

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Lucie Švadlenková

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

Konzultant: Mgr. Adam Reguli

Hradec Králové, 2024

„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 1. 5. 2024

.....

Lucie Švadlenková

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Petře Štěřbové, PhD. a konzultantovi Mgr. Adamovi Regulimu za odborné vedení mé práce, obrovskou ochotu a vstřícnost, trpělivost a za poskytování cenných rad, nejen při práci v laboratoři, ale také při konzultacích a při psaní této práce. Práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 666).

OBSAH

<i>ABSTRAKT</i>	6
<i>ABSTRACT</i>	7
<i>Použité zkratky</i>	8
1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
<i>2.1 Princip kapalinové chromatografie a ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie</i>	11
<i>2.1.1 UHPLC instrumentace</i>	11
2.2. Spojení LC-MS	15
<i>2.2.1 Ionizace</i>	15
<i>2.2.2 Hmotnostní analyzátory</i>	17
<i>2.2.3 Detekce a typy záznamů</i>	20
<i>2.2.4 Kvantitativní hodnocení pomocí LC-MS</i>	21
2.3 Úprava biologického vzorku před analýzou	23
<i>2.3.1 Precipitace proteinů</i>	23
<i>2.3.2 Extrakce kapalina-kapalina</i>	23
<i>2.3.3 Extrakce na pevné fázi</i>	24
<i>2.3.4 Mikroextrakční techniky</i>	24
2.4 Validace metody	25
2.5 Analyzovaná potenciální léčiva	26
3 CÍL PRÁCE	27
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1 Použité chemikálie, materiál, přístroje a pomůcky	28
<i>4.1.1 Chemikálie</i>	28
<i>4.1.2 Materiál</i>	28
<i>4.1.3 Přístroje</i>	28
4.2 Příprava roztoků	29
<i>4.2.1 Zásobní roztoky</i>	29

4.2.2 Pracovní roztoky.....	29
4.2.3 Standardní roztoky.....	29
4.3 Optimalizace UHPLC-MS/MS podmínek.....	29
4.4 Úprava vzorku.....	31
4.5 Validace metody a její aplikace do analýzy reálných vzorků plazmy.....	32
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
5.1 Optimalizace UHPLC-MS/MS podmínek.....	34
5.2 Úprava vzorku.....	37
5.3 Validace metody.....	38
5.4 Analýza reálných vzorků plazmy z farmakokinetické studie.....	39
6 ZÁVĚR.....	41
POUŽITÁ LITERATURA.....	42

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Lucie Švadlenková

Konzultant: Mgr. Adam Reguli

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

Název diplomové práce: UHPLC-MS/MS analýza vybraných potenciálních léčiv v biologickém materiálu

Látky s kódovým označením JM-298 a JM-299 jsou polohové izomery, které jsou v současné době předmětem intenzivního výzkumu jako potenciální léčiva používaná v léčbě metabolických a jaterních onemocnění. Cílem této práce je vyvinout a validovat UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení těchto analytů z plazmy a stanovit jejich farmakokinetický profil v tomto materiálu po podání myším.

Při úpravě vzorku plazmy (25 µl) bylo zkoušeno několik precipitačních činidel (acetonitril, okyselený acetonitril, methanol a okyselený methanol), kdy nejvyšší výtěžnosti a nejnižších matricových efektů bylo dosaženo při použití 250 µl methanolu. Samotná analýza probíhala za využití UHPLC-MS/MS instrumentu s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. Separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 (2,1×50 mm, 1,7 µm) opatřené předkolonou se stejným typem sorbentu. Kolonový prostor byl vyhříván na 30 °C a objem nástřiku vzorku byl 1 µl, průtoková rychlost mobilní fáze 0,3 ml/min. V rámci optimalizace byly testovány různé mobilní fáze, a to například směsi acetonitrilu či methanolu s různými koncentracemi kyseliny mravenčí ve vodě při izokratické i gradientové eluci. Nejvyšší odezvy s optimální symetrií píků bylo dosaženo při gradientové eluci s mobilní fází tvořenou 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě a acetonitrem. Vyvinutá metoda byla validována pro obě látky v koncentračním rozmezí 0,25 až 25,00 µg/ml v plazmě a následně použita pro stanovení farmakokinetického profilu v myší plazmě po podání látky JM-298 nebo JM-299.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Lucie Švadlenková

Supervisor – specialist: Mgr. Adam Reguli

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

Title of Thesis: HPLC-MS/MS analysis of selected drug candidates in biological materials

Substances with codenames JM-298 and JM-299 are positional isomers that are currently under intensive research as potential drugs used in the treatment of metabolic and liver diseases. The aim of this work was to develop and validate the UHPLC-MS/MS method for the determination of these analytes from plasma and to determine their pharmacokinetic profile in this material after administration to mice.

Several precipitating agents (acetonitrile, acidified acetonitrile, methanol and acidified methanol) were tested in plasma sample preparation (25 μ l), where the highest recoveries and the lowest matrix effects were achieved when 250 μ l of methanol was used. The analysis was carried out using the UHPLC-MS/MS instrument with electrospray ionisation in positive mode. Separation was carried out using an Acquity UPLC BEH C18 (2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m) protected with a pre-column with the same sorbent. The column oven was heated to 30 $^{\circ}$ C and the sample injection volume was 1 μ l, the flow rate of the mobile phase was 0.3 ml/min. As part of the optimisation, various mobile phases were tested, for example mixtures of acetonitrile or methanol with different concentrations of formic acid in water during isocratic and gradient elution. The highest response with optimal peak symmetry was achieved by gradient elution with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water and acetonitrile. The developed method was validated for both substances in the concentration range of 0.25 to 25.00 μ g/ml in plasma and subsequently used for the determination of the pharmacokinetic profile in mice plasma after the administration of JM-298 or JM-299.

Použité zkratky

ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
EMA	Evropská léková agentura
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
HF-LPME	extrakce s využitím dutého vlákna
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na léky pro humánní použití
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LIT	lineární iontová past
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LLOQ	spodní limit kvantifikace
ME	matricové efekty
MeOH	methanol
MEPS	mikroextrakce tuhou fází ve stříkačce
MF	mobilní fáze
MRM	selektivní záznam více reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
PEEK	polyetheretherketon
PTFE	polytetrafluorethylen
Q	kvadrupól
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
RIC	rekonstruovaný iontový proud
SBSE	sorpční extrakce na míchací tyčince

SDME	mikroextrakce do kapky organického rozpouštědla
SF	stacionární fáze
SIM	selektivní záznam iontů
SPDE	dynamická extrakce na tuhou fázi
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevnou fázi
SRM	selektivní záznam jedné reakce
TIC	celkový iontový proud
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ULOQ	horní limit kvantifikace

1 ÚVOD

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií se stala důležitou součástí farmaceutické analýzy a bioanalýzy. Velmi rychle vytlačila z použití klasickou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, a to především díky zkrácení doby samotné analýzy, vyšší citlivosti a lepší separační účinnosti [1]. Umožňuje nám identifikovat strukturu a obsah léčiva, metabolitů, ale i odhalit případné nečistoty. Před samotnou chromatografickou analýzou je nutná úprava biologického vzorku. Vzhledem k množství balastních a interferujících látek by bez tohoto kroku mohlo dojít k poškození chromatografického systému a zkreslení výsledků měření. Jedná se o nejkritičtější krok analýzy z hlediska chyb a časové náročnosti. K úpravě vzorku se nejčastěji používají metody jako je precipitace, extrakce z kapaliny do kapaliny nebo extrakce na tuhou fázi.

Nezbytnou součástí vývoje nových a efektivnějších léčiv je sledování farmakokinetických parametrů, na základě kterých je možné popsat osud léčiva v organismu. Tato práce se zaměřuje na vývoj UHPLC-MS/MS metody včetně úpravy vzorku.

Chromatografická metoda byla upravena na základě metody pro stanovení strukturního analogu testovaných analytů s kódovým označením XK-469, který byl použit jako vnitřní standard. Optimalizace spočívala primárně v testování ideálního složení mobilní fáze a úpravě gradientu. V rámci vývoje úpravy vzorku byla testována různá precipitační činidla s cílem zabezpečit nejvyšší možnou výtěžnost s minimálními matricovými efekty.

Po validaci byla metoda použita ke stanovení farmakokinetického profilu v myší plazmě po dobu 24 hodin od perorálního podání látky JM-298 nebo JM-299.

2 TEORETICKÁ ČÁST

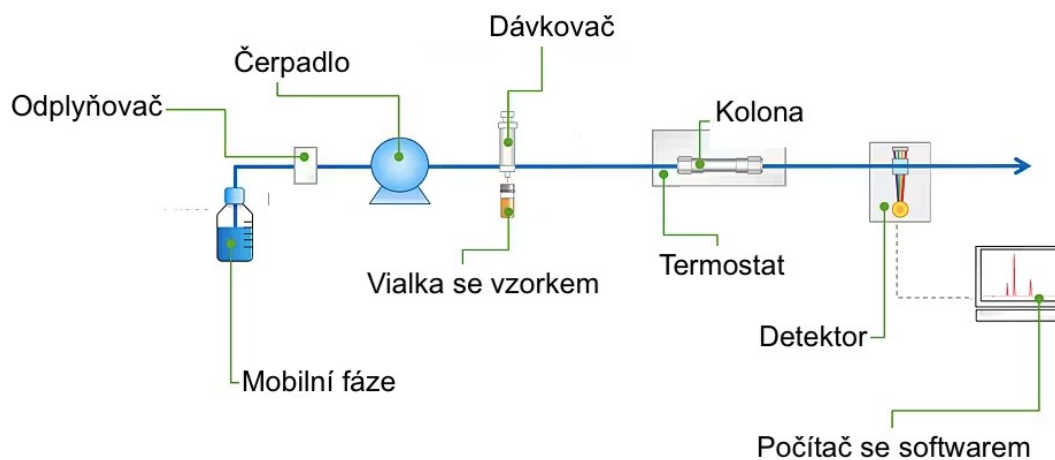
2.1 Princip kapalinové chromatografie a ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC, liquid chromatography) je fyzikální separační metoda, která umožňuje dělit analyty na základě jejich rozdílné distribuce mezi mobilní (proudící kapalina) a stacionární fázi (sorbent uvnitř kolony).

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, ultra-high performance liquid chromatography) je důležitým počinem ve vývoji vysokoúčinné kapalinové chromatografie. UHPLC využívá kolon, které jsou naplněné velmi malými částicemi, díky kterým je separace účinnější a rychlejší. Avšak malé částice generují vyšší zpětný tlak, proto je potřeba použít zařízení odolné vůči vysokým tlakům s minimálním mimokolonovým příspěvkem [1][2].

2.1.1 UHPLC instrumentace

Základní části UHPLC jsou zásobníky mobilní fáze (MF), odplyňovač, vysokotlaká čerpadla, dávkovací zařízení, chromatografická kolona umístěná v termostatu a detektor. Celý systém je připojený k počítači s vhodným softwarem (obr. 1).



Obr. 1: Schéma UHPLC (převzato a upraveno podle [3]).

Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky MF jsou nejčastěji tlustostěnné skleněné lahve naplněné příslušnou mobilní fází, opatřené víčkem nebo hliníkovou fólií, která zabraňuje vniknutí nečistot do příslušného rozpouštědla a brání jeho nadměrnému odpařování. Důležitá je inertnost materiálu nádoby vůči mobilní fázi, aby nedocházelo ke kontaminaci mobilní fáze v důsledku nežádoucí extrakce složek materiálu nádoby [4].

