

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Vývoj metody pro stanovení entekaviru v biologických
materiálech s využitím UHPLC-MS/MS

Autor práce

TOMÁŠ GOTTVALD

Vedoucí práce

Doc. PharmDr. LUCIE NOVÁKOVÁ, Ph.D.

Vedoucí katedry

Prof. RNDr. PETR SOLICH, CSc.

Datum

HRADEC KRÁLOVÉ 2013

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Tomáš Gottvald

Školitel: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj metody pro stanovení entekaviru v biologických materiálech s využitím UHPLC-MS/MS

Entekavir je syntetický analog guanosinového nukleosidu, který hraje významnou roli v léčbě virové infekce chronické hepatitidy B. Tato práce byla zaměřena na vývoj vysoce citlivé metody pro stanovení koncentrace entekaviru v biologickém materiálu (potkaní moči) pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Při analýze byl použit stabilní izotopicky značený vnitřní standard, entekavir $C_2^{13}N^{15}$. Vzhledem ke struktuře analyzované molekuly bylo vhodné k analýze využít hydrofilní interakční chromatografii (HILIC). Jedním z hlavních úkolů bylo potvrdit tento fakt porovnáním s běžně používanou chromatografií na reverzních fázích (RP-UHPLC) na koloně Acquity BEH C18. Mobilní fáze pro reverzní chromatografii byla optimalizována na složení: acetonitril/0,01% kyselina mravenčí v poměru 4 : 96. HILIC separace byla provedena na koloně Acquity BEH Amide za použití izokratické eluce a složení mobilní fáze acetonitril/5 mM octan amonný pH 4,0 (75 : 25). Ve výsledku HILIC poskytovala lepší výsledky, pokud jde o linearitu a opakovatelnost. Příprava vzorku byla provedena pomocí extrakce na tuhé fázi použitím kolonky HLB Oasis, která je vhodná pro analýzu polárních látek. Jako eluční činidlo byl při optimalizaci zvolen 75 % acetonitril. Ve stejné koncentraci byl acetonitril použit v mobilní fázi HILIC, proto mohl být obvykle následující krok odpařování s výhodou vynechán. K minimalizaci matricových efektů přispělo použití UHPLC separace, HILIC chromatografie, SPE pro přípravu vzorku, izotopicky značeného vnitřního standardu a naředění vzorku. Vliv těchto efektů, zkoumaný metodou post-kolonové infuze a post-extrakčního přídatku byl zanedbatelný. Následující validační parametry svědčí o vhodnosti použití této metody ke stanovení entekaviru v potkaní moči – Správnost (< 5% chyba), výtěžnost (87-109 %), přesnost (< 3% RSD), selektivita a citlivost (LOQ = 100 pg/ml).

Klíčová slova: entekavir, hydrofilní interakční chromatografie, UHPLC-MS/MS, extrakce na tuhé fázi, matricové efekty, validace

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Tomáš Gottvald

Supervisor: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of thesis: Development of method for the determination of entecavir in biological materials using UHPLC-MS/MS

Entecavir is a synthetic guanosine nucleoside that plays an important role in treatment of chronic hepatitis B virus infection. This work was focused on development of highly sensitive method to determine entecavir concentrations in rat urine by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Entecavir C₂¹³N¹⁵, stable isotopically labeled internal standard, was used for quantitation. Hydrophilic interaction chromatography seems to be a suitable technique for retention and separation of polar compounds present in analyzed sample. One of the main goals was to confirm this fact by comparison with commonly used reverse phase chromatography mode (RP-UHPLC) on BEH C18 stationary phase. Conditions for RP-UHPLC were optimized as follows: mobile phase composed of acetonitrile/0.01 % formic acid (4:96). The HILIC conditions on BEH Amide stationary phase were optimized using isocratic elution with mobile phase composed of acetonitrile/5 mM ammonium acetate pH 4.0 (75:25). HILIC method provided much better results in terms of linearity and repeatability. Due to high polarity of entecavir Oasis HLB cartridge was chosen for solid phase extraction. Advantageously entecavir was eluted with 75 % acetonitrile in water, which was the same composition as HILIC mobile phase. Therefore, evaporation step could be omitted. Several strategies were used to overcome matrix effect, such as UHPLC separation, HILIC chromatography, SPE sample pre-treatment, stable isotopically labeled internal standard and dilution step. Therefore, influence of matrix effects, which were determined by post-column infusion and post-extraction addition method, was negligible in this method. The following validation parameters demonstrated the suitability of this method for the determination of entecavir in rat urine – accuracy (< 5% error), recovery (87 – 109 %), precision (< 3% RSD), selectivity and sensitivity (LOQ = 100 pg/ml).

Keywords: entecavir, hydrophilic interaction chromatography, UHPLC-MS/MS, solid phase extraction, matrix effects, validation.

Prohlášení

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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 13. května 2013

.....

Tomáš Gottvald

Poděkování

Poděkování patří zejména mé školitelce Doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, její vstřícný přístup a poskytnutí cenných rad při realizaci mé diplomové práce. Děkuji také pracovníkům Katedry analytické chemie za ochotu a spolupráci při experimentální práci v laboratoři. V neposlední řadě bych rád poděkoval také své rodině za podporu během mého studia.

Seznam použitých zkratk

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
CI	Chemická ionizace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
HBV	Virus hepatitidy B
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	Vnitřní standard
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MALDI	Desorpce laserem za účasti matrice
ME	Matricové efekty
MeOH	Metanol
MP	Mobilní fáze
Mr	Relativní molekulová hmotnost
MS	Hmotnostní spektrometrie
m/z	Poměr molekulové hmotnosti a náboje
RP	Obrácené fáze
S/N	Poměr signálu k šumu
SIM	Monitorování vybraného iontu
SP	Stacionární fáze
SPE	Extrakce na tuhé fázi
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíl a zadání práce.....	10
3	Teoretická část	11
3.1	Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)	11
3.1.1	Mechanismus HILIC separace.....	12
3.1.2	Mobilní fáze používané v HILIC.....	12
3.1.3	Stacionární fáze používané v HILIC	13
3.2	UHPLC-MS.....	17
3.2.1	Ionizační techniky.....	18
3.2.2	Hmotnostní analyzátory – kvadrupól.....	20
3.3	Extrakce na tuhé fázi (SPE, solid phase extraction).....	22
3.3.1	Sorbenty používané v SPE.....	23
3.3.2	Metodologie SPE	23
3.4	Matricové efekty	25
3.4.1	Zdroje matricových efektů.....	25
3.4.2	Určení matricových efektů.....	27
3.4.3	Eliminace matricových efektů	29
3.5	Validace analytické metody	30
3.6	Entekavir	32
3.6.1	Hepatitida B	32
3.6.2	Mechanismus účinku	32
3.6.3	Struktura.....	33
3.6.4	Metody stanovení entekaviru.....	33
4	Experimentální část.....	35
4.1	Použité chemikálie a přístroje	35

4.1.1	Standardní látky	35
4.1.2	Chemikálie	35
4.1.3	Přístrojové vybavení	36
4.2	Pracovní postup	37
4.2.1	Příprava standardních roztoků	37
4.2.2	Příprava vodných složek mobilních fází.....	37
4.2.3	Optimalizace nastavení hmotnostního spektrometru	39
4.2.4	Optimalizace UHPLC podmínek	40
4.2.5	Optimalizace přípravy vzorku	40
4.2.6	Validace metody	41
5	Výsledky a diskuze	42
5.1	Optimalizace MS a MS/MS	42
5.2	Optimalizace UHPLC podmínek	46
5.3	Optimalizace metody pro přípravu vzorku	52
5.4	Validace metody.....	53
5.5	Reálné vzorky.....	57
6	Závěr	59
7	Literatura.....	60
8	Přílohy.....	63

1 Úvod

V současné době rostou požadavky na citlivost stanovení farmaceuticky významných látek. Metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií umožňuje vysoce citlivé a selektivní stanovení. Převážná většina biologicky aktivních látek od jednoduchých aminokyselin či sacharidů až po složité proteiny jsou často látky polární, které bývají pomocí běžných chromatografických technik na normálních či na reverzních fázích problematicky stanovitelné. HILIC metoda nabízí řešení těchto nedostatků a zdá se být vhodnou technikou pro analýzu polárních bioaktivních látek.

Stanovovaná látka entekavir hraje důležitou roli na poli léčiv určených k léčbě chronické hepatitidy B. Ačkoli existuje možnost preventivní vakcinace, je HVB stále velkým problémem, a to především v zemích třetího světa.

Pro vývoj vysoce citlivé metody je nutné optimalizovat podmínky HPLC-MS systému, vhodnou metodou požadovanou látku extrahovat z biologického vzorku a ověřit vhodnost vyvinuté metody validací.

2 Cíl a zadání práce

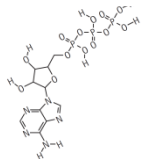
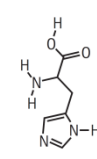
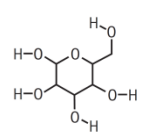




Tato práce se zabývá vývojem metody stanovení entekaviru, analogu guanosinového nukleosidu, metodou UHPLC-MS. Prvotním cílem bylo optimalizovat podmínky jak na úrovni chromatografie, tak hmotnostní spektrometrie. Nejprve bylo nutno optimalizovat nastavení iontového zdroje a kolizní energie použitého trojitého kvadrupólu. Dále byl sledován vliv vybraných stacionárních (HILIC a RP) a mobilních fází na retenci analytu. Neméně důležitým krokem byl výběr a optimalizace vhodné metody pro extrakci analytu z biologické matrice. Vzhledem k charakteru biologického vzorku byl kladen důraz na matricové efekty, na jejich určení a případnou eliminaci. Následovala validace metody se závěrečným stanovením entekaviru v reálných biologických vzorcích.

3 Teoretická část

3.1 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Metoda HILIC neboli hydrofilní interakční chromatografie je separační technikou, která byla vyvinuta s cílem doplnit spektrum metod pro analýzu často problematicky analyzovatelných silně polárních molekul, které v současné době nabývají na důležitosti. S těmito látkami se setkáváme především v odvětví bioanalýzy, toxikologie, proteomice, při studiu metabolismu léčiv a v dalších odvětvích farmaceutického průmyslu [1][2].

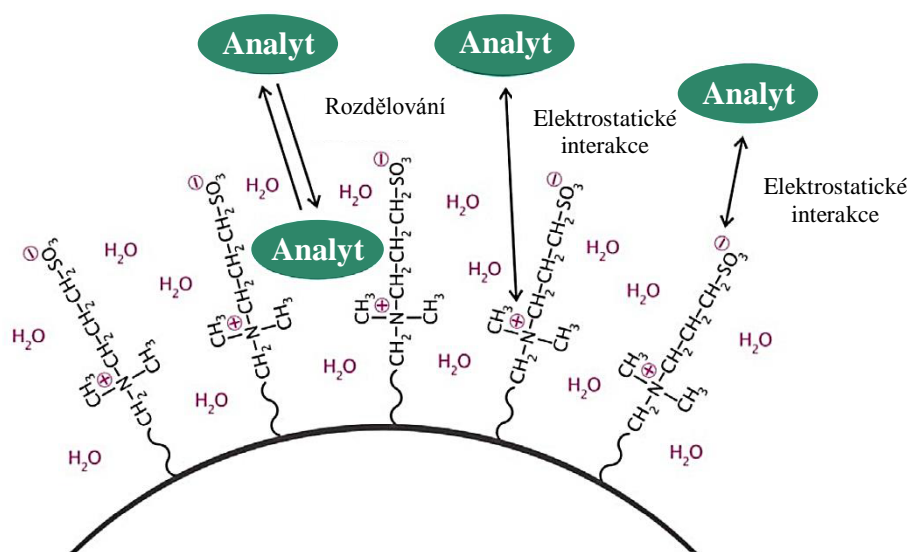
Výraz HILIC byl poprvé použit Alpertem v roce 1990. Ačkoli historie této separační techniky sahá do roku 1975, odkdy byla využívána v HPLC k analýze sacharidů, nebylo možné, vzhledem k limitované instrumentaci a uspořádání HPLC, využít tuto techniku v rozsahu, ve kterém je využívána v současné době [3]. HILIC tvoří jakousi alternativu mezi chromatografickými systémy na normálních (NP) a reverzních fázích (RP). Je zde použita polární stacionární fáze, stejně jako u NPLC. Z hlediska mobilní fáze má tato technika naopak blíže k RPLC, jelikož je tvořena převážně (> 60 %) organickou složkou. HILIC je tedy určena pro látky polární, hydrofilní, které jsou ve vodě dobře rozpustné. Podmínkou separace je, že stacionární fáze musí vykazovat vyšší polaritu, než fáze mobilní [4]. Do jaké míry je látka hydrofilní, udává log P, což je logaritmus distribučního koeficientu látky v systému dvou nemísitelných kapalin voda/oktanol. HILIC je vhodná především pro látky se zápornými hodnotami log P. Naopak vyšší hodnoty (kladné) jsou vhodnější pro aplikaci chromatografie na reverzních fázích. Příklady takovýchto sloučenin ukazuje obrázek 3.1.

HILIC		ROZSAH POUŽITÍ					RPLC			
ATP	Histidin	Glukóza	Uracil	Pyridin	Toluen	Hexan				
										
-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	Log P

Obrázek 3.1: Příklady sloučenin s rozdílnými hodnotami Log P. Čím nižší hodnota log P, tím je látka vhodnější pro analýzu v systému HILIC [5].

3.1.1 Mechanismus HILIC separace

Ačkoli mechanismus retence nebyl doposud detailně objasněn, lze vycházet z mnoha publikovaných studií, podporujících Alpertovu definici retence. Voda, jenž je součástí mobilní fáze (> 3 %) tvoří na povrchu stacionární fáze stagnantní vrstvu. Mezi touto vrstvou a roztokem analytu dochází na základě hydrofilních interakcí k rozdělování, přičemž tento mechanismus lze označit za primární (viz obr. 3.2). Jako sekundární mechanismus se uplatňují elektrostatické síly, které přispívají k retenci v různé míře v závislosti na povaze stacionární fáze, polarizovatelnosti cílové sloučeniny a přísadku pufru k mobilní fázi [6][7]. Zároveň platí, že retence se zvyšuje s rostoucí polaritou analyzovaných sloučenin a stacionární fáze, nebo naopak snížením polaritativy fáze mobilní [2].



Obrázek 3.2: Retenční mechanismy HILIC [6].

3.1.2 Mobilní fáze používané v HILIC

Základ mobilní fáze tvoří organická složka, nejčastěji acetonitril v koncentraci 40 – 97 % ve vodě často s přísadkem pufru. Výběr vhodného rozpouštědla je důležitý z hlediska eluční síly, která roste se zvyšující se polaritou a schopností vytvářet proton-donorové a proton-akceptorové interakce [6]. Řadu možných organických rozpouštědel použitelných v HILIC ukazuje obrázek 3.3.

acetonitril ◀ **isopropanol** ◀ **etanol** ◀ **metanol** ◀ **voda**



Obrázek 3.3: Eluotropní řada organických složek použitelných v HILIC.

Nejvyšší retenci analyzované látky umožňuje acetonitril, jelikož je jako nejslabší rozpouštědlo nejméně polární a nedochází k proton-donorovým interakcím, které retenci snižují [8]. Dalšími důvody potvrzujícími vhodnost použití acetonitrilu jsou nízká viskozita související s vyšší účinností separace a vyšší citlivost při LC-MS analýze díky lepší ionizaci při použití elektrospreje jako ionizační techniky [9][10].

Voda musí být v mobilní fázi obsažena alespoň ze 3 %, protože vytváří na povrchu stacionární fáze hydratovanou vrstvu a účastní se tedy vlastního mechanismu separace [6]. Vodnou složku tvoří převážně pufrý jako mravenčan či octan amonný nebo jejich odpovídající kyseliny či báze, které ovšem musí mít dobrou rozpustnost v organických rozpouštědlech [5][6]. Pufrý obsažené v mobilní fázi slouží k zachování požadované hodnoty pH a iontové síly. Mohou také přispívat k ionizovatelnosti analytu, a tím ovlivňovat změny v retenci. [11].

3.1.3 Stacionární fáze používané v HILIC

HILIC metoda se stává stále populárnější, a tudíž roste i počet dostupných stacionárních fází (SP). Základ SP je tvořen buď silikagelem či polymerní maticí, přičemž povrch je často modifikován polárními funkčními skupinami. Stacionární fáze lze rozdělit z hlediska náboje na fáze neutrální, kde nedochází k elektrostatickým interakcím (diol, amid), fáze nabitě, kde se naopak vyskytují silné elektrostatické interakce (silikagel, aminopropyl) a tzv. zwitterionty, u kterých se také objevují elektrostatické interakce, nicméně v menším rozsahu. Nabitě SP dávají prostor pro ovlivnění selektivity prostřednictvím elektrostatických interakcí, je však nutná přítomnost soli či pufru v mobilní fázi. Vysoké koncentrace soli ovšem snižují citlivost některých detekčních technik (MS) [5][8].

Při výběru kolony je nutné si uvědomit, pro jaký typ analýzy bude určena. Jednotlivé stacionární fáze se liší v několika následujících vlastnostech.

Prostý silikagel

Existuje několik typů silikagelu, které se liší čistotou v závislosti na způsobu přípravy. **Typ A**, připravený precipitací z alkalického silikátového roztoku bývá kontaminován zbytky kovů, které ovlivňují retenci a ve výsledku způsobují asymetričnost píků, a proto není příliš vhodný pro aplikace v systému HILIC [8][11]. **Typ B**, připraven agregací z roztoků silikátů, obsahuje velmi malé množství nečistot a je relativně stabilní až do hodnot pH = 9. Poskytuje lepší separační účinnost, obzvláště pro bazické sloučeniny. Při vyšších hodnotách pH (5 - 9) se zde uplatňuje sekundární mechanismus, kdy jsou silanolové skupiny ionizovány a schopny elektrostaticky interagovat s ionty mobilní fáze tak, že zvyšují retenci bazických látek (kationtů) a zároveň díky elektrostatické repulzi aniontů snižují retenci látek kyselých [8][12]. Silikagel **typu C** má až z 95 % Si-OH skupiny nahrazeny nepolárními skupinami Si-H, je určen pro analýzu kyselin a zásad za použití pufru a organického rozpouštědla o koncentraci 50 – 70 % [11].

Silikagel modifikovaný aminoskupinami

Zatímco bazické látky vykazují vyšší retenci na prostém silikagelu, modifikace aminoskupinami přispěla k vyšší afinitě kyselých sloučenin [8][11]. Jako první byla tato fáze použita pro analýzu sacharidů, u nichž se s výhodou používá dodnes. Oproti prostému silikagelu zvyšuje poměr mutarotace sacharidů, což zabraňuje tvorbě dvojitých píků, způsobené rozlišením anomerů [1]. Prostý silikagel a silikagel modifikovaný aminoskupinami patří mezi fáze nabitě, tudíž je nutno brát na vědomí, že zde existuje riziko nevratné adsorpce z důvodu vyšší reaktivity [13].

Amidové a polysukcinimidové fáze

Amidová skupina je méně reaktivní než amin a postrádá jeho bazicitu. Retence ionizovatelných analytů není proto v takové míře ovlivněna iontově-výměnnými interakcemi. Výhodou je lepší stabilita a delší doba používání. Tyto fáze jsou vhodné zejména pro analýzu bazických látek. Uplatnění lze nalézt především při analýze peptidů, oligosacharidů, glykoproteinů a různých glykosidů [1][8].

Silikagel modifikovaný diolovými skupinami

Tato fáze vykazuje vysokou polaritu a možnost tvorby vodíkových vazeb. Oproti prostému silikagelu téměř neobsahuje ionizovatelné skupiny, tudíž se hodí pro aplikace, kde by mohly být iontové interakce nežádoucí. Používá se především k analýze proteinů. V poslední době nachází uplatnění ve stanovení fenolických sloučenin [8].

Cyklodextrinové stacionární fáze

Cyklodextriny jsou oligosacharidy složené z pěti až sedmi D-glukopyranózových jednotek, které jsou uspořádány do cyklického toroidního útvaru. Vzhledem k této konfiguraci a orientaci hydroxylových skupin lze nalézt rozdíl v hydrofilite vně a uvnitř tohoto útvaru [8]. Jelikož jsou jednotlivé cukerné jednotky opticky aktivní, tyto kolony bývají s výhodou používány k dělení chirálních sloučenin [14].

Zwitteriontové stacionární fáze

Tyto fáze, jejichž základem může být silikagel či polymerní částice obsahují kyselou sulfonovou skupinu a bazickou kvarterní amoniovou skupinu, které od sebe dělí krátký alkylový řetězec. Mají amfoterní charakter, jsou tedy nositeli jak kladného, tak záporného náboje. V případě molárního poměru 1:1 dochází k vyvážení nábojů, nicméně existuje malý záporný náboj přičítaný vzdálenosti sulfonové skupiny od povrchu silikagelu, tudíž umožňují slabé elektrostatické interakce [15]. Zwitterionty vzhledem ke své struktuře také velmi silně váží vodu, což je základní předpoklad pro mechanismus HILIC. Kolony jsou komerčně dostupné pod názvy ZIC-HILIC, jehož základ tvoří silikagel a ZIC-pHILIC s polymerním základem. Zwitterionty navázané na polymerní částice mají širší toleranci pH prostředí (2 - 10) oproti základu tvořeném silikagelem (3 - 8) [6]. Obecně jsou ZIC-HILIC kolony ve srovnání s nemodifikovaným silikagelem, aminopropylovou a amidovou silikagelovou fází stabilnější vůči změnám pH [15]. Přehled jednotlivých stacionárních fází používaných v HILIC znázorňuje tabulka 3.1.

Silikagel	
Propylamin	
Polysukcimid - Poly (2-sulfoethyl) aspartamid	
Amid	
Diol, polyethylenglykol	
B-cyklodextrin	
Sacharid (maltóza)	
Zwitteriont (sulfobetain)	

Tabulka 3.1: Přehled stacionárních fází HILIC. Převzato a upraveno [11].

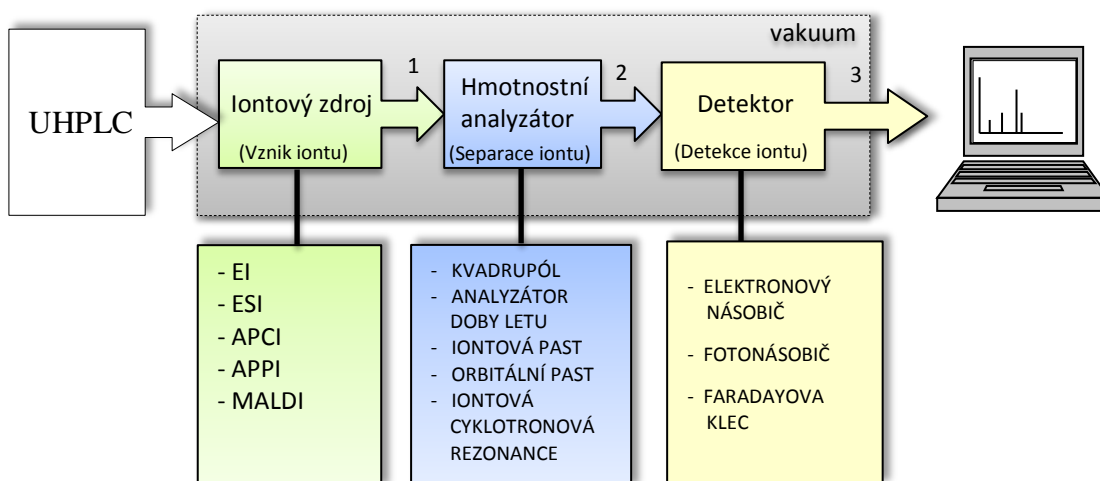
3.2 UHPLC-MS

Zvýšené požadavky na rychlejší a účinnější analýzu daly vzniknout metodě **UHPLC** (Ultra High Performance Liquid Chromatography). Tato metoda pracuje oproti běžné kapalinové chromatografii za vyššího tlaku (> 400 bar) a využívá kratších kolon s částicemi pod 2 μm , což přispívá k vyšší citlivosti a účinnosti metody. Při konvenční kapalinové chromatografii se retenční čas pohybuje okolo 10 minut. Použitím UHPLC lze snížit čas analýzy až na 1 minutu. Spojení UHPLC s hmotnostní spektrometrií se v současné době jeví jako nejvýhodnější kombinace. [16].

Hmotnostní spektrometrie je v současnosti vzhledem k vysoké citlivosti (nízkým detekčním limitům) a možnosti analyzovat velmi malý objem vzorku jedna z nejdůležitějších analytických technik. Pracuje na principu převedení molekul na ionty a následném rozlišení dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Je schopna poskytnout jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o sloučeninách. Hmotnostní spektrometrie je založena na následujících krocích.

- 1) Ionizace – molekula analytu je ionizována a převedena do plynného stavu.
- 2) Hmotnostní analýza – separace a hmotnostní analýza iontů na základě m/z , pomocí magnetického a/nebo elektrického pole za vysokého vakua.
- 3) Detekce – iontový svazek je zachycen, zesílen a zobrazen ve formě hmotnostního spektra [17].

Schéma uspořádání hmotnostního spektrometru a příklady používaných ionizačních technik, hmotnostních analyzátorů a detektorů uvádí obrázek 3.4.



Obrázek 3.4: Schéma hmotnostního spektrometru s příklady používaných komponent.

3.2.1 Ionizační techniky

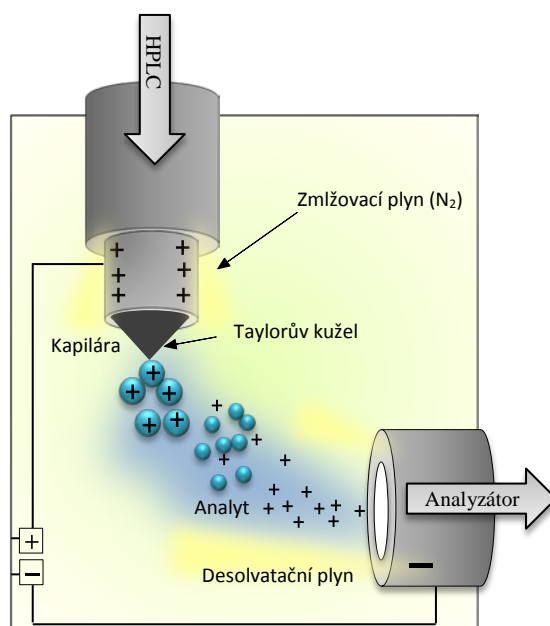
Hlavním úkolem pro iontový zdroj je převést plynný, kapalný či pevný vzorek do ionizovaného stavu v plynné fázi a vytvořit konstantní proud iontů o dostatečné intenzitě pro následující analýzu [18]. Dle způsobu, jakým je možno tohoto dosáhnout, lze ionizační techniky rozdělit na tvrdé, které způsobují rozsáhlou fragmentaci molekul, a měkké, šetrnější techniky, které dávají vzniknout molekulárním iontům. Výběr iontového zdroje je vysoce závislý na aplikaci, neexistuje univerzální ionizační technika [17]. Přehled nejpoužívanějších ionizačních technik znázorňuje tabulka 3.2.

<i>Ionizační technika</i>	<i>Vytvořený iont</i>	<i>Ionizace</i>	<i>Vhodný analyt</i>	<i>Rozsah hmoty do (daltony)</i>	<i>Vhodná aplikace</i>	
Elektronová ionizace (EI)	$M^+ \bullet, M \bullet$	Tvrdá technika	Těkavé, termostabilní látky	10^3	GC/MS (Rozsáhlé knihovny spekter)	
Chemická ionizace (CI)	$[M+H]^+, [M-H]^-$	Měkká technika	Malé těkavé molekuly	10^3	GC/MS	
API techniky	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)	$[M+H]^+, [M+X]^+, [M-H]^-$	Měkká technika (tvrdší ve srovnání s ESI)	Nepolární až středně polární látky	2×10^3	LC/MS
	Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)	$[M+H]^+, [M+X]^+, [M-H]^-$	Měkká technika (tvrdší ve srovnání s ESI)	Nepolární až středně polární (Možnost i zcela nepolární látky)	2×10^3	LC/MS
	Ionizace elektrospřejem (ESI)	$[M-nX]^{n-}, [M+nH]^{n+}, [M+Na]^+$	Měkká technika (vícenásobně nabití ionty)	Středně polární až iontové látky (Peptidy, proteiny atd.)	2×10^5	LC/MS
Desorpce laserem za účasti matrice (MALDI)	$[M+H]^+, [M+X]^+$	Měkká technika	Velké netěkavé molekuly, (Peptidy, proteiny, nukleotidy atd.)	5×10^5	LC/MS	

Tabulka 3.2: Srovnání ionizačních metod. Vypracováno ze zdroje [17][19].

Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem patří k nejvýznamnějším ionizačním technikám používaných v MS. Řadí se mezi měkké ionizační techniky a uskutečňuje přestup iontu z roztoku do plynné fáze. Je vhodná pro analýzu vysokomolekulárních a netěkavých sloučenin. Analyzovaný vzorek je rozpuštěn v polárním těkavém rozpouštědle a je přiváděn přes sprejovací kapiláru s vysokým pozitivním či negativním elektrickým potenciálem (1 - 4 kV). Na konci kapiláry vznikají nabitě kapénky, které se vlivem teploty a proudícího plynu (N_2) odpařují, zmenšují a následně rozpadají (Coulombická exploze), dojde k uvolnění iontů do plynné fáze. Pohyb iontů je založen na opačně orientovaném toku kationtů a aniontů v elektrickém poli. Ty jsou pomocí fokusačních a urychlujících elektrod vháněny z prostoru o atmosférickém tlaku do evakuovaného prostoru analyzátoru (viz obr. 3.5).



Obrázek 3.5: Schéma ionizace elektrosprejem.

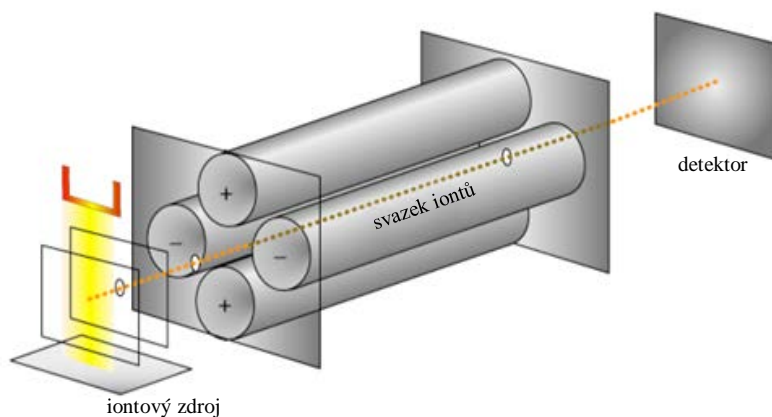
Elektrosprej dosahuje významných předností oproti ostatním ionizačním technikám, díky jeho schopnosti vytvářet vícenásobně nabitě ionty, což umožňuje analýzu látek s vysokou molekulovou hmotností (peptidy, proteiny, nukleotidy). Jelikož se řadí mezi měkké ionizační techniky, umožní získat kvazimolekulární ionty $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ a $[M-H]^-$ [20][21][22].

3.2.2 Hmotnostní analyzátory – kvadrupól

K rozlišení iontů dle m/z slouží hmotnostní analyzátory. Existují různé druhy analyzátorů, přičemž jejich konstrukce a provedení se liší v závislosti na druhu použití. Mezi nejběžnější patří kvadrupól, magnetický analyzátor, iontová past a analyzátor doby letu.

Kvadrupól

Kvadrupól je tvořen čtyřmi paralelně rozmístěnými tyčemi (viz obr. 3.6). Vždy na dvě protilehlé tyče je vkládáno buď kladné či záporné stejnosměrné napětí, přičemž na oba páry tyčí je zároveň superponováno radiofrekvenční střídavé napětí. Vhodné nastavení napětí na obou párech v daném okamžiku umožňuje proletět pouze iontům o určitém m/z . Ostatní částice jsou vyneseny z elektrického pole a zachyceny elektrodami. Plynulou změnou zmíněných parametrů jsou k detektoru postupně propouštěny všechny ionty [22].



Obrázek 3.6: Kvadrupólový analyzátor [19].

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Jedná se o spektrometrii s více analyzátory, přičemž každý analyzátor vystupuje jako samostatná jednotka a umožní tak sledovat reakce probíhající ve spektrometru. S výhodou se používá **trojitý kvadrupól**. V tomto tzv. MS/MS uspořádání podrobíme v druhém kvadrupólu ion (vybraný prvním kvadrupólem) excitaci srážkami s kolizním plynem, čímž dojde k fragmentaci a ve třetím kroku (kvadrupólu) u těchto fragmentů změříme hmotnostní spektrum. Prostřední kvadrupól tedy slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem. Různé nastavení jednotlivých kvadrupólů, umožňuje analýzu v několika následujících módech [19][22].

Sken prekurzorových iontů (SCAN/SIM)

První kvadrupól skenuje celý rozsah spektra a všechny fragmenty propouští ke kolizní cele k fragmentaci. Třetí je nastaven pro ionty o určitém m/z. Tak pro určitý fragmentový ion lze zjistit ion prekