

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA v HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**VÝVOJ LC-MS METODY PRO LÁTKY VYUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ
AKTIVITY CYTOCHROMU**

Diplomová práce
Bc. Martin Smolík

Vedoucí práce: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.
Konzultant: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

V Hradci Králové 2024

Prohlášení autora:

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

V Hradci Králové, dne20.4.2024.....

.....
Bc. Martin Smolík

Poděkování

Rád bych touto cestou vyjádřil upřímné poděkování PharmDr. Lukáši Lochmanovi, Ph.D. za jeho cenné rady, doporučení a trpělivost při vedení a sepisování mé diplomové práce. Taktéž bych chtěl poděkovat prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za vstřícnost a ochotu pomoci při korekturách textu. Mé díky patří také PharmDr. Tomáši Smutnému, Ph.D. za poskytnutí reálných vzorků, na kterých byla naměřena nezanedbatelná část práce. Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině za jejich podporu, bez níž by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce byla vypracována za podpory projektu SVV 260 666.

OBSAH

1	ABSTRAKT.....	6
2	ABSTRACT.....	8
3	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
4	ÚVOD.....	12
5	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
5.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	13
5.1.1	Princip HPLC.....	13
5.1.2	Instrumentace HPLC.....	14
5.1.3	Stacionární fáze v HPLC.....	15
5.2	Hmotnostní spektrometrie.....	16
5.2.1	Iontové zdroje.....	16
5.2.2	Hmotnostní analyzátory.....	19
5.2.3	MS Detektory.....	22
5.2.4	LC-MS.....	22
5.3	Validace analytické metody.....	25
5.3.1	Kalibrace metody.....	25
5.3.2	Kontrola kvality.....	26
5.3.3	Přesnost a správnost.....	26
5.3.4	Selektivita.....	27
5.3.5	Carry-over.....	27
5.3.6	Sensitivita.....	27
5.4	Cytochromy P450.....	28
5.4.1	Struktura a aktivita cytochromů P450.....	28
5.4.2	Klasifikace cytochromu P450 a jeho izoform.....	31
5.4.3	Cytochrom P450 3A4.....	31
5.4.4	Cytochrom P450 2B6.....	32
5.4.5	Cytochrom P450 2C9.....	32
5.5	Stanovení aktivity cytochromu P450.....	33
6	CÍLE PRÁCE.....	37
7	PRAKTICKÁ ČÁST.....	38
7.1	Chemikálie a spotřební materiál.....	38
7.2	Přístrojové vybavení.....	39

7.3	Příprava mobilní fáze	39
7.4	Příprava roztoků standardů a vzorků	40
7.5	LC-MS podmínky a jejich optimalizace	42
7.5.1	Typ MF	42
7.5.2	Gradient, teplota kolony a průtok MF	42
7.5.3	Objem nástřiku.....	43
7.5.4	Rozhraní LC-MS.....	43
7.6	Optimalizovaná LC-MS metoda	44
7.7	Kvantifikace analytů a kalibrace	44
7.8	Validace metody	46
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
8.1	Optimalizace LC a MS podmínek	48
8.1.1	LC	48
8.1.2	MS.....	50
8.2	Příprava vzorků.....	52
8.3	Kalibrace	53
8.4	Validace metody	55
8.5	Analýza reálných vzorků	58
9	ZÁVĚR	61
10	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY A DALŠÍCH ZDROJŮ	62
11	PŘÍLOHY	67

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Bc. Martin Smolík

Vedoucí práce: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Konzultant: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj LC-MS metody pro látky využívané pro stanovení aktivity cytochromu

Cytochromy P450 (CYP450) jsou enzymy s klíčovou rolí v metabolismu xenobiotik a některých endobiotik (cholesterol, steroidní hormony, eikosanoidy). Vyskytují se v játrech, gastrointestinálním traktu, plicích a ledvinách. Stanovení aktivity CYP450 je vhodným nástrojem pro zjištění možných lékových interakcí vznikajících z důvodu inhibice či indukce různých izoform tohoto enzymu.

Tato diplomová práce je věnována vývoji a validaci nové analytické metody využívající kapalinovou chromatografii spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro stanovení aktivity CYP450 izoform 3A4, 2C9 a 2B6, které jsou nezbytné pro metabolismus mnoha léčiv a biologicky aktivních látek. V rámci diplomové práce byla vyvinuta metoda poskytující rychlé, přesné a spolehlivé měření aktivity těchto enzymů na základě kvantifikace specifických substrátů CYP450, a to midazolamu (3A4), diklofenaku (2C9) a bupropionu (2B6) a jejich příslušných hydroxylovaných metabolitů v buněčném médiu.

Analyty byly separovány na koloně Phenomenex Luna® Phenyl-Hexyl (3 μ m, 100 \times 3 mm, Phenomenex), za použití gradientu mobilní fáze s přidavkem 0,05% kyseliny octové ve vodě i acetonitrilu (v/v). Detekce probíhala pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM) s ionizací elektrosprejem. Limity kvantifikace byly stanoveny na 0,05 μ mol/l pro bupropion, midazolam, 4-hydroxymidazolam a diklofenak a 0,025 μ mol/l pro hydroxybupropion, 1-hydroxymidazolam a 4-hydroxydiklofenak.

Nově zavedená analytická metoda byla částečně validována, kdy validovanými kritérii byly kalibrační křivky, kontrola kvality, přesnost, správnost, senzitivita, selektivita a carry-over. Výsledky validace prokázaly, že analytická metoda splňuje všechna akceptační kritéria stanovená americkou Food and Drug Administration.

V závěru přípravy diplomové práce byla použitelnost metody prokázána při analýze 16 reálných vzorků v buněčném médiu, na nichž byl testován vliv rifampicinu na indukci CYP450 v *in vitro* modelu primárních lidských hepatocytů ve 3D uspořádání. Naměřená data se stanou součástí publikace s impakt faktorem.

Klíčová slova:

Analýza, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, cytochrom P450, 3D hepatální buňky, midazolam, diklofenak, bupropion, 1-hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam, 4-hydroxydiklofenak, hydroxybupropion

2 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Bc. Martin Smolík

Supervisor: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Consultant: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of thesis: Development of LC-MS method for compounds used for determination of cytochrome activity.

Cytochromes P450 (CYP450) are enzymes that play a key role in the metabolism of xenobiotics and some endobiotics (cholesterol, steroid hormones, and eicosanoids). They are present in the liver, gastrointestinal tract, lungs, and kidneys. Determination of CYP450 activity is a valuable tool to detect drug interactions resulting from inhibition or induction of various isoforms of this enzyme.

This thesis is devoted to the development and validation of a new analytical method using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of activity CYP450 isoforms 3A4, 2C9, and 2B6, which are crucial for the metabolism of many drugs and biologically active substances. In the framework of this thesis, a new method was developed providing a fast, accurate, and reliable measurement of the activity of these enzymes based on the quantification of specific CYP450 substrates, namely midazolam (3A4), diclofenac (2C9), bupropion (2B6) and their appropriate hydroxylated metabolites in cell culture medium.

Analytes were separated on a Luna® Phenyl-Hexyl column (3 µm, 100×3 mm, Phenomenex), using a mobile phase gradient. Used mobile phase was composed of 0.05% acetic acid in water and 0.05% acetic acid in acetonitrile (v/v). Detection was done using tandem mass spectrometry in selected reaction monitoring (MRM) mode with electrospray ionization. Lower limits of quantification were set at 0.05 µmol/l for bupropion, midazolam, 4-hydroxymidazolam and diclofenac and 0.025 µmol/l for hydroxybupropion, 1-hydroxymidazolam and 4-hydroxydiclofenac.

The newly introduced method was partially validated, where the validated criteria were calibration curves, quality control, accuracy, precision, sensitivity, selectivity, and carry-over. The validation results showed that the method meets all the acceptance criteria set by the US Food and Drug Administration.

At the end of the diploma thesis, the method's applicability was demonstrated by the analysis of sixteen real samples in a cell culture medium to evaluate the effect of rifampicin on CYP450 in an *in vitro* model of human hepatic cells arranged in 3D. The measured data will become part of the publication with an impact factor.

Keywords:

Analysis, mass spectrometry, liquid chromatography, cytochrome P450, 3D human hepatic cells, midazolam, diclofenac, bupropion, 1-hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam, 4-hydroxydiclofenac, hydroxybupropion

3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 1OH-MID 1-hydroxymidazolam
- 3xIS směs 3 vnitřních standardů
- 4OH-DCF 4-hydroxydiklofenak
- 4OH-MID 4-hydroxymidazolam
- AA kyselina octová
- AC střídavý proud
- ACN acetonitril
- AMK aminokyselina
- APCI chemická ionizace za atmosférického tlaku
- AUC plocha pod píkem
- BUP bupropion
- CYP450 cytochrom P450
- DC stejnosměrný proud
- DCF diklofenak
- DMSO dimethylsulfoxid
- ESI ionizace elektrosprejem
- FA kyselina mravenčí
- FDA Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
- HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- ICH Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na léčivé přípravky
- IS vnitřní standard
- KARB karbamazepin
- KETOP ketoprofen
- LC kapalinová chromatografie
- LLOQ spodní limit kvantifikace
- MeOH methanol
- MF mobilní fáze
- MID midazolam
- MRM sledování vybraných fragmentů (multiple reaction monitoring)
- MS hmotnostní spektrometrie

- MS/MS tandemová hmotnostní spektrometrie
- OH-BUP hydroxybupropion
- OXAZ oxazepam
- QC kontrola kvality
- RF radiofrekvence
- RSD relativní směrodatná odchylka
- SF stacionární fáze
- SRM sledování vybraného fragmentu (selected reaction monitoring)

4 ÚVOD

Cytochromy P450 (CYP450) jsou rodinou enzymů, která hraje s podstatnou rolí v metabolismu xenobiotik a některých endobiotik. Ovlivnění aktivity CYP450 je jedna z hlavních příčin lékových interakcí. Z toho důvodu je důležité studium vlivu léčiv na aktivitu CYP450. Tyto znalosti mohou vést ke zvýšení bezpečnosti a kvality farmakologické péče o pacienty a lepší předvídatelnosti účinků při vývoji nových léčiv.¹

Aktivita CYP450 se hodnotí na základě sledování změn v koncentraci specifických substrátů a jejich metabolitů. K tomuto účelu je nejvhodnější kapalinová chromatografie (LC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Tato instrumentace umožňuje přesné a selektivní měření i velmi nízkých koncentrací látek vzniklých v důsledku enzymatické aktivity jednotlivých izoform CYP450.²

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj analytické metody, která umožní simultánní kvantifikaci specifických substrátů: midazolamu (MID), bupropionu (BUP) a diklofenaku (DCF) a jejich hydroxylovaných metabolitů: 1-hydroxymidazolamu (1OH-MID), 4-hydroxymidazolamu (4OH-MID), hydroxybupropionu (OH-BUP) a 4-hydroxydiklofenaku (4OH-DCF) za účelem stanovení aktivity příslušných izoform CYP450 (3A4, 2C9 a 2B6). Metoda byla vyvíjena v návaznosti na již zavedenou metodu pro stanovení aktivity CYP450 3A4. Tato metoda využívala pro separaci kolonu Luna[®] Phenyl-Hexyl a mobilní fázi (MF) tvořenou acetonitrilem (ACN) a 0,1% kyselinou mravenčí (FA).³ Jako vnitřní standard (IS) byl použit oxazepam (OXAZ) a celková doba analýzy byla 10,4 minuty.³

Nově vyvinutá analytická metoda umožňuje efektivní separaci a kvantifikaci všech analytů pro stanovení aktivity CYP450 izoform 3A4, 2B6 a 2C9 s celkovou dobou analýzy 8,5 minut. Jako IS byly použity: OXAZ, karbamazepin (KARB) a ketoprofen (KETOP). Optimalizovaná MF je složena z 0,05% kyseliny octové (AA) ve vodě a 0,05% AA v ACN.

Metoda byla následně částečně validována dle kritérií Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration). Reálná využitelnost metody byla následně demonstrována analýzou série 16 vzorků vzešlých z experimentu na *in vitro* modelu primárních lidských hepatocytů ve 3D uspořádání, na nichž byl testován vliv rifampicinu na aktivitu izoform CYP450 3A4, 2B6 a 2C9.

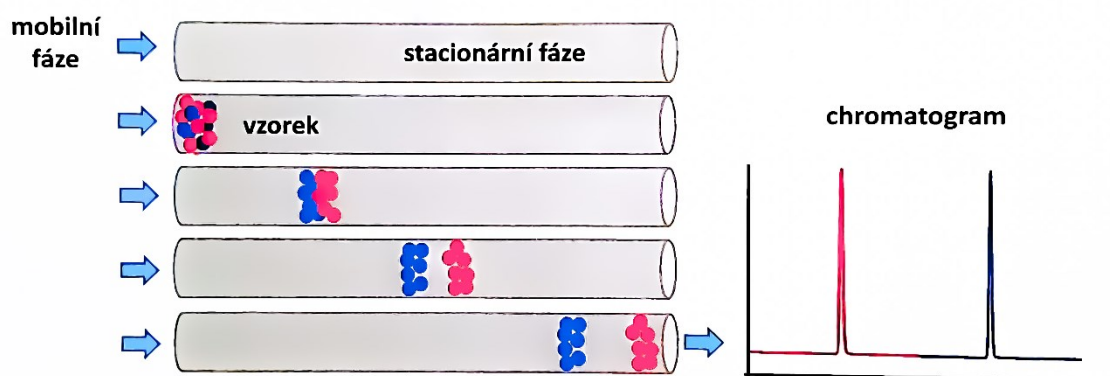
5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography) je nejrozšířenější separační technikou, která používá jako MF kapalinu. Nepohyblivá stacionární fáze (SF) je při HPLC obvykle tvořena sorbentem na bázi silikagelu, skrz který proudí pod tlakem MF. Pomocí HPLC lze analyzovat jak molekuly s nízkou, tak i vysokou molekulární hmotností. V praxi tak lze HPLC instrumentaci využít napříč různými obory, a to od klinické farmacie, toxikologie a biochemie až po environmentální analýzu a analýzu v oblasti proteomických a metabolomických studií.^{4,5}

5.1.1 Princip HPLC

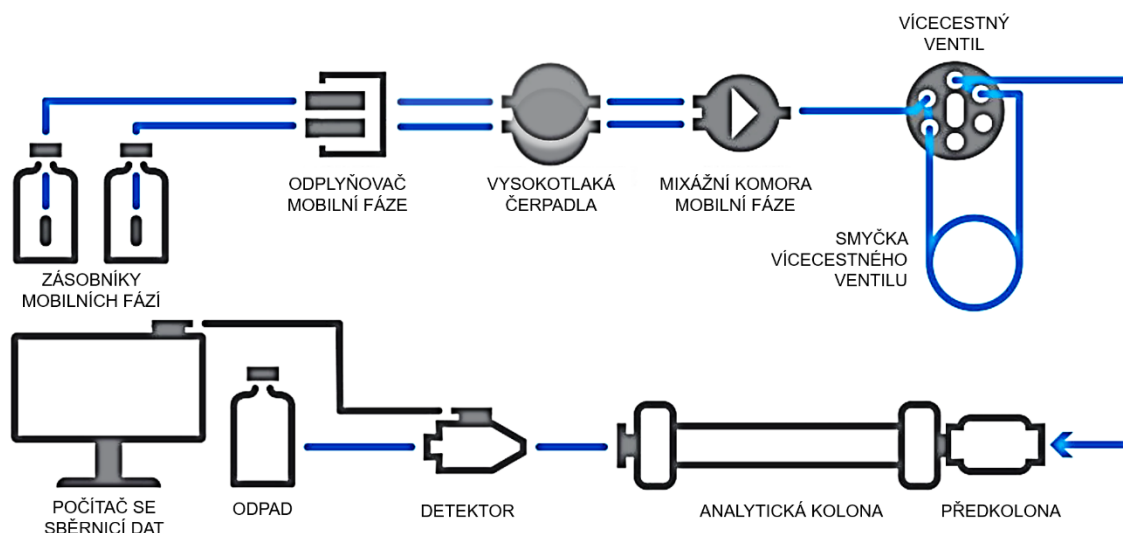
Principem fungování LC je opakované ustalování rovnováhy distribuce analytů mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, tedy SF a MF. Analyt se pohybuje SF pomaleji, pokud s ní má více interakcí, a tím se zpožďuje oproti analytům, které mají interakcí se SF méně a jsou rychleji unášeny proudem MF k detektoru. K separaci různých analytů pak dochází tehdy, když se od sebe liší mírou interakcí s SF. Tento princip je popsán na Obr. 1. Míru retence analytu určuje počet a síla interakcí, jež má se SF při průchodu kolonou. V závislosti na použitém sorbentu může docházet k hydrofobním interakcím, π - π interakcím, disperzním interakcím, u fluorovaných SF i k fluor-fluor interakcím.^{4,5}



Obrázek 1 Princip separace analytů v HPLC.⁵

5.1.2 Instrumentace HPLC

Kapalinové chromatografy jsou obvykle modulárního typu, kdy každý modul HPLC má svou konkrétní funkci. Zjednodušené schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na Obr. 2. MF je uložena v zásobních lahvích a před průchodem kapalinovým chromatografem je odplyněna v odplyňovači (degasseru). O správné složení MF se starají vysokotlaká čerpadla a gradientový ventil s mixážní komorou MF. Prvním modulem, kterým prochází vzorek je autosampler. Ten správně a opakovatelně dávkuje vzorky z vialek do smyčky vícecestného ventilu, který poté vzorek uvolňuje dále do proudu MF, která jej unáší k SF. SF je uložena v kolonovém termostatu, který udržuje stálou teplotu. Předkolona, umístěná před analytickou kolonou, plní funkci filtru a v bioanalytických aplikacích výrazně prodlužuje délku použitelnosti analytické kolony. Po separaci analytickou kolonou jsou analyty unášeny k detektoru.^{4,5}



Obrázek 2 Schématické znázornění HPLC instrumentace. (převzato a upraveno)⁶

Detektory jsou umístěné za analytickou kolonou, kde zaznamenávají rozdíly ve složení procházející MF. Informace o složení MF s analyty převádí do elektronického signálu, který je zaznamenáván a pomocí softwaru převeden na chromatogram. Obvyklými požadavky na detektory jsou: citlivost, nízký poměr signálu vůči šumu, vysoká frekvence sběru dat a specifita detekce. Pro svoji jednoduchost a univerzálnost jsou rozšířené spektrofotometrické detektory, nicméně v posledních dekádách jsou na ústupu na úkor detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).^{4,5}

5.1.3 Stacionární fáze v HPLC

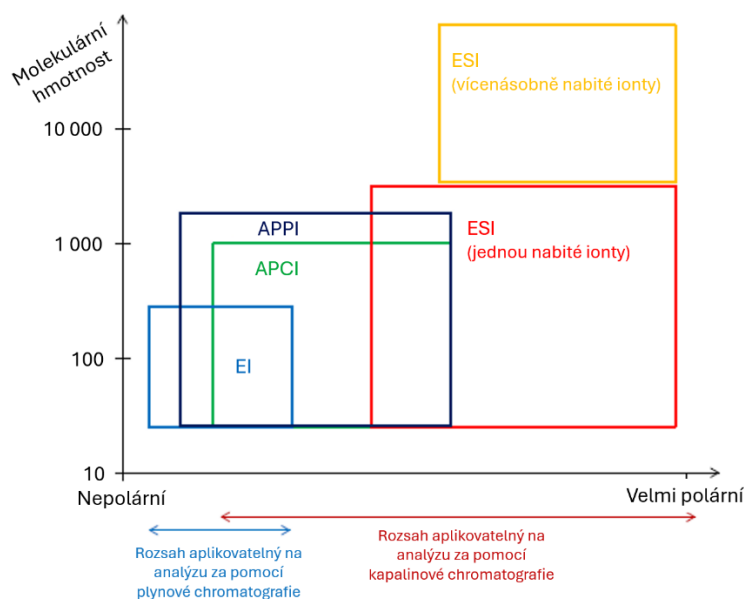
SF v LC se dají dělit dle jejich chemického složení na polymerní SF, SF na bázi oxidů kovů, hybridní SF a SF na bázi silikagelu, které jsou v praxi rozšířené nejvíce.⁵ Silikagel je chemicky modifikován tak, že se na silanolové skupiny na jeho povrchu navážou funkční skupiny, které ovlivňují selektivitu SF. Silikagel je běžně modifikován navázáním alkylů nebo alkylfenylů, přičemž nejčastěji jde o navázání oktylů (C8) a oktadecylů (C18). SF na bázi silikagelu modifikované C18 interagují s analyty zejména na základě hydrofobních interakcí.⁵ Alkylfenylové funkční skupiny poskytují SF vyšší polaritu (oproti C18) a možnost π - π interakcí s analyty, které ústí ve vyšší selektivitu vůči látkám s aromatickým charakterem.^{7,8} Přítomnost krátkého alkylového řetězce zároveň umožňuje také separaci analytů na základě jejich různé polarity.⁷ Při volbě SF s alkylfenylovými funkčními skupinami je preferováno použití MF na základě methanolu (MeOH) z důvodu snižování selektivity alkylfenylových SF působením ACN v MF.⁵