Mobilní fáze je do systému nasávaná přes fritu, která udržuje přívodní hadici na dně zásobníku a její primární funkcí je filtrace případných nečistot jako je například prach. Doporučená porozita frit je $\geq 10 \mu\text{m}$, aby nedocházelo k omezení proudění rozpouštědla [4].

Odplyňovač

Plyny rozpuštěné v mobilní fázi mohou vést ke kolísání tlaku v systému a také k ovlivnění detekce, a to především u ultrafialových, fluorescenčních a elektrochemických detektorů [4].

Odplynění lze provést několika způsoby: probubláváním heliem, působením ultrazvuku nebo vakuem. U UHPLC systémů volíme nejčastěji online vakuové odplyňování, kde mobilní fáze prochází tenkostěnnou porézni hadičkou z polytetrafluorethylenu (PTFE) umístěnou ve vakuové komoře. Rozdíl tlaků pak umožní odsátí plynů z mobilní fáze [4][5].

Vysokotlaká čerpadla

Vysokotlaká čerpadla zajišťují pohyb MF chromatografickým systémem. Čerpání mobilní fáze musí být přesné, reprodukovatelné a bezpulsní. Rychlost průtoku u UHPLC systému se pohybuje v rozsahu 0,01 až 2 ml/min při pracovním tlaku až 1500 bar [6][7].

Vysokotlaká čerpadla můžeme rozdělit dle principu, na kterém pracují, tj. na čerpadla pracující při konstantním tlaku a čerpadla pracující při konstantním objemovém průtoku. Druhá z jmenovaných možností je díky vyšší robustnosti dominantní [6].

V současnosti se nejvíce využívají pístová čerpadla. Tento typ čerpadel uvádí MF do pohybu pístem. Píst se pohybuje prostřednictvím elektromotoru rychlostí, která odpovídá požadované rychlosti průtoku kapaliny.

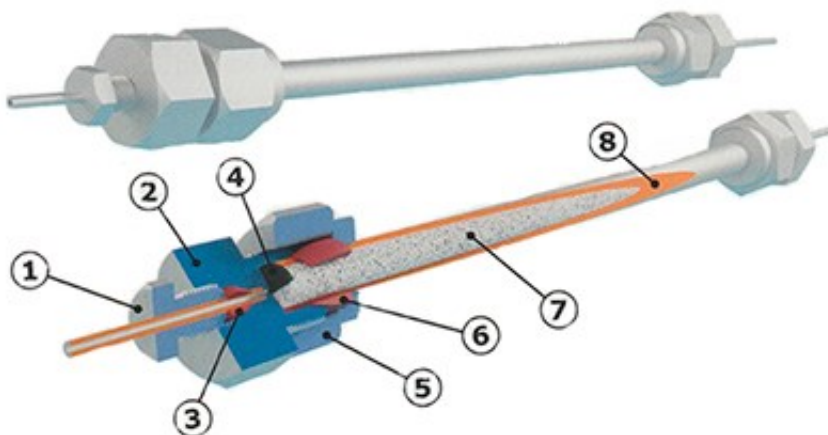
Pro minimalizaci pulzací jsou v současné době používána pístová čerpadla s dvěma hlavami, kdy jedna hlava nasává mobilní fázi a současně druhá svůj obsah vytlačuje dále do systému. Mluvíme o recipročním zapojení hlav v čerpadle [6].

Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení pracuje u UHPLC systému při velmi vysokých tlacích a je schopné nastříkat velmi malé množství vzorku ($<2 \mu\text{l}$) s vysokou správností a přesností [1]. Automatické dávkovací zařízení (autosampler) se skládá ze dvou hlavních částí: nástřikového zařízení, které má za úkol dávkování přesného množství vzorku (vícecestný ventil a dávkovací smyčka), a prostoru pro umístění vialk obsahujících vzorky. Díky možnosti úpravy teploty uvnitř autosampleru je možné i při delším skladování vzorků zachovat jejich potřebnou stabilitu. Autosamplery v současné době vytlačují manuální dávkování [6].

Chromatografická kolona

Chromatografická kolona (obr. 2), umístěná v horkovzdušném termostatu, je nejdůležitější částí chromatografického systému. Uvnitř kolony je ukotvena stacionární fáze. Kolona musí odolávat vysokým tlakům, chemickému působení mobilní fáze a vnitřní povrch musí být hladký. Nejčastěji jsou vyráběny z nerezové oceli, případně z polyetheretherketonu (PEEK) [6]. Kolony pro UHPLC analýzy jsou obvykle dlouhé 50–100 mm o tloušťce 2,1 mm [8] a jsou naplněné stacionární fází s částicemi menšími než $2 \mu\text{m}$ [1].



Obr. 2: Konstrukce chromatografické kolony: 1 – vstup pro kapiláru se šroubem, 2 – koncová hlavice, 3 – těsnění vstupního šroubu, 4 – frit, 5 – ochranný kroužek, 6 – těsnění koncové hlavice, 7 – náplň kolony, 8 – plášť kolony (převzato z [6]).

Stacionární fáze

Stacionárních fází (SF) máme několik typů. Jedním z nejstarších typů jsou SF na bázi silikagelu, jejich nevýhodou je omezená stabilita v bazickém prostředí, kde se

silikagel rozpouští a v silně kyselém prostředí, kde dochází k hydrolyze navázané funkční skupiny. Povrchové silanolové skupiny mohou být modifikovány vhodnými organickými sloučeninami, které určují selektivitu připravené fáze. Chemicky vázané SF mají omezenou stabilitu v silně kyselém prostředí, kde dochází k hydrolyze navázané funkční skupiny. Chemicky vázané polární SF obsahují navázaný např. aminopropyl, nitrilovou skupinu nebo diol. Nepochární pak nejčastěji C8, C18 nebo fenylovou skupinu. Reverzní fáze na bázi silikagelu jsou nejrozšířenějším typem sorbentu [9].

Dalším typem je SF na bázi oxidů kovů, která patří mezi polární anorganické sorbenty, používané jako alternativa k silikagelu díky lepší chemické stabilitě. Dále SF na bázi organických polymerů, které měly nahradit silikagel, vzhledem ke své stabilitě v širokém rozmezí pH i při vysokých teplotách. Využití u UHPLC lze jen těch, které dosahují limitů mechanické odolnosti, nejčastěji polyvinylalkohol nebo methakryláty [6].

Hybridní stacionární fáze, které vznikly kombinací silikagelu a organického polymeru. Jejich vlastnosti jsou chemicky i termálně lepší než u silikagelu, příkladem jsou hybridní SF s ethylenovými můstky, připravené povrchovou modifikací. Dále SF na bázi grafitizovaného uhlíku s nejlepší mechanickou stabilitou a chromatografickou účinností. Pro iontově-výměnnou chromatografii využíváme SF schopné vyměňovat ionty na pevném nosiči. Dělíme je na katexy (záporně nabitě) a anexy (kladně nabitě) [6].

Detektor

Detektory jsou v chromatografickém systému umístěny přímo za kolonou, aby se zabránilo rozmývání píku. Zaznamenávají rozdíl v signálu při průtoku samotné mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyty, který převádí na elektrickou energii.

Vlastnosti ideálního detektoru jsou vysoká citlivost, univerzálnost ve spektru analytů, selektivita, široký lineární rozsah, nedestruktivnost, signál nezávislý na složení mobilní fáze, změně teploty a průtoku, a také by měl minimálně přispívat k mimokolonovému rozmývání elučních zón [6].

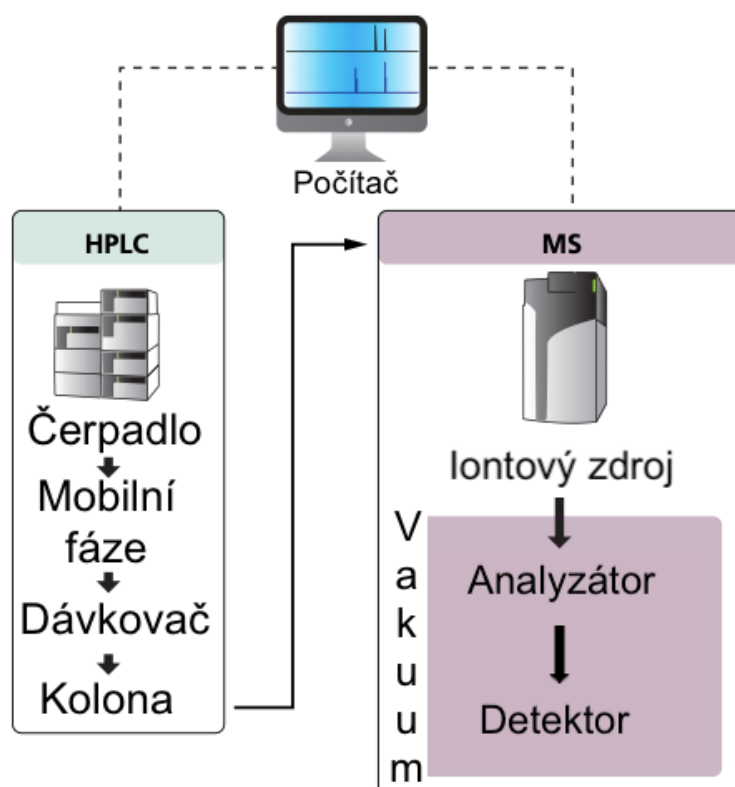
Příklady nejvíce využívaných detektorů v kapalinové chromatografii jsou UV-Vis detektor a hmotnostní spektrometr (MS). Především v bioanalýze je spojení LC-MS klíčové [6], a bude mu věnována samostatná kapitola. Dále se používá také vodivostní, aerosolový, chemiluminiscenční, refraktometrický, elektrochemický nebo fluorescenční detektor.

2.2. Spojení LC-MS

Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda založená na přímém měření poměru hmotnosti a počtu kladných nebo záporných elementárních nábojů iontů v plynné fázi (m/z) získaných ionizací analyzované látky [10].

Data z hmotnostní spektrometrie mají charakter kvalitativní i kvantitativní. V současné době spojení LC-MS převažuje nad spojením LC s plynovou chromatografií, protože se jedná o metodu, kterou lze analyzovat i málo těkavé, polární a tepelně nestálé sloučeniny [11].

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, analyzátor, detektor a počítač s kompatibilním softwarem, kterým se budeme věnovat v následujících podkapitolách (obr. 3).



Obr. 3: Spojení LC-MS (převzato a upraveno dle [12]).

2.2.1 Ionizace

V iontovém zdroji dochází k ionizaci analytů. V současné době se využívá řada ionizačních technik. Způsob ionizace volíme především dle těkavosti, tepelné stability, molekulové hmotnosti a polaritý daného analytu [6].

