho dne a pro výpočet „*between-run*“ parametrů byla každá koncentrační hladina změřena třikrát (n=3) v různých dnech.

### 3.3.3 Roztoky pro hodnocení matricového efektu

Dále bylo nutné zjistit, jestli dochází ke změně odezvy detektoru vlivem složení biologické matrice výpočtem IS – normalizovaného matricového efektu. Ke zjištění matricového efektu byly měřeny koncentrační hladiny GIL 20 nmol/l a 370 nmol/l

---

připravené v buněčném médiu (Opti-MEM) a rozpouštědle bez obsahu biologické matrice (20% MeOH, v/v).

Standarty v Opti-MEM médiu byly připraveny pro každou koncentrační hladinu šestkrát (n=6) a rozpouštědlové standarty byly pro každou koncentraci připraveny třikrát (n=3). Příprava standardů vycházela ze zásobního roztoku 10  $\mu\text{mol/l}$  GIL dle tabulky 2.

#### **3.3.4 Roztoky pro stabilitu**

Dalším důležitým bodem validace byla stabilita analytu při zpracování vzorku a případném uchovávání za snížené teploty.

Pro sledování dlouhodobé stability v mrazáku (-20 °C) a při opakovaném rozmražení/zamražení byly připraveny následující roztoky: GIL 10  $\mu\text{mol/l}$  v Opti-MEM médiu a IS 200 nmol/l v 70% MeOH. Takto připravené roztoky byly uchovávány při -20 °C po dobu 16 dní. V den analýzy byl roztok GIL naředěn Opti-MEM médiem na koncentrace 20 a 370 nmol/l a 50  $\mu\text{l}$  těchto roztoků bylo smícháno s 50  $\mu\text{l}$  roztoku IS. V případě stability při opakovaném rozmražení/zamražení byly měřeny 3 cykly. Stabilita GIL byla hodnocena též u již naředěných roztoků o koncentracích 20 a 370 nmol/l uchovávaných v mrazáku.

Pro hodnocení stability GIL při laboratorní teplotě a teplotě v autosampleru byly připraveny roztoky o koncentraci 20 a 370 nmol/l, které byly měřeny ihned po přípravě a následně po 24 hodinách.

#### **3.3.5 Zpracování vzorků**

V případě zpracování reálného vzorku by se zkoumaný analyt naředěný médiem Opti-MEM napipetoval do insertu ve vialce v poměru 1:1 s roztokem IS (v našem případě by šlo o 50  $\mu\text{l}$  reálného vzorku + 50  $\mu\text{l}$  roztoku IS).

### 3.4 CHROMATOGRAFICKÉ METODY – LC/MS

#### ➤ LC-MS/MS – LCQ

Během této metody byl použita kolona Hypersil GOLD C18 s předkolonovým filtrem. Teplota v kolonovém prostoru byla 40 °C. Mobilní fáze byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí (vodná fáze) a z 0,1% kyseliny mravenčí v MeOH (organická fáze) s v režimu isokratické eluce (50 % organické fáze) při průtoku 0,320 ml/min. Celkový čas analýzy byl 5 minut s tím, že prvních 3,5 minut nebylo analyzováno a bylo přesměřováno do odpadu. Nástřik analyzovaného vzorku byl 10 µl. Vzorky byly uchovávány v autosampleru při 10 °C.

Parametry iontového zdroje jsou uvedeny v tabulce 3. Analýza probíhala v režimu SRM s následujícími iontovými přechody: GIL  $[M+H]^+$   $m/z = 553$  (CID 68%)  $\rightarrow m/z 436, 353$  a IS  $[M+H]^+$   $m/z = 514$  (CID 38%)  $\rightarrow m/z 389$ .

Tabulka 3 Parametry iontového zdroje LCQ-ESI pro analýzu gilteritinibu

Capillary Temperature	325 °C
Spray Voltage	3,3 kV
Sheat Gas	50 arb
Auxiliary Gas	10 arb
Capillary Voltage	43 V
Tube Lens	- 15

#### ➤ LC-MS/MS – QQQ

V rámci této metody byla použita také kolona Hypersil GOLD C18 s předkolonovým filtrem. Teplota v kolonovém prostoru byla 40 °C. Mobilní fáze byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí (vodná fáze) a z MeOH (organická fáze) v režimu isokratické eluce (50 % organické fáze) při průtoku 0,350 ml/min. Celkový čas analýzy byl 5 minut s tím, že prvních 3,5 minut nebylo analyzováno a bylo přesměřováno do odpadu. Nástřik analyzovaného vzorku byl 10 µl. Vzorky byly uchovávány v autosampleru při 10 °C.

Parametry iontového zdroje jsou uvedeny v tabulce 4. Analýza probíhala v režimu SRM s následujícími iontovými přechody: GIL  $[M+H]^+$   $m/z = 553$  (CE -27, -34)  $\rightarrow m/z 436, 353$  a IS  $[M+H]^+$   $m/z = 514$  (CE -20)  $\rightarrow m/z 389$ .



*Tabulka 4 Parametry iontového zdroje QQQ-ESI pro analýzu gilteritinibu*

Nebulizer Gas Flow	3 l/min
DL Temperature	250 °C
Heat Block Temperature	400 °C
Drying Gas Flow	15 l/min

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 TRANSFER CHROMATOGRAFICKÉ METODY Z LCQ NA QQQ

Původně bylo plánováno stanovovat GIL z Opti-MEM buněčného média na chromatografickém systému „Shimadzu Prominence“ s hmotnostně-spektrometrickou detekcí pomocí Thermo Finnigan LCQ.