Silanolové funkční skupiny není možné pokrýt požadovanou skupinou (C8, C18, alkylfenyl) zcela a v analytické koloně tak zůstávají přítomny volné silanolové skupiny, které mohou interagovat s bazickými analyty a zhoršovat tak tvary jejich píků. Tento problém je řešen pomocí tzv. endcappingu a sterického stínění volných silanolů. Endcapping snižuje počet volných silanolových skupin za pomoci adice menších organosilanů (např. trimethylsilanu) na volné silanolové skupiny. Sterické stínění volných silanolů je založeno na začlenění objemných alkylových substituentů (např. diisobutylu, fenylu) do SF tak, aby volné silanolové skupiny nebyly stericky přístupné analytům a nemohly tak s nimi interagovat.⁵

5.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

5.2.1 Iontové zdroje

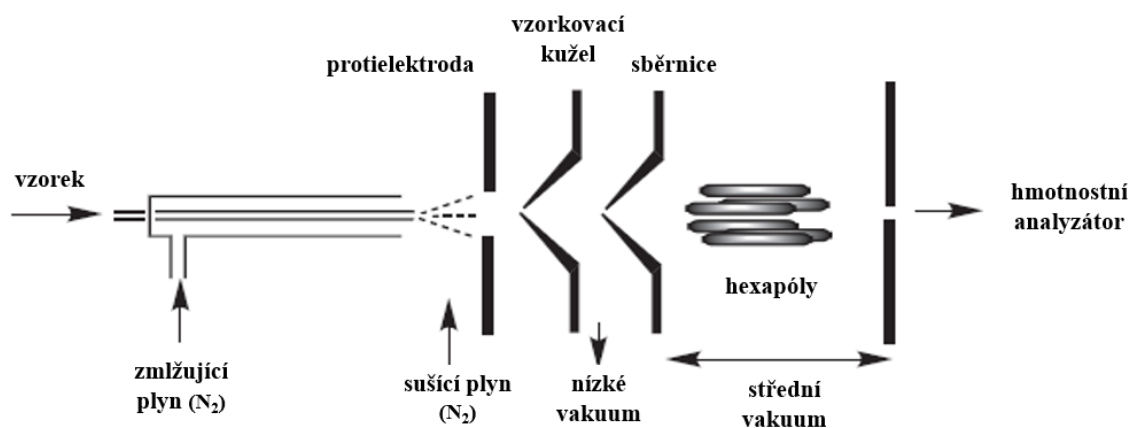
Ionizačních technik existuje široká škála, nicméně žádná z nich není naprosto univerzální. Vzhledem k rozdílným podmínkám, které jsou třeba pro správnou funkci, jak kapalinového chromatografu (s kapalným stavem MF s analyty), tak hmotnostního spektrometru (zplyněné analyty) je evidentní nutnost použití specializovaného rozhraní, které převede analyt v MF do iontové formy. Nejčastěji se ve spojení s LC používají měkké ionizační techniky za atmosférického tlaku, tedy ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku.^{9,10} Na Obr. 3 je schematické znázornění použitelnosti různých typů ionizace analytů v závislosti na jejich polaritě a molekulární hmotnosti. Chceme-li analyzovat látky s nízkou molekulární hmotností a nízkou polaritou, je vhodné použít fotoionizaci za atmosférického tlaku či APCI. Pokud chceme ionizovat látky polárnějšího charakteru, je nejvhodnějším způsobem ionizace pomocí ESI.^{5,9} V této diplomové práci budou blíže rozebrány ESI a APCI.



Obrázek 3 Typy iontových zdrojů v závislosti na vlastnostech analytu EI – elektronová ionizace (použitelná v kombinaci s plynovou chromatografií). (převzato a upraveno)⁸

ESI

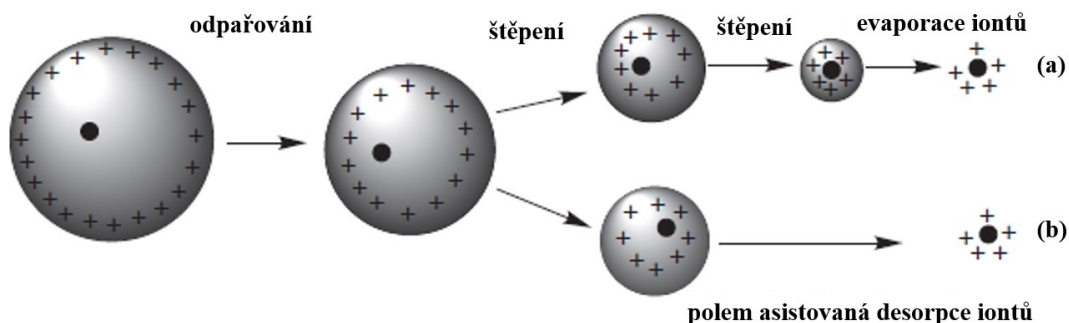
Nejrozšířenější a nejčastěji používaná ionizační technika za atmosférického tlaku je ESI. Je to zejména z důvodu širokého aplikačního rozsahu. ESI umožňuje ionizovat jak malé, méně polární, tak i velké polární molekuly. Poskytuje jednonásobně, v některých případech i vícenásobně nabitě ionty, a to buď protonované, nebo deprotonované v závislosti na nastavení módu ESI. Jedná se o měkkou ionizační techniku, což znamená, že poskytuje minimální fragmentaci analytů, nicméně ESI lze nastavit i takovým způsobem, že fragmentace bude v omezené míře probíhat.^{8,9,11}



Obrázek 4 Schematický popis ESI a iontové optiky. (převzato a upraveno)¹¹

Na Obr. 4 je schematicky znázorněn ESI. První částí, se kterou přijde MF do styku je kapilára, na kterou je vkládáno napětí v rozmezí 3 – 5 kV.¹² Napětí umožní předání požadovaného náboje MF. Tím se zahájí pohyb opačně nabitých iontů směrem ke kapiláře, kde se při styku s ní oxidují nebo vybíjejí. Tento proud iontů spolu s povrchovým napětím vytvoří tzv. Taylorův kužel.¹⁰ Skrze jeho špičku unikají ionty shodné polarity s kapilárou a po výstupu se začnou uvolňovat do prostoru ve formě kapek o různé velikosti. Obecně se dá říci, že tvorba menších kapek usnadňuje desolvaci analytu, a tak i zvyšuje výtěžnost ionizace.⁹ Velikost kapek je přímo úměrná povrchovému napětí a viskozitě MF. Nepřímou úměrou je ovlivněna napětím na kapiláře, a koncentrací pufří.⁹ Dále je velikost kapek ovlivněna průtokem MF, který ovlivňuje i množství náboje, který je kapičkám MF předán. Následně se kapky začnou vypařovat, a když repulzní síly náboje na nich překonají povrchové napětí, dojde k překročení Rayleighova limitu a k tzv. Coulombické explozi, která vytvoří velké množství menších nabitých kapiček. Tento proces se opakuje do té doby, dokud nedojde k předání náboje analytu a jeho uvolnění z MF. Následně jsou ionty analytu unášeny do iontové optiky.

Pokud je analytu náboj předán ještě před kompletním vypařením MF, může dojít k jeho vytržení z kapičky vlivem elektrického pole. Proces vypařování a Coulombické exploze je zobrazen na Obr. 5.^{9,10}

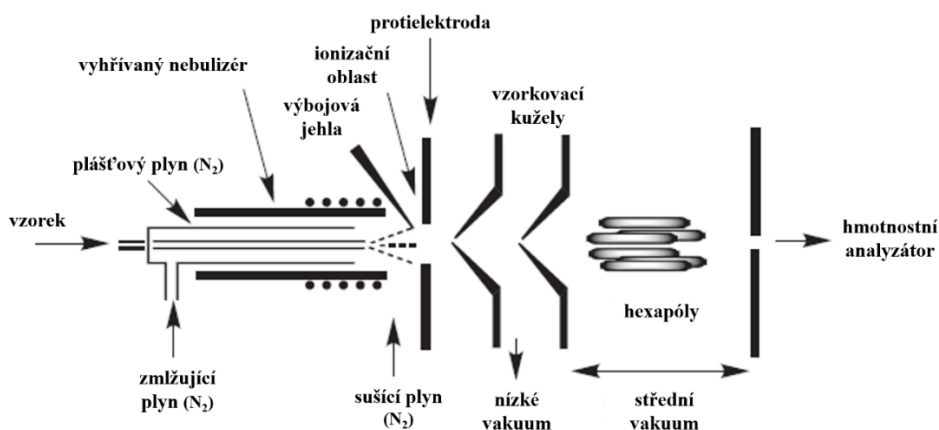


Obrázek 5 Proces desolvatace analytu v ESI. (převzato a upraveno)¹¹

Pro nikterak nemodifikovanou ESI platí, že její optimální průtok je přibližně 5 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Bez výraznějších úprav je pro ESI vyšší průtok problematický a může vést k výraznému snížení citlivosti analýzy.⁹ Aby byl ESI použitelná s vyššími průtoky MF z LC, je v bodě výstupu vypouštěn nahřátý nebulizační a sušící plyn, který napomáhá odpařování MF a tím také desolvataci ionizovaných analytů.^{9,12,13}

APCI

APCI se v praxi používá zejména při analýze relativně nepolárních a termostabilních molekul (analyty se při ionizaci mohou zahřát až na 100 °C) s hmotností do 1 500 Da.¹¹



Obrázek 6 Schematický popis APCI zdroje. (převzato a upraveno)¹¹

Tento iontový zdroj je složen ze 3 částí: nebulizátoru, ionizačního prostoru a iontové optiky. Jeho uspořádání je schematicky znázorněno na Obr. 6. Vzorek v MF je vypouštěn kapilárou, přičemž je nebulizován a odpařen dusíkem o vysoké teplotě (350 – 500 °C) tak, aby do oblasti, ve které dochází k ionizaci dorazil v plynné fázi.¹¹ V ionizačním prostoru se nachází jehla, na kterou je vkládáno napětí v rozmezí 2 – 3 kV, které ionizuje okolní plyn. Jehla vytváří na své špičce tzv. korónový výboj, skrze který proudí zplyněná MF. Předpokládá se, že v pozitivním módu APCI vznikají primární ionty ve formě N_2^{+} a N_4^{+} , které svůj náboj dále předávají molekulám z MF. Vznikají tak nabitě formy vody (H_3O^+) a ACN (CH_3CN^+), případně MeOH ($CH_3OH_2^+$).¹¹ Ty následně předají náboj ve formě protonu analytům, čímž vznikají protonované formy analytů $[M+H]^+$. Ionty analytů jsou pak dále usměrněny do hmotnostního spektrometru. V negativním módu emitované elektrony spolu s plynným dusíkem a vodou primárně tvoří OH^- ionty. Ty následně přebírají protony od analytů, čímž vzniká voda a analyt v deprotonované formě $[M-H]^-$.^{9,11}

APCI není na složení MF příliš závislá a je schopna pracovat při vyšších průtocích MF 0,5 – 2 ml/min, což umožňuje použití kolon s větším vnitřním průměrem (4,6 mm). Nevýhodou je však možný vznik aduktů analytu s ionty z MF, např. $[M+NH_4]^+$ a $[M+CH_3COO]^-$.⁹

5.2.2 Hmotnostní analyzátory

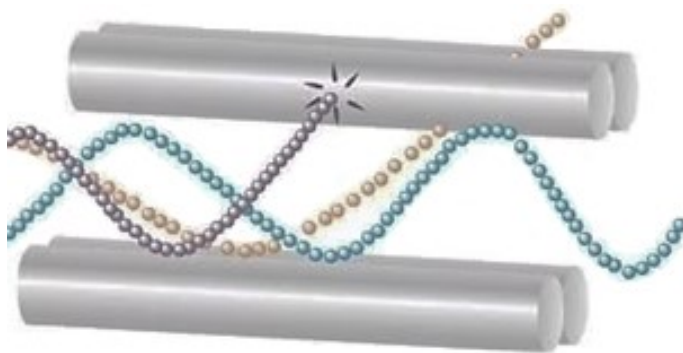
Klíčovým bodem v analýze látek pomocí MS je separace iontů dle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z). Toho je možno dosáhnout různými principy, na kterých pracují hmotnostní analyzátory. Těch je vyvinuta celá řada, kdy každý z nich má různé vlastnosti s řadou výhod i nevýhod.

Obecně se analyzátory dají dělit na: analyzátory skenovací (kvadrupóly, elektro/magnetické sektory), jež v jeden moment propouštějí na detektor pouze ionty o definovaném m/z , analyzátory průletové, které posílají všechny ionty v krátkém pulzu skrze letovou trubici, kde se separují díky rozdílné době letu (analyzátor doby letu) a analyzátory využívající zachycení iontů v pasti. Ty mohou ionty detekovat více způsoby. V případě jednodušších iontových pastí jsou ionty postupně vypuzovány na detektor. Orbitální elektrostatická iontová past detekuje ionty na základě měření proudového obrazu, který je indukovan axiální oscilací iontů v elektrostatickém poli. Iontová cyklotronová rezonance taktéž detekuje proudový obraz, nicméně oscilace iontů je indukována přítomností velmi silného magnetického pole, ve kterém se ionty začnou

pohybovat po cykloidální trajektorii s určitou cyklotronovou frekvencí, která je typická pro specifické m/z .^{14,15}

Kvadrupól

Přístroje využívající kvadrupól jako hmotnostní analyzátor jsou v praxi používány nejčastěji.¹¹ Analyzátor se skládá ze čtyř shodných souběžných elektrod ve čtvercovém uspořádání. Elektrody mohou být cylindrické, nebo ve tvaru hyperboly. Pomocí hyperbolické geometrie lze dosáhnout vyššího rozlišení, ale vzhledem k náročné výrobě jsou tyto přístroje nákladnější, a proto i méně rozšířené.¹⁵



Obrázek 7 Kvadrupól se znázorněnými toky iontů.¹⁶

Na dvě protilehlé elektrody je aplikováno současně stejnosměrné (DC, direct current) a střídavé (AC, alternating current) napětí, a to ve frekvenci mezi 20 kHz a 300 GHz (označuje se jako radiofrekvenční, RF). Druhý pár elektrod je ve všem shodný, až na opačnou polaritu napětí. Tím je vytvořeno elektrické pole uvnitř kvadrupólu, skrze které jsou ionty pouštěny. Při definovaném DC a RF mají ionty se shodným m/z při průletu elektrickým polem stabilní trajektorii, zatímco zbytek iontů má trajektorii letu nestabilní. Když amplituda jejich oscilace přesáhne hranice elektrod, mohou uniknout mimo prostor kvadrupólu, nebo narazit na jednu z tyčí kvadrupólu, kde se iont vybijí a přestane tak být nadále ovlivňován elektrickým polem. Dráhy iontů v kvadrupólu jsou znázorněny na Obr. 7.^{11,15}

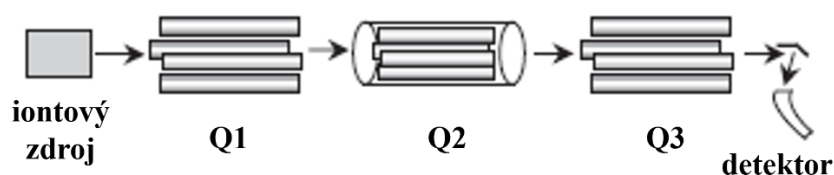
Abychom mohli získat hmotnostní spektrum, je postupně měněn potenciál DC a AC při zachování RF, což působí postupnou změnu kvadrupólového pole tak, že postupně prochází hmota s různým m/z .¹¹

Analyzátoři využívající pouze kvadrupóly jsou relativně kompaktní, lehké, relativně mechanicky jednoduché a cenově dostupné stolní přístroje, které jsou vysoce senzitivní, s širokým lineárním rozsahem a vysokou skenovací rychlostí.¹¹

Primární využití nacházejí v analýze nízkomolekulárních sloučenin, nicméně díky vícenásobnému nabití iontů pomocí ESI je jimi možno analyzovat i biopolymery o výrazně vyšších molekulových hmotnostech.¹⁵

Trojité kvadrupól

Trojité kvadrupól se řadí mezi tandemové hmotnostní analyzátory, tzn. jde o kombinaci dvou nebo více hmotnostních analyzátorů složených do série (Obr. 8), jež umožňuje více skenovacích možností.¹¹



Obrázek 8 Schematické znázornění trojitého kvadrupólu. (převzato a upraveno)¹¹

Po ionizaci hmoty iontovým zdrojem prochází ionty prvním kvadrupólem (na Obr. 8 označen jako Q1). Ten může v závislosti na skenovacím módu propouštět veškerou hmotu, nebo filtrovat ionty, které propustí skrz, tzv. prekurzory. Druhý kvadrupól (označen jako Q2) pracuje pouze jako iontová optika, nebo jako kolizní cela, ve které dochází k fragmentaci prekurzorů na fragmenty. Třetí kvadrupól (označen jako Q3) opět v závislosti na výběru skenovacího módu funguje jako hmotnostní filtr vybírající průchozí hmotu, nebo jako iontová optika propouštějící všechny procházející fragmenty na detektor.¹¹

Různými kombinacemi módů kvadrupólů lze docílit různých skenů a to:

- TIC součet proudu všech prekurzorů dopadajících na detektor
- MS sken měření hmotnostního spektra prekurzorů
- SIM měření vybraného prekurzoru v čase
- MS/MS sken měření hmotnostního spektra fragmentů
- Sken prekurzorů měření prekurzorů poskytujících definovaný fragment
- Sken neutrálních ztrát měření prekurzorů podstupujících neutrální ztrátu
- SRM či MRM měření vybraného fragmentu či fragmentů v čase⁵

5.2.3 MS Detektory

Nedílnou součástí hmotnostního spektrometru je detektor. Ten má za úkol převést informaci o proudu iontů do formy elektrického signálu, který lze dále zesílit a zobrazit v podobě hmotnostního spektra. MS detektory by měly být senzitivní, přesné, stabilní, s nízkým šumem, širokým dynamickým rozsahem a rychlou odezvou. Detektory se dají rozdělit na ty, které jsou schopny získávat informace pouze o množství iontů a na ty, které mohou sbírat informace o množství iontů a k tomu detekovat i m/z detekovaných iontů.¹⁴ V prvním případě ionty dopadají stále na jeden bod detektoru a je třeba je před detekcí separovat hmotnostním analyzátozem (obvykle skenovacím) tak, aby v jeden moment dopadaly pouze ionty o jednotném a známém m/z . Příkladem těchto detektorů může být elektronásobič, fotonásobič či Faradayova klec. V případě druhém je detektor schopen ionty detekovat i ve vztahu k jejich m/z .¹⁴ Příkladem může být orbitální elektrostatická past, iontová cyklotronová rezonance nebo detektor ohniskové roviny používaný v přístrojích s magnetickým sektorem.^{11,14}

5.2.4 LC-MS

Spojení MS s LC umožnilo analýzu vzorků, které byly dříve analyzovány jen velmi obtížně. Zejména šlo o vzorky s komplexní maticí, jakými jsou například tkáň, části rostlin a vzorky pocházející z životního prostředí.^{5,11}

Pokud bychom tyto vzorky chtěli analyzovat pouze pomocí LC, nejspíše bychom došli k závěru, že ne všechny analyty je možné zcela separovat a že případnou koeluci analytů ani nemusíme odhalit. Navíc určení totožnosti jednotlivých analytů probíhá pouze na základě porovnání retenčních časů se standardy, kdy shodné retenční vlastnosti mohou mít i látky navzájem strukturálně odlišné.⁹

MS umožňuje analýzu pestré škály analytů, kdy hmotnostní spektra daných látek jsou dostatečně specifická ke spolehlivému určení totožnosti řady látek. Jsou však případy, ve kterých je aplikace MS problematická z důvodu přílišné podobnosti ve struktuře analytů, která znemožňuje absolutní jistotu v jejich rozpoznání (izomery). Z toho důvodu je nutné takové látky od sebe před MS detekcí chromatograficky separovat. Separaci můžeme také dosáhnout potlačením vlivu interferujících látek a maticových efektů.¹⁷

Vzhledem ke krátkému trvání eluce píků nelze ke spojení LC a MS použít hmotnostní detektory s pomalou frekvencí sběru dat 0,5 – 2 Hz (např. magnetický sektor nebo iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací)⁸ a je možné použít