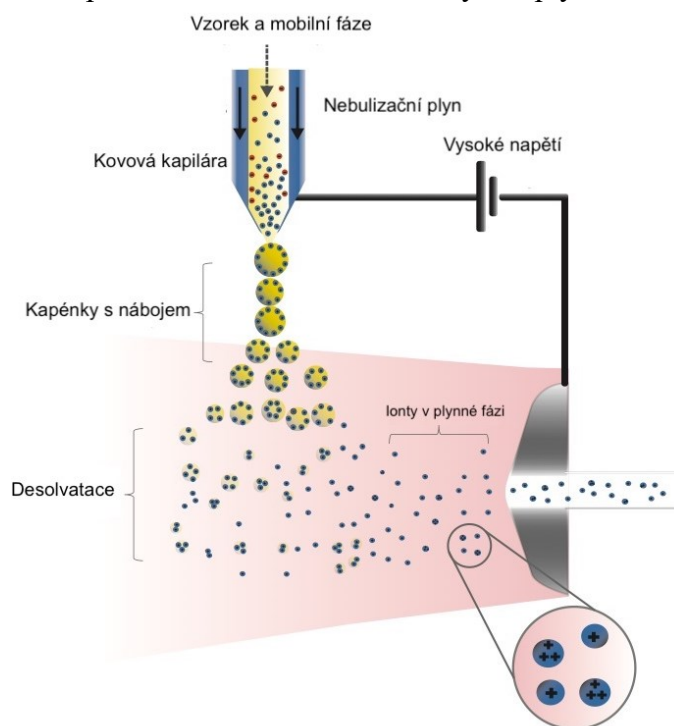
Mezi měkké ionizační techniky řadíme ionizaci elektrosprejem (ESI, electrospray ionization), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) a fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI, atmospheric pressure photoionization). Nejpoužívanějšími ionizačními technikami ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou ESI a APCI. Tyto techniky budou detailněji vysvětleny v následujícím textu [13].

Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem je vhodná především pro netěkavé, tepelně labilní sloučeniny v širokém rozmezí molekulových hmotností [13].

K tvorbě iontů dochází průchodem roztoku analytu přes tenkou kovovou kapiláru, na kterou je vkládáno napětí o velikosti 3 až 6 kV [13]. Mezi kapilárou a elektrodou je vytvořeno elektrické pole, kde vznikají velmi jemné kapky mlhy. Dochází tedy k rozprašování. Rozprašené kapky budou mít kladný nebo záporný náboj v závislosti na polaritě vloženého napětí na kapiláru.

Tyto kapičky se zmenšují odpařováním rozpouštědla v sušícím plynu (nejčastěji dusíku) při atmosférickém tlaku nebo ve vyhřívané komoře při sníženém tlaku. Snižující se velikost kapiček zvyšuje odpuzivé síly mezi přebytečnými náboji v kapce a dochází k její dezintegraci (Coulombické explozi) na mnoho menších kapiček, dokud nedojde k úplnému odpaření rozpouštědla a vzniku iontů analytu v plynné fázi (obr. 4) [14].

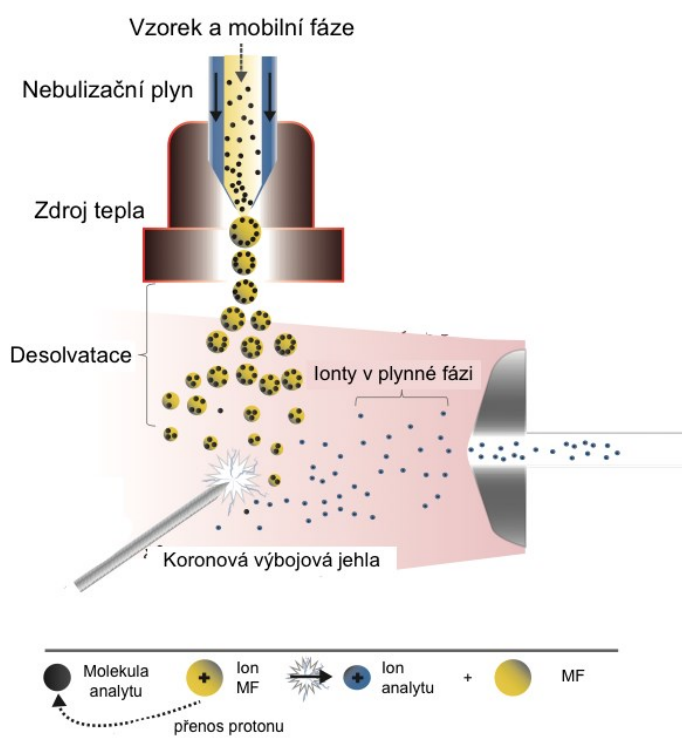


Obr. 4: Ionizace elektrosprejem (převzato a upraveno podle [12]).

Chemická ionizace za atmosférického tlaku

APCI je ionizační technika používaná u nepolárních sloučenin se střední molekulovou hmotností do 1500 Da, není vhodná pro tepelně labilní sloučeniny a vysoce polární látky. Tato technika využívá reakci iontů a molekul v plynné fázi při atmosférickém tlaku [13].

Podobně jako u ESI je mobilní fáze s analyty přivedena do iontového zdroje, konkrétně do pneumatického nebulizátoru, kde je vysokorychlostním proudem dusíku přeměněna na jemnou mlhu. Ta je pak vytlačována proudem plynu přes vyhřívanou desolvatační komoru. Zde dochází k odpaření mobilní fáze a díky vloženému korónovému výboji jsou nejprve ionizovány molekuly rozpouštědla. Ty poté ionizují molekuly analytu (obr. 5) [13].



Obr. 5: Schéma APCI, včetně principu ionizace (převzato a upraveno dle [12]).

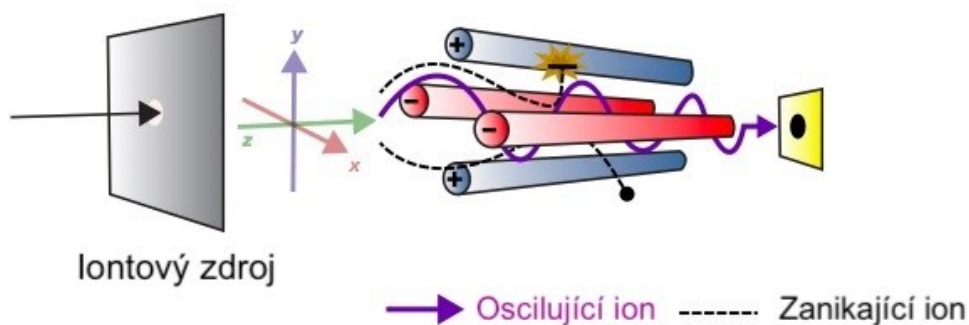
2.2.2 Hmotnostní analyzátořy

Hmotnostní analyzátoř separuje ionty podle poměru hmotnosti k náboji (m/z). Jeho výběř je závislý zejména na vlastnostech analytu a požadavcích prováděného experimentu (např. kvalitativní nebo kvantitativní informace, požadavek na citlivost atd.) [15].

Mezi nejčastější typy analyzátorů patří kvadrupól (Q), trojitý kvadrupól (QqQ), iontová past (IT) a analyzátor doby letu (TOF). Dále je také možné využít analyzátor iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) nebo orbitrap, spolu s četnými kombinacemi, hybridy, těchto analyzátorů.

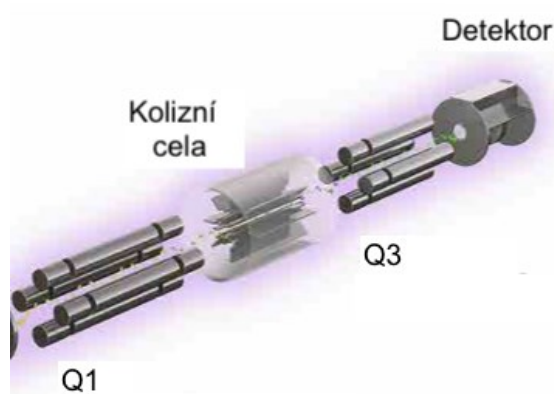
Kvadrupól a trojitý kvadrupól

Kvadrupól funguje jako pomyslný hmotnostní filtr, který filtruje a rozlišuje ionty podle m/z . Skládá se ze čtyř válcových (hyperbolický) tyčí, které jsou navzájem rovnoběžné. Na dvě protilehlé tyče je aplikováno kladné jednosměrné napětí, na další dvě pak záporné. Na všechny je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí [16]. Ionty s konkrétním m/z , přivedené do analyzátoru, při určitém poměru jednosměrného a střídavého napětí stabilně oscilují a projdou kvadrupólem na detektor. Zatímco ionty s odlišným m/z jsou zachyceny tyčemi kvadrupólu (jejich oscilace nejsou při daném poměru složek elektrického pole stabilní), zobrazeno na obr. 6. Používají se také ve spojení s jinými typy analyzátoru, například s TOF [15].



Obr. 6: Kvadrupól (upraveno podle [12]).

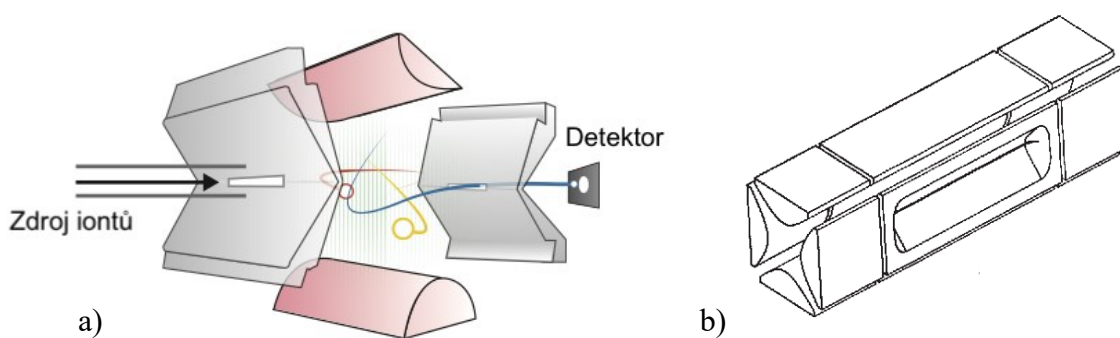
Trojité kvadrupól je složen ze tří kvadrupólových analyzátorů v tandemovém uspořádání. První analyzátor (Q_1) může skenovat v rozsahu hodnot m/z nebo selektivně filtrovat ionty zvoleného m/z . Druhý kvadrupól se používá jako kolizní cela, dochází zde k fragmentaci vybraných iontů z Q_1 . Výsledné fragmenty jsou skenovány třetím kvadrupólem (Q_3) (obr. 7) [15].



Obr. 7: Trojitý kvadrupól (upraveno podle [12]).

Iontová past

Iontová past, nebo také kvadrupólová iontová past, se skládá z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod, na které je podobně jako u kvadrupólu vloženo napětí. Koncové elektrody obsahují otvory pro přívod iontů z iontového zdroje a pro vypuzení iontů na detektor. Trajektorie pohybu iontů v analyzátoru jsou stabilizovány heliem. Změnou napětí na elektrodách dochází k vypuzení iontů dle poměru m/z na detektor. V současné době je použití trojrozměrné iontové pasti nahrazováno lineární iontovou pastí (LIT), která umožňuje vyšší akumulaci iontů a disponuje také vyšší citlivostí. LIT je často použita jako hybridní analyzátor ve spojení Q – LIT nebo LIT – FT-ICR (obr. 8) [17].