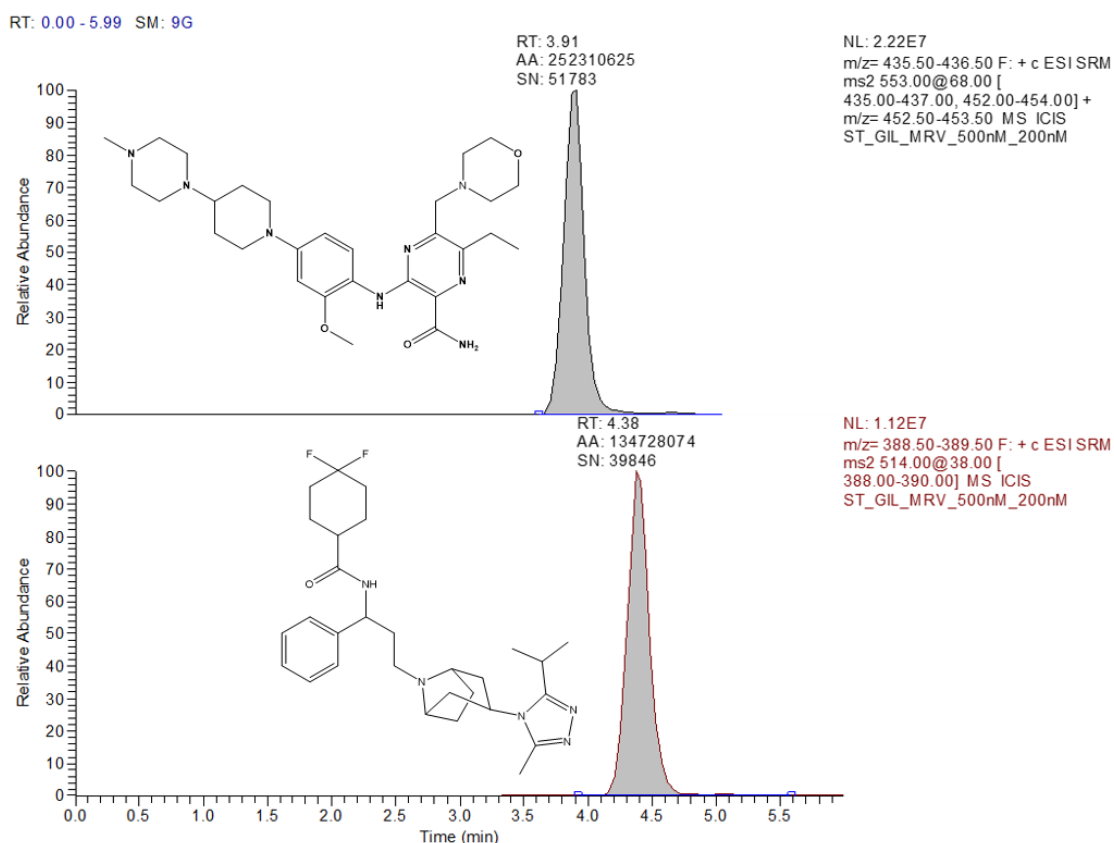
V průběhu prevalidace metody bylo zjištěno, že s přibývajícím počtem nástřiků dochází v průběhu analýzy k významnému snížení odezvy jak GIL, tak i IS.

Vzhledem k tomu, že vzorek média neprocházel před vlastní analýzou žádnou úpravou (pouze byl naředěn přidáním vnitřního standardu v 70% MeOH v poměru 1:1, v/v), byla zde vysoká pravděpodobnost, že supresi signálu způsobují složky pocházející z média. V případě Opti-Mem média se po stránce složení jedná o upravené minimální esenciální (MEM) médium pufované kyselinou N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonovou (HEPES) a uhličitanem sodným a obohacené hypoxanthinem, thymidinem, pyruvátem, L-glutaminem, stopovými prvky a růstovými faktory (32).

Vzhledem ke komplexnímu složení této biologické matrice bylo v rámci vývoje a optimalizace metody cílem zajistit separaci GIL od jednotlivých komponent matrice a také minimalizovat riziko kontaminace MS detektoru netěkavými složkami média. Již v průběhu optimalizace vlastní LC-MS/MS metody na Hypersil GOLD chromatografické koloně bylo zjištěno, že při zvyšování obsahu organické složky v mobilní fázi dochází ke koeluci GIL se supresujícími složkami matrice a jako nejvhodnější se ukázaly následující podmínky: mobilní fáze složená z 0,1% kyseliny mravenčí (vodná fáze) a z 0,1% kyseliny mravenčí v MeOH (organická fáze) s v režimu isokratické eluce (50 % organické fáze) s průtokem 0,32 ml/min. Celkový čas analýzy byl nastaven na 5 minut s tím, že prvních 3,5 minut nebylo analyzováno a bylo přesměřováno do odpadu. Nástřik analyzovaného vzorku byl 10  $\mu$ l. Teplota v kolonovém prostoru byla 40 °C.

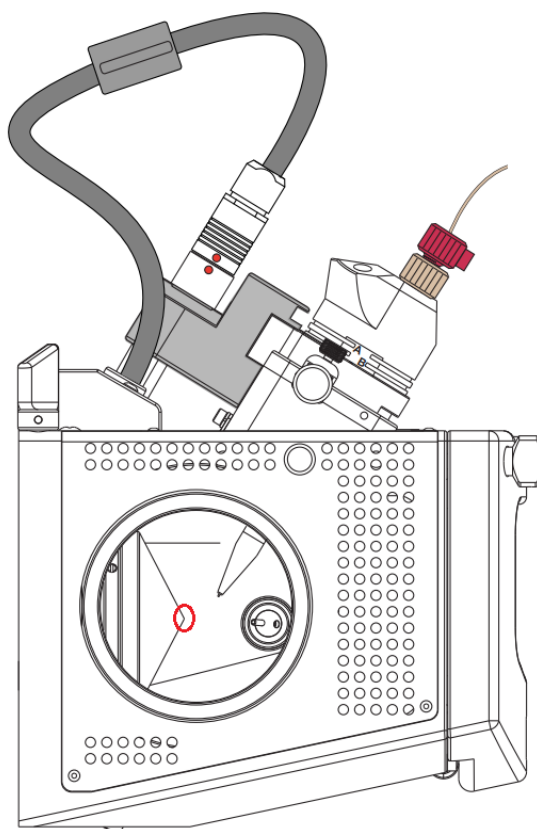
Při výsledných chromatografických podmínkách byl získán chromatogram zobrazený na obrázku 7. Na chromatogramu jsou také zobrazeny chemické struktury GIL a MRV (IS).