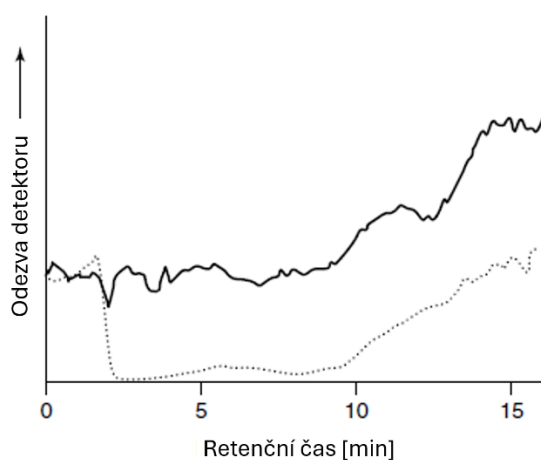
pouze detektory, jež sbírají data s minimální frekvencí 5 Hz. Je tomu proto, že ke spolehlivé kvantifikaci je třeba alespoň 10 bodů na pík. Pokud počet bodů klesne, je kvantifikace velmi znesnadněna. S dostatečnou frekvencí jsou schopny měřit hmotnostní analyzátoři založené na iontových pastích (2 – 10 Hz), kvadrupólech (2 – 10 Hz), analyzátořech doby letu (10 – 100 Hz) a moderních elektrostatických orbitálních pastích (1 – 40 Hz).^{8,11}

Pro LC-MS aplikace je teoreticky použitelná většina na trhu dostupných kolon, ale v praxi je vhodnější používat takové kolony, které jsou pro LC-MS určeny. Je to z toho důvodu, že při výrobním procesu SF je kladen nárok na minimální obsah kovů a zároveň na minimální tzv. krvácení kolony. To je proces, při kterém se postupem času z kolony vymývají skupiny, kterými byl silikagel modifikován, čímž je zvyšován šum základní linie chromatogramu.⁵

Výběr složek MF pro LC-MS s reverzní fází je poměrně limitován. Je to z důvodu nutné těkavosti použitých rozpouštědel. Použitelnými složkami pro tvorbu MF jsou ethanol, propanol, propan-2-ol, butanol a ethylacetát, nicméně nejvhodnější vlastnosti mají MeOH a ACN.^{5,10} Užití vyššího procenta organické složky má pozitivní vliv na ionizaci analytu (snižuje povrchové napětí). Při použití gradientové eluce je doporučeno, aby k eluci prvního analytu docházelo současně s alespoň 10% zastoupením organických rozpouštědel v MF.¹⁰ I pro aditiva platí, že musí být těkavá, a tak je jejich výběr omezen na FA, AA, kyselinu trifluorocetovou a hydroxid amonný v nízkých koncentracích. Při použití vyšších koncentrací aditiv mohou soutěžit o náboj a snižovat tak ionizaci analytu.^{5,10}

Matricové efekty

Jedním z výrazných problémů, kterému je třeba čelit při vývoji metody pro LC-MS analýzu jsou matricové efekty, které se nejčastěji projevují při ESI, nicméně jsou přítomny i při APCI. V obou případech jak v pozitivním, tak negativním módu ionizace. U ESI jde zejména o snížení množství ionizovaného analytu, u APCI je snížení méně časté a vyskytuje se i zvýšení ionizace analytů, zejména v případech, když je v MF obsaženo vyšší procento organické složky.¹⁸ Matricové efekty mohou být zodpovědné za snížení přesnosti, správnosti a ztrátu senzitivity do takové míry, kdy se hledané analyty mohou stát nedetekovatelnými.¹⁸ To je způsobeno tím, že jednotlivé složky z matrice (např. soli, elektrolyty, polární látky, fenoly, močovina, cukry, fosfolipidy, metabolity) se při separaci v kapalinovém chromatografu mohou eluovat v různých časech a při průchodu iontovým zdrojem blokovat přístup k povrchu kapky během desolvatace či soutěžit o náboj s analyty. Tím mohou v průběhu analýzy nepředvídatelně ovlivnit míru vzniku ionizovaných molekul analytu. Z toho důvodu je vhodné při vývoji metody ověřit vliv matricového efektu. To se často provádí kontinuálním postkolonovým přidavkem sledovaného analytu během nástřiku matrice. (viz Obr. 9).^{5,9}



Obrázek 9 Chromatogram postkolonového přidavku metoxyfenozinu (SRM, přechod z m/z 367 na m/z 149). Plnou čarou je zobrazena odezva při nástřiku 50% ACN a tečkovanou čarou odezva při nástřiku extraktu matrice. (převzato a upraveno)⁹

5.3 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY

Validace analytické metody zajišťuje, že výsledky získané ověřenými metodami jsou spolehlivé a reprodukovatelné. Jedná se o základní metodiku, pomocí které jsme schopni hodnotit vhodnost analytické metody pro danou aplikaci. Požadavky na validační parametry se mohou lišit podle organizace, která validaci vyžaduje, a dle typu doporučení.¹⁷

Hlavními autoritami v oblasti doporučení k validačním kritériím jsou v současné době FDA vydávající dokument s názvem „Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry“¹⁹ a mezinárodní Rada pro harmonizaci technických požadavků pro léčivé přípravky (ICH, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) vydávající dokument „ICH guideline M10 on bioanalytical method validation“²⁰. Dříve bylo v praxi používáno také evropské doporučení zpracované European Medicines Agency, nicméně to bylo od července 2022 nahrazeno dříve zmiňovanými doporučeními od ICH, které oficiálně vešla v platnost 21. ledna roku 2023.^{20,21}

V této diplomové práci bude teoretická část omezena na validační kritéria spojená s experimentální částí této práce, tedy kalibrací metody, kontrolou kvality (QC), selektivitou, přesností, správností, senzitivitou a hodnocením carry-overu.

5.3.1 Kalibrace metody

Kalibrační křivka demonstruje závislost mezi koncentrací analytu a odezvou přístroje.²⁰ Doporučení pro kalibraci od FDA¹⁹ a od ICH²⁰ jsou si velmi podobná a obě doporučení se shodují v nárocích na:

- Použití blanku a nulového kalibrátoru při každé kalibraci.
- Použití minimálně šesti kalibračních bodů při každé kalibraci.
- Použití shodné matrice pro kalibraci a vzorky.
- Aplikaci co nejjednoduššího regresního modelu poskytující adekvátní výsledky.
- Akceptačních kritériích kalibrace: alespoň 75 % kalibrátorů by mělo být odchýleno maximálně o 15 % od nominální koncentrace kalibrátoru, s výjimkou kalibrátoru na hladině spodního limitu kvantifikace (LLOQ), který může vykazovat odchylku až do 20 % nominální koncentrace.

V podstatě jediným rozdílem mezi těmito doporučeními je skutečnost, že ICH explicitně uvádí,²⁰ že při replikaci měření je nutné, aby výše uvedená akceptační kritéria kalibrace platila alespoň pro 50 % replikátů, kdežto FDA tento nárok neuvádí.^{19,20}

5.3.2 Kontrola kvality

Vzorky pro QC by měly být připraveny ve stejné matrici jako analyzované vzorky a aby bylo dosaženo co největší správnosti výsledků, měly by být uchovávány stejně, jako analyzované vzorky. Jejich smyslem je ověření funkčnosti analytické metody, pokud by naměřené koncentrace nesplňovaly akceptační kritéria, nelze tvrdit, že je analytická metoda spolehlivá a naměřené hodnoty budou odpovídat reálným koncentracím.²⁰

Doporučení od FDA a ICH pro QC jsou si v základu velmi podobná. Obě doporučení požadují 4 hladiny pro QC vzorky, kdy se liší v definicích koncentračního rozmezí pro jednotlivé QC vzorky:^{19,20}

- 1. QC na hladině LLOQ
 - FDA i ICH jej definují jako koncentraci LLOQ
- 2. QC pro nízkou hladinu
 - FDA jej definuje jako trojnásobek koncentrace LLOQ
 - ICH jej definuje jako hodnotu do trojnásobku koncentrace LLOQ
- 3. QC pro střední hladinu
 - FDA jej definuje jako střední hodnotu (blíže nespecifikuje)
 - ICH jej definuje jako 30 – 50 % kalibračního rozmezí
- 4. QC pro vysokou hladinu
 - FDA jej definuje jako vysokou hodnotu (blíže nespecifikuje)
 - ICH jej definuje jako alespoň 75% horní meze kvantifikace

V doporučení FDA jsou akceptační kritéria analýzy uvedena tak, že naměřené hodnoty QC by měly ve více než 67 % všech, a alespoň 50 % výsledků na jedné koncentrační hladině splňovat odchylku od nominální koncentrace do 15 %.¹⁹

5.3.3 Přesnost a správnost

Správnost je definována jako: „*těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny*“²² a přesnost měření je definována jako: „*těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek*“²², kdy tyto hodnoty se vypočítají z naměřených koncentrací QC vzorků. Ty by měly být provedeny alespoň v pěti replikátech a analyzovat by se měly nejméně 3krát.^{19,20}

Aby byla dle FDA i ICH metoda přijatelně přesná, nesmí relativní směrodatná odchylka (RSD) přesáhnout 15 % s výjimkou hladiny LLOQ, kde je limit pro RSD

až 20 %. Metoda je považována za správnou, pokud odchylka měření nepřesahuje 15 % (pro LLOQ 20 %) od nominální koncentrace.^{19,22}

5.3.4 Selektivita

Selektivita je definována jako schopnost analytického instrumentu rozlišit a správně kvantifikovat analyt v přítomnosti potenciálně interferujících látek z matrice.²⁰ Jak FDA, tak i ICH k tomuto problému přistupují velmi podobně. Obě autority doporučují, aby byla selektivita testována alespoň na šesti slepých vzorcích, jež by měly být získané z odlišných zdrojů. Kritéria přijatelnosti metody jsou pak od obou agentur nastavena tak, že by v retenčních časech analytů a IS nemělo docházet k signifikantním interferencím způsobeným látkami v matrici vzorku. ICH dále specifikuje, že tato odezva by pro analyty neměla přesáhnout 20 % LLOQ příslušného analytu. ICH i FDA určují, že odezva interferujících látek v čase eluce IS by neměla přesáhnout 5 % průměrné plochy pod píkem (AUC) IS ve vzorcích.^{19,20}

5.3.5 Carry-over

Podle ICH lze carry-over definovat jako změnu naměřené koncentrace z důvodu přítomnosti pozůstatku analytů z předchozí analýzy.²⁰ FDA i ICH se shodují v kritériu pro přijatelnost metody a pro analyty nepřipouští carry-over vyšší, než je 20 % AUC LLOQ. FDA sice explicitně nespécifikuje, po jaké koncentraci analytu v předešlé analýze by měl být carry-over hodnocen, nicméně lze předpokládat, že jako v případě doporučení ICH jde o koncentraci odpovídající nejvyšší kalibrační úrovni.^{19,20} Z doporučení ICH dále plyne, že pokud dochází ke carry-overu IS, neměla by AUC IS v blanku média přesahovat 5 % průměrné odezvy IS.²⁰

5.3.6 Sensitivita

Sensitivita analytické metody je dle FDA definována jako koncentrace analytu, která má výšku píku alespoň v pětinásobku šumu nulového kalibrátoru a zároveň splňuje QC (na koncentrační úrovni LLOQ) přesnost do 20 % RSD. ICH určuje LLOQ pouze jako koncentraci, při které má analytická metoda akceptovatelnou přesnost a správnost.^{19,20}

5.4 CYTOCHROMY P450

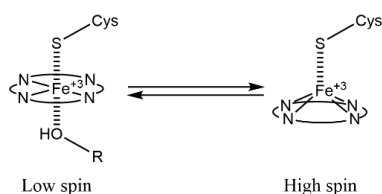
CYP450 představují širokou nadrodinu hemoproteinů. Svě jméno získaly na základě toho, že v redukovaném stavu s navázaným CO vykazují charakteristickou absorpci elektromagnetického záření v pásu okolo 450 nm. CYP450 jsou důležité enzymy v metabolismu mnoha endogenních (eikosanoidy, cholesterol, steroidní hormony) i exogenních látek, včetně většiny léčiv. Jejich výskyt je velmi rozšířen, od jejich objevu v roce 1958 nebyl dosud identifikován jediný eukaryotní či prokaryotní organismus, ve kterém by se alespoň některé izoformy tohoto enzymu nevyskytovaly. Obecně se CYP450 nejhojněji vyskytují v játrech, nicméně ve významném množství jsou exprimovány i v gastrointestinálním traktu, plicích a ledvinách.^{1,23}

5.4.1 Struktura a aktivita cytochromů P450

U prokaryotních buněk se CYP450 volně pohybují rozpuštěné v cytosolu. U eukaryot jsou CYP450 ukotveny na membránu hladkého endoplazmatického retikula a v menší míře také na mitochondriích.^{1,23} CYP450 zastává asi 12 – 15 % z celkové hmotnosti endoplazmatického retikula.²³

U eukaryot má CYP450 podobu trojbokého hranolu s jedním hrotem nasměrovaným do cytosolu. Složen je z protoporfyrinu IX s atomem Fe^{3+} a apoproteinu, jež je tvořen pouze jedním polypeptidickým řetězcem o délce 45 až 55 kDa. Atom Fe^{3+} v centru protoporfyrinu je obklopen čtyřmi atomy dusíku, které slouží jako ligandy v planární rovině. Dále je na něj jako pátý ligand vázán thiolátový anion cysteinu z apoproteinu. Šestým ligandem naproti thiolátovému anionu je molekula vody.^{1,23}

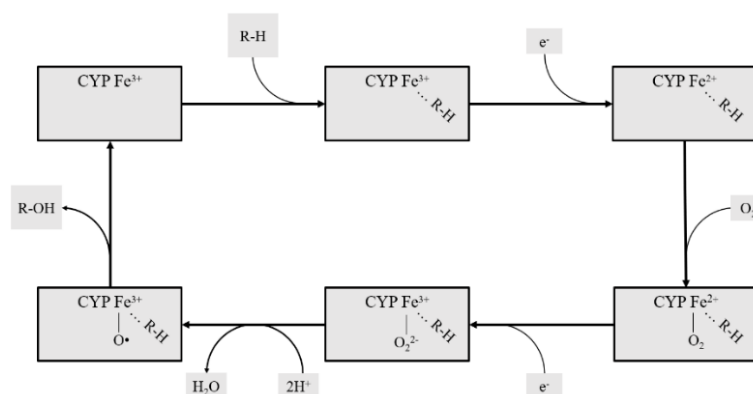
Atom Fe^{3+} se může nacházet v CYP450 ve dvou stavech, a to v tzv. *low spin stavu*, kdy má maximálně spárované 3d valenční elektrony a v *high spin stavu*, kdy má naopak maximálně nespárované 3d valenční elektrony. Pokud není třeba, aby byl CYP450 aktivní, je rovnováha mezi těmito stavy značně vychýlena ve prospěch *low spin stavu*. Při interakci CYP450 s hydrofobním substrátem dochází k indukci posunu rovnováhy ve prospěch *high spin stavu*, který zapříčiní posunutí Fe^{3+} mimo rovinu kruhu porfyrinu IX se současným zrušením vazby molekuly vody (Obr. 10).^{1,23}



Obrázek 10 LS a HS stav Fe^{3+} atomu v protoporfyrinu IX. (převzato)¹

Tento posun způsobí změnu redoxního potenciálu z -350 mV u *low spin stavu* na -175 mV u *high spin stavu*, což umožní přenos elektronu z nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (s redoxním potenciálem -365 mV). Tímto způsobem je zahájen katalytický cyklus, kdy popsany mechanismus je jeden ze způsobů regulace aktivity CYP450.^{1,23} CYP450 v organismu působí zejména jako monooxygenázy (Obr. 11), nicméně mohou zprostředkovávat více druhů katalytických reakcí.^{1,23}

Monooxidázová aktivita CYP450

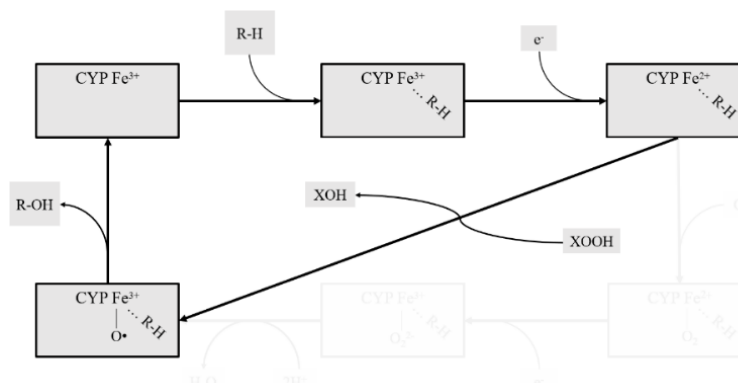


Obrázek 11 Katalytický cyklus CYP450 – monooxygenázová reakce. (převzato)¹

Souhrn reakce: $RH + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow ROH + H_2O$

Nejčastěji CYP450 v organismu figurují jako monooxygenázy. Z molekuly O_2 odštěpí jeden atom kyslíku, který následně zabudují do molekuly substrátu. Druhý atom kyslíku reaguje s 2 H^+ za vzniku molekuly vody (Obr. 11).^{1,23}

Peroxidázová aktivita CYP450



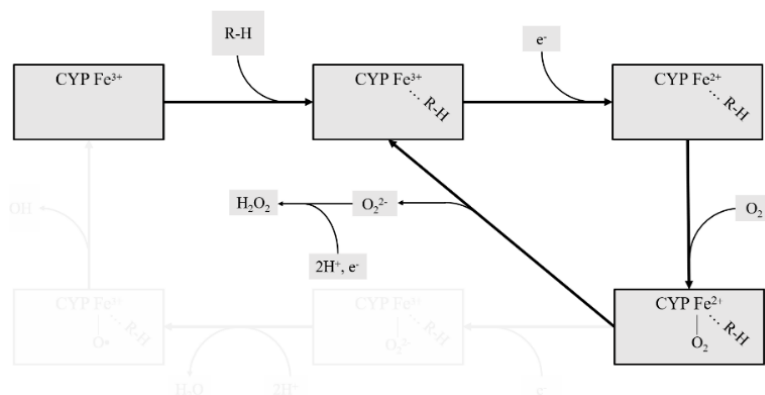
Obrázek 12 Katalytický cyklus CYP450 – peroxidázová zkratka. (převzato)¹

Souhrn reakce: $RH + XOOH \rightarrow XOH + ROH$

Pro oxidaci xenobiotik není vždy třeba vzdušný kyslík a k oxidaci substrátů může docházet i za anaerobních podmínek. Peroxidázová aktivita CYP450 zajišťuje oxidaci

xenobiotik za využití kyslíku z molekuly H₂O₂, peroxidovaných lipidů, peroxidovaných steroidů, nebo organických hydroperoxidů (Obr. 12).^{1,24}

Rozpojovací reakce CYP

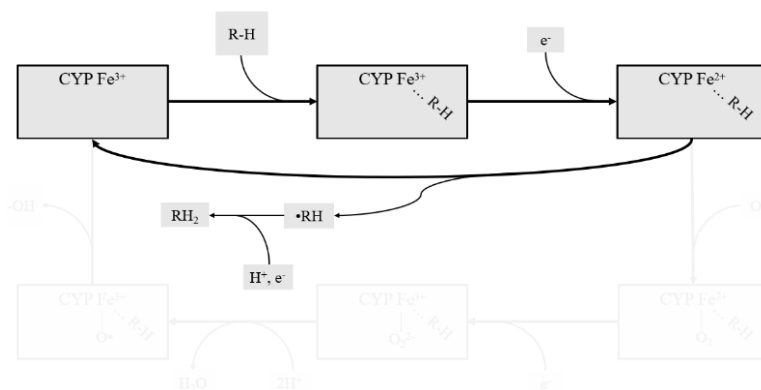


Obrázek 13 Katalytický cyklus CYP450 – rozpojovací reakce. (převzato)¹

Souhrn reakce: $O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$

Za určitých okolností mohou CYP450 redukovat molekulu O₂ na superoxidanion radikál (a tak tvořit H₂O₂) aniž by využily kyslík k monooxygenázové aktivitě. Tato aktivita je zejména přítomna u CYP450 podrodiny 2B a u izofomy 2E1. Některé látky tuto reakci zvyšují tím, že se navážou do vazebného místa, aniž by sami podléhali oxygenaci (Obr. 13). V tomto spočívá podstata toxického účinku některých látek (perfluoro-n-hexan, trichlorethan, některé barbituráty atd.).^{1,25}

Reduktázová aktivita



Obrázek 14 Katalytický cyklus CYP450 – reduktázová reakce. (převzato)¹

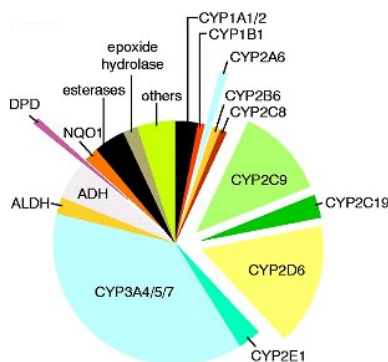
Souhrn reakce: $RH + e^- + H^+ \rightarrow RH_2$