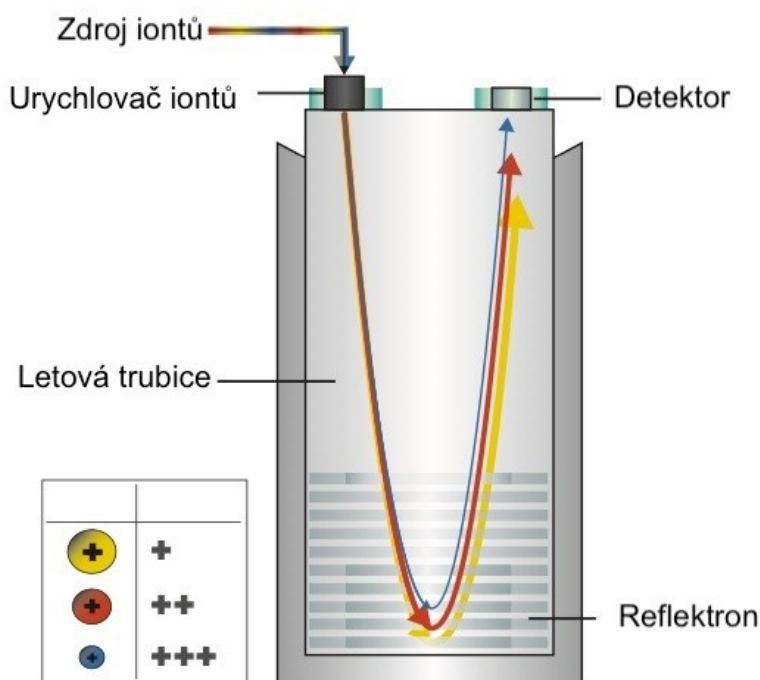


Obr. 8: a) 3D iontová past (převzato a upraveno podle [12]), b) Lineární iontová past [18].

Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu dělí ionty podle různého m/z na základě času potřebného pro jejich průlet – od začátku do konce letové trubice, kde dopadají na detektor. Ionty jsou

urychlovány v elektrickém poli, rychleji proletí ty s menším poměrem m/z . Rozlišení jednotlivých iontů analytů roste úměrně s délkou volné dráhy letu iontů. V současné době se před samotným procesem TOF provádí fokusace a filtrace iontů, což přispívá k minimalizaci šumu. Ke zlepšení rozlišovací schopnosti a přesnosti jsou důležité reflektory neboli iontová zrcadla, protože kompenzují rozdíly v době letu mezi ionty se stejným poměrem m/z a rozdílnou počáteční kinetickou energií (obr. 9) [14][19].



Obr. 9: Schéma analyzátoru doby letu (převzato a upraveno dle [12]).

2.2.3 Detekce a typy záznamů

Ionty projdou hmotnostním analyzátozem a poté jsou detekovány a přeměněny na měřitelný signál pomocí detektoru. Výběr detektoru závisí na řadě faktorů, jako je například dynamický rozsah a zda je daný detektor vhodný pro hmotnostní analyzátoz [20].

Mezi často používané patří elektronový násobič. Výhodou elektronového násobiče je jeho tichý chod a možnost počítání jednotlivých iontů. Dále lze využít fotonásobič či relativně levnou a jednoduchou Faradayovu klec [20].

Typy záznamů, které můžeme analýzou získat:

- Chromatogram celkového iontového proudu (TIC, total ion current) – sběr dat probíhá v celém rozsahu očekávaných m/z , v každém bodě TIC lze získat kvalitativní informace v podobě spektra. Ze záznamu TIC lze extrahovat chromatogram určitého charakteristického iontu nazývaný rekonstruovaný iontový proud (RIC) [6].
- Selektivní záznam iontů (SIM, selective ion monitoring), vyjadřuje závislost vybraného iontu (vybraných iontů) na čase [6].
- Sken produktových iontů – MS/MS sken, obsahuje pouze produktové ionty vzniklé fragmentací z vybraného prekurzoru, využívá se k určení struktury analytu [6].
- Sken neutrálních ztrát – MS/MS sken, kde monitorujeme všechny prekurzory, které podléhají neutrální ztrátě, tento sken je používán pro identifikaci strukturně podobných látek [6].
- Selektivní záznam jedné/více reakcí (SRM/MRM, selective/multiple reaction monitoring) – MS/MS záznam, při kterém sledujeme specifické fragmentační reakce vybraného iontu. Sken se používá v kvantitativní analýze pro svou vysokou selektivitu a citlivost [6].

2.2.4 Kvantitativní hodnocení pomocí LC-MS

Mezi nejčastější techniky kvantifikace pomocí LC-MS patří metoda vnitřního standardu a kalibrační postup [4].

Ačkoli je UHPLC-MS jednou z nejcitlivějších a nejselektivnějších analytických technik, častým problémem pro kvantitativní hodnocení jsou matricové efekty, zejména pak při použití ESI u analýzy komplikovaných matic. Často jsou způsobeny změnou ionizační účinnosti cílových analytů v přítomnosti koelujících sloučenin z matrice. Matricové efekty lze pozorovat jako ztrátu odezvy (zeslabení odezvy iontů) nebo jako zvýšení odezvy (zesílení odezvy iontů). Tento problém je možné řešit několika způsoby: úpravou vzorku, tím dojde k odstranění ostatních složek z matrice; úpravou chromatografických podmínek, díky tomu se látky z matrice budou eluovat v jiném retenčním čase než stanovovaný analyt a tedy nebudou ovlivňovat jeho ionizaci; nebo využitím vnitřního standardu, kdy zásadní význam mají především izotopicky značené standardy [21]. Výše uvedeným metodám kvantifikace se blíže věnuje následující text.

Metoda vnitřního standardu

Principem této metody je, že vnitřní standard (IS) přidáváme k analyzovanému i referenčnímu vzorku ve stejném množství, a to již před úpravou vzorku. S výhodou metodu IS používáme tam, kde dochází k složitější úpravě vzorku před analýzou, a může tak dojít k ztrátě analytu vlivem lidského faktoru, případně u metod, u kterých se může odezva detektoru v průběhu dne měnit vlivem okolních podmínek (např. MS). V případě stanovení více analytů ve vzorku může být žádoucí mít více IS [4].

U LC-MS je možné jako vnitřní standard používat stabilní, izotopově značený standard stanovovaného analytu. Izotopicky značené standardy se koelují společně s analytem (k označení je možné použít ^{13}C nebo deuterium), a tak nepodléhají změnám separačních podmínek nebo podmínkám detektoru. Další velkou výhodou je kompenzace matricových efektů. Pokud není k dispozici izotopicky značená molekula, pak jako IS využíváme strukturní analog analytu [4].

Koncentrace zkoušené látky se stanoví podle vztahu [10]:

$$c_{vz} = \frac{\left(\frac{A_{vz}}{A_{IS}}\right)}{\left(\frac{A_{ST}}{A_{IS}}\right)} \times c_{ST} \quad (1)$$

Kde A_{vz} je plocha stanovované látky, A_{ST} plocha standardu, kterou získáme měřením standardu o známé c_{ST} , a plocha vnitřního standardu A_{IS} .

Kalibrační postup

Při této metodě se stanoví vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem – nejčastěji plocha pod píkem nebo poměr ploch stanovované látky a vnitřního standardu (y) a množství (koncentrace, hmotnost atd.) stanovované látky (x) a vypočítá se kalibrační funkce. V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie má kalibrační křivka ve většině případů tvar přímky, kterou lze popsat rovnicí $y = ax + b$ [10]. Provádí se přípravou řady vzorků v daném koncentračním rozmezí a na základě výsledků analýzy se sestrojí graf závislosti odezvy na koncentraci. Při konstrukci kalibrační křivky je doporučeno použít 5 až 7 kalibračních standardů [22]. Vzdálenost všech bodů od kalibrační křivky popisuje koeficient determinace (R), kde R^2 by mělo být větší než 0,9999 [4]. Dále je možné při vyhodnocování kalibrační křivky uplatnit vážení, např. $1/x^2$ [23].

2.3 Úprava biologického vzorku před analýzou

Úprava biologického vzorku je nezbytným krokem při LC-MS analýze, aby byla zajištěna odpovídající citlivost, selektivita a reprodukovatelnost dané metody. Jedná se o proces, kde dochází k izolaci měřeného analytu z matrice, eliminaci interferujících složek matrice v extrahovaných vzorcích a k zakoncentrování analytu. Ideální způsob úpravy vzorku by měl snížit vliv matrice na minimum při zachování dostatečné extrakční výtěžnosti, která by měla být opakovatelná [24].

2.3.1 Precipitace proteinů

Běžná biologická matrice, jako je např. plazma, sérum nebo krev, obsahuje proteiny, které by po přímém nástřiku do LC-MS systému byly vysráženy organickými rozpouštědly (nebo pufrů) a došlo by k nenávratnému poškození kolony, proto je nutné je před samotnou analýzou odstranit. Jedná se o jednoduchou a rychlou techniku.

Vzorek matrice je smíchán s určitým objemem precipitačního činidla (nejčastěji se jedná o organická rozpouštědla mísitelná s vodou, kyseliny, kovové ionty nebo soli), který má za následek agregaci a precipitaci bílkovin. Po centrifugaci a/nebo filtraci se vysrážené proteiny oddělí od supernatantu obsahujícího stanovovaný analyt. Provádí se v mikrozkušnicích nebo lze i v miniaturizovaném 96jamkovém uspořádání. Výhodou je vysoká výtěžnost, nevýhodou pak odstranění pouze proteinů a vazba analytů na precipitát [24].

2.3.2 Extrakce kapalina-kapalina

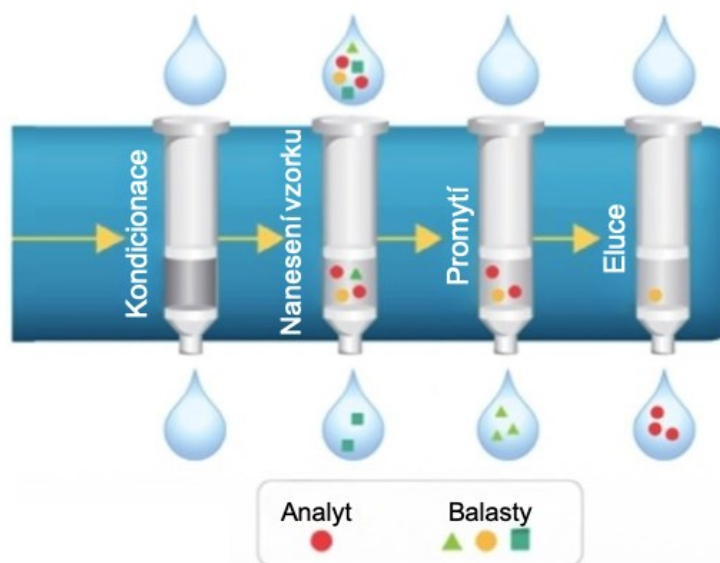
Extrakce kapalina-kapalina (LLE, liquid liquid extraction) je jednou z nejstarších technik v přípravě vzorků. Principem LLE je distribuce složek vzorku na základě jejich rozdílné rozpustnosti mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny. LLE je využívána k odstranění interferujících látek a k zakoncentrování analytu před samotnou analýzou [25].

Provedení spočívá v intenzivním třepání, kdy vzniká nestabilní emulze, která se následně odděluje odstředivou silou. Někdy lze přidat anorganickou sůl, aby se zlepšilo oddělení dvou fází. Extrakční účinnost závisí na selektivitě rozpouštědla, teplotě, tlaku a matricových efektech. V případě, že analyt je v ionizované formě, je třeba upravit pH tak, aby byla potlačena ionizace, a byla tak umožněna extrakce [25].