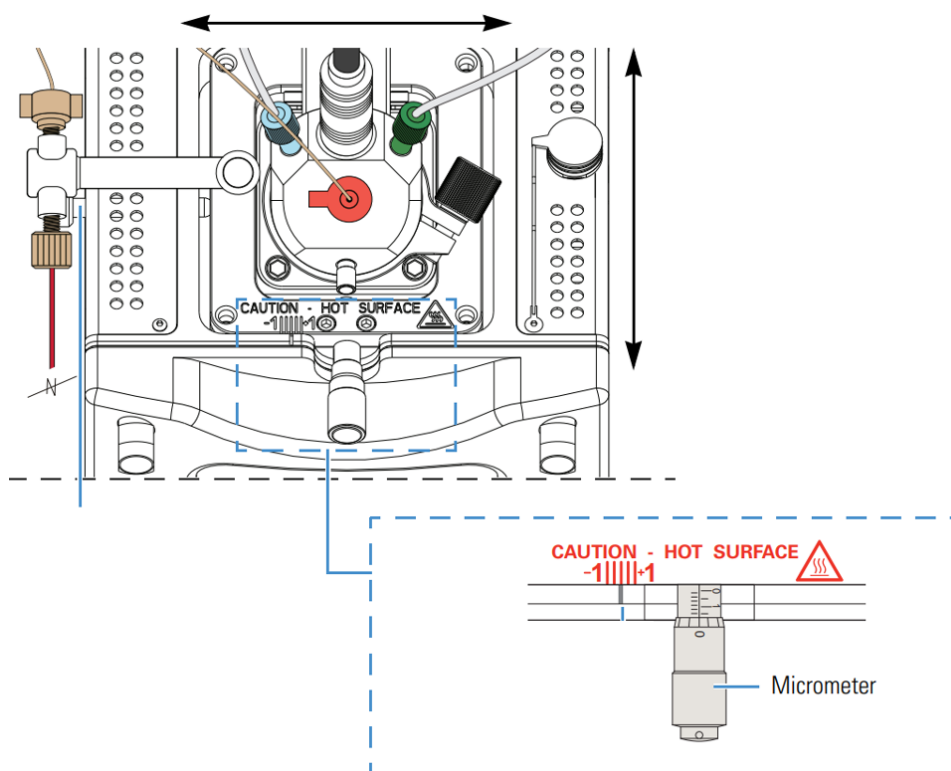
Obrázek 7 Výsledný chromatogram pro vzorek gilteritinibu ( $t_R = 3,91$  min) v Opti-MEM médiu o koncentraci 500 nmol/l za použití vnitřního standardu ( $t_R = 4,38$  min) o koncentraci 200 nmol/l

Vzhledem k retenčním časům GIL (~ 3,9 min) a IS (~ 4,4 min) nebylo potřeba získávat data pořízená na začátku analýzy a mobilní fáze byla až do 3,2 min odváděna do odpadu. Opakovaným nástřikem standardu GIL v Opti-MEM bylo však pozorováno, že dochází k vnější kontaminaci (usazování balastů) na vstupu na ion-transferovou kapiláru (viz obrázek 8), což zároveň vedlo ke snížení odezvy analytů.



*Obrázek 8 Diagonální konstrukční uspořádání iontového zdroje (elektrosprej) u MS detektoru Thermo Finnigan Max Advantage LCQ. Červeně je vyznačena oblast, kde docházelo k usazování balastů (33)*

Byl testován vliv polohy/vzdálenosti iontového zdroje (ESI) od vstupu na ion-transferovou kapiláru. V pilotním experimentu byly testovány tři vzdálenosti ESI (sprejovací kapiláry) od vstupního otvoru ion-transferové kapiláry. Vzdálenost byla nastavena pomocí šroubu umístěného v přední části iontového zdroje MS detektoru (viz obrázek 9). Výsledky popisující vliv vzdálenosti sprejovací kapiláry od vstupu na ion-transferovou kapiláru u Thermo Fisher Max Advantage LCQ na analýzu GIL jsou uvedeny v tabulce 5.



Obrázek 9 Nastavení vzdálenosti sprejovací kapiláry u Thermo Fisher Max Advantage LCQ pomocí šroubu (micrometer) (33)

Tabulka 5 Vliv vzdálenosti sprejovací kapiláry na odezvu gilteritinibu (GIL; 500 nmol/l v Opti-MEM médiu) a vnitřního standardu (IS; 200 nmol/l) ve společné směsi (1:1, v/v) po 40 nástřicích vzorku vyjádřený jako relativní směrodatná odchylka (RSD)

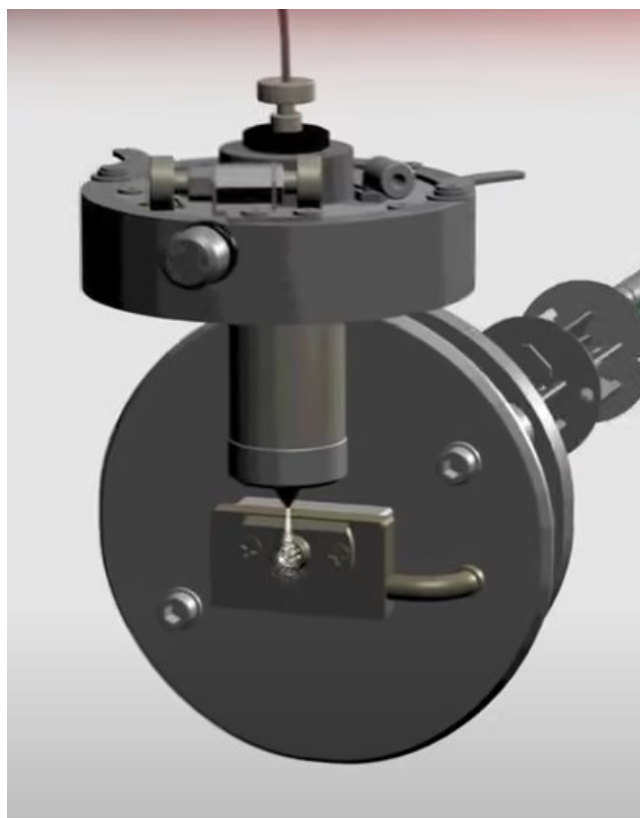
mikrometr	50 mm		75 mm		100 mm	
nástřik	GIL	IS	GIL	IS	GIL	IS
1	279633596	14429437	268060775	14357586	395594885	14028138
40	68277722	4299046	204045737	10364939	324561985	11960149
průměr	201363998	9941699	235048018	10930510	356844858	14531629
RSD	34,5%	37,1%	10,3%	13,5%	5,5%	11,2%
odezva	-75,6%	-77,0%	-23,9%	-27,8%	-18,0%	-14,7%

Ve výchozí pozici (50 mm) bylo po 40 nástřicích pro standard GIL (500 nmol/l) a IS (200 nmol/l) v Opti-MEM médiu pozorováno pro GIL a IS snížení odezvy o 75,6 % a 77,0 %. Z tabulky vyplývá, že vzrůstající vzdálenost sprejovací kapiláry pozitivně ovlivňuje odezvu jak GIL, tak IS. Avšak vzhledem k tomu, že reálné vzorky z transportních experimentů jsou obvykle měřeny ve velké sérii ( $n > 100$ ), je potřeba

zajistit, aby i při opakovaném nástřiku z jednoho vzorku bylo dosaženo bylo opakovatelné odezvy na začátku i na konci analýzy.