Někdy může být místo O₂ akceptorem elektronu substrát, který se tak redukuje. K této reakci většinou dochází za anaerobních podmínek, přičemž kyslík figuruje jako kompetitivní inhibitor (Obr. 14). Může jít o mechanismus toxicity některých látek, např. redukce halogenderivátů alkanů, která vede ke vzniku reaktivních volných radikálů.^{1,26}

5.4.2 Klasifikace cytochromu P450 a jeho izoforem

CYP450 se od sebe mohou navzájem lišit sekvencí aminokyselin (AMK) v apoproteinu. To zapříčiňuje i preferenci různých substrátů (pro jeden substrát je více CYP450, které jsou schopny jej metabolizovat) a rozdílnou citlivost vůči inhibitorům jeho aktivity.^{1,23} CYP450 se dělí do: rodin při 40% shodě v AMK sekvenci, podrodin při 60 – 70% shodě v AMK sekvenci a na jednotlivé izoformy. Rodinu CYP450 označuje první číslo, podrodinu písmeno a konkrétní izoformu značí poslední číslo v označení.¹ Dosud bylo u člověka identifikováno 57 izoforem CYP450, kdy nejdůležitější izoformy z hlediska metabolismu léčiv jsou uvedeny v grafu 1.^{27,28} Z něj vyplývá, že metabolismus většiny léčiv je zprostředkován pouze omezeným množstvím izoforem CYP450.^{1,29}

Graf 1 Podíl enzymů a jednotlivých izoforem CYP450 na metabolismu léčiv.²⁹



5.4.3 Cytochrom P450 3A4

Tabulka 1 Seznam substrátů, inhibitorů a induktorů CYP450 3A4.^{1,23}

<i>Xenobiotické substráty</i>	midazolam, cyklosporin, ergotamin, erytromycin, aflatoxiny, kokain, kodein, lidokain, metadon
<i>Inhibitory</i>	makrolidová antibiotika, ketokonazol, diltiazem, lovastatin, chinin, grapefruitový džus
<i>Induktory</i>	barbituráty, fenytoin, rifampicin, dexamethason, karbamazepin

Jedná se o nejvýznamnější lidský CYP450, který je zodpovědný za metabolismus přibližně 30 % veškerých xenobiotik a až 50 % všech léčiv. V tabulce 1 je uveden seznam substrátů, inhibitorů a induktorů CYP450 3A4. Nízká substrátová specifita této izoformy je způsobena silnou plasticitou vazebného místa pro substrát. CYP450 3A4 je lokalizován především v játrech a střevě, nicméně v menším zastoupení se vyskytuje také v ledvinách, plicích, mozku a placentě. Jeho aktivita je silně interindividuálně variabilní z důvodu výrazné indukovatelnosti a citlivosti vůči inhibitorům. Jeho exprese je regulována prostřednictvím pregnanového X receptoru.^{1,23}

5.4.4 Cytochrom P450 2B6

Tabulka 2 Seznam substrátů, inhibitorů a induktorů CYP450 2B6.^{1,23}

<i>Xenobiotické substráty</i>	bupropion, efavirenz, pethidine, ketamin, propofol, cyklofosfamid, artemisinin, aflatoxin B1
<i>Inhibitory</i>	nelfinavir, efavirenz, ritonavir, paroxetin, sertralin, norfluoretin, fluvoxamin, vorikonazol
<i>Induktory</i>	barbituráty, fenytoin, rifampicin, efavirenz

CYP450 2B6 může jak snižovat toxicitu xenobiotik, tak i aktivovat řadu prokarcinogenů, včetně některých pesticidů a herbicidů. Seznam substrátů, inhibitorů a induktorů je uveden v tabulce 2. Aktivita tohoto CYP450 je velmi interindividuálně variabilní kvůli vysokému genetickému polymorfismu napříč lidskou populací. Jeho exprese je regulována prostřednictvím pregnanového X receptoru a konstitutivního androstanového receptoru.³⁰

5.4.5 Cytochrom P450 2C9

Tabulka 3 Seznam substrátů, inhibitorů a induktorů CYP450 2C9.^{1,23}

<i>Xenobiotické substráty</i>	warfarin, tolbutamid, sartany, fluvastatin, fenytoin, nesteroidní antiflogistika
<i>Inhibitory</i>	sulfafenazol, amiodaron, flukonazol
<i>Induktory</i>	barbituráty, rifampicin, steroidy

CYP450 2C9 byl identifikován pouze jako deaktivující, tzn. dosud nebyla nalezena látka, která by se po metabolizaci touto izoformou stala více toxickou. Nejvýznamnější substráty, inhibitory a induktory CYP450 2C9 jsou uvedeny v tabulce 3. Geny pro tento enzym podléhají výraznému genetickému polymorfismu, a proto je i jeho exprese napříč lidskou populací značně variabilní. Jeho exprese je taktéž regulována prostřednictvím pregnanového X receptoru a konstitutivního androstanového receptoru.¹

5.5 STANOVENÍ AKTIVITY CYTOCHROMU P450

Pro studium reakčních mechanismů CYP450 se historicky uplatnily tyto techniky: spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra, fluorescenční spektroskopie, Ramanova, Mössbauerova a rentgenová spektroskopie.² Polymorfismy (tedy existenci více variant genu v populaci s četností nad 1 %) nebo bodové mutace v genech pro CYP450 jsou studovány za pomoci sekvenování deoxyribonukleové kyseliny kódující příslušné geny.²³ Expresi CYP450 pak lze studovat pomocí kvantifikace mediátorové ribonukleové kyseliny. K tomuto se používá kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí.³ Ke studiu struktur nově objevených izoform CYP450 se jako nejvhodnější metoda jeví nukleární magnetická rezonance.²

Aktivita CYP450 se stanovuje *in vitro* ve vzorcích buněčných kultur z důvodu studia možného vlivu xenobiotika na expresi či metabolismus CYP450, a tak i vzniku potenciálních lékových interakcí,³¹ nebo i *in vivo* pro získání klinicky relevantních informací o metabolismu léčiv na základě, kterých je možné individualizovat terapii.²⁸

Stanovení aktivity CYP450 se provádí sledováním metabolismu specifických substrátů. To jsou látky, které jsou metabolizovány pouze jednou izoformou CYP450 (seznam v tabulce 4).² Tímto způsobem lze stanovit, zdali vlivem zkoumané látky dochází k inhibici enzymatické aktivity, či k expresi CYP450 a následnému zvýšení metabolizace substrátu.¹ Koncentrace metabolitů specifických substrátů je standardně měřena za pomoci LC-MS.²

Tabulka 4 Specifické substráty izoform CYP450.

Izoforma CYP450	Specifické substráty
1A1	7-(2-chloroethoxy)-3H-fenoxazin-3-on ³²
1A2	fenactin ^{33,34}
2A6	nikotin ³⁵
2B6	bupropion ^{34,35}
2C19	omeprazol ³⁵ , S-mephenytoin ³⁴
2C8	repaglinid ³⁵ , paclitaxel ³⁴
2C9	losartan ³⁵ , diklofenak ³⁴
2D6	dextrometorfan ^{34,35}
2E1	chloroxazon ³³
2J2	astemizol ³³
3A4	midazolam ^{34,35}

V rámci přípravy této diplomové práce bylo nutné se nejprve seznámit s dříve publikovanými vědeckými články, které se věnují problematice analýzy specifických

substrátů a jejich metabolitů pro hodnocení aktivity CYP450. Výsledky rešerše jsou zpracovány v textu níže a přehled vybraných parametrů analytických metod je uveden v tabulce 5.

Výchozí metoda pro tuto diplomovou práci byla již dříve publikována v odborném článku.³ Původní práce se věnovala analýze MID a jeho metabolitů 1OH-MID a 4OH-MID v buněčném médiu z experimentů s buněčnými kulturami primárních lidských hepatocytů ve 2D a 3D uspořádání pomocí LC-MS/MS. K analýze byl využit trojitý kvadrupól a jako IS byl použit OXAZ. LLOQ metody byla pro všechny analyty 0,1 μM .³

Studie autora *Gerin et al.*³⁶ se věnovala analýze BUP, OH-BUP, MID, 1OH-MID, 4OH-MID, DCF a 4OH-DCF v supernatantu buněčných kultur lidských hepatocytů. Dalšími analyty byl fenacetin a acetaminofen. K analýze byl použit trojitý kvadrupól a jako IS byly použity izotopicky značené standardy hydroxylovaných metabolitů. LLOQ metody byla pro OH-BUP 0,00373 μM , pro 1OH-MID 0,0029 μM a pro 4OH-DCF 0,00961 μM .³⁶

Studie autora *Grangeon et al.*²⁸ se podrobně zabývala analýzou BUP, OH-BUP, MID, 1OH-MID a 4OH-MID v plazmě a moči pacientů za použití LC-MS/MS instrumentace. Dalšími analyty zahrnutými do této studie byly kofein, tolbutamid (pro určení aktivity CYP450 2C9 místo DCF), omeprazol, dextromethorfan a chlorzoxazon. Pro analýzu byl využit trojitý kvadrupól, přičemž jako IS byly použity izotopicky značené formy všech uvedených analytů. Rozmezí kvantifikace se lišilo v závislosti na analyzovaném biologickém materiálu.²⁸

Studie autora *Lee et al.*³⁷ se zaměřila na analýzu OH-BUP a 1OH-MID ve vzorcích obsahujících směs lidských mikrozomů s LC-MS/MS analýzou. Další analyty zahrnovaly acetaminofen, 7-hydroxykumarin, 4-hydroxytolbutamid (pro určení aktivity izoformy 2C9), 4'-hydroxymefenytoin, dextrorfan, 6-hydroxychloroxazon a 6 β -hydroxytestosteron. Pro analýzu byl vybrán trojitý kvadrupól, přičemž jako IS byl použit KARB. LLOQ této analytické metody činila 0,000977 μM .³⁷

Studie autora *Linder et al.*³⁸ se věnovala analýze OH-BUP, 1OH-MID a 4OH-DCF ve směsi lidských mikrozomů prostřednictvím LC-MS/MS. Další analyty zahrnovaly acetaminofen, 7-hydroxykumarin, 6 α -hydroxypaklitaxel, 4'-hydroxymefenytoin, dextrorfan a 6-hydroxychloroxazon. K analýze byl použit trojitý kvadrupól s tolbutamidem jako IS. LLOQ v článku uveden nebyl.³⁸

V průběhu rešerše analytických metod používaných k simultánní determinaci aktivity izoform CYP450 3A4, 2B6 a 2C9 byly nalezeny 4 články, které se touto problematikou zabývaly.^{28,36-38} Výchozí metodou pro návrh optimalizované metody byla již zmíněná metoda používaná pro analýzu MID a jeho metabolitů za pomoci LC-MS/MS.³

Zdroje²⁸ a³⁸ analyzovaly analyty za pomoci více LC metod, což zvyšovalo dobu analýzy kvůli nutnosti opakovaného nástřiku vzorků, vždy za upravených chromatografických podmínek.^{28,38}

Zdroj³⁷ popisoval metodu, kterou lze analyzovat BUP, OH-BUP, MID a 1OH-MID během 4,1 min, avšak retenční časy OH-BUP a 1OH-MID jsou si velmi blízké. V gradientu metody nebyla zahrnuta opětovná ekvilibrace kolony po eluci analytů a lze předpokládat, že doba trvání této metody bude delší. Jako IS byl použit KARB.³⁷

Analytická metoda autora *Gerin et al.*³⁶ umožňovala analýzu BUP, MID, DCF a jejich metabolitů OH-BUP, 1OH-MID, 4OH-MID a 4OH-DCF. 1OH-MID a 4OH-MID měli velmi blízké retenčními časy, což může být při podobnosti MRM přechodů problematické. Analytická metoda byla určena pro kvantifikaci velmi nízkých koncentrací analytů v séru a v moči, nikoliv v buněčném médiu.³⁶

Nejčastěji byl k analýze používán gradient MF složené z FA, H₂O a ACN. Jako SF byly voleny kolony se sorbentem na základě C18 modifikovaného silikagelu. Analýza publikovaných metod prokázala, že přístup k analýze vybraných analytů zcela není jednotný a většina publikovaných metod neumožňuje simultánní analýzu substrátů a metabolitů pro více izoform CYP450.^{3,28,36-38}

Tabulka 5 Shrnutí vybraných parametrů publikovaných analytických metod.

Analyty	Retenční čas [min]	Označení SF Rozměry SF Velikost částic	Složení MF gradient	Detekce, Průtok, teplota	Zdroj
MF A = 0,1% FA v H ₂ O MF B = ACN					
MID	3,5	Phenomenex, Luna Phenyl-Hexyl 100 mm × 3 mm 3 μm	Čas [min] MF A [%] MF B [%]	MRM	3
1OH-MID	3,2		0,00 – 2,50 70 → 63 30 → 37	0,4 ml/min 25 °C	
4OH-MID	2,9		2,50 – 2,51 63 → 45 37 → 55		
			2,51 – 5,20 45 55		
			5,20 – 5,30 45 → 15 55 → 85		
			5,30 – 7,30 15 85		
		7,30 – 7,40 15 → 70 85 → 30			
		7,40 – 10,4 70 30			
MF A = 0,1 % kys. trifluoroctová v H ₂ O MF B = ACN					
BUP	5,4	Agilent Technologies, Zorbax eclipse XDB-C18 50 mm × 2,1 mm 5 μm	Čas [min] MF A [%] MF B [%]	MRM	36
OH-BUP	4,9		0,0 – 1,0 95 → 75 5 → 25		
MID	5,8		1,0 – 4,5 75 → 50 25 → 50		
1OH-MID	5,5		4,5 – 5,5 50 → 10 50 → 90		
4OH-MID	5,4		5,5 – 7,5 10 90		
DCF	7,9		7,5 – 11 10 → 95 90 → 5		
4OH-DCF	7,1				
MID isokratická eluce (40:60; V/V), 8 min MF A = mravenčan amonný 10 mM, pH 3 MF B = ACN					
BUP	5,9	Phenomenex, Luna PFP(2) 150 mm × 3 mm 3 μm		MRM	28
OH-BUP	4,5			350 μl/min	
MID	5,2			40 °C	
1OH-MID	4,8		BUP isokratická eluce (40:60; V/V), 11 min		
4OH-MID	4,0		MF A = 0,01% FA v H ₂ O MF B = 0,01% FA v ACN		
MF A = 0,1% FA v H ₂ O MF B = 0,1% FA v ACN					
BUP	-	Waters Corporation, Atlantis dC18 150 mm × 4,6mm 5 μm	Čas [min] MF A [%] MF B [%]	MRM	37
OH-BUP	4,0		0,0 – 0,1 100 0		
MID	-		0,1 – 4,0 100 → 50 0 → 50		
1OH-MID	3,9		4,0 – 4,1 50 50		
MF A = 0,1% FA v H ₂ O MF B = 0,1% FA v ACN					
Gradient pro analýzu OH-BUP					
OH-BUP	-	Agilent Technologies, Zorbax Eclipse Plus C18 50 mm × 2,1 mm 3,5 μm	Čas [min] MF A [%] MF B [%]	MRM	38
			0 – 0,8 95 5		
			0,8 – 3,3 95 → 2 5 → 98		
Gradient pro analýzu 1OH-MID					
1OH-MID	-		Čas [min] MF A [%] MF B [%]	0,4 → 0,6 ml/min	
			0 – 0,8 90 10		
			0,8 – 2,8 90 → 5 10 → 95		
Gradient pro analýzu 4OH-DCF					
4OH-DCF	-		Čas [min] MF A [%] MF B [%]	neuvědena	
			0 – 0,3 95 5		
			0,3 – 2,8 95 → 5 5 → 95		

6 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat analytickou metodu pro simultánní kvantifikaci specifických substrátů MID, BUP, DCL a jejich metabolitů pro CYP450 3A4, 2B6 a 2C9 ve Williamsově E buněčném médiu.

Dílčí cíle práce byly:

- a. Vyvinout analytickou metodu využívající LC-MS/MS pro kvantifikaci BUP, MID, DCF a jejich hydroxylovaných metabolitů OH-BUP, 1OH-MID, 4OH-MID a 4OH-DCF.
- b. Tuto metodu optimalizovat pro simultánní kvantifikaci všech výše uvedených analytů a jejich metabolitů se zachováním krátkého času analýzy.
- c. Novou analytickou metodu částečně validovat dle validačních kritérií FDA. Vybrané validační parametry jsou: kalibrační křivky, QC, selektivita metody, carry-over, sensitivita, přesnost a správnost.
- d. Prokázat funkčnost metody stanovením aktivity CYP450 izoform 3A4, 2B6 a 2C9 v 16 reálných vzorcích pocházejících z experimentu na *in vitro* modelu primárních lidských hepatocytů ve 3D uspořádání, na kterých byl zkoumán vliv rifampicinu na expresi izoform CYP450 v různých časových intervalech.

7 PRAKTICKÁ ČÁST

7.1 CHEMIKÁLIE A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Rozpouštědla:

- ACN LC-MS grade VWR Chemicals (Česká republika)
- MeOH LC-MS grade VWR Chemicals (Česká republika)
- ultračistá deionizovaná voda Milli-Q® IQ 7000 Merck (Německo)
- dimethylsulfoxid (DMSO) Merck KGaA (Německo)

Standardy:

- MID Toronto Research Chemicals (Kanada)
- 1OH-MID Toronto Research Chemicals (Kanada)
- 4OH-MID Toronto Research Chemicals (Kanada)
- BUP Merck KGaA (Německo)
- OH-BUP Merck KGaA (Německo)
- DCF Merck KGaA (Německo)
- 4OH-DCF Merck KGaA (Německo)
- KARB Merck KGaA (Německo)
- kyselina flufenamová Merck KGaA (Německo)
- OXAZ Merck KGaA (Německo)
- KETOP Merck KGaA (Německo)

Ostatní chemikálie:

- FA LC-MS grade VWR Chemicals (Česká republika)
- AA LC-MS grade Honeywell (USA)
- amoniak 28% VWR Chemicals (Česká republika)
- buněčné médium William's E medium; ThermoFisher Scientific (USA)

Spotřební materiál:

- injekční stříkačky Injekt®-F LuerSolo, 0,01 ml – 1 ml; B. Braun (Německo)
- injekční filtry MF-Millipore™ 0,22 µm PVDF Hydrophilic; Merck (Německo)
- primární lidské hepatocytů v 3D uspořádání BioIVT (USA)

7.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

LC-MS systém Nexera X2 + LCMS-8030 (Shimadzu Corporation, Japonsko) složený z:

- degasser DGU-20A₅
- 2× čerpadla LC-30AD
- autosampler SIL-30AC
- kolonový termostat CTO-30A
- program pro sběr dat LabSolutions, Verze 5.85
- hmotnostní spektrometr LCMS-8030
- předkolona ColumnGuard C18; Phenomenex (USA)
- kolona Luna[®] Phenyl-Hexyl (3 μm, 100×3 mm, 100 Å); Phenomenex (USA)

Přístroje a pomůcky:

- pH metr pH 8+ DHS, XS Standard, T-BNC DHS; XS Instruments (Itálie)
- třepačka WIZARD IR; VELP Scientific Inc. (Itálie)
- analytické váhy CPA225D-0CE; Sartorius AG (Německo)

7.3 PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE

Během vývoje metody bylo připraveno několik typů MF. Jako finální byla vybrána MF s přidavkem 0,05% AA (v/v) ve H₂O i v ACN. Příprava MF probíhala následovně: do 500 ml odměrné baňky naplněné vodou (MF A) nebo požadovaným rozpouštědlem (MF B) bylo přidáno požadované množství AA nebo FA. Odměrná baňka byla následně doplněna rozpouštědlem po rysku. MF s obsahem amoniaku byla připravena úpravou MF s 0,1% obsahem AA v H₂O (v/v). pH této MF bylo upraveno na 4,50 pomocí 5% roztoku (v/v) amoniaku. Připravené MF jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Seznam připravených MF.

MF A	MF B
0,05 % AA v H ₂ O	ACN s 0,05 % AA
0,05 % AA v H ₂ O	ACN
0,05 % AA v H ₂ O	MeOH
0,1 % AA v H ₂ O	ACN s 0,1 % AA
0,1 % AA v H ₂ O	ACN
0,1 % AA v H ₂ O + NH ₃	ACN
0,2 % AA v H ₂ O	ACN s 0,2 % AA
0,3 % AA v H ₂ O	ACN s 0,3 % AA
0,4 % AA v H ₂ O	ACN s 0,4 % AA
0,1 % FA v H ₂ O	ACN
0,1 % FA v H ₂ O	MeOH

Pozn.: Veškerá uvedená procenta v tabulce jsou vyjádřena jako (v/v).

7.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ STANDARDŮ A VZORKŮ

Zásobní roztoky standardů byly připraveny rozpuštěním látek v DMSO. BUP byl připraven jako 10 mM a 40 mM roztok. OH-BUP, 1OH-MID a 4OH-DCF byly připraveny jako 1 mM a 10 mM roztoky. MID, 4OH-MID a DCF byly připraveny pouze jako 10 mM roztoky. Tyto roztoky byly uchovávány při -80 °C. Zásobní roztoky jednotlivých IS o koncentraci 10 mM byly připraveny v ACN a byly uchovávány v lednici při 4 °C.