2.3.3 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (SPE) je všestrannou technikou pro přípravu vzorku. Umožňuje čištění od balastů, zakoncentrování, odsolování, derivatizaci i frakcionaci. Principem SPE je rozdělování mezi kapalnou a pevnou fází na základě interakcí mezi sorbentem a analytem (nejčastěji na základě van der Waalsových sil, vodíkových můstků, interakcí dipól-dipól nebo iontových interakcí kation-anion). SPE kolony jsou dostupné s celou řadou sorbentů, např. chemicky upravený silikagel, polymery, grafitizovaný nebo porézní uhlík. Všechny jsou pak vyráběny tak, aby poskytovaly velmi porézní materiál s velkým povrchem [26].

Obecným postupem (obr. 10) je kondicionace a aktivace kolony, kdy se zvyšuje efektivní plocha povrchu sorbentu a sníží se interference s balasty, provádí se organickými rozpouštědly nebo vodou. Následuje nanesení zkoušeného vzorku na pevnou fázi, kdy dochází k interakci mezi analytem a sorbentem uvnitř kolony a k jeho zachycení, dále promytí vzorku a odstranění nečistot a nakonec dochází k eluci analytu pomocí elučního činidla [26].



Obr. 10: Schéma provedení SPE (převzato a upraveno dle [27]).

2.3.4 Mikroextrakční techniky

V posledních letech je vyvíjeno úsilí zjednodušit proces přípravy vzorků. Hlavním cílem je miniaturizace extrakčního zařízení, minimalizace spotřeby toxických organických rozpouštědel, snížení počtu kroků úpravy vzorku, snížení požadavků na objem vzorku, zkrácení času extrakce a maximalizace její účinnosti. Mezi mikroextrakční techniky odvozené od LLE patří například: mikroextrakce do kapky organického

rozpouštědla (SDME, single drop microextraction), extrakce s využitím dutého vlákna (HF-LPME, hollow fibre liquid phase microextraction) nebo disperzní mikroextrakce [28].

Mezi mikroextrakční techniky odvozené od SPE (SPME, solid phase microextraction), které se liší umístěním sorbentu a způsobem provedení je například SPME využívající vlákno, SPME s tuhou fází ve stříkačce (MEPS, microextraction by packed sorbent), dynamická SPE (SPDE, solid phase dynamic extraction), sorpční extrakce na míchací tyčince (SBSE, stir bar sorptive extraction) nebo také extrakce pomocí plněných pipetovacích špiček, kterou můžeme rozdělit na miniaturizovanou disperzní SPE a „Stop and go extraction“ (miniaturizovaná klasická SPE) [29].

2.4 Validace metody

Validace je regulační požadavek, specifikován je ve směrnicih Amerického úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration), Evropské lékové agentury (EMA, European Medicines Agency), směrnice k validaci vydává také Mezinárodní konference pro harmonizaci (ICH, The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). Cílem validace je prokázat, že daná metoda je spolehlivá a vhodná k účelu, pro který byla vyvinuta [30].

Dle EMA směrnice (Guideline on bioanalytical method validation [31]) patří mezi validační parametry selektivita, přenos analytu, spodní limit kvantifikace, linearita, přesnost, preciznost, diluční integrita, matricové efekty a stabilita.

Stručný popis parametrů hodnocených v experimentální části:

- Přesnost – popisuje blízkost stanovené hodnoty získané metodou k nominální koncentraci analytu (v procentech). Přesnost je posuzována na vzorcích kvality (vzorky QC, quality control), ke kterým je přidáno známé množství analytu [31].
- Preciznost – vyjadřuje pomocí variačního koeficientu blízkost jednotlivých opakovaných měření individuálně připravených vzorků obsahujících analyt. Měla by být prokázána preciznost pro spodní limit kvantifikace (LLOQ, lower limit of quantification), nízké, střední a vysoké QC vzorky [31].
- Linearita – ve specifikovaném koncentračním rozmezí určuje závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu. Koncentrační standardy by měly být připraveny ve stejné matrici jako testované vzorky, tedy např. přidáním známé koncentrace

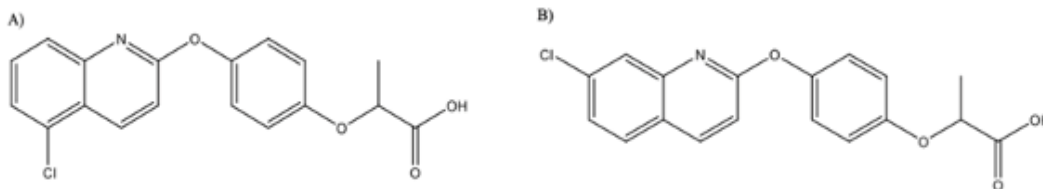
analytu k prázdné plazmě. Testované vzorky by měly mít koncentraci mezi LLOQ a horním limitem kvantifikace (ULOQ, upper limit of quantification). Kalibrační křivka by měla být sestavena minimálně ze šesti úrovní kalibrační koncentrace, slepého vzorku (neobsahuje analyt ani IS) a nulového vzorku (obsahující pouze IS) [31].

- Matricové efekty – vliv použité matrice na analýzu u UHPLC-MS by měl být zkoumán na alespoň šesti vzorcích z různých zdrojů. Pro analyt a vnitřní standard se zjišťuje matricový efekt výpočtem poměru plochy píku v přítomnosti matrice (matrice obohacená po extrakci analytem nebo IS) k ploše píku v nepřítomnosti matrice (čistý roztok analytu nebo IS). Stanovení by mělo být provedeno na dvou úrovních – na nízké úrovni koncentrace (maximálně třikrát LLOQ) a blízko ULOQ [31].

2.5 Analyzovaná potenciální léčiva

2-[4-(5-chlorchinolin-2-yloxy)fenoxy]propanová kyselina (JM-298) a 2-[4-(7-chlorchinolin-2-yloxy)fenoxy]propanová kyselina (JM-299) jsou potenciální léčiva ve fázi preklinického zkoušení, jedná se o polohové izomery (jejich struktury nalezneme na obr. 11). Mechanismem účinku se jedná o ligandy vícejaderných receptorů na bázi kyseliny 2-[4-(chinolin-2-yloxy)fenoxy]propanové a 2-[4-(chinoxalin-2-yloxy)fenoxy]propanové pro léčbu metabolických a jaterních onemocnění (např. hyperlipidémie, hypercholesterolémie, dyslipidémie, steatózy, steatohepatitidy) [32].

Tato potenciální léčiva byla připravena na Katedře organické a bioorganické chemie (skupina doc. Roha) a jejich biologické hodnocení probíhá na Katedře farmakologie a toxikologie (skupina prof. Pávka) [32].



Obr. 11: Chemické struktury analytů: A) JM-298; B) JM-299.

3 CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo:

1. Vyvinout a optimalizovat metody pro stanovení JM-298 a JM-299 z plazmy využívající proteinové precipitace jako úpravy vzorku a následné UHPLC-MS/MS analýzy.
2. Ověřit vybrané validační parametry metod na základě EMA doporučení.
3. Aplikovat metody do analýzy reálných vzorků myší plazmy za účelem stanovení farmakokinetického profilu těchto látek.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, materiál, přístroje a pomůcky

4.1.1 Chemikálie

2-[4-(5-chlorchinolin-2-yloxy)fenoxy]propanová kyselina (JM-298), Katedra organické a bioorganické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

2-[4-(7-chlorchinolin-2-yloxy)fenoxy]propanová kyselina (JM-299), Katedra organické a bioorganické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

2-[4-(7-chlorochinoxalin-2-yloxy)fenoxy]propanová kyselina (XK-469), Katedra organické a bioorganické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Methanol LC-MS čistoty, Merck, Německo

Acetonitril LC-MS čistoty, Merck, Německo

Kyselina mravenčí LC-MS čistoty, Merck, Německo

Králičí plazma s heparinem jako antikoagulačním činidlem, Katedra farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Milli-Q voda připravená pomocí Millipore čistícího systému, Merck Millipore, Německo

4.1.2 Materiál

Kolona Acquity UPLC BEH C18 o rozměrech 2,1×50 mm a velikosti částic 1,7 μm (Waters, Irsko)

Předkolona Acquity UPLC BEH C18 VanGuard o rozměrech 2,1×5 mm a velikosti částic 1,7 μm (Waters, Irsko)

4.1.3 Přístroje

Chromatografický systém (Shimadzu, Japonsko):

UHPLC sestava Nexera X2 Shimadzu – degasser 20 A₅, dvě LC – 30 AD pumpy (jedna má zabudovanou kontrolní jednotku), CTO – 30A kolonový termostat.

Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem jako analyzátozem, ESI⁺ ionizace (LCMS-8030).

Chromatografický program LabSolutions (verze 5.123).

Další přístroje:

Analytické váhy CPA225D-0CE (Sartorius, Německo)

Ultrazvuková koupel Ecoson U-3 STH (Ecoson, Slovensko)

Centrifuga Megafuge 8R (ThermoFisher Scientific, Německo)

Wizard advanced IR Vortex (Velp Scientifica, Itálie)

4.2 Příprava roztoků

4.2.1 Zásobní roztoky

Zásobní roztoky analytů JM-298 a JM-299 i vnitřního standardu XK-469 byly připraveny v koncentraci 1 mg/ml. Požadované množství substance bylo naváženo a následně rozpuštěno v potřebném množství methanolu. Rozpuštění bylo podpořeno vložением do ultrazvukové lázně na dobu 5 minut. Takto připravené zásobní roztoky byly skladované při -20 °C a použitelné po dobu jednoho měsíce.

4.2.2 Pracovní roztoky

Pracovní roztoky JM-298 byly připraveny v koncentračním rozmezí 6,3 – 625,0 µg/ml ředěním ze zásobních roztoků methanolem. Pracovní roztoky JM-299 v koncentračním rozmezí 3,1 – 312,5 µg/ml byly připraveny stejným způsobem. Pracovní roztok vnitřního standardu XK-469 byl připraven naředěním zásobního roztoku methanolem na koncentraci 12,5 µg/ml. Roztoky byly skladované při teplotě -20 °C a použitelné po dobu dvou týdnů.

4.2.3 Standardní roztoky

Standardní roztok byl připraven jako směsný roztok analytu JM-298 a vnitřního standardu XK-469 v methanolu o koncentraci 1 µg/ml. Obdobně byl následně připraven i standardní roztok s JM-299. Roztoky byly skladovány při teplotě 8 °C a analyzovány do 24 hodin po přípravě. Tyto roztoky byly používány při optimalizaci chromatografických podmínek.

4.3 Optimalizace UHPLC-MS/MS podmínek

Při optimalizaci se vycházelo z metody již dříve vyvinuté pro analýzu XK-469. Separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18, opatřené předkolonou Acquity

UPLC BEH C18 VanGuard. Kolonový prostor byl vyhříván na 30 °C a objem nástřiku vzorku byl 1 µl, průtoková rychlost MF 0,3 ml/min.

Použitou ionizační technikou byl elektrosprej nastavený v pozitivním módu, analyzátozem byl trojitý kvadrupól a pro kvantifikaci byl použit SRM mód. MS parametry jsou uvedeny v tab. 1 a SMR přechody jednotlivých analytů v tab. 2.

Tab. 1: Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru.

Parametry MS	
Průtok nebulizačního plynu	3 l/min
Průtok sušícího plynu	15 l/min
Napětí rozhraní	4,5 kV
Teplota „heat“ bloku	400 °C
CID tlak plynu	230 kPa

Tab. 2: SRM přechody.