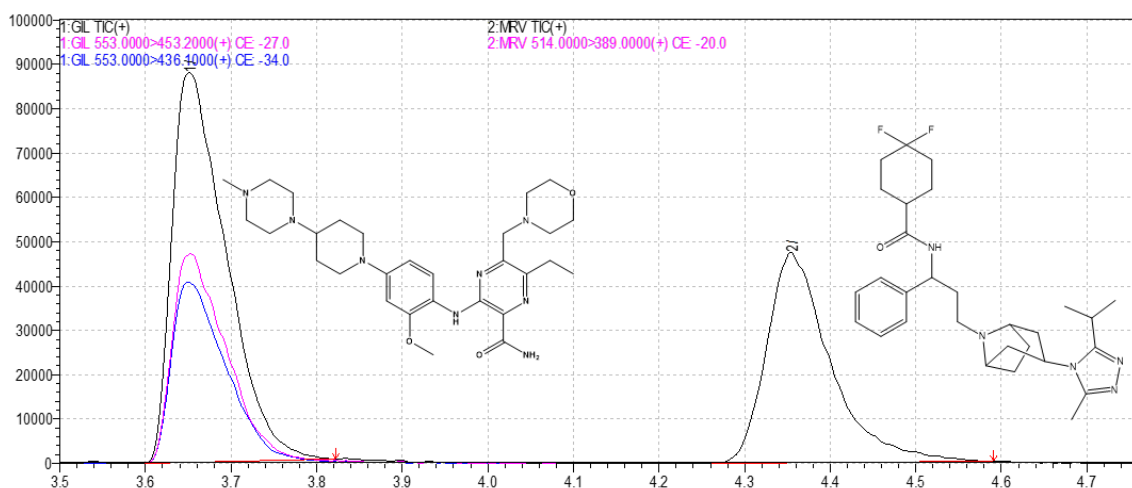
Suprese signálu analytů v důsledku složení biologické matrice může být kromě vzdálenosti sprejovací kapiláry ovlivněna též samotnou konstrukcí iontového zdroje. Pro ověření byla proto metoda pro stanovení GIL transferována na „*Shimadzu LCMS QQQ*“, kde je na rozdíl od předchozího LC-MS instrumentu iontový zdroj umístěn ortogonálně (kolmo) ke vstupu na ion-transferovou kapiláru (viz obrázek 10).

Díky ortogonálnímu uspořádání ESI nedopadá rozprašovaný roztok přímo na vstup kapiláry, což snižuje jeho kontaminace a zlepšuje robustnost přístroje (34).



Obrázek 10 Ortogonální konstrukční uspořádání iontového zdroje (elektrosprej) u MS detektoru *Shimadzu LCMS 8030* (trojitý kvadrupól) (35)

V důsledku transferu došlo k úpravě chromatografické metody, kdy byl průtok mobilní fáze zvýšen na 0,35 ml/min. Finální chromatogram získaný za těchto podmínek je zobrazen na obrázku 11.



Obrázek 11 Výsledný chromatogram pro vzorek gilteritinibu ( $t_R = 3,66$  min) v Opti-MEM médiu o koncentraci 500 nmol/l za použití vnitřního standardu ( $t_R = 4,34$  min) o koncentraci 200 nmol/l

Následně bylo provedeno 100 nástřiků vzorku obsahující GIL (500 nmol/l) a IS (200 nmol/l) v Opti-MEM médiu a byl posezen vliv na odezvu analytů (tabulka 6).

Tabulka 6 Vliv konstrukce iontového zdroje u Shimadzu LCMS 8030 na odezvu gilteritinibu (GIL; 500 nmol/l) a vnitřního standardu (IS; 200 nmol/l) ve společné směsi (1:1, v/v) po 40 a 100 nástřicích vzorku vyjádřený jako relativní směrodatná odchylka (RSD)

nástřik	GIL	IS
1	384436	305157
40	284316	284316
průměr	366336	283697
RSD	3,3 %	3,5 %
odezva	<b>-6,5 %</b>	<b>-6,8%</b>
nástřik	GIL	IS
100	368154	298751
průměr	375996	284467
RSD	3,5 %	3,6 %
odezva	<b>-4,2 %</b>	<b>-2,1 %</b>

Na základě získaných výsledků byla dále pro analýzu GIL v Opti-MEM buněčném médiu využívána LC-MS sestava Shimadzu LCMS 8030, na které byla také metoda validována.

## 4.2 VALIDACE METODY

### 4.2.1 Selektivita a přenos vzorků mezi analýzami

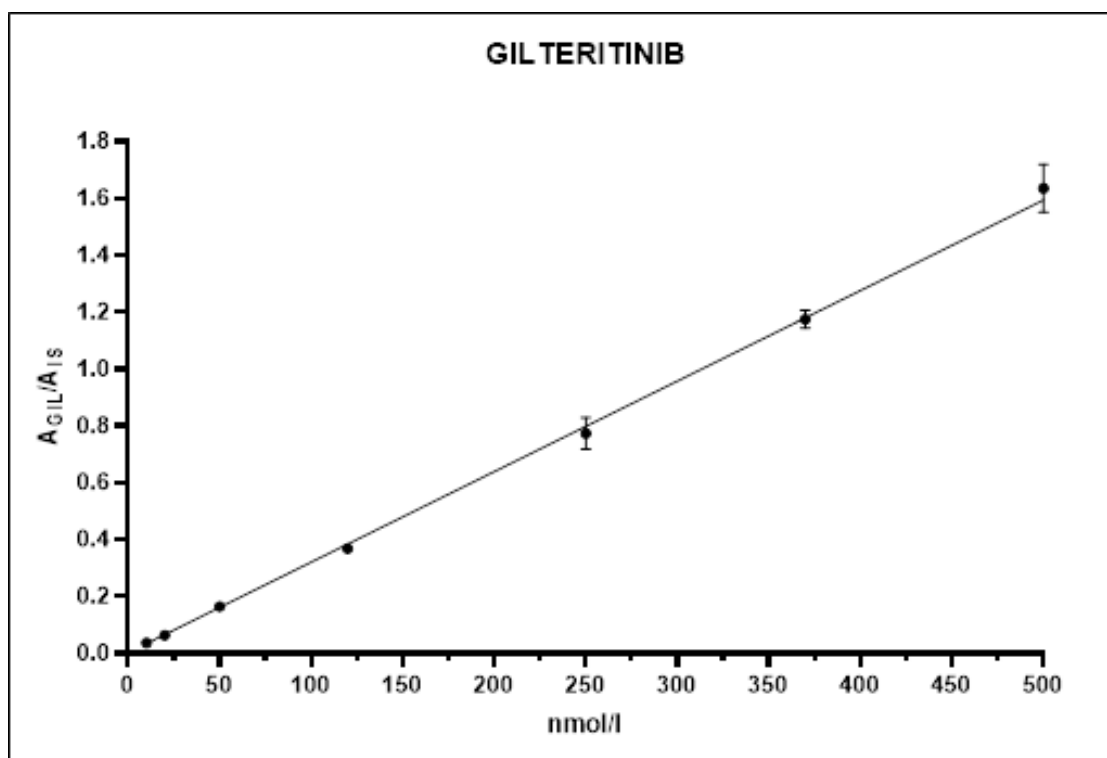
Selektivita metody byla ověřena analýzou vzorku složeného z blankového Opti-MEM a 70% MeOH (v/v) v poměru 1:1 (v/v). Na chromatogramu nebyly v daných retenčních časech odpovídajících GIL a IS pozorovány žádné interferující píky. Zároveň nebyl po nástřiku nejvyššího kalibračního standardu (500 nmol/l GIL a 200 nmol/l IS) v následném blankovém vzorku sledován žádný významný přenos analytu.