Roztok směsi tří vnitřních standardů (3xIS) v 50% ACN byl připravován následovně: do odměrné baňky (50 ml) s 25 ml vody byly přidány 10 mM zásobní roztoky IS, a to 10 µl KARB, 20 µl OXAZ a 100 µl KETOP. Následně se objem odměrné baňky doplnil po rysku ACN.

Ze zásobních roztoků standardů se dále připravovaly zásobní roztoky pro kalibrátory (tabulka 7) a pro QC vzorky o koncentracích dle tabulky 8. Zásobní roztoky kalibrátorů a QC vzorků byly uchovávány při 4 °C.

Tabulka 7 Příprava zásobních roztoků kalibrátorů.

Kalibrační úroveň (počet analytů)	Koncentrace [µM]	Objem 1 mM standardu [µl]	Objem 10 mM standardu [µl]	Objem 40 mM standardu [µl]	Objem ACN [µl]	Celkový objem [µl]
L 0 (3)	0,025	2,5	-	-	992,5	1000
L 1 (7)	0,05	-	0,5	-	996,5	1000
L 2 (7)	0,1	-	0,5	-	496,5	500
L 3 (7)	0,2	-	1	-	493	500
L 4 (7)	0,5	-	2,5	-	482,5	500
L 5 (7)	1,0	-	5	-	465	500
L 6 (7)	3,0	-	15	-	395	500
L 7 (7)	5,0	-	10	-	130	200
L 8 (7)	8,0	-	12	-	66	150
L 9 (7)	10,0	-	15	-	45	150
L 10 (7)	12,0	-	18	-	24	150
L 11 (1)	16,0	-	-	4	96	100
L 12 (1)	20,0	-	-	5	95	100

Tabulka 8 Koncentrace QC vzorků.

	BUP [µM]	OH-BUP [µM]	MID [µM]	1OH-MID [µM]	4OH-MID [µM]	DCF [µM]	4OH-DCF [µM]
QC 1	0,05	0,05	0,05	0,025	0,05	0,05	0,025
QC 2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1
QC 3	10	5	5	5	5	5	5
QC 4	20	10	10	10	10	10	10

Pracovní roztoky kalibrátorů a QC vzorků byly připravovány tak, že k 495 μ l buněčného média bylo přidáno 5 μ l příslušného zásobního roztoku pro vybranou koncentrační hladinu a 500 μ l 3xIS. Poté byla směs promíchána 15 s na třepačce. 150 μ l směsi bylo následně zfiltrováno přes injekční filtr (0,22 μ m, PVDF) do vialky s inzertem.

Pro automatické ladění parametrů MS pomocí programu obsaženého v softwaru LabSolutions byly použity 50 μ M roztoky analytů rozpuštěné v 50% ACN.

Reálné vzorky z biologických experimentů byly po rozmrazení promíchány na třepačce (15 s). 100 μ l vzorku bylo odebráno do 0,5 ml zkumavky Eppendorf a smícháno se 100 μ l 3xIS. Směs byla promíchána 15 s na třepačce a zfiltrována přes injekční filtr (0,22 μ m, PVDF) do vialky s inzertem.

Pro analýzu BUP a DCF bylo nutné vzorky naředit z důvodu příliš vysokých koncentrací těchto analytů. K přípravě vzorku bylo použito 50 μ l vzorku a 50 μ l buněčného média, které byly smíchány a následně zpracovány dle výše uvedeného postupu.

7.5 LC-MS PODMÍNKY A JEJICH OPTIMALIZACE

Analytická metoda využívající LC-MS byla vyvíjena na základě již zavedené metody, která byla určena k analýze MID a jeho metabolitů 1OHMID a 4OHMID.³ Z toho důvodu byla pro analýzu zvolena kolona Luna® Phenyl-Hexyl (3 µm, 100×3 mm, Phenomenex), která se již dříve pro tento typ analytů osvědčila.

7.5.1 Typ MF

MF byly testovány s ohledem na ionizaci a retenční chování analytů. Hodnoceny byly odezvy analytů, retenční časy, tvary píků a separace analytů.

U MF A byla testována možnost použití tlumivých roztoků s FA, AA či AA s pH upraveným pomocí amoniaku. Dále byly zkoušeny různé koncentrace AA (0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% a 0,4%).

U MF B byla testována možnost výběru MeOH či ACN. Posléze byla testována vhodnost přidavku AA do MF B (vždy ve stejné koncentraci AA jako v MF A).

7.5.2 Gradient, teplota kolony a průtok MF

Výchozí gradient pro vyvíjenou analytickou metodu byl převzat viz tabulka 9.³ Gradient byl dále optimalizován tak, aby bylo docíleno lepší separace analytů za současného zkrácení celkové doby analýzy. Optimalizovaný gradient je uveden v tabulce 10.

Tabulka 9 Program gradientu výchozí metody.³

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0.00 – 2.50	70 → 63	30 → 37
2.50 – 2.51	63 → 45	37 → 55
2.51 – 5.20	45	55
5.20 – 5.30	45 → 15	55 → 85
5.30 – 7.30	15	85
7.30 – 7.40	15 → 70	85 → 30
7.40 – 10.40	70	30

Tabulka 10 Program gradientu optimalizované metody.

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0.00 – 3.30	65	35
3.30 – 3.40	45 → 65	35 → 55
3.40 – 5.20	45	55
5.20 – 5.30	5 → 45	55 → 95
5.30 – 7.00	5	95
7.00 – 7.10	65 → 5	95 → 35
7.10 – 8.50	65	35

Vliv teploty na separaci byl testován při 25, 35, 40 a 45 °C. Teplota byla optimalizována tak, aby analýza měla co nejkratší čas a aby byla zachována separace analytů. Stejným způsobem byl optimalizován průtok MF. Ten byl testován při hodnotách 0,4 ml/min a 0,6 ml/min.

7.5.3 Objem nástřiku

Testovány byly následující objemy nástřiku: 1 µl, 5 µl a 10 µl. Konečný objem nástřiku byl zvolen podle opakovatelnosti, odezvy analytů a tvaru píků analytů. Na závěr byl pro další optimalizaci metody zvolen nástřik 5 µl.

7.5.4 Rozhraní LC-MS

Při optimalizaci metody se hledalo nejvhodnější nastavení pro následující parametry:

- Úhel ESI – (úhel, který svírá výstup z ESI se vstupem do desolvatační linie) Byly zkoušeny hodnoty -2°, 0° a 2°.
- Průtok zmlžujícího plynu (Nebulizing gas flow) – Zkoušen byl průtok 2 l/min, 2,5 l/min a 2,9 l/min.
- Průtok sušícího plynu (Drying gas flow) – Zkoušen byl průtok 10 l/min, 15 l/min, 18 l/min a 20 l/min.
- Teplota desolvatační linie (Desolvation Line temperature) – Byla zkoušena teplota 200 °C, 250 °C a 300 °C.
- Teplota tepelného bloku (Heat block temperature) – Zkoušena teplota 350 °C, 400 °C a 450 °C.

7.6 OPTIMALIZOVANÁ LC-MS METODA

Finální vyvinutá metoda, která byla použita k analýze reálných vzorků využívala kolonu Luna® Phenyl-Hexyl s předkolonou ColumnGuard C18. Separace byla provedena pomocí gradientu (tabulka 10) MF A složené z 0,05% AA (v/v) a MF B z 0,05% AA v ACN (v/v). Teplota kolony byla udržována na 35 °C a průtok MF byl 0,4 ml/min. Na kolonu bylo nastříkováno 5 µl vzorku. Jako IS pro BUP a OH-BUP byl zvolen KARB v koncentraci 1 µM, pro MID, 1OH-MID a 4OH-MID byl vybrán OXAZ v koncentraci 2 µM a pro DCF a 4OH-DCF byl zvolen KETOP v koncentraci 10 µM. Rozhraní LC a MS bylo nastaveno následovně: průtok zmlžujícího plynu 2,9 l/min, průtok sušícího plynu 20 l/min, teplota desolvatační linie 200 °C, teplota tepelného bloku 450 °C a úhel ESI 0°. Způsob ionizace, kolizní energie a MRM přechody jsou zaznamenány v tabulce 12.

7.7 KVANTIFIKACE ANALYTŮ A KALIBRACE

Kalibrátory, QC vzorky a reálné vzorky byly vždy nastříkovány v triplicátu. Kvantifikovány byly pomocí metody vnitřního standardu s použitím kalibračních křivek.

Kalibrační křivky byly konstruovány v závislosti na kalibračním rozsahu konkrétního analytu, viz tabulka 11.

Tabulka 11 Rozsah kalibrace a počet kalibrátorů.

Analyt	Rozsah kalibrace [µM]	Počet kalibrátorů
BUP	0,05 – 20	12
OH-BUP	0,025 – 12	11
MID	0,05 – 12	10
1OH-MID	0,025 – 12	11
4OH-MID	0,05 – 12	10
DCF	0,05 – 12	10
4OH-DCF	0,025 – 12	11

Současně s kalibrátory byl vždy měřen i blank media a nulový kalibrátor. Kalibrační křivky byly konstruovány v programu GrapPad-Prism. Jako matematické modely pro závislost odezvy systému na koncentraci analytů byly používány polynomy prvního řádu (přímka). V případě DCF bylo pro kalibraci nutné použít polynom druhého řádu, jehož funkcí je kvadratická rovnice. Vzhledem k širokému rozsahu kalibračních křivek bylo při jejich tvorbě používáno vážení hodnot jako $1/X$, nebo $1/X^2$. Kritéria pro hodnocení výběru správného matematického modelu popisující kalibrační křivku byla:

- **Dopočítaná odchylka kalibrátoru od nominální koncentrace.** Dle doporučení FDA bylo hlavním kritériem přijatelnosti modelu kalibrační křivky vyhodnocení velikosti odchylky zpětně dopočítané koncentrace kalibrátoru vůči jeho nominální koncentraci. Kritériem přijatelnosti byla velikost odchylky, kdy na LLOQ nesmí odchylka přesáhnout 20 % nominální koncentrace, a u ostatních kalibrátorů 15 %.
- **Distribuce reziduí kalibrační křivky.** Byla hodnocena distribuce reziduí kalibrační křivky. Reziduum je definované jako vzdálenost hodnoty kalibrátoru od regresní křivky. Pokud by rezidua nebyly normálně rozdělené (Gaussovo rozdělení), je pravděpodobné, že k regresi nebyl použit správný regresní model.³⁹ Pro tento účel byly používány statistické testy D'Agostino-Pearsonův omnibus, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk a Kolmogorov-Smirnov. Akceptovány byly ty kalibrační křivky, které splňovaly alespoň dva z nich.
- **Hodnota R^2 .** Pokud bylo přijatelných více variant kalibračních křivek a ve zbývajících kritériích přijatelnosti byly obdobné, byly preferovány kalibrační křivky s vyšší hodnotou R^2 .

7.8 VALIDACE METODY

Validace byla prováděna dle doporučení FDA¹⁹. Vzhledem k použití metody pro výzkumné účely byla vyvinutá analytická metoda validována částečně, a to z hlediska těchto kritických parametrů:

- **Kalibrační křivka** – Akceptační kritérium pro kalibrační křivky stanovuje, že: během kalibrace má být analyzován i blank a nulový kalibrátor, má být kalibrováno za pomoci nejméně šesti koncentračních úrovní, matrice vzorků a kalibrátoru musí být shodná a maximální přípustná odchylka zpětně přepočítaných koncentrací kalibrátorů od nominální koncentrace je nanejvýše 15 % (na hladině LLOQ až 20 %).¹⁹
- **QC** – Hladiny (LLOQ, nízká, střední, vysoká) koncentrací QC vzorků byly zvoleny podle tabulky 8. Všechny úrovně QC byly připraveny v 5 replikátech. Akceptační kritérium pro QC je nastavené tak, že alespoň 67 % všech a nejméně 50 % výsledků z jedné hladiny QC musí vykazovat odchylku od nominální koncentrace menší než 15 %, u LLOQ menší než 20 %.¹⁹
- **Selektivita** – Aby byla metoda akceptovatelná, neměly by se v blankách media vyskytovat interference z matrice větší než 20 % LLOQ.¹⁹
- **Carry-over** – Po nástřiku kalibrátoru pro nejvyšší úroveň koncentrace analytu (pro všechny analyty 12 μM , pro BUP 20 μM) byl následně nastříknut blank média. Akceptační kritérium pro carry-over je, že po předchozí analýze nesmí mít v blanku média pík analytu AUC vyšší než 20 % LLOQ.¹⁹
- **Sensitivita** – Jako LLOQ byl stanoven kalibrátor, jež vykazoval akceptovatelnou přesnost a správnost na nejnižší koncentrační hladině.¹⁹
- **Přesnost a správnost** – Jsou vypočteny z naměřených koncentrací replikátů QC vzorků. Správnost metody je akceptovatelná, pokud maximální odchylka mezi naměřenou a nominální koncentrací nepřesahuje 15 % (na hladině LLOQ až 20 %). Metoda je akceptovatelně přesná, pokud RSD nepřesahuje 15 % pro všechny hladiny krom LLOQ, kde je akceptovatelná hodnota RSD až 20 %.¹⁹

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Vývoj nové analytické metody navazoval na již zavedenou metodu.³ Ta byla určena ke stanovení aktivity CYP450 3A4 pomocí kvantifikace MID a jeho metabolitů 1OH-MID a 4OH-MID.³ Cílem diplomové práce bylo analytickou metodu upravit a optimalizovat tak, aby bylo možno měřit jak MID a jeho metabolity, tak i BUP a DCF s jejich metabolity OH-BUP a 4OH-DCF, a tak umožnit stanovení aktivity CYP450 izoformem 3A4, 2B6 a 2C9. Z rešerše (kapitola 5.5 *Stanovení aktivity cytochromu P450*) vyplývá, že pro analýzu těchto analytů pomocí LC-MS/MS je zavedeno několik metod, které jsou si navzájem podobné zejména ve volbě MF tvořené FA a ACN a použití SF na bázi modifikovaného C18 silikagelu.^{28,36–38} Jako IS byly nejčastěji používány izotopicky značené analogy analytů a KARB, který byl následně při vývoji metody použit jako IS pro BUP a OH-BUP. Na základě rešerše a výchozí metody byla nejprve vyzkoušena MF s MF A tvořenou 0,1% FA (v/v) a MF B tvořenou ACN.

Nejprve bylo nutné nové analyty tzv. naladit, tedy nalézt takové parametry pro MS, které budou poskytovat signál analytů. Laděnými parametry MS byly m/z prekurzorů, m/z fragmentů, kolizní energie pro tvorbu fragmentů a pre-rod bias kvadrupólů v MS. Během tohoto kroku bylo zjištěno, že použití FA v MF není vhodné. Z tohoto důvodu byla pro další optimalizaci používána MF s obsahem AA.

Po nalezení parametrů MS, které poskytovaly odezvu analytů byla provedena optimalizace LC a LC-MS rozhraní. Pro separaci byla zvolena kolona,³ Luna® Phenyl-Hexyl. Optimalizováno bylo procentuální zastoupení AA v MF A a v MF B, možnost nahrazení ACN za MeOH, průtok MF, teplota kolonového prostoru, objem nástřiku vzorku a program gradientu MF. Testování těchto parametrů je popsáno v kapitole 7.5 *LC-MS podmínky a jejich optimalizace*.

Metodika přípravy kalibrátorů, QC vzorků a reálných vzorků byla převzata z výchozí metody a je podrobněji vysvětlená v kapitole 7.4 *Příprava roztoků standardů a vzorků*.³ Po optimalizaci podmínek pro LC a MS proběhla kalibrace, částečná validace metody a následně také ověření metody na sérii šestnácti reálných vzorků.

8.1 OPTIMALIZACE LC A MS PODMÍNEK

Cílem optimalizace LC-MS podmínek byla možnost měření v širokém koncentračním rozsahu pro všechny analyty a dosažení separace analytů na základní linii. Důraz byl kladen také na zachování co nejkratšího celkového času analýzy.

8.1.1 LC

Stacionární fáze

Stejně jako ve výchozí metodě byla pro analýzu vybrána kolona Luna Phenyl-Hexyl, jelikož v kombinaci s MF tvořenou AA a ACN poskytovala optimální separační podmínky.

Byl testován vliv teploty na separaci při 25, 35, 40 a 45 °C. Teplota kolony ve výchozí metodě byla nastavena na 25 °C. Změna na 35 °C přinesla mírné zlepšení separace mezi píky BUP a OH-BUP, prodloužení retenčních časů pro MID, 1OH-MID a 4OH-MID a současně zkrácení retenčních časů pro 4OH-DCF a DCF.

Mobilní fáze

Výchozí MF byla složena z MF A tvořené 0,1% FA (v/v) a MF B tvořenou ACN. Kritickým parametrem pro výběr MF byla ionizace 4OH-DCF, který vykazoval slabou odezvu v MS. Při použití MF založené na FA 4OH-DCF neionizoval a nebylo možné jej detekovat. Z tohoto důvodu se dále metoda vyvíjela pouze s MF obsahující AA.

Dále byl testován vliv koncentrace AA v MF A a v MF B s: 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % a 0,4 % AA. Z naměřených dat vyplývalo, že ionizaci 4OH-DCF nejvíce podporuje MF s 0,4% AA, ale z důvodu nevyhovujících kalibrací pro všechny analyty nebyla dále MF s 0,4% AA používána. Druhá MF, která podporovala ionizaci 4OH-DCF, byla MF s 0,05 % AA, a proto byla zvolena jako základ MF pro další optimalizaci.

Byla testována použitelnost MeOH a ACN jako typ MF B. MF s MeOH potlačovala ionizaci 4OH-DCF, kdežto MF s ACN nikoliv. Z toho důvodu byly dále používány MF B s ACN.

Testován byl i vliv obsahu AA v MF B. Z naměřených dat plynulo, že její přítomnost zvyšuje ionizaci 4OH-DCF přibližně o 15 %. Nakonec bylo vybráno toto optimalizované složení MF: MF A 0,05 % AA (v/v) a MF B ACN s 0,05 % AA (v/v).

Průtok MF

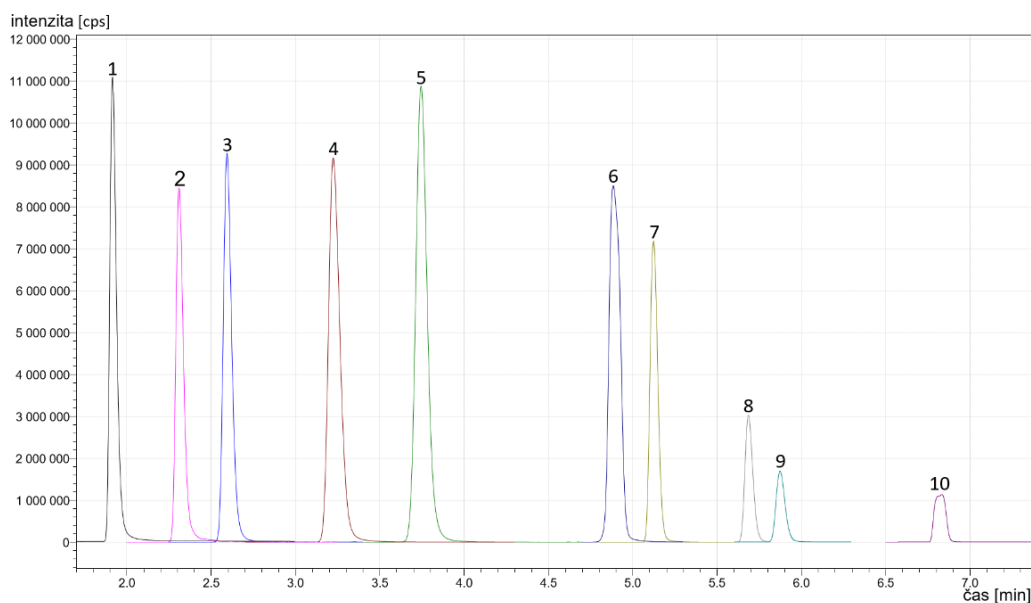
Na základě výchozí metody byl průtok zvolen na 0,4 ml/min. Bylo testováno zvýšení průtoku 0,6 ml/min, které umožnilo zkrácení analýzy, ale způsobilo snížení separační účinnosti. Zároveň došlo ke zkrácení retenčního času OH-BUP pod 1,8 min, které je nežádoucí z důvodu možné koeluce s balasty z matrice. Z toho důvodu byl nadále ponechán průtok 0,4 ml/min.

Nastřikovaný objem vzorku

Výchozí objem nástřiku vzorku byl 5 μ l, který se prokázal jako nejvhodnější i pro vyvíjenou metodu. V rámci optimalizace metody byly zkoušeny i nástřiky 1 μ l a 10 μ l, nicméně 1 μ l nástřiky neumožňovaly dostatečnou citlivost pro stanovení metabolitů a 10 μ l nástřiky neposkytovali akceptovatelnou opakovatelnost.