	Prekurzorový <i>m/z</i>	Produktový <i>m/z</i>	Kolizní energie (eV)
XK-469	344,9	299,0	-20
		136,9	-55
JM-298	344,3	272,1	-25
		162,0	-43
JM-299	344,3	272,1	-25
		162,0	-43

V rámci optimalizace byly testovány následující MF v izokratickém módu (70% B):

- 1) 0,05% kyselina mravenčí ve vodě (A) a acetonitril (B)
- 2) 0,1% kyselina mravenčí ve vodě (A) a acetonitril (B)
- 3) 0,3% kyselina mravenčí ve vodě (A) a acetonitril (B)
- 4) 0,05% kyselina mravenčí ve vodě (A) a methanol (B)

Po výběru složek MF byly dále zkoušeny následující gradientové módy:

- A. 0,00 – 3,00 min (50 - 80% B); 3,00 – 3,01 min (80% B); 3,01 – 4,00 min (95% B); 4,01 – 5,50 min (50% B)

- B. 0,00 – 1,75 min (50 - 80% B); 1,75 – 1,76 min (95% B); 1,76 – 4,00 min (95% B);
4,01 – 5,50 min (50% B)
- C. 0,00 – 1,75 min (70% B); 1,75 – 1,76 min (95% B); 1,76 – 3,00 min (95% B);
3,01 – 5,5 min (70% B)
- D. 0,00 – 0,80 min (35 - 70% B); 0,80 – 2,50 min (70% B); 2,50 – 3,00 min (95% B);
3,00 – 4,00 (95% B); 4,00 – 4,01 (35% B); 4,01 – 5,50 (35% B)

Výpočet vybraných chromatografických parametrů:

K výpočtu faktoru symetrie a rozlišení byly použity vztahy uvedené v Českém lékopise [10].

Faktor symetrie:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (2)$$

Kde $w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Rozlišení:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (3)$$

Kde t_{R1} , t_{R2} jsou retenční časy píků ($t_{R2} > t_{R1}$), w_{h1} , w_{h2} jsou šířky píků v polovině výšky.

4.4 Úprava vzorku

Pro úpravu vzorku plazmy byly testovány různé způsoby proteinové precipitace. Do mikrozkušavek Eppendorf bylo nejdříve pipetováno 25 μ l plazmy s přídavkem analytu (0,25 μ g/ml) a následně bylo přidáno precipitační činidlo. Byla testována následující činidla a jejich objemy: acetonitril (150 μ l); 3,5% kyselina mravenčí v acetonitrilu (150 μ l); 7,0% kyselina mravenčí v acetonitrilu (150 μ l); methanol (150 μ l), methanol (200 μ l); methanol (250 μ l) a 7,0% kyselina mravenčí v methanolu (200 μ l).

Po přidání činidla byl vzorek protřepán pomocí vortexu po dobu 20 sekund a následně centrifugován při 10 000 otáčkách za minutu a 4 °C po dobu 5 minut. Následně

byl odebrán supernatant, který byl zfiltrován přes PVDF filtry s rozměry pórů 0,22 μm a analyzován.

4.5 Validace metody a její aplikace do analýzy reálných vzorků plazmy

Vyvinutá analytická metoda byla validována pro stanovení JM-298 i JM-299 v plazmě podle parametrů Evropské lékové agentury pro validaci bioanalytických metod [31].

Vzhledem k omezené dostupnosti prázdné myší plazmy byla před validací metodou standardního přídatku ověřena možnost použití králičí plazmy namísto myší na přípravu QC a kalibračních vzorků. Analyzován byl vzorek A – reálný vzorek myší plazmy z *in vivo* studie (24 h po aplikaci látky), vzorek B – stejný vzorek s přídatkem známého množství analytu a vzorek C – vzorek prázdné králičí plazmy se stejným přídatkem analytu jako u vzorku B. Následně byla vypočtená procentuální shoda mezi A + C a vzorkem B, která by v případě, že typ plazmy nemá vliv na analýzu, měla být 100 %. Tento experiment byl proveden dvakrát.

V rámci validace byly ověřovány následující parametry – linearita, přesnost a preciznost, matricové efekty a výtěžnost. Linearita v plazmě byla stanovována v rozsahu 0,25 – 25,00 $\mu\text{g/ml}$ na osmi hladinách ($L_1 - L_8$): 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 5,00; 10,00; 15,00 a 25,00 $\mu\text{g/ml}$. Vzorky byly připraveny přidáním 1 μl vnitřního standardu (XK-469; 25,0 $\mu\text{g/ml}$) a 1 μl pracovního roztoku JM-298 o potřebné koncentraci k 24 μl plazmy. Pro JM-299 byly vzorky připraveny přidáním 2 μl IS (XK-469; 12,5 $\mu\text{g/ml}$) a 2 μl pracovního roztoku o příslušné koncentraci k 23 μl plazmy. Po úpravě vzorku precipitací byl každý vzorek nastříknut dvakrát a výsledky byly vyhodnoceny s použitím lineární regrese s vážením $1/x^2$.

Přesnost a preciznost byla zjišťována na koncentračních hladinách 0,25; 1,00 a 25,00 $\mu\text{g/ml}$, kde pro každou hladinu bylo připraveno pět vzorků, analogicky jako bylo popsáno u hodnocení linearity. Přesnost byla stanovena v procentech jako poměr stanovené koncentrace měřeného vzorku vypočtené na základě kalibrační křivky a teoretické (přidané) koncentrace. Preciznost byla vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky (R.S.D.) mezi jednotlivými vzorky na dané koncentrační hladině.

Matricové efekty (ME) byly hodnoceny na koncentrační hladině blízké spodnímu limitu kvantifikace (0,50 $\mu\text{g/ml}$) a hladině blízké hornímu limitu kvantifikace

(15,00 µg/ml), kde pro každou hladinu byly připraveny čtyři vzorky. Byla vypočtena průměrná hodnota poměru plochy pod píkem s přidavkem analytu do prázdné plazmy po extrakčním procesu a plochy pod píkem čistého standardního roztoku. Po výpočtu absolutních ME, byly na základě poměru ME analytu k ME vnitřního standardu vypočítané normalizované ME.

Výtěžnost z plazmy byla ověřena porovnáním ploch píků analytů ve vzorku s plochami píků analytů přidaných do roztoku po extrakci prázdné plazmy. Použité byly dva vzorky o koncentraci 0,25 µg/ml.

V rámci *in vivo* studie (provedené na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Katedra farmakologie, prof. Pávek) byla čtyřem myším perorálně podána dávka 10 mg/kg JM-298 nebo JM-299 a byl sledován 24hodinový koncentrační profil v plazmě. Plazma byla odebírána v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4; 8 a 24 hodin. Vzhledem k tomu, že v prvních časových intervalech (do 1 h) byly koncentrace analytů vyšší než horní bod kalibrace, byly tyto vzorky před úpravou ředěné prázdnu plazmou (12,5 µl prázdné plazmy + 12,5 µl vzorku). Tento krok byl v rámci vyhodnocení zohledněn. V ostatních případech bylo pro extrakci použito vždy 25 µl reálné myší plazmy.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace UHPLC-MS/MS podmínek

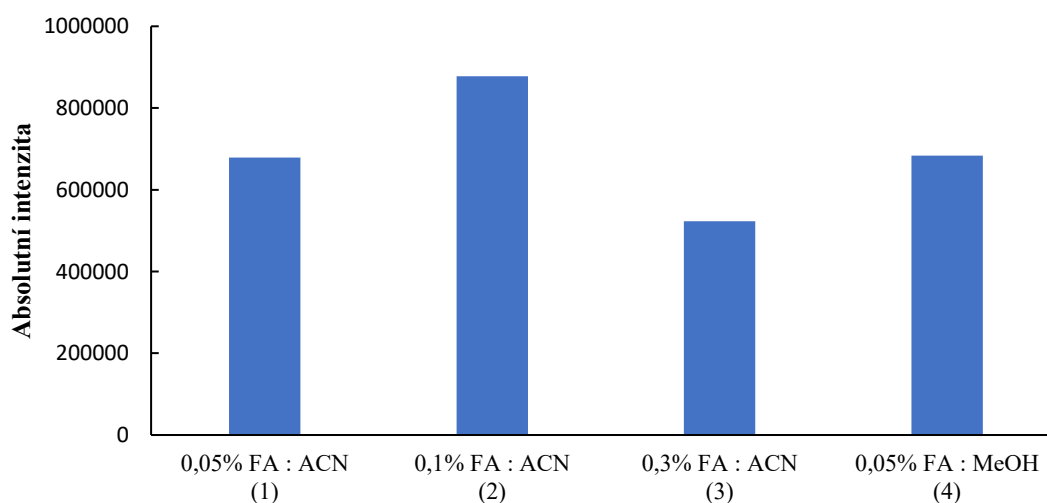
Při vývoji metody byly podmínky primárně optimalizovány pro analýzu látky JM-298 s využitím XK-469 jako IS. Cílem optimalizace bylo zajistit co nejvyšší citlivost detekce, akceptovatelnou symetrii píků (0,8 až 1,5 [10]) a co nejnižší rozlišení (R_s), aby se IS eluoval co nejbližše analytu a byl tedy zatížen obdobnými matricovými efekty, což je výhodné pro kvantifikaci [34], v některých případech pak i pro zkrácení času analýzy.

V první fázi byly testovány různé směsi mobilních fází (viz. Kapitola 4.3 Optimalizace UHPLC-MS/MS podmínek, body 1-4) při izokratické eluci.

Složení MF mělo minimální vliv na symetrii píků, o něco lepší symetrii můžeme vidět u MF č. 4 (uvedeno v tab. 3). Avšak jak vyplývá z obr. 12, nejvyšší odezva detektoru pro JM-298 s akceptovatelnou symetrií píků byla dosažena při použití MF č. 2. Na základě těchto výsledků byla pro další optimalizaci jako optimální zvolena MF, složená z 0,1% kyseliny mravenčí (FA) ve vodě (A) a acetonitrilu (B).

Tab. 3: Faktory symetrie píků dosažené při testování jednotlivých MF v izokratickém módu.