### 4.2.2 Linearita

Linearita byla hodnocena v koncentračním rozmezí GIL 10-500 nmol/l v buněčném médiu Opti-MEM. Graf uvedený na obrázku 12 představuje kalibrační přímku získanou ze čtyř stanovení pomocí vážení lineární regrese (1/x). V daném koncentračním rozmezí je metoda pro stanovení GIL v Opti-MEM lineární (R=9992). V tabulce 7 jsou uvedeny parametry kalibrační křivky.

*Tabulka 7 Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky ( $y=0,002947x+0001197$ ) a její parametry. Dosazením poměru plochy pod píkem pro gilteritinib ( $A_{GIL}$ ) a vnitřní standard ( $A_{IS}$ ) do rovnice kalibrační křivky byla zpětně vypočítána koncentrace jednotlivých hladin a vyjádřena v procentech vzhledem k referenční koncentraci*

1/x	$y=0,002947x+0001197$							<b>R=0.9992</b>
c [nmol/l]	10	20	50	120	250	370	500	
(n=4)	KP1	KP2	KP3	KP4	KP5	KP6	KP7	
$A_{GIL}/A_{IS}$	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>	<b>0,16</b>	<b>0,37</b>	<b>0,75</b>	<b>1,16</b>	<b>1,62</b>	
přepočet koncentrace [nmol/l]	11,32	21,26	53,53	126,19	254,09	393,28	550,84	
	<b>113,25 %</b>	<b>106,31 %</b>	<b>107,06 %</b>	<b>105,16 %</b>	<b>101,63 %</b>	<b>106,29 %</b>	<b>110,17 %</b>	



Obrázek 12 Kalibrační křivka pro gilteritinib v rozmezí 10-500 nmol/l v buněčném médiu Opti-MEM. Graf vyjadřuje závislost poměru plochy pod pikem gilteritinibu ( $A_{GIL}$ ) a vnitřního standardu ( $A_{IS}$ ) na koncentraci gilteritinibu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ( $n=4$ )  $\pm$  směrodatná odchylka

#### 4.2.3 Přesnost a preciznost

Přesnost a preciznost metody byla hodnocena na 4 koncentračních hladinách 10, 20, 120 a 370 nmol/l. Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8. Pro „within-run“ přesnost a preciznost. Bylo stanoveno celkem 5 paralelních vzorků na téže koncentrační hladině v rámci jednoho dne.

Tabulka 8 "Within-run" přesnost a preciznost metody. Přesnost pro jednotlivé koncentrační hladiny je vyjádřena jako průměr vypočítaných koncentrací ( $c$ ) z pěti měření ( $n=5$ )  $\pm$  směrodatná odchylka ( $SD$ ) a procentuálně vyjádřena vzhledem k referenční hodnotě. Preciznost je vyjádřena jako variační koeficient ( $CV$ )

<b>"Within-run"</b>				
$c$ [nmol/l]	10	20	120	370
$c$ naměřená [nmol/l] $\pm$ SD ( $n=5$ )	10,30 $\pm$ 0,53	22,49 $\pm$ 0,43	105,12 $\pm$ 6,42	361,18 $\pm$ 10,12
přesnost	<b>103,04 %</b>	<b>112,45 %</b>	<b>87,60 %</b>	<b>97,62 %</b>
preciznost (CV)	<b>5,21 %</b>	<b>1,92 %</b>	<b>6,11 %</b>	<b>2,80 %</b>

Ze získaných dat vyplývá že *within-run* přesnost a preciznost vyhovuje požadavkům EMA směrnice. Data pro *within-run* přesnost splňují stanovenou podmínku, při které musí být splněno odchylna  $\pm 15\%$  předepsaných hodnot koncentrací (u LLLOQ  $\pm 20\%$ ). V případě získaných dat pro *within-run* preciznost výsledky také odpovídají EMA směrnici. Data splňují podmínku hodnoty variačního koeficientu (CV, viz tabulka 8.), který nepřesáhnul hodnotu  $\pm 15\%$  (u LLOQ  $\pm 20\%$ ).

Pro „*between-run*“ přesnost a preciznost byla každá koncentrační hladina bylo stanoveno 3 paralelních vzorků na téže koncentrační hladině v různých dnech (tabulka 9).

Tabulka 9 "Between-run" přesnost a preciznost metody. Přesnost pro jednotlivé koncentrační hladiny je vyjádřena jako průměr vypočítaných koncentrací (*c*) ze tří měření ( $n=3$ )  $\pm$  směrodatná odchylna (SD) a procentuálně vyjádřena vzhledem k referenční hodnotě. Preciznost je vyjádřena jako variační koeficient (CV)

<b>„Between-run“</b>				
<b>c [nmol/l]</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>120</b>	<b>370</b>
<b>c naměřená [nmol/l] <math>\pm</math> SD (n=3)</b>	11,30 $\pm$ 0,68	20,12 $\pm$ 0,93	125,94 $\pm$ 4,60	381,61 $\pm$ 7,65
<b>přesnost</b>	<b>112,99 %</b>	<b>100,61 %</b>	<b>104,37 %</b>	<b>103,14 %</b>
<b>preciznost (CV)</b>	<b>4,64 %</b>	<b>6,16 %</b>	<b>3,67 %</b>	<b>2,01 %</b>

Ze získaných dat vyplývá že *between-run* přesnost a preciznost vyhovuje požadavkům EMA směrnice. Data pro *between-run* přesnost splňují stanovenou podmínku, při které musí být splněno odchylna  $\pm 15\%$  předepsaných hodnot koncentrací (u LLLOQ  $\pm 20\%$ ). V případě získaných dat pro *between-run* preciznost výsledky také odpovídají EMA směrnici. Data splňují podmínku hodnoty variačního koeficientu (CV, viz tabulka 9), který nepřesáhnul hodnotu  $\pm 15\%$  (u LLOQ  $\pm 20\%$ ).



#### 4.2.4 Matricový efekt

Matricový efekt byl normalizován na vnitřní standard pomocí analýzy standardů připravených v buněčném médiu Opti-MEM a 20% MeOH (v/v) při koncentraci GIL 20 a 370 nmol/l a IS 200 nmol/l (tabulka 10). U standardů připravených v buněčném médiu byla pozorována mírná suprese signálu.

*Tabulka 10 Matricový efekt normalizovaný na vnitřní standard (IS-normalizovaný ME) vyjádřený jako průměr ze šesti stanovení (n=6) ± směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV)*

Matricový efekt		
c [nmol/l]	20	370
IS-normalizovaný ME ± SD (n=6)	1,53 ± 0,04	1,31 ± 0,03
CV	3,67 %	2,33 %

Ze získaných dat bylo zjištěno že matricový efekt vyhovuje požadavkům EMA směrnice, jelikož variační koeficient stanovený pro dvě koncentrační hladiny (nízkou a vysokou) nepřesahuje hodnotu 15 %

#### 4.2.5 Stabilita

Stabilita GIL v Opti-MEM médiu byla sledována na několika úrovních. Vzhledem k tomu, že reálné vzorky byly plánované měřit v den provádění experimentu, bylo hlavním cílem testování stability zjistit, za jakých podmínek by bylo v případě potřeby možné vzorky uchovávat a také zjistit jaká je stabilita koncertovaných pracovních roztoků. Dlouhodobá stabilita (uchované v mrazáku po dobu 16 dnů) byla hodnocena pro vzorky uchovávané v mrazáku (-20 °C) dvěma způsoby: jednak se jednalo o stabilitu zmraženého standardu o koncentraci 10 µmol/l, ze kterého se připravily vzorky o koncentraci 20 a 370 nmol/l v první a poslední den měření a dále se jednalo o měření již připravených standardů o těchto koncentracích. V rámci hodnocení stability při opakovaném rozmražení/zamražení (3 cykly) byl opět připraven standard o koncentraci 10 µmol/l, který byl opakovaně rozmražen, byly z něj připraveny vzorky o koncentraci 20 a 370 nmol/l a zásobní standard byl opět zamražen. Pro hodnocení stability při laboratorní teplotě a v autosampleru byly připraven vzorky (20 a 370 nmol/l) změřeny ihned po přípravě a poté ponechány volně v laboratoři při 25 °C a v autosampleru (10 °C) a po uplynutí 24 hod byly tyto vzorky znovu zanalyzovány. Současně byl pro každý stabilitní experiment připravený roztok IS o koncentraci 200 nmol/l v 70% MeOH (v/v).

Výsledné stability vyjádřeny jako konečný obsah GIL v procentech jsou uvedeny v tabulce 11.

Ze získaných dat vyplývá, že v případě zmraženého standardu o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , ze kterého se až v den měření připravovaly vzorky o koncentracích 20 a 370  $\text{nmol/l}$  vyhovují požadavkům EMA směrnici. Získané hodnoty nepoklesly v uvedeném časovém intervalu o více než 15 %. V druhém případě, kdy se jednalo připravené a zamražené vzorky o koncentracích 20 a 370  $\text{nmol/l}$ , bylo zjištěno, že data nesplňují požadavky EMA směrnice, jelikož výsledky (tabulka 11) poklesly o více jak 15 %. V tomto případě se tedy uchovávání při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  nejeví jako vhodné pro tento typ vzorku.

*Tabulka 11 Stabilita gilteritinibu (GIL) v Opti-MEM buněčném médiu vyjádřena v procentech vůči čerstvě připravenému standardu*

c GIL [nmol/l]	20	370	t [°C]
Dlouhodobá stabilita (10 $\mu\text{mol/l}$ )	<b>95,94 %</b>	<b>97,02 %</b>	-20
Dlouhodobá stabilita	<b>80,71 %</b>	<b>84,73 %</b>	-20
Opakované rozmražení-zamražení	<b>71,13 %</b>	<b>61,81 %</b>	-20/25
Stabilita při laboratorní teplotě	<b>85,22 %</b>	<b>83,08 %</b>	25
Stabilita v autosampleru	<b>91,61 %</b>	<b>89,57 %</b>	10 $^\circ\text{C}$

Vzorky již připravené v Opti-MEM médiu nejsou rovněž vhodné pro opakované rozmrazování a zamrazování. Zároveň naředěné vzorky (20 a 370  $\text{nmol/l}$ ) vykazovaly nižší stabilitu vůči vzorkům připravovaným ze zamraženého zásobního standardu (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Vzorky, které byly již zpracované přidáním vnitřního standardu vykázaly při uložení v autosampleru po dobu 24 hodin dostatečnou stabilitu, tudíž je metoda vhodná i pro měření větší série vzorků.

#### 4.2.6 Reálné vzorky

Vzhledem k tomu že v průběhu vypracování diplomové práce došlo k dočasnému přerušení plánovaných transportních experimentů, nebylo možné metodu aplikovat na reálné vzorky.