Gradient MF

Výchozí gradient (tabulka 9) byl převzat z původní metody.³ Během vývoje optimalizované metody byl upraven tak, aby byly všechny analyty separované na základní linii. Upravený gradient je uveden v tabulce 10 s ukázkovým chromatogramem na Obr. 15. Celkový čas analýzy s použitím optimalizovaných podmínek se zkrátil z původních 10,4 minuty na 8,5 minuty.³



Obrázek 15 Chromatogram všech analytů a IS měřeno s optimalizovanými podmínkami metody (koncentrace kalibrační úrovně L7 5 μ M). OH-BUP (**1**, t_r 1,9 min), BUP (**2**, t_r 2,3 min), 4OH-MID (**3**, t_r 2,6 min), MID (**4**, t_r 3,3 min), 1OH-MID (**5**, t_r 3,7 min), KARB (**6**, t_r 4,9 min), OXAZ (**7**, t_r 5,1 min), 4OH-DCF (**8**, t_r 5,7 min), KETOP (**9**, t_r 5,9 min), DCF (**10**, t_r 6,8 min).

8.1.2 MS

Ladění parametrů MS

Parametry pro MRM přechody MID, 1OH-MID a 4OH-MID bylo možné převzít z výchozí metody.³ Výsledky ladění pro analyty jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12 Shrnuté MS parametry metody

	ESI mód	Prekurzor	Fragment 1	CE 1	Fragment 2	CE 2
BUP	pozitiv	240,25	184,00	-20,0	131,00	-40,0
OH-BUP	pozitiv	256,25	238,05	-22,5	139,00	-27,0
MID	pozitiv	326,30	291,10	-29,0	222,10	-50,0
1OH-MID	pozitiv	342,30	324,05	-21,0	168,05	-42,0
4OH-MID	pozitiv	342,30	325,00	-23,0	109,00	-30,0
DCF	negativ	295,65	252,20	12,0	-	-
4OH-DCF	pozitiv	313,65	231,95	-30,0	230,10	-34,0
KARB	pozitiv	237,00	194,00	-20,0	192,00	-24,0
OXAZ	pozitiv	287,20	241,00	-25,0	269,00	-16,0
KETOP	negativ	252,95	209,15	8,0	-	-

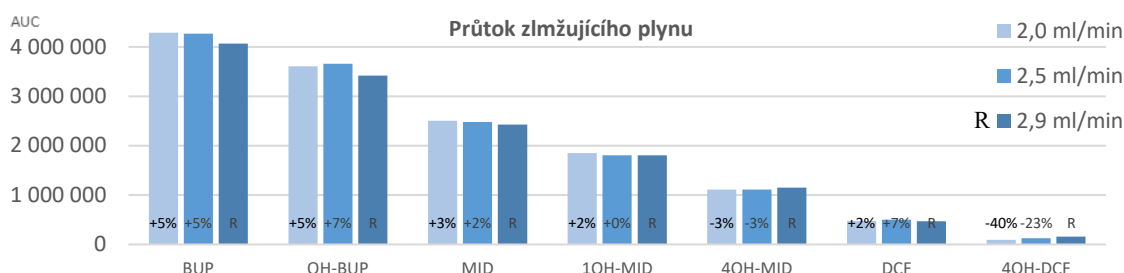
Naměřené fragmenty analytů byly porovnávány s hmotnostními spektry nalezenými v knihovných spekter a hmotnostními spektry v literatuře. Byly nalezeny tyto shody u přechodů pro: BUP z 240 → 184²⁸, pro OH-BUP z 256 → 139^{28,36} a 238³⁷, pro MID z 326 → 291²⁸, pro 1OH-MID z 342 → 324³⁷, a pro 4OH-DCF z 313 → 231³⁶.

Rozhraní LC a MS

Výchozí parametry rozhraní LC a MS byly zvoleny na základě již zavedené metody pro analýzu MID a jeho metabolitů.

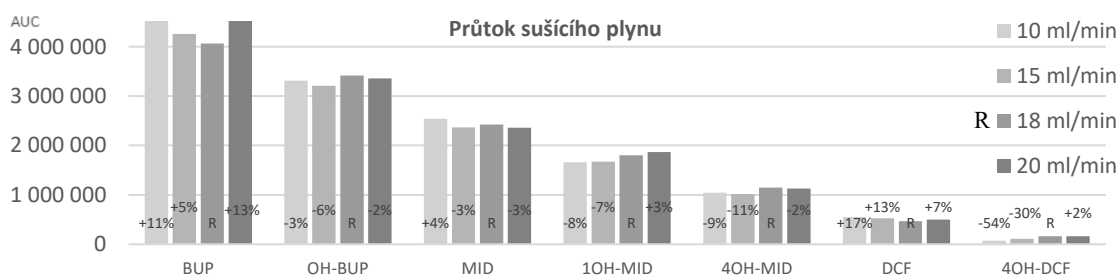
Vzhledem k nízké odezvě DCF a zejména 4OH-DCF bylo rozhraní LC a MS optimalizováno s ohledem na co největší zesílení jejich signálu. Souhrn nejvhodnějších parametrů pro rozhraní LC a MS je uveden v kapitole 7.6 *Optimalizovaná LC-MS metoda*, naměřené hodnoty jsou uvedeny v grafech 2 – 6.

Graf 2 Závislost AUC analytů na průtoku zmlžujícího plynu.



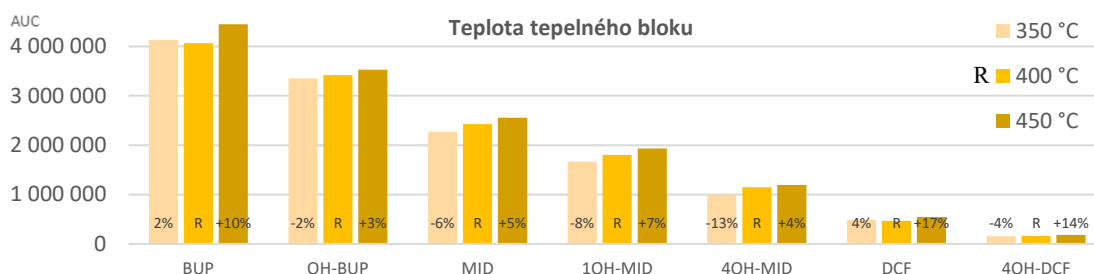
V grafu jsou znázorněny průměrné AUC. Měření bylo provedeno v triplicátu. Referenční hodnoty (převzaté z výchozí metody) jsou označeny jako R.

Graf 3 Závislost AUC analytů na průtoku sušícího plynu



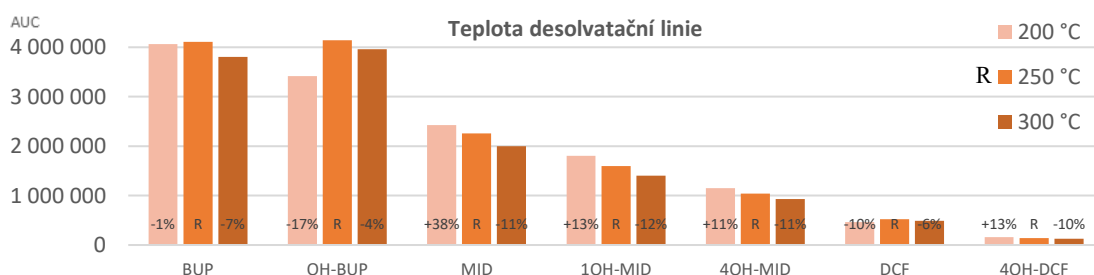
V grafu jsou znázorněny průměrné AUC. Měření bylo provedeno v triplicátu. Referenční hodnoty (převzaté z výchozí metody) jsou označeny jako R.

Graf 4 Závislost AUC analytů na teplotě tepelného bloku



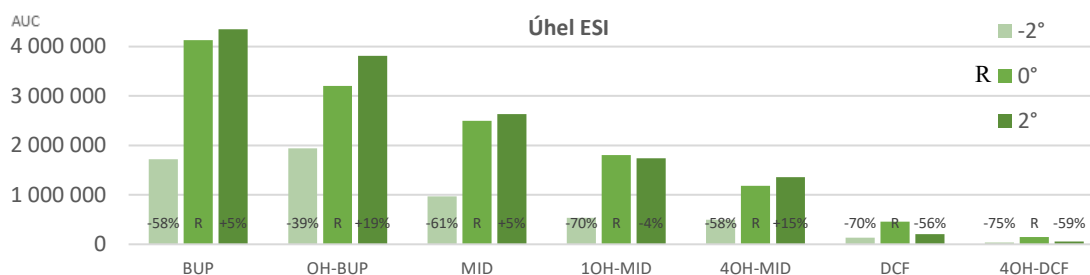
V grafu jsou znázorněny průměrné AUC. Měření bylo provedeno v triplicátu. Referenční hodnoty (převzaté z výchozí metody) jsou označeny jako R.

Graf 5 Závislost AUC analytů na teplotě desolvatační linie



V grafu jsou znázorněny průměrné AUC. Měření bylo provedeno v triplicátu. Referenční hodnoty (převzaté z výchozí metody) jsou označeny jako R.

Graf 6 Závislost AUC analytů na úhlu ESI vůči vstupu do MS



V grafu jsou znázorněny průměrné AUC. Měření bylo provedeno v triplikátu. Referenční hodnoty (převzaté z výchozí metody) jsou označeny jako R.

8.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Proces přípravy vzorků vycházel z výchozí metody a principiálně nebyl měněn.³ Z důvodu analýzy více látek současně byly do směsi ACN s IS přidány další 2 IS. Vybrané byly tak, aby měla každá skupina látek ve vzorku IS, který je jí strukturně podobný. Pro BUP a OH-BUP byl na základě rešerše jako IS zvolen KARB.³⁷ Pro DCF a 4OH-DCF byla jako IS nejprve zkoušena kyselina flufenamová, nicméně kvůli jejímu carry-overu byla nahrazena KETOP. Na rozdíl od výchozí metody bylo nutné vzorky zpracovávat pro analýzu v jak neředěné, tak i ředěné podobě. Ředění vzorků bylo zavedeno kvůli překročení horního limitu kvantifikace u analytů BUP a DCF. Kalibrátory a QC vzorky byly připravovány totožným způsobem jako v případě výchozí metody, jen s rozdílem přítomnosti více analytů v zásobních roztocích.

8.3 KALIBRACE

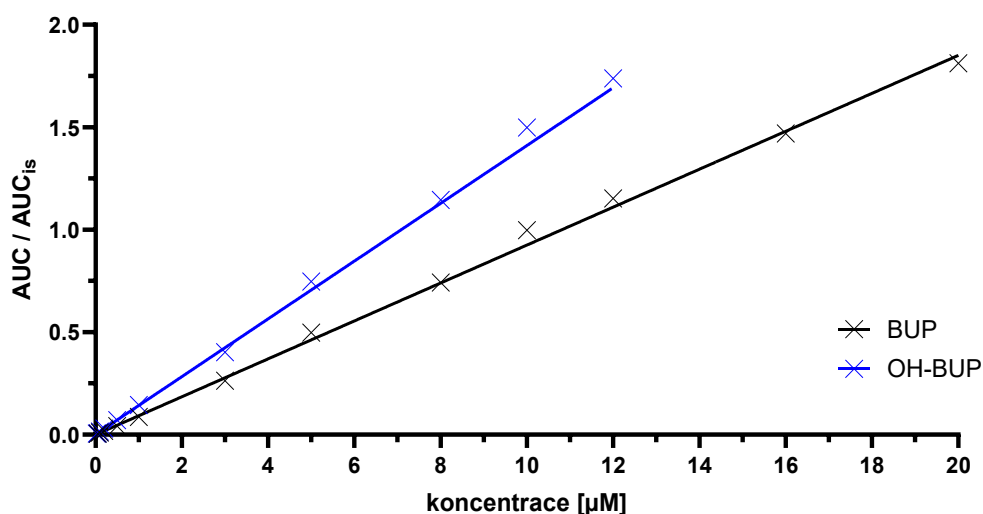
Z naměřených AUC analytů v kalibračních roztocích byly sestrojeny kalibrační křivky pro příslušné analyty. Jejich rovnice, rozsah a hodnota R^2 jsou uvedeny v tabulce 13. Kalibrační křivky jsou graficky zobrazené na grafech 7 – 9 včetně jejich reziduí na grafu 10.

Tabulka 13 Parametry kalibračních křivek.

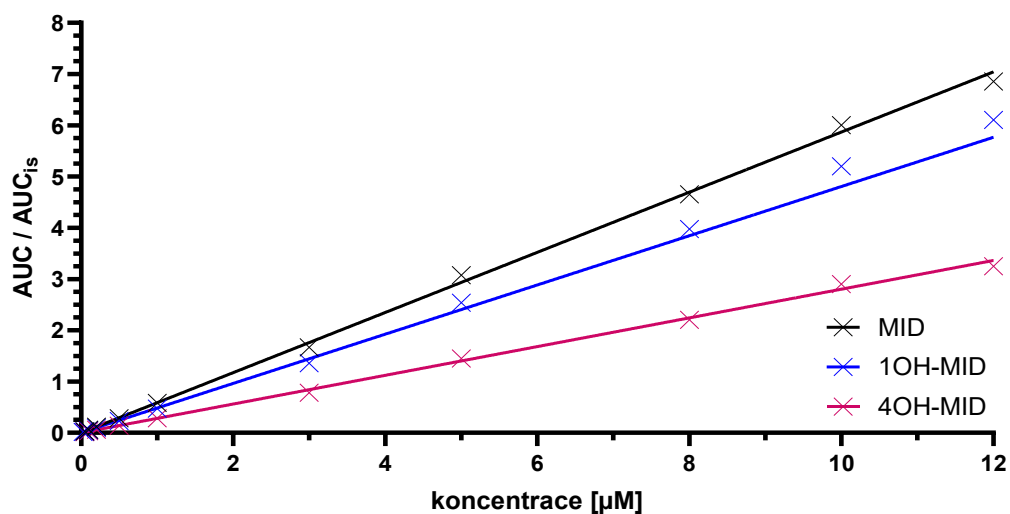
Analyt	Rovnice kalibrační křivky	R^2	Rozsah kalibrace [μM]
BUP	$y = -0,00045 + 0,1015 \cdot x$	0,9958	0,05 – 20
OH-BUP	$y = 0,000892 + 0,1200 \cdot x$	0,9935	0,025 – 12
MID	$y = 0,001651 + 0,4542 \cdot x$	0,9982	0,05 – 12
1OH-MID	$y = 0,000817 + 0,4549 \cdot x$	0,9950	0,025 – 12
4OH-MID	$y = 0,001535 + 0,2446 \cdot x$	0,9978	0,05 – 12
DCF	$y = 0,005141 + 0,1934 \cdot x + (-0,00549) \cdot x^2$	0,9994	0,05 – 12
4OH-DCF	$y = -0,00058 + 0,1610 \cdot x$	0,9980	0,025 – 12

Modely kalibračních křivek byly podle doporučení FDA sestavovány tak, aby byly vyjádřeny co nejjednodušším modelem.¹⁹ Pro DCF nebylo možné použít lineární matematickou funkci přímky s rovnicí $y = ax + b$, jako u ostatních analytů. Z toho důvodu bylo pro DCF zvolen model polynomu druhého řádu (kvadratická rovnice mající tvar $y = ax + b + c \cdot x^2$).

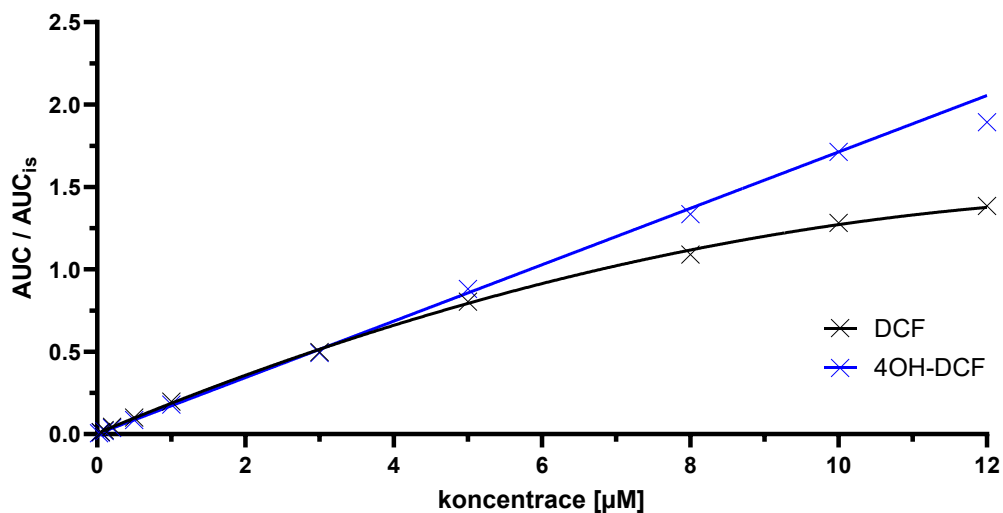
Graf 7 Kalibrační křivka BUP a OH-BUP



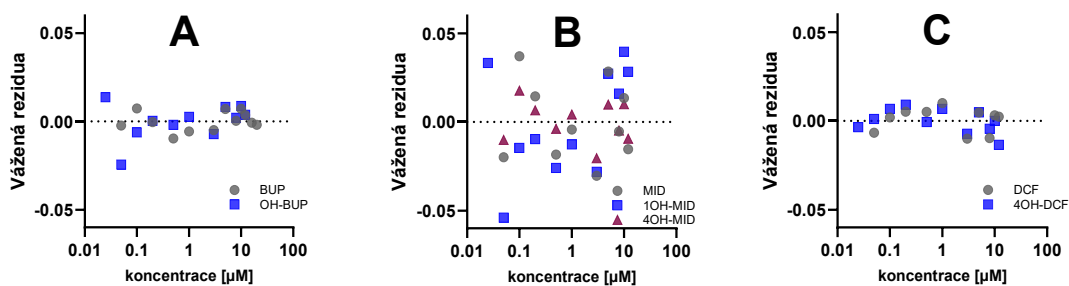
Graf 8 Kalibrační křivka MID, 1OH-MID a 4OH-MID



Graf 9 Kalibrační křivka DCF a 4OH-DCF



Graf 10 Rezidua kalibrátorů.



Grafy distribuce vážených reziduí lze použít pro hodnocení vhodnosti výběru regresního modelu.³⁹ Z grafů 10, A – C je patrné normální rozdělení vážených reziduí. Z toho lze usoudit, že vybrané regresní modely odpovídají funkci závislosti AUC/AUC_{IS} na koncentraci analytů.

8.4 VALIDACE METODY

Analytická metoda byla částečně validována na základě doporučení FDA.¹⁹ Validovány byly tyto parametry: kalibrační křivky, QC, selektivita metody, carry-over a přesnost a správnost.

Validace metody nebyla pro 4OH-MID provedena z důvodu naměření koncentrací nižších než LLOQ ve všech vzorcích. Nejvyšší naměřená koncentrace 4OH-MID byla interpolací kalibrační křivky odhadnuta na 0,04 μM .

Kalibrační křivky

Kalibrační křivky byly konstruovány na základě doporučení od FDA. Při zpětném přepočtu koncentrací všechny kalibrátory splňují akceptační kritéria, tedy všechny zpětně vypočítané koncentrace jsou od nominálních koncentrací odchýleny do 15 % a na LLOQ do 20 %.¹⁹ Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 16 – 18 v příloze diplomové práce.