Izokratická eluce	Faktor symetrie	
	XK-469	JM-298
1) 0,05% FA : ACN	1,4	1,3
2) 0,1% FA : ACN	1,5	1,4
3) 0,3% FA : ACN	1,4	1,4
4) 0,05% FA : MeOH	1,2	1,1



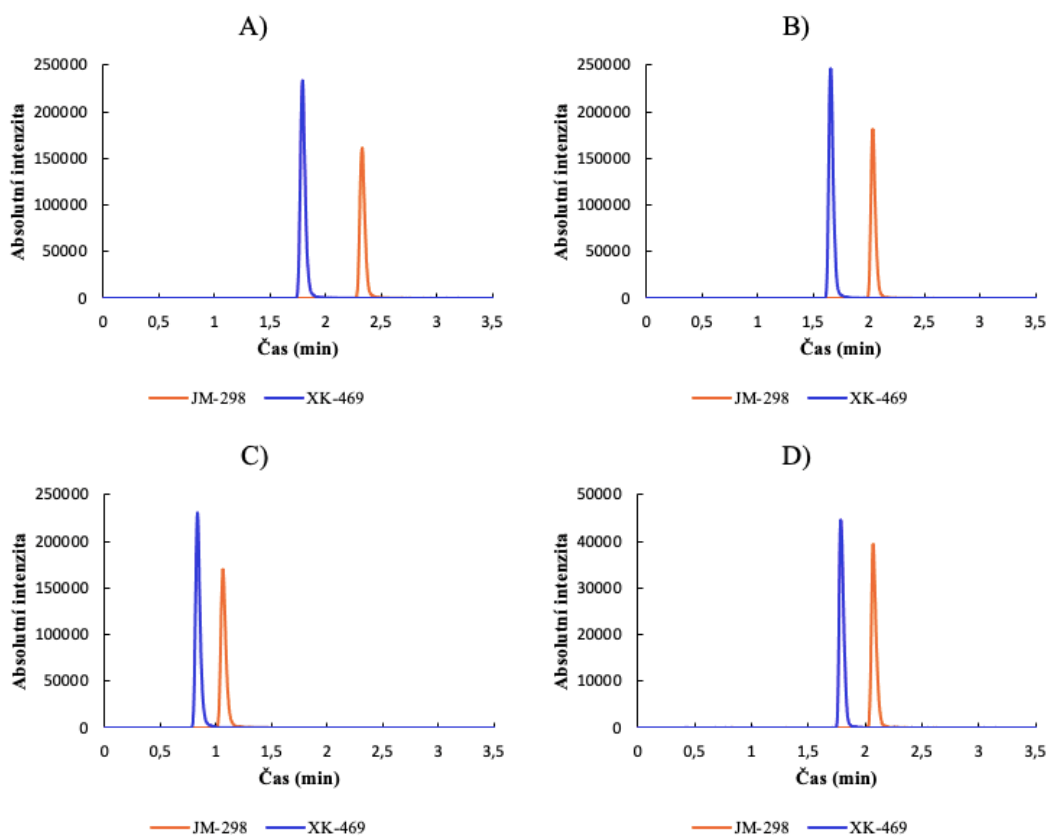
Obr. 12: Závislost odezvy detektoru při použití různých složení mobilních fází při izokratické eluci pro JM-298.

Následně byly pro tuto MF testovány různé gradientové módy (viz. Kapitola 4.3 Optimalizace UHPLC-MS/MS podmínek, body A-D) s cílem dosáhnou co nejnižšího rozlišení mezi stanovovaným analytem a vnitřním standardem, za současného zachování akceptovatelné symetrie píků.

Navzdory tomu, že nejnižší rozlišení je pozorováno při použití gradientu C, jako optimální jsme zvolili gradient D: 0,00 – 0,80 min (35 - 70% B); 0,80 – 2,50 min (70% B); 2,50 – 3,00 min (95% B); 3,0 – 4,0 (95% B); 4,00 - 4,01 (35% B); 4,01 – 5,50 (35% B). Z důvodu, aby se složky matrice neeluovaly současně se stanovovanými analyty (a nedocházelo tedy k potlačení, nebo naopak ke zvýšení odezvy), byl potřebný vyšší poměr hydrofilní mobilní fáze (A) v úvodu gradientu za účelem eluce hydrofilních složek matrice. Po eluci analytů naopak vyšší poměr organické složky (B), za účelem odstranění lipofilních balastů z kolony. Shrnutí vybraných parametrů pro testované gradienty jsou uvedeny v tab. 4 a separace je ilustrována na obr. 13.

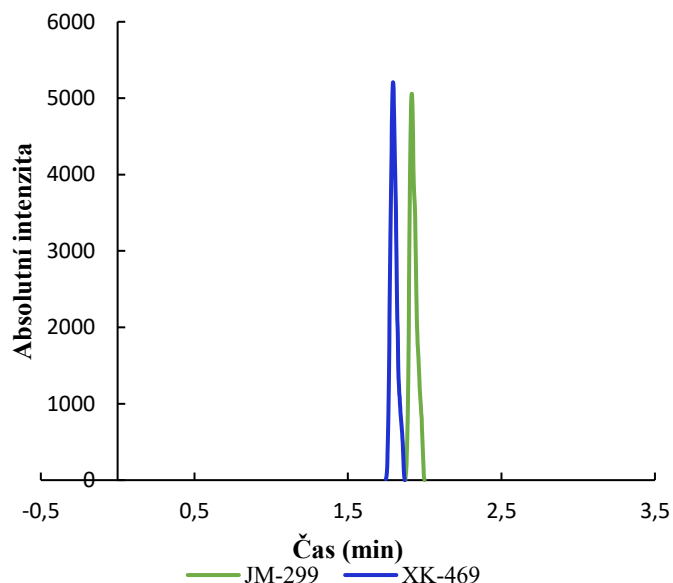
Tab. 4: Retenční časy, faktory symetrie a rozlišení dosažené při testování gradientů MF 0,1% FA ve vodě a ACN.

Gradient	Analyt	Retenční čas	Faktor symetrie	Rozlišení
A	JM-298	2,3	1,2	6,5
	XK-469	1,8	1,3	
B	JM-298	2,0	1,3	5,1
	XK-469	1,7	1,3	
C	JM-298	1,1	1,4	2,8
	XK-469	0,8	1,4	
D	JM-298	2,1	1,4	3,9
	XK-469	1,8	1,4	



Obr. 13: Záznamy separace JM-298 a XK-469 při použití gradientů A-D.

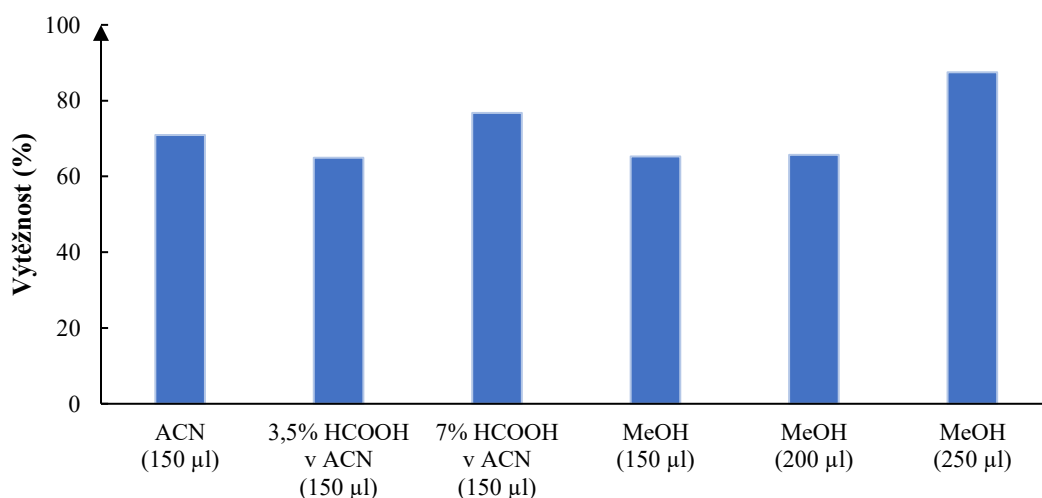
Optimalizace metody probíhala pro JM-298. Následně byly tyto podmínky aplikovány i v rámci analýzy JM-299. Rozlišení nabývalo hodnoty 1,6 a IS se tedy eluoval blíže analytu než při analýze JM-298. Analýzou QC vzorků a vzorků pro kalibrační přímkou na spodní až horní hladině bylo prokázáno, že metoda je dostatečně citlivá i pro stanovení JM-299 z biologické matrice. Reprezentativní chromatogram separace JM-299 a XK-469 můžeme vidět na obr. 14.



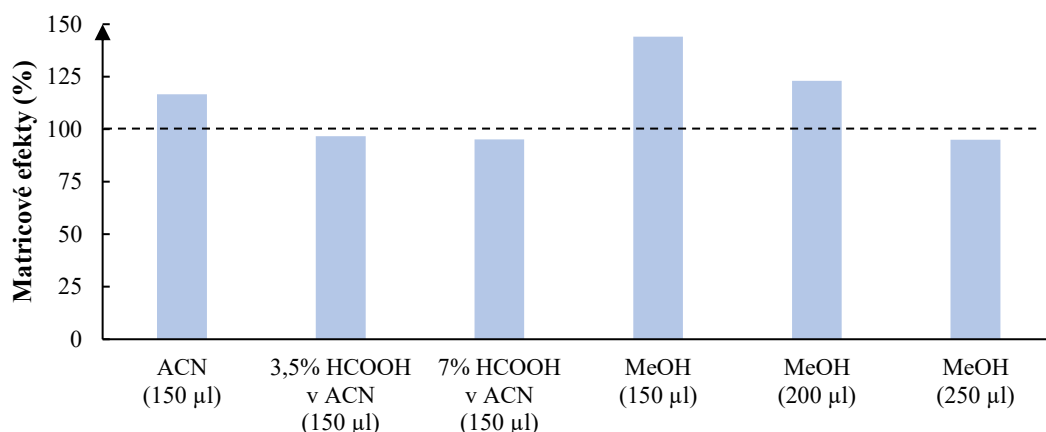
Obr: 14: Záznam separace JM-299 a XK-469 při použití gradientu D.

5.2 Úprava vzorku

K úpravě vzorku byla použita precipitace, která byla použita i v metodě pro analýzu XK-469, ze které jsme vycházeli. Při zpracování vzorku byla zkoušena následující precipitační činidla uvedená na obr. 15 s cílem zajistit co nejvyšší výtěžnost (obr. 15) s co nejnižšími matricovými efekty (obr. 16). Nejlepší výtěžnosti (87,5 %) a nejnižších absolutních matricových efektů (95,0 %) u JM-298 bylo dosaženo při použití 250 μ l methanolu. Stejný způsob byl použitý také na úpravu vzorků s JM-299, v tomto případě byla výtěžnost 92,3 % a absolutní matricové efekty 99,6 %.



Obr. 15: Přehled průměrných výtěžností jednotlivých precipitačních činidel pro JM-298 (n=2).



Obr. 16: Přehled absolutních matricových efektů jednotlivých precipitačních činidel pro JM-298 (n=1).

5.3 Validace metody

Před samotnou validací metody byla na základě využití metody standardního přídatku ověřena shoda mezi králíčí a myší plazmou, která činila 96,6 % (průměrná hodnota ze 2 experimentů). Bylo prokázáno, že je možné použít králíčí plazmu jako prázdnou matici pro přípravu QC a kalibračních vzorků bez toho, aby byly ovlivněny výsledky stanovení JM-298 a JM-299 v myší plasmě.

Linearita byla hodnocena v koncentračním rozmezí 0,25 – 25,00 µg/ml pro JM-298 i JM-299 v plazmě. Metodou lineární regrese byla sestrojena kalibrační křivka s vážením $1/x^2$, s rovnicemi pro JM-298 $y = 0,000584x + 0,00867$ a pro JM-299 $y = 0,001099x + 0,03636$. Koeficient determinace pro JM-298 byl 0,9924 a pro JM-299 0,9920.

Přesnost v rámci jednoho dne pro JM-298 se pohybovala v rozmezí 91,14 – 114,93 % a preciznost v rozmezí 1,7 – 7,8 % R.S.D. U JM-299 byla přesnost 89,1 – 97,0 % a preciznost 5,2 – 10,5 % R.S.D. Mezdenní přesnost a preciznost pro JM-298 byla 99,1 – 129,3 % a 1,5 – 4,7 % R.S.D. Pro JM-299 94,6 – 109,6 % a 7,1 – 10,0 % R.S.D.

V rámci stanovení matricových efektů bylo měřeno šest vzorků na dvou koncentračních hladinách – nízké 0,50 µg/ml a vysoké 15,00 µg/ml. U JM-298 byla hodnota normalizovaných matricových efektů na obou koncentračních hladinách v rozmezí 90,0 – 110,1 % v případě JM-299 v rozmezí 102,5 – 104,4 %.