## 5 CITOVANÁ LITERATURA

- (1) Mladěnka Přemysl, Cílená protinádorová farmakoterapie, Katedra farmakologie a toxikologie [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova], [online] [cit. 2022-04-29] Dostupné z:  
[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/258867/mod\\_resource/content/7/S-51-Mladenka-C3%ADlen%C3%A1%20protin%C3%A1dorov%C3%A1%20terapie.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/258867/mod_resource/content/7/S-51-Mladenka-C3%ADlen%C3%A1%20protin%C3%A1dorov%C3%A1%20terapie.pdf)
- (2) PERL, Alexander E., Giovanni MARTINELLI, Jorge E. CORTES, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3 – Mutated AML. *New England Journal of Medicine* [online]. 2019, **381**(18), 1728-1740 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1902688
- (3) PubChem [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 49803313, Gilteritinib; [cited 2022-05-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gilteritinib>
- (4) ABBAS, Hussein A., Mansour ALFAYEZ, Tapan KADIA, Farhad RAVANDI-KASHANI a Naval DAVER, Midostaurin In Acute Myeloid Leukemia: An Evidence-Based Review And Patient Selection, Cancer Management and Research [online]. 2019, 11, 8817-8828 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1179-1322. Dostupné z: doi:10.2147/CMAR.S177894)
- (5) DREXLER, Hans G. a Hilmar QUENTMEIER. Mini Review FLT3: Receptor and Ligand. *Growth Factors* [online]. 2009, **22**(2), 71-73 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0897-7194. Dostupné z: doi:10.1080/08977190410001700989
- (6) Gilteritinib Plus Azacitidine Combination Shows Promise in Newly Diagnosed FLT3 -Mutated AML. *The Oncologist* [online]. 2021, **26**(S1), S10-S10 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1083-7159. Dostupné z: doi:10.1002/onco.13652
- (7) YASU, Takeo, Tomiyuki SUGI, Kenji MOMO, Masao HAGIHARA a Hiroshi YASUI. Determination of the concentration of gilteritinib in human plasma using HPLC. *Biomedical Chromatography* [online]. 2021, **35**(4) [cit. 2022-04-29]. ISSN 0269-3879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.5028
- (8) GARRISON, Dominique A., Yan JIN, Muhammad Erfan UDDIN, Alex SPARREBOOM a Sharyn D. BAKER. Development, validation, and

- application of an LC-MS/MS method for the determination of the AXL/FLT3 inhibitor gilteritinib in mouse plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 2021, **1179** [cit. 2022-04-29].
- (9) WANG, Qiong, Zhe CHEN, Dingwen CHEN a Xia-yan YE., An LC-MS/MS Bioanalytical Assay for the Determination of Gilteritinib in Rat Plasma and Application to a Drug–Drug Interaction Study, *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 2020, 14, 2061-2067 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S243760
- (10) Joni J. Palmgrén, Jukka Mönkkönen, Timo Korjamo, Anssi Hassinen, Seppo Auriola, Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Volume 64, Issue 3, [online] [cit. 2022-04-29] 2006, 369-378, ISSN 0939-6411, Dostupné z <https://doi.org/c.https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S093964110600155X>)
- (11) GLEESON, John P. a Fiona MCCARTNEY. Striving Towards the Perfect In Vitro Oral Drug Absorption Model. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2019, **40**(10), 720-724 [cit. 2022-04-30]. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2019.07.010
- (12) NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- (13) CORRADINI, Danilo, Elena EKSTEEN (KATZ), Roy EKSTEEN, Peter SCHOENMAKERS a Neil MILLER, ed. *Handbook of HPLC* [online]. CRC Press, 1998 [cit. 2022-04-28]. ISBN 9780203909751. Dostupné z: doi:10.1201/9780203909751
- (14) PRZYBYCIEL, Matthew a Ronald MAJORS. Phase Collapse in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *LCGC North America* [online]. 2002, 20(6), 516-523 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/>
- (15) Kovaříková Petra, Stariat Ján, HPLC – popis základního hardwaru, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy [Farmaceutická fakulta v Hradci

- 
- Králové, Univerzita Karlova], [online]. [cit. 2022-04-29] Dostupné z [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%20HPLC%20instrumentace.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%20HPLC%20instrumentace.pdf)
- (16) LACOURSE, Margaret E. a William R. LACOURSE. General instrumentation in HPLC \*. *Liquid Chromatography* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 417-429 [cit. 2022-04-28]. ISBN 9780128053935. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805393-5.00017-8
- (17) SHOYKHET, Konstantin; BROECKHOVEN, Ken; DONG, Michael W. Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices. *LC GC North America*, [online]. 2019, s 374-384 [cit. 2022-05-01] Dostupné z <https://www.chromatographyonline.com/view/modern-hplc-pumps-perspectives-principles-and-practices>
- (18) BERRY, Laverne a Barry L. KARGER. Pumps and injectors for modern liquid chromatography. *Analytical Chemistry* [online]. 1973, **45**(9), 819A-828a [cit. 2022-05-01]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac60331a002
- (19) Steiner Frank, Carsten Paul, Dong Michael W, , *HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices*, *LC GC North America*, [online]. 2019, s 514-529 [cit. 2022-05-01] Dostupné z <https://www.chromatographyonline.com/view/hplc-autosamplers-perspectives-principles-and-practices>
- (20) 2.1 Chromatografické kolony. *HPLC.cz: Teorie HPLC* [online]. Česká republika: Michal Douša, 2020 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: HPLC.cz
- (21) KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- (22) KUMAR, Kalaimani Jayaraj; VIJAYAN, Venugopal. An overview of liquid chromatography-mass spectroscopy instrumentation. [online]. 2014, 128(1-2), 93-106 [cit. 2022-05-01] Dostupné z: <https://www.phmethods.net/articles/an-overview-of-liquid-chromatographymass-spectroscopy-instrumentation.pdf>
- (23) Pitt J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, [online], 2009, 19–34. [cit. 2022-05-01], Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>

- 
- (24) TAOUATAS, Nadia, Madalina M DRUGAN, Albert J R HECK a Shabaz MOHAMMED. Straightforward ladder sequencing of peptides using a Lys-N metalloendopeptidase. *Nature Methods* [online]. 2008, 5(5), 405-407 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1204
- (25) Kovaříková Petra, Stariat Ján, Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova], [online]. [cit. 2022-04-29], Dostupné z [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod\\_resource/content/6/Lekce%206\\_MS.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod_resource/content/6/Lekce%206_MS.pdf)
- (26) SADÍLEK, Martin. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy* [online], 2020, 114.2: 133-144, [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: [3541-Article-Text-5097-1-10-20200213.pdf \(gcms.cz\)](https://www.gcms.cz/Article-Text-5097-1-10-20200213.pdf)
- (27) GROSS, Jürgen H. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, 2011-12-15, s. 507-559 [cit. 2022-05-01]. ISBN 978-3-642-10709-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-10711-5\_11
- (28) PAPADOYANNIS, Ioannis N. a Victoria F. SAMANIDOU. Validation of HPLC Instrumentation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2011, 27(5), 753-783 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1081/JLC-120029697
- (29) BRUCE, P., P. MINKKINEN a M. -L. RIEKKOLA. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. *Mikrochimica Acta* [online]. 1998, 128(1-2), 93-106 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/BF01242196
- (30) Guideline on Bioanalytical Method Validation. Ve: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu) [online]. 2011 [cit. 16. 1. 2021]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
- (31) Kovaříková Petra, Stariat Ján, Validace chromatografických metod, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova], [online]. [cit. 2022-04-29], Dostupné z