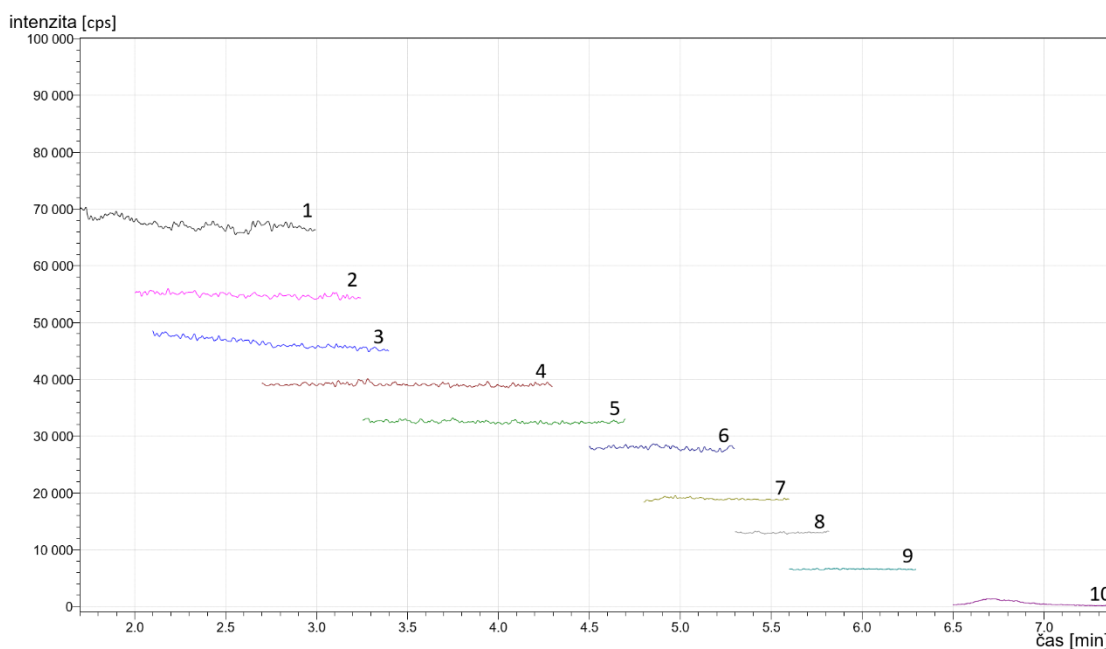
Kontrola kvality

QC vzorky splňovaly akceptační kritéria FDA, tedy alespoň 67 % všech a nejméně 50 % výsledků z jedné hladiny QC je od nominální koncentrace odchýleno maximálně o 15 % (na LLOQ maximálně o 20 %).¹⁹ Naměřená data jsou uvedena v tabulkách 19 – 21 v příloze této diplomové práce.

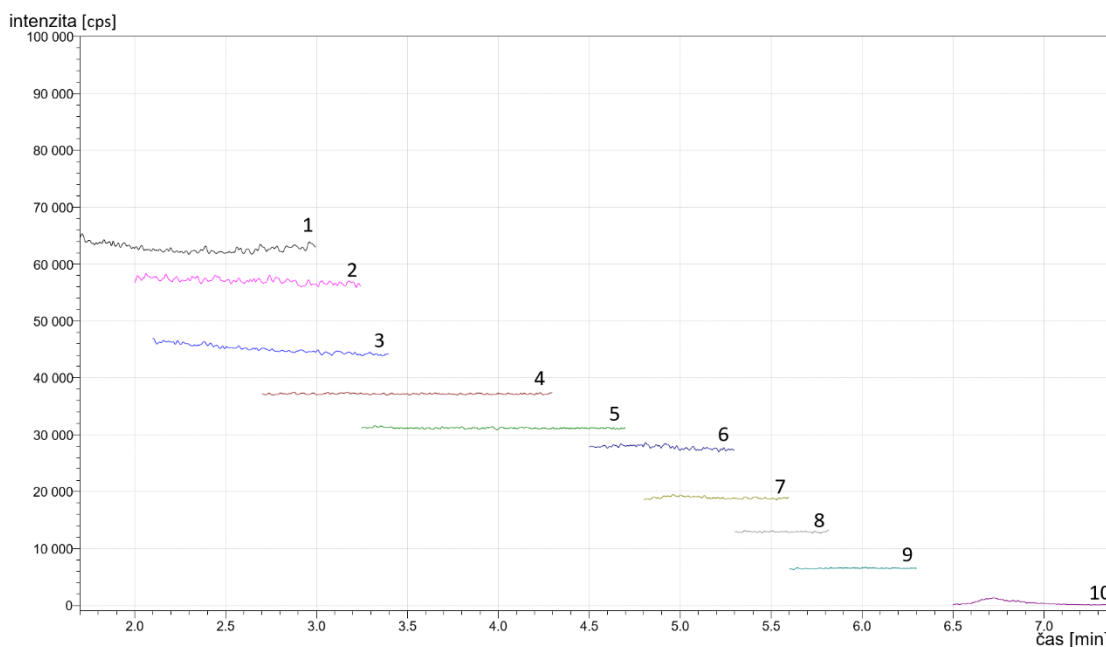
Selektivita a Carry-over

Analýza naměřených chromatogramů neprokázala přítomnost interferujících látek v časech eluce analytů.

Carry-over byl ověřen nástřikem kalibrátorů s nejvyšší hladinou analytů (L12 pro BUP a L10 pro ostatní analyty) a následným nástřikem blanku media. Výsledné chromatogramy blanků media jsou na Obr. 16 a 17, kdy je zřetelné, že ke carry-overu nedochází.



Obrázek 16 Chromatogram blanku media po předchozí analýze kalibrátoru L10 (koncentrace analytů 12 μM). Na chromatogramu jsou uvedeny záznamy odpovídající MRM přechodům analytů OH-BUP (1), BUP (2), 4OH-MID (3), MID (4), 1OH-MID(5), KARB (6), OXAZ (7), 4OH-DCF (8), KETOP (9), DCF (10).



Obrázek 17 Chromatogram blanku media po předchozí analýze kalibrátoru L12 (koncentrace BUP 20 μM). Na chromatogramu jsou uvedeny záznamy odpovídající MRM přechodům analytů OH-BUP (1), BUP (2), 4OH-MID (3), MID (4), 1OH-MID(5), KARB (6), OXAZ (7), 4OH-DCF (8), KETOP (9), DCF (10).

Sensitivita

Jako LLOQ byla pro analyty OH-BUP, 1OH-MID a 4OH-DCF testována i koncentrační hladina 0,01 μM , avšak signál analytů při této koncentraci nebyl dostatečně přesný. Z toho důvodu byl pro OH-BUP, 1OH-MID a 4OH-DCF LLOQ stanoven na koncentraci 0,025 μM . Pro BUP, MID, 4OH-MID a DCF byl LLOQ stanoven na koncentraci 0,05 μM .

Přesnost a správnost

Metoda dosahovala přesnosti a správnosti, jež je dle akceptačních kritérií FDA přijatelná. Přesnost je vyjádřena v procentech jako velikost RSD. Správnost je vyjádřena jako procentuální odchylka naměřená od nominální koncentrace. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 14. Naměřené koncentrace replikátů jsou uvedeny v tabulkách 19-21.

Tabulka 14 Přesnost a správnost metody.

Analyt	Úroveň QC	Koncentrační hladina [μM]	Správnost [%]	RSD [%]
BUP	QC 1	0,05	1	9
	QC 2	0,2	0	9
	QC 3	10	-3	11
	QC 4	20	-7	3
OH-BUP	QC 1	0,05	-5	5
	QC 2	0,1	8	4
	QC 3	5	-3	5
	QC 4	10	-9	3
MID	QC 1	0,05	2	3
	QC 2	0,2	3	1
	QC 3	5	-13	1
	QC 4	10	-15	1
1OH-MID	QC 1	0,025	-16	1
	QC 2	0,1	-4	3
	QC 3	5	-14	1
	QC 4	10	-5	14
DCF	QC 1	0,05	13	3
	QC 2	0,2	14	1
	QC 3	5	14	1
	QC 4	10	1	3
4OH-DCF	QC 1	0,025	12	0
	QC 2	0,1	14	1
	QC 3	5	14	3
	QC 4	10	8	5

Pozn.: QC vzorky byly na kolonu nastříknuty třikrát (počítáno s průměrnou hodnotou) po pěti replikátech na jednu koncentrační hladinu.

Analytická metoda byla částečně validována dle doporučení FDA. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že nově zavedená metoda splňuje akceptační kritéria.

8.5 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ

Vyvinutá metoda a její použitelnost byla ověřena analýzou reálných vzorků z experimentu na *in vitro* modelu primárních lidských hepatocytů ve 3D uspořádání, na kterých byl testován vliv rifampicinu. Tyto vzorky byly poskytnuty Katedrou farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Ve vzorcích byla stanovena aktivita CYP450 3A4, 2B6 a 2C9 za pomoci kvantifikace BUP, OH-BUP, MID, 1OH-MID, 4OH-MID, DCF a 4OH-DCF. Celkem bylo analyzováno 16 vzorků.

Chromatogram reálného vzorku č. 8 a jeho přibližná část je na Obr. 18 a 19. Na prvním chromatogramu je patrná vysoká koncentrace parentních látek, zejména pak BUP.

Studie byla navržena tak, že každý vzorek byl připraven v duplikátu. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 22 kdy jsou duplicitní vzorky pro snazší porovnání uvedeny vedle sebe. Zprůměrované koncentrace duplikovaných vzorků jsou uvedeny v tabulce 15.

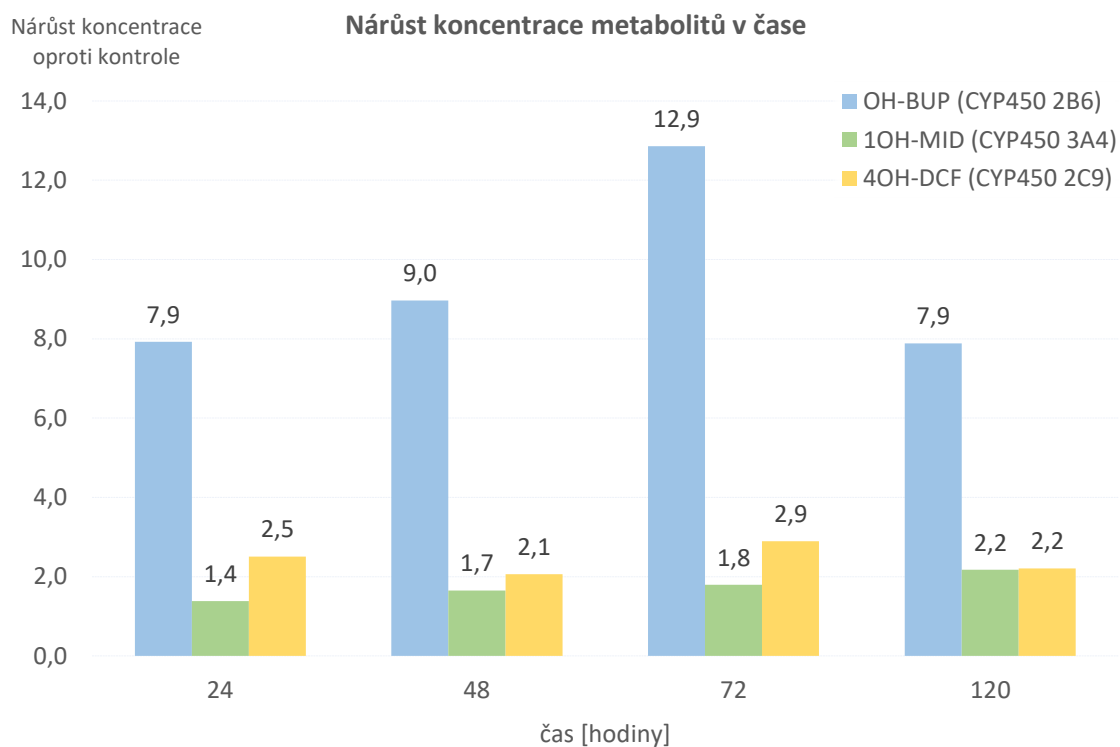
Tabulka 15 Zprůměrované naměřené koncentrace analytů ve vzorcích.

Vzorek	BUP [μ M]	OH-BUP [μ M]	MID [μ M]	1OH-MID [μ M]	4OH-MID [μ M]	DCF [μ M]	4OH-DCF [μ M]
24 h DMSO	26,85	0,007	5,97	0,190	0,023	9,26	0,036
48 h DMSO	28,70	0,010	6,79	0,210	0,025	10,60	0,045
72 h DMSO	33,15	0,007	7,85	0,176	0,024	12,71	0,030
120 h DMSO	25,94	0,006	5,90	0,091	0,011	9,14	0,058
24 h Rifampicin 10 μ M	28,16	0,054	6,47	0,264	0,027	10,58	0,090
48 h Rifampicin 10 μ M	29,58	0,094	7,33	0,347	0,024	11,26	0,093
72 h Rifampicin 10 μ M	31,61	0,096	7,37	0,316	0,024	10,74	0,086
120 h Rifampicin 10 μ M	28,15	0,050	6,35	0,198	0,018	9,50	0,128

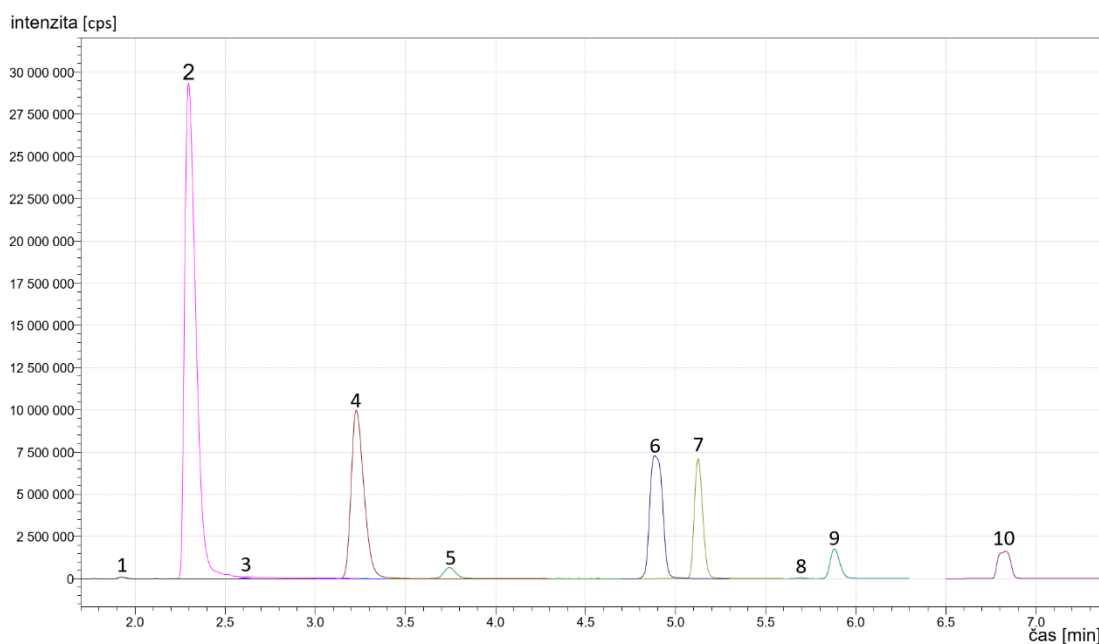
Pozn.: Červeně označené hodnoty jsou pod úrovní LLOQ.

Byly vypočítány změny koncentrace analytů ve vzorcích (ovlivněných rifampicinem) vůči příslušné kontrole (pouze s DMSO) během různé doby působení rifampicinu (24, 48, 72 a 120 hodin). Výsledné změny v koncentracích metabolitů jsou uvedeny v grafu 11. Změna koncentrací všech tří parentních látek (BUP, MID a DCF) zůstala napříč časem bez výrazných změn a pohybovala se v rozmezí 0,8 – 1,1 násobném nárůstu. 4OH-MID se vyskytoval ve všech vzorcích v koncentracích pod LLOQ a z toho důvodu není dále diskutován.

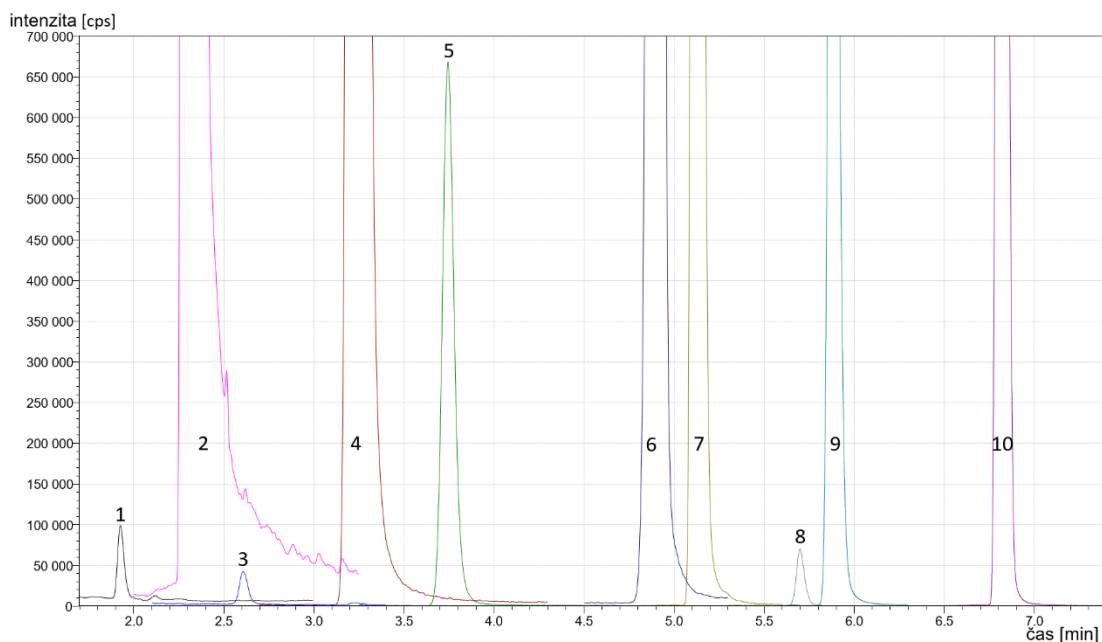
Graf 11 Nárůst koncentrace metabolitů ve srovnání s kontrolními vzorky.



Z grafu 11 vyplývá, že CYP450 2B6 (metabolit OH-BUP) a 2C9 (metabolit 4OH-DCF) v *in vitro* modelech primárních lidských hepatocytů ve 3D uspořádání vykazují nejvyšší aktivitu po 72 hodinách působení rifampicinu. CYP450 3A4 vykazuje nejvyšší nárůst aktivity po 120 hodinách působení rifampicinu.



Obrázek 18 Chromatogram vzorku č. 8 po působení 10 μ M rifampicinu v intervalu 48 hodin, OH-BUP (**1**, t_r 1,9 min), BUP (**2**, t_r 2,3 min), 4OH-MID (**3**, t_r 2,6 min), MID (**4**, t_r 3,3 min), 1OH-MID (**5**, t_r 3,7 min), KARB (**6**, t_r 4,9 min), OXAZ (**7**, t_r 5,1 min), 4OH-DCF (**8**, t_r 5,7 min), KETOP (**9**, t_r 5,9 min), DCF (**10**, t_r 6,8 min).



Obrázek 19 Přibližný chromatogram vzorku č. 8 po působení 10 μ M rifampicinu v intervalu 48 hodin, OH-BUP (**1**, t_r 1,9 min), BUP (**2**, t_r 2,3 min), 4OH-MID (**3**, t_r 2,6 min), MID (**4**, t_r 3,3 min), 1OH-MID (**5**, t_r 3,7 min), KARB (**6**, t_r 4,9 min), OXAZ (**7**, t_r 5,1 min), 4OH-DCF (**8**, t_r 5,7 min), KETOP (**9**, t_r 5,9 min), DCF (**10**, t_r 6,8 min).

9 ZÁVĚR

Všechny cíle diplomové práce byly splněny. Byla vyvinuta analytická metoda využívající LC-MS/MS, která umožňuje spolehlivou kvantifikaci BUP, MID, DCF a jejich metabolitů OH-BUP, 1OH-MID, 4OH-MID a 4OH-DCF. K analýze byla použita kolona Luna® Phenyl-Hexyl s gradientovou elucí MF. MF A byla tvořena 0,05 % AA (v/v) a MF B ACN s 0,05 % AA (v/v). Současná kalibrace metody umožňuje analyty kvantifikovat v rozmezích: BUP 0,05 – 20 μM , MID 0,05 – 12 μM , DCF 0,05 – 12 μM , OH-BUP 0,025 – 12 μM , 1OH-MID 0,025 – 12 μM , 4OH-MID 0,05 – 12 μM a 4OH-DCF 0,025 – 12 μM .

Tato metoda byla částečně validována dle doporučení FDA. Kalibrační křivky a QC splňují akceptační kritéria. Dále byly validovány selektivita metody, carry-over, sensitivita, přesnost a správnost. Všechny validované parametry splnily akceptační kritéria.

Na závěr byla použitelnost metody demonstrována analýzou 16 reálných vzorků z experimentu na buněčných kulturách primárních lidských hepatocytů v 3D uspořádání, na kterých byl zkoumán vliv rifampicinu na aktivitu izoform CYP450 3A4, 2B6 a 2C9. Výsledky měření reálných vzorků, které se stanou součástí připravované publikace v odborném časopise s impakt faktorem, potvrdily, že metoda je užitečným nástrojem pro stanovení aktivit těchto izoform. Do budoucna je plánováno rozšíření analytické metody pro umožnění stanovení aktivity dalších izoform CYP450.

10 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY A DALŠÍCH ZDROJŮ

1. SKÁLOVÁ, Lenka a , kolektiv. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 987-80-246-3733-4.
2. KUZIKOV, A.V.; MASAMREKH, R.A.; ARCHAKOV, A.I. a SHUMYANTSEVA, V.V. Methods for determining of cytochrome P450 isozymes functional activity. Online. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2018, roč. 64, č. 2, s. 149-168. ISSN 2310-6905. Dostupné z: <https://doi.org/10.18097/PBMC20186402149>. [cit. 2024-05-09].
3. PAVEK, Petr; DUSEK, Jan; SMUTNY, Tomas; LOCHMAN, Lukas; KUCERA, Radim et al. Gene Expression Profiling of 1 α ,25(OH) 2 D 3 Treatment in 2D/3D Human Hepatocyte Models Reveals CYP3A4 Induction but Minor Changes in Other Xenobiotic-Metabolizing Genes. Online. *Molecular nutrition and food research*. 2022, roč. 66, č. 9. ISSN 1613-4125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200070>. [cit. 2024-05-09].
4. ROUESSAC, Francis a ROUESSAC, Annick. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. Third edition. Hoboken: Wiley, 2022. ISBN 978-1-119-70133-0.
5. NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal a ČESLA, Petr. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
6. IDEX HEALTH & SCIENCE LLC. *HPLC Help Center*. Online. 2024. Dostupné z: <https://www.idex-hs.com/resources/resources-detail/hplc-center>. [cit. 2024-05-09].
7. PHENOMENEX. *Explore Luna HPLC Columns*. Online. Explore Luna HPLC Columns. 2015. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/documents/2020/09/24/13/39/explore-luna-hplc-columns>. [cit. 2024-05-09].
8. DONG, M. W. *HPLC and UHPLC for practicing scientists*. Second edition. Hoboken: Wiley, 2019. ISBN 978-111-9313-793.
9. ARDREY, R. E. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. Analytical techniques in the sciences. New York: J. Wiley, 2003. ISBN 04-714-9799-1.

10. KROMIDAS, Stavros. *The HPLC-MS Handbook for Practitioners*. Saarbrücken: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2017. ISBN 9783527809202.
11. DASS, Chhabil. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken: Wiley, 2007. ISBN 978-047-1682-295.
12. SHIMADZU CORPORATION. *Interfaces for LC-MS*. Online. Dostupné z: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basics_of_lcms/interfaces_for_lcms.html. [cit. 2024-05-09].
13. AGILENT TECHNOLOGIES, INC. *Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology*. Online. 2009. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-3494en_lo%20CMS.pdf. [cit. 2024-05-09].
14. FRIEDECKÝ, Bedřich a LEMR, Karel. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, roč. 20, č. 3, s. 152-157. ISSN 1210-7921. Dostupné také z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>.
15. GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry a Textbook. Second edition*. Heidelberg: Springer Berlin, 2011. ISBN 978-3-642-10711-5.
16. WATERS CORPORATION. *What Type of Instruments Are Used in Mass Spectrometry?* Online. 2024. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/the-mass-spectrometry-primer/what-types-of-instruments-are-used.html>. [cit. 2024-05-09].
17. NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal a ČESLA, Petr. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.
18. GOSETTI, Fabio; MAZZUCCO, Eleonora; ZAMPIERI, Davide a GENNARO, Maria Carla. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Chromatography A*. 2010, roč. 1217, č. 25, s. 3929-3937. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.060>. [cit. 2024-05-09].
19. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. Online. FDA Guidance Documents. 2018. Dostupné z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. [cit. 2024-05-09].

20. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *ICH M10 on bioanalytical method validation - Scientific guideline*. Online. 2022. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. [cit. 2024-05-09].
21. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Bioanalytical method validation - Scientific guideline*. Online. 2015, 2022. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. [cit. 2024-05-09].
22. *Mezinárodní slovník legální metrologie*. 2. vydání. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010. Dostupné z: <https://www.unmz.cz/metrologie/metrologicky-system/terminologie-v-metrologii/>
23. LEWIS, David F.V. *Guide to Cytochromes P450*. Second edition. Taylor & Francis, 2001. ISBN 0-203-48477.
24. HRYCAY, Eugene G. a BANDIERA, Stelvio M. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. Online. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012, roč. 522, č. 2, s. 71-89. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.003>. [cit. 2024-05-09].
25. ALBERTOLLE, Matthew E. a PETER GUENGERICH, F. The relationships between cytochromes P450 and H₂O₂: Production, reaction, and inhibition. Online. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018, roč. 186, č. 186, s. 228-234. ISSN 01620134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.05.014>. [cit. 2024-05-09].
26. GUENGERICH, F. Peter a MUNRO, Andrew W. Unusual Cytochrome P450 Enzymes and Reactions. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, roč. 288, č. 24, s. 17065-17073. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.462275>. [cit. 2024-05-09].
27. REDLICH, Gorden; ZANGER, Ulrich M.; RIEDMAIER, Stephan; BACHE, Nicolai; GIESSING, Anders B. M. et al. Distinction between human cytochrome P450 (CYP) isoforms and identification of new phosphorylation sites by mass spectrometry. Online. *Journal of Proteome Research*. 2008, roč. 7, č. 11, s. 4678–4688. ISSN 1535-3893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/pr800231w>. [cit. 2024-05-09].

28. GRANGEON, Alexia; GRAVEL, Sophie; GAUDETTE, Fleur; TURGEON, Jacques a MICHAUD, Veronique. Highly sensitive LC–MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human. Online. *Journal of Chromatography B*. 2017, roč. 1040, s. 144-158. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.006>. [cit. 2024-05-09].
29. EVANS, William E. a RELING, Mary V. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. Online. *Science*. 1999, roč. 286, č. 5439, s. 487-491. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.487>. [cit. 2024-05-09].
30. TURPEINEN, Miia a ZANGER, Ulrich M. Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. Online. *Dmdi*. 2012, roč. 27, č. 4, s. 185-197. ISSN 2191-0162. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/dmdi-2012-0027>. [cit. 2024-05-09].
31. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Investigation of drug interactions - Scientific guideline*. Online. 2012, 2015. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/investigation-drug-interactions-scientific-guideline>. [cit. 2024-05-09].
32. JIN, Qiang; MA, Hongying; FENG, Lei; WANG, Ping; HE, Rongjing et al. Sensing cytochrome P450 1A1 activity by a resorufin-based isoform-specific fluorescent probe. Online. *Chinese Chemical Letters*. 2020, roč. 31, č. 11, s. 2945-2949. ISSN 10018417. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2020.05.038>. [cit. 2024-05-09].
33. KIM, Hyun-Ji; LEE, Hyunyoung; JI, Hyeon-Kyeong; LEE, Taeho a LIU, Kwang-Hyeon. Screening of ten cytochrome P450 enzyme activities with 12 probe substrates in human liver microsomes using cocktail incubation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Online. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2019, roč. 40, č. 3-4, s. 101-111. ISSN 0142-2782. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bdd.2174>. [cit. 2024-05-09].
34. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Drug Development and Drug Interactions | Table of Substrates, Inhibitors and Inducers*. Online. 2023. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers?fbclid=IwAR0TpdQIO->

- [aNCQ8xch5wfsyNmDWnRsUVOBHYS1kWZY_SAnE0pBinl027HgU#table1-2](#).
[cit. 2024-05-09].
35. PURIS, Elena; PASANEN, Markku; GYNTHNER, Mikko; HÄKKINEN, Merja R.; PIHLAJAMÄKI, Jussi et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of nine cytochrome P450 probe drugs and their corresponding metabolites in human serum and urine. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017, roč. 409, č. 1, s. 251-268. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9994-x>. [cit. 2024-05-09].
36. GERIN, Brigitte; DELL'AIERA, Sylvie; RICHERT, Lysiane; SMITH, Steven a CHANTEUX, Hugues. Assessment of cytochrome P450 (1A2, 2B6, 2C9 and 3A4) induction in cryopreserved human hepatocytes cultured in 48-well plates using the cocktail strategy. Online. *Xenobiotica*. 2012, roč. 43, č. 4, s. 320-335. ISSN 0049-8254. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.719088>. [cit. 2024-05-09].
37. LEE, Kye Sook a KIM, Sang Kyum. Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug–drug interactions. Online. *Journal of Applied Toxicology*. 2013, roč. 33, č. 2, s. 100-108. ISSN 0260-437X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jat.1720>. [cit. 2024-05-09].
38. LINDER, Collette D.; RENAUD, Nicole A. a HUTZLER, J. Matthew. Is 1-Aminobenzotriazole an Appropriate *in Vitro* Tool as a Nonspecific Cytochrome P450 Inactivator? Online. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, roč. 37, č. 1, s. 10-13. ISSN 0090-9556. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024075>. [cit. 2024-05-09].
39. GRAPHPAD SOFTWARE, LLC. *GraphPad Prism 10 Curve Fitting Guide - Residual plot*. Online. 2024. Dostupné z: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_fit_tab_residuals_2.htm. [cit. 2024-05-09].

11 PŘÍLOHY

Tabulka 16 Odchylka kalibrátorů pro BUP a OH-BUP.

Analyt	Nominální koncentrace [μM]	Zpětně přepočtená koncentrace [μM]	Odchylka od nominální koncentrace [%]
BUP	0,05	0,052	4
	0,1	0,099	1
	0,2	0,179	11
	0,5	0,451	10
	1	0,918	8
	3	2,69	10
	5	5,09	2
	8	7,54	6
	10	10,97	10
	12	12,96	8
	16	17,90	12
	20	21,85	9
OH-BUP	0,025	0,026	5
	0,05	0,048	5
	0,1	0,097	3
	0,2	0,184	8
	0,5	0,471	6
	1	0,947	5
	3	2,80	7
	5	5,32	6
	8	8,45	6
	10	10,98	10
	12	12,87	7

Pozn.: Kalibrátory byly měřeny v triplikátu.

Tabulka 17 Odchylna kalibrátorů pro MID, 1OH-MID a 4OH-MID.

Analyt	Nominální koncentrace [μM]	Zpětně přepočtená koncentrace [μM]	Odchylna od nominální koncentrace [%]	
MID	0,05	0,049	2	
	0,1	0,106	6	
	0,2	0,194	3	
	0,5	0,500	0	
	1	0,983	2	
	3	2,93	2	
	5	5,16	3	
	8	7,95	1	
	10	10,10	1	
	12	11,93	1	
	1OH-MID	0,025	0,026	2
		0,05	0,049	2
0,1		0,101	1	
0,2		0,186	7	
0,5		0,477	5	
1		0,931	7	
3		2,87	4	
5		5,26	5	
8		8,31	4	
10		10,64	6	
12		12,82	7	
4OH-MID		0,05	0,049	3
	0,1	0,107	7	
	0,2	0,195	3	
	0,5	0,502	0	
	1	0,989	1	
	3	2,85	5	
	5	5,16	3	
	8	7,93	1	
	10	10,32	3	
	12	11,83	1	

Pozn.: Kalibrátory byly měřeny v triplikátu, uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 18 Odchylka kalibrátorů pro DCF a 4OH-DCF.

Analyt	Nominální koncentrace [μM]	Zpětně přepočtená koncentrace [μM]	Odchylka od nominální koncentrace [%]
DCF	0,05	0,042	16
	0,1	0,107	7
	0,2	0,208	4
	0,5	0,525	5
	1	1,02	2
	3	2,89	4
	5	5,10	2
	8	7,82	2
	10	10,13	1
	12	12,00	0
4OH-DCF	0,025	0,025	1
	0,05	0,053	5
	0,1	0,098	2
	0,2	0,187	6
	0,5	0,503	1
	1	1,06	6
	3	3,11	4
	5	5,25	5
	8	7,85	2
	10	9,88	1
12	11,09	8	

Pozn.: Kalibrátory byly měřeny v triplikátu, uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 19 Výsledky QC pro BUP a OH-BUP.

Analyt	Nominální koncentrace QC [μM]	Naměřená koncentrace QC [μM]	Odchylka od nominální koncentrace [%]	Úspěšnost na hladině QC [%]	Celková úspěšnost QC [%]
BUP	0,05	0,055	9	60	70
		0,053	5		
		0,044	12		
		0,069	38		
	0,2	0,073	46	60	
		0,262	31		
		0,262	31		
		0,225	12		
	10	0,189	5	80	
		0,186	7		
		11,55	15		
		9,34	7		
	20	-	-*	80	
		9,28	7		
		8,66	13		
		18,44	8		
OH-BUP	0,05	18,90	6	80	95
		-	-*		
		17,74	11		
		19,39	3		
	0,1	0,051	2	100	
		0,044	11		
		0,047	7		
		0,047	5		
	5	0,078	56	100	
		0,111	11		
		0,109	9		
		0,110	10		
	10	0,109	9	100	
		0,100	0		
		5,30	6		
		4,90	2		
10	4,82	4	100		
	4,69	6			
	4,66	7			
	9,07	9			
10	9,50	5	100		
	8,71	13			
	8,99	10			
	9,13	9			

Pozn.: Červeně jsou označeny výsledky, jež neodpovídají akceptačním kritériím FDA (tzn. jsou od nominální koncentrace odchýleny o více než 20 % na hladině LLOQ a o více než 15 % na ostatních hladinách).

Každé QC měřeno v triplikátu, uvedena průměrná hodnota.

* Při měření došlo k chybě a koncentrace BUP nebyly naměřené.

Tabulka 20 Výsledky QC pro MID a 1OH-MID

Analyt	Nominální koncentrace QC [µM]	Naměřená koncentrace QC [µM]	Odchylka od nominální koncentrace [%]	Úspěšnost QC [%]	Celková úspěšnost QC [%]
MID	0,05	0,050	0	100	80
		0,050	1		
		0,050	1		
		0,051	3		
		0,053	7		
	0,1	0,205	2	100	
		0,206	3		
		0,207	3		
		0,208	4		
		0,209	4		
	5	4,41	12	60	
		4,28	14		
		4,06	19		
		3,94	21		
		4,34	13		
	10	8,51	15	60	
		8,60	14		
		7,11	29		
		8,51	15		
7,32		27			
1OH-MID	0,025	0,021	15	100	90
		0,021	16		
		0,021	15		
		0,021	14		
		0,021	17		
	0,1	0,097	3	100	
		0,094	6		
		0,091	9		
		0,098	2		
		0,101	1		
	5	4,40	12	100	
		4,31	14		
		4,32	14		
		4,23	15		
		4,27	15		
	10	8,57	14	60	
		8,56	14		
		11,43	14		
		8,24	18		
8,28		17			

Pozn.: Červeně jsou označeny výsledky, jež neodpovídají akceptačním kritériím FDA (tzn. jsou od nominální koncentrace odchýleny o více než 20 % na hladině LLOQ a o více než 15 % na ostatních hladinách).

Každé QC měřeno v triplikátu, uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 21 Výsledky QC pro DCF a 4OH-DCF

Analyt	Nominální koncentrace QC [μM]	Naměřená koncentrace QC [μM]	Odchylka od nominální koncentrace [%]	Úspěšnost QC [%]	Celková úspěšnost QC [%]
DCF	0,05	0,054	8	100	95
		0,055	11		
		0,060	20		
		0,056	13		
	0,2	0,057	13	80	
		0,230	15		
		0,225	13		
		0,228	14		
		0,228	14		
	5	0,249	25	100	
		5,63	13		
		5,76	15		
		5,76	15		
		5,62	12		
	10	5,63	13	100	
		10,45	4		
10,41		4			
9,69		3			
9,76		2			
4OH-DCF	0,025	9,98	0	60	70
		0,037	48		
		0,038	52		
		0,028	12		
	0,1	0,028	12	60	
		0,028	13		
		0,112	12		
		0,115	15		
		0,115	15		
	5	0,118	18	60	
		0,116	16		
		5,73	15		
		5,45	9		
		5,95	19		
	10	5,68	14	100	
		5,82	16		
10,33		3			
10,51		5			
11,20		12			
	11,52	15			
	10,35	4			

Pozn.: Červeně jsou označeny výsledky, jež neodpovídají akceptačním kritériím FDA (tzn. jsou od nominální koncentrace odchýleny o více než 20 % na hladině LLOQ a o více než 15 % na ostatních hladinách).

Každé QC měřeno v triplicátu, uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 22 Výsledky analýzy reálných vzorků.

Vzorek 1 12.8.23 24h DMSO		Vzorek 3 12.8.23 24h DMSO	
BUP	21,02 μM	BUP	27,93 μM
OH-BUP	0,009 μM pod LLOQ	OH-BUP	0,018 μM pod LLOQ
MID	7,17 μM	MID	8,24 μM
1OH-MID	0,199 μM	1OH-MID	0,212 μM
4OH-MID	0,018 μM pod LLOQ	4OH-MID	0,028 μM pod LLOQ
DCF	6,97 μM	DCF	10,46 μM
4OH-DCF	0,049 μM	4OH-DCF	0,045 μM
Vzorek 2 12.8.23 24h 10 μM rifampicin		Vzorek 4 12.8.23 24h rifampicin 10 μM	
BUP	24,51 μM	BUP	26,84 μM
OH-BUP	0,057 μM	OH-BUP	0,082 μM
MID	7,77 μM	MID	8,95 μM
1OH-MID	0,230 μM	1OH-MID	0,336 μM
4OH-MID	0,017 μM pod LLOQ	4OH-MID	0,040 μM pod LLOQ
DCF	8,53 μM	DCF	11,27 μM
4OH-DCF	0,080 μM	4OH-DCF	0,129 μM
Vzorek 5 13.8.23 48h DMSO		Vzorek 7 13.8.23 48h DMSO	
BUP	25,90 μM	BUP	26,44 μM
OH-BUP	0,017 μM pod LLOQ	OH-BUP	0,019 μM pod LLOQ
MID	7,96 μM	MID	9,58 μM
1OH-MID	0,203 μM	1OH-MID	0,250 μM
4OH-MID	0,021 μM pod LLOQ	4OH-MID	0,031 μM pod LLOQ
DCF	9,57 μM	DCF	10,29 μM
4OH-DCF	0,061 μM	4OH-DCF	0,054 μM
Vzorek 6 13.8.23 48h rifampicin 10 μM		Vzorek 8 13.8.23 48h rifampicin 10 μM	
BUP	26,96 μM	BUP	26,97 μM
OH-BUP	0,120 μM	OH-BUP	0,113 μM
MID	9,74 μM	MID	9,20 μM
1OH-MID	0,363 μM	1OH-MID	0,379 μM
4OH-MID	0,024 μM pod LLOQ	4OH-MID	0,026 μM pod LLOQ
DCF	10,45 μM	DCF	10,59 μM
4OH-DCF	0,107 μM	4OH-DCF	0,109 μM
Vzorek 9 14.8.23 72h DMSO		Vzorek 11 14.8.23 72h DMSO	
BUP	30,44 μM	BUP	30,00 μM
OH-BUP	0,013 μM pod LLOQ	OH-BUP	0,016 μM pod LLOQ
MID	10,25 μM	MID	10,03 μM
1OH-MID	0,182 μM	1OH-MID	0,199 μM
4OH-MID	0,024 μM pod LLOQ	4OH-MID	0,025 μM pod LLOQ
DCF	12,12 μM	DCF	11,42 μM
4OH-DCF	0,043 μM	4OH-DCF	0,038 μM

Pozn.: Vzorky byly měřeny v triplicátu, uvedena průměrná hodnota.

Pokračování tabulky 22 Výsledky analýzy reálných vzorků.

Vzorek 10 14.8.23 72h rifampicin 10 µM		Vzorek 12 14.8.23 72h rifampicin 10 µM	
BUP	26,97 µM	BUP	30,67 µM
OH-BUP	0,123 µM	OH-BUP	0,116 µM
MID	9,29 µM	MID	9,74 µM
1OH-MID	0,355 µM	1OH-MID	0,323 µM
4OH-MID	0,021 µM pod LLOQ	4OH-MID	0,029 µM pod LLOQ
DCF	10,56 µM	DCF	9,55 µM
4OH-DCF	0,093 µM	4OH-DCF	0,108 µM
Vzorek 13 16.8.23 120h DMSO		Vzorek 15 16.8.23 120h DMSO	
BUP	27,64 µM	BUP	19,65 µM
OH-BUP	0,025 µM pod LLOQ	OH-BUP	0,001 µM pod LLOQ
MID	8,05 µM	MID	7,19 µM
1OH-MID	0,132 µM	1OH-MID	0,070 µM
4OH-MID	0,015 µM pod LLOQ	4OH-MID	0,005 µM pod LLOQ
DCF	9,68 µM	DCF	7,55 µM
4OH-DCF	0,083 µM	4OH-DCF	0,059 µM
Vzorek 14 16.8.23 120h rifampicin 10 µM		Vzorek 16 16.8.23 120h rifampicin 10 µM	
BUP	24,99 µM	BUP	26,33 µM
OH-BUP	0,066 µM	OH-BUP	0,062 µM
MID	7,76 µM	MID	8,63 µM
1OH-MID	0,212 µM	1OH-MID	0,215 µM
4OH-MID	0,018 µM pod LLOQ	4OH-MID	0,018 µM pod LLOQ
DCF	8,74 µM	DCF	9,17 µM
4OH-DCF	0,147 µM	4OH-DCF	0,144 µM

Pozn.: Vzorky byly měřeny v triplikátu, uvedena průměrná hodnota.