Výtěžnost byla stanovena pro koncentraci 0,25 µg/ml, u JM-298 dosahovala 87,5 % a u JM-299 92,3 %. Pro výpočet matricových efektů a výtěžnosti byl použit postup uvedený v kapitole 4.5 Validace metody a její aplikace do analýzy reálných vzorků. Celkový přehled vybraných validačních parametrů metod je uveden v tab. 5.

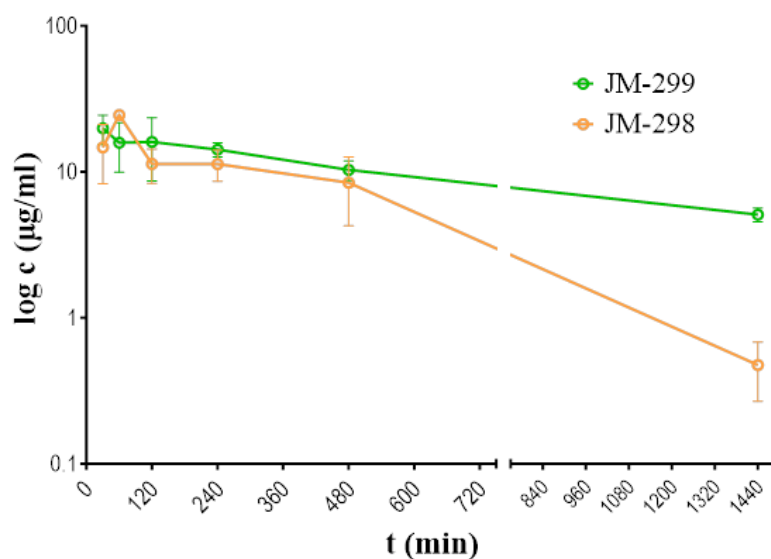
Tab. 5: Přehled validovaných parametrů a jejich hodnoty pro JM-298 a JM-299.

Linearita (vážení: 1/x²)				
Analyt	Koncentrační rozmezí (µg/ml)		R²	Rovnice kalibrační křivky
JM-298	0,25 – 25,00		0,9924	y = 0,000584x + 0,00867
JM-299	0,25 – 25,00		0,9920	y = 0,001099x + 0,03636
Preciznost a přesnost				
Konc. (µg/ml)	Krátkodobá (Intra-day)		Dlouhodobá (Inter-day)	
	Preciznost	Přesnost	Preciznost	Přesnost
	R.S.D.	(%)	R.S.D.	(%)
JM-298				
0,25	7,8	104,7	2,1	99,1
1,00	3,6	114,9	1,5	111,8
25,00	2,1	91,1	2,0	103,6
JM-299				
0,25	6,7	90,8	7,11	96,7
1,00	10,5	94,9	9,34	109,6
25,00	5,2	97,0	10,0	96,6
Matricové efekty				
Konc. (µg/ml)	IS-normalizované			
	(%)		R.S.D.	
JM-298				
0,50	110,1		8,9	
15,00	90,0		5,2	
JM-299				
0,50	102,5		8,5	
15,00	104,4		8,2	

5.4 Analýza reálných vzorků plazmy z farmakokinetické studie

Pro analýzu reálných vzorků byla odebírána plazma ve 30 minutách, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h a 24 h po aplikaci JM-298 nebo JM-299 myším. V každém čase byl odebrán vzorek od čtyř různých myší.

Na základě naměřených koncentrací byl sestaven farmakokinetický profil (obr. 17), kdy maximální koncentrace (c_{max}) pro oba analyty byla v 1 – 2 hodině od *per os* podání. Koncentrace v plazmě byly detekovatelné po dobu celé farmakokinetické studie, tedy po dobu 24 hodin.



Obr. 17: Farmakokinetický profil látek JM-298, JM-299 u myši.

U jednotlivých naměřených koncentrací jsou patrné relativně vysoké směrodatné odchylky, které lze odůvodnit tím, že každý odběr je samostatné zvíře, které má svůj jedinečný metabolismus. U analýzy vzorků myši plazmy je tento postup běžný, jelikož kvůli malému celkovému objemu krve u myši není možné odebírat vzorek od stejného zvířete opakovaně. Možným řešením tohoto problému je stále více využívaný „microsampling“, který díky malé spotřebě vzorku umožňuje opakovaný odběr ze stejného zvířete. Díky tomu je možné snížit spotřebu zvířat potřebných k experimentu a také získat farmakokinetický profil, který lépe popisuje osud léčiva v organismu [35].

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly vyvinuty podmínky UHPLC-MS/MS metody, včetně úpravy vzorku pro stanovení JM-298 a JM-299 v plazmě.

Separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 o rozměrech 2,1×50 mm (velikost částic 1,7 μm), opatřené předkolonou se stejným typem sorbentu, jako mobilní fáze byla použita 0,1% kyselina mravenčí ve vodě (A) a acetonitril (B) při gradientovém typu eluce 0,00 – 0,80 min (35 – 70% B); 0,80 – 2,50 min (70% B); 2,50 – 3,00 min (95% B); 3,00 – 4,00 (95% B); 4,00 – 4,01 (35% B); 4,01 – 5,50 (35% B). Rychlost průtoku MF byla 0,3 ml/min a celková doba analýzy činila 5,5 min, objem nástřiku byl 1 μl a jako vnitřní standard byl použitý strukturní analog obou analytů – XK-469.

V rámci vývoje metody úpravy vzorku plazmy (25 μl) byla testována různá precipitační činidla, přičemž nejvyšších výtěžností pro oba stanovované analyty (87,5 – 92,3 %) bylo dosaženo při použití 250 μl methanolu. Normalizované matricové efekty za těchto podmínek byly v obou případech v rozmezí 90,0 – 110,1 %.

Vyvinutá UHPLC-MS/MS metoda byla následně částečně validována dle doporučení Evropské lékové agentury. V rámci validace byla hodnocena linearita pomocí lineární regrese v koncentračním rozmezí 0,25 – 25,00 μg/ml pro JM-298 i JM-299, přesnost a preciznost, matricové efekty a výtěžnost. Přičemž všechny testované parametry odpovídaly požadavkům.

Nově vyvinutá metoda byla následně použita pro analýzu vzorků plazmy odebraných po *per os* podání obou látek myším.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Dong, M. W. *HPLC and UHPLC for Practicing scientists*. Second edition, John Wiley & Sons, New Jersey 2019. ISBN 9781119313793.
- [2] Guillarme, D.; Veuthey, J. L. (Eds) *UHPLC in life sciences*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2012. ISBN 978-1-84973-388-5.
- [3] https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html [zobrazeno 14. 10. 2023].
- [4] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. Third Edition, John Wiley & Sons, New Jersey 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [5] Hansen, S. H.; Pedersen-Bjergaard, S. (Eds) *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample preparation, separation techniques, and mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Chichester 2015. ISBN 9781118716816.
- [6] Nováková, L.; Douša, M.; Česla, P. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Druhé přepracované a rozšířené vydání, Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, Brno 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [7] Broeckhoven, K.; Shoykhet, K.; Dong, M. W. *Modern HPLC Pumps: Perspectives, Principles, and Practices* [online].
Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/modern-hplc-pumps-perspectives-principles-and-practices> [zobrazeno 17. 10. 2023].
- [8] <https://www.thermofisher.com/blog/analyteguru/hplc-or-uhplc> [zobrazeno 3. 12. 2023].
- [9] Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, New Jersey 2007. ISBN 978-0-470-08795-4.
- [10] *Český lékopis 2017 – 1. díl (Pharmacopoea Bohemica)*. Grada Publishing, Praha 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [11] McMaster, M. C. *LC-MS: practical user's guide*. John Wiley & Sons, New Jersey 2005. ISBN 978-0-471-65531-2.
- [12] https://www.shimadzu.ru/sites/shimadzu.seg/files/SEG/C10G-E065A_Shimadzu_Fundamental_Guide_to_LCMS.pdf [zobrazeno 22. 10. 2023].
- [13] De Hoffman, E; Stroobant, V. *Mass spectrometry: Principles and Applications*. Third Edition, John Wiley & Sons, Chichester 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [14] Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to mass spectrometry:*

- instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. Fourth edition, John Wiley & Sons, Chichester 2008. ISBN 978-0-470-51634-8.
- [15] Mirzaei, H.; Carrasco, M. (Eds) *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*. Springer International Publishing, Cham 2016. ISBN 3-319-41448-8.
- [16] Holčapek, M. *Hmotnostní analyzátory* [on-line]. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/MS/04_05_MS_analyzatory_RJ.pdf [zobrazeno 24. 10. 2023].
- [17] Fujii, T. (Ed) *Ion/Molecule Attachment Reactions: Mass Spectrometry*. Springer, New York 2015. ISBN 978-1-4899-7587-4.
- [18] Douglas, D. J.; Frank A. J.; Mao D. Linear ion traps in mass spektrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **2005**, *24*, 1-29.
- [19] Forcisi, S., et al. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra-high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A.*, **2013**, *1292*, 51-65.
- [20] <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/types-of-ion-detector-for-mass-spectrometry-347890> [zobrazeno 24. 10. 2023].
- [21] Zhou, W.; Yang, S.; Wang, P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor, *Bioanalysis*, **2017**, *9*, 1839-1844.
- [22] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi. II*. Druhé upravené vydání, Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, Brno 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.
- [23] <https://www.chromatographyonline.com/view/calibration-curves-part-v-curve-weighting> [zobrazeno 17. 2. 2024].
- [24] Li, W.; Jian, W.; Fu, Y. *Sample preparation in LC-MS bioanalysis*. John Wiley & Sons, New Jersey 2019. ISBN 9781119274308.
- [25] Švarc-Gajić, J. *Sampling and sample preparation in analytical chemistry*. Nova Science Publishers, New York 2012. ISBN 9781621004660.
- [26] Żwir-Ferenc, A.; Biziuk, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Pol. J. Environ. Stud.*, **2006**, *15*, 677-690.
- [27] Andrade-Eiroa, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2016**, *80*, 641-654.
- [28] Kabir, A.; Locatelli, M.; Ulusoy, H. I. Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation. *Separations*,

2017, 4, 36.

[29] Risticovic, S.; et al. Recent developments in solid-phase microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 393, 781-795.

[30] Ermer, J.; Nethercote, P. W. *Method validation in pharmaceutical analysis: a guide to best practice*. Second edition, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2015. ISBN 1-5231-4402-5.

[31] European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf, **2011**.

[32] Pávek P., Laštůvková H., Mičuda S., Kučera O., Roh J., Melnikova I., Štefela A., Karabanovich G., Drastík M., Smutný T. *Multitarget nuclear receptor ligands based on 2-(4-(quinolin-2-yloxy)phenoxy)propanoic acid and 2-(4-(quinoxalin-2-yloxy)phenoxy)propanoic acid for the treatment of metabolic and liver diseases*. PCT/CZ2022/050136.

[33] https://www.inacom.nl/wp-content/uploads/2020/04/theory_of_hplc_chromatographic_parameters_1_.pdf

[zobrazeno 6. 4. 2024].

[34] <https://www.chromatographyonline.com/view/strategies-detection-and-elimination-matrix-effects-quantitative-lc-ms-analysis> [zobrazeno 10. 4. 2024].

[35] Patel, N. J.; et al. Evaluation and Optimization of Blood Micro-Sampling Methods: Serial Sampling in a Cross-Over Design from an Individual Mouse. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2016**, 19, 496-510.