---

[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/243291/mod\\_resource/content/5/Lekce%2011  
Validace%20HPLC%20metody.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/243291/mod_resource/content/5/Lekce%2011%20Validace%20HPLC%20metody.pdf)

- (32) *OPTI-MEM® Reduced Serum Medium modification of MEM (Eagle's):  
Instructions for Use*. Gibco Intvitrogen Corporation, 2001. Dostupné také z:  
[http://t-takaya.net/manual/Invitrogen\\_51985.pdf](http://t-takaya.net/manual/Invitrogen_51985.pdf)
- (33) LCQ Fleet: Getting Started Guide. Thermo Fisher Scientific, 2015. Dostupné  
také z: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-97055-  
97225-LC-MS-LCQ-Fleet-Start-Man9705597225-EN.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-97055-97225-LC-MS-LCQ-Fleet-Start-Man9705597225-EN.pdf)
- (34) LEMR, Karel a Lucie BOROVCOVÁ. IONIZACE  
ELEKTROSPREJE. *Chemické listy* [online]. 2020, **114**, 169-188 [cit. 2022-04-  
29]. Dostupné z: [https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-  
h3hsga3/application::paper.paper/3559-Article-Text-5131-1-10-20200309.pdf](https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/application::paper.paper/3559-Article-Text-5131-1-10-20200309.pdf)
- (35) Shimadzu: LCMS-8030 Triple Quadrupole Mass Spectrometer. In: Youtube  
[online]. 13.07.2011 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z:  
<https://www.youtube.com/watch?v=FN5hUIwj0go>. Kanál uživatele  
Biocompare.

---

## 6 SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obrázek 1** Chemická struktura gilteritinibu (strana 14)

**Obrázek 2** Mechanismus účinku FLT3 inhibitorů (strana 14)

**Obrázek 3** Popis chromatografické kolony (strana 23)

**Obrázek 4** Ionizace elektrosprejem (strana 25)

**Obrázek 5** MS spektrometr s kvadrupólem (strana 26)

**Obrázek 6** Schéma trojitého kvadrupólu (strana 27)

**Obrázek 7** Výsledný chromatogram pro vzorek gilteritinibu ( $t_R = 3,91$  min) v Opti-MEM médiu o koncentraci 500 nmol/l za použití vnitřního standardu ( $t_R = 4,38$  min) o koncentraci 200 nmol/l (strana 42)

**Obrázek 8** Diagonální konstrukční uspořádání iontového zdroje (elektrosprej) u MS detektoru Thermo Finnigan Max Advantage LCQ. Červeně je vyznačena oblast, kde docházelo k usazování balastů (strana 43)

**Obrázek 9** Nastavení vzdálenosti sprejovací kapiláry u Thermo Fisher Max Advantage LCQ pomocí šroubu (micrometer) (strana 44)

**Obrázek 10** Ortogonální konstrukční uspořádání iontového zdroje (elektrosprej) u MS detektoru Shimadzu LCMS 8030 (trojitý kvadrupól) (strana 45)

**Obrázek 11** Výsledný chromatogram pro vzorek gilteritinibu ( $t_R = 3,66$  min) v Opti-MEM médiu o koncentraci 500 nmol/l za použití vnitřního standardu ( $t_R = 4,34$  min) o koncentraci 200 nmol/l (strana 46)

**Obrázek 12** Kalibrační křivka pro gilteritinib v rozmezí 10-500 nmol/l v buněčném médiu Opti-MEM. Graf vyjadřuje závislost poměru plochy pod píkem gilteritinibu ( $A_{GIL}$ ) a vnitřního standardu ( $A_{IS}$ ) na koncentraci gilteritinibu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ( $n=4$ )  $\pm$  směrodatná odchylka (strana 48)



---

## 7 SEZNAM TABULEK

**Tabulka 1** Lineární gradient (strana 16)

**Tabulka 2** Příprava kalibračních hladin do kalibrační křivky pro kvantifikaci gilteritinibu (GIL) (strana 37)

**Tabulka 3** Parametry iontového zdroje LCQ-ESI pro analýzu gilteritinibu (strana 39)

**Tabulka 4** Parametry iontového zdroje QQQ-ESI pro analýzu gilteritinibu (strana 40)

**Tabulka 5** Vliv vzdálenosti sprejovací kapiláry na odezvu gilteritinibu (GIL; 500 nmol/l v Opti-MEM médiu) a vnitřního standardu (IS; 200 nmol/l) ve společné směsi (1:1, v/v) po 40 nástřicích vzorku vyjádřený jako relativní směrodatná odchylka (RSD) (strana 44)

**Tabulka 6** Vliv konstrukce iontového zdroje u Shimadzu LCMS 8030 na odezvu gilteritinibu (GIL; 500 nmol/l) a vnitřního standardu (IS; 200 nmol/l) ve společné směsi (1:1, v/v) po 40 a 100 nástřicích vzorku vyjádřený jako relativní směrodatná odchylka (RSD) (strana 46)

**Tabulka 7** Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky ( $y=0,002947x+0001197$ ) a její parametry. Dosazením poměru plochy pod píkem pro gilteritinib ( $A_{GIL}$ ) a vnitřní standard ( $A_{IS}$ ) do rovnice kalibrační křivky byla zpětně vypočítána koncentrace jednotlivých hladin a vyjádřená v procentech vzhledem k referenční koncentraci (strana 47)

**Tabulka 8** "Within run" přesnost a preciznost metody. Přesnost pro jednotlivé koncentrační hladiny je vyjádřena jako průměr vypočítaných koncentrací ( $c$ ) z pěti měření ( $n=5$ )  $\pm$  směrodatná odchylka (SD) a procentuálně vyjádřena vzhledem k referenční hodnotě. Preciznost je vyjádřena jako variační koeficient (CV) (strana 48)

**Tabulka 9** "Between-run" přesnost a preciznost metody. Přesnost pro jednotlivé koncentrační hladiny je vyjádřena jako průměr vypočítaných koncentrací ( $c$ ) ze tří měření ( $n=3$ )  $\pm$  směrodatná odchylka (SD) a procentuálně vyjádřena vzhledem k referenční hodnotě. Preciznost je vyjádřena jako variační koeficient (CV) (strana 49)

**Tabulka 10** Matricový efekt normalizovaný na vnitřní standard (IS-normalizovaný ME) vyjádřený jako průměr ze šesti stanovení ( $n=6$ )  $\pm$  směrodatná odchylka (SD) a variační koeficient (CV) (strana 50)



*Tabulka 11* Stabilita gilteritinibu (GIL) v Opti-MEM buněčném médiu vyjádřena v procentech vůči čerstvě připravenému standardu (strana 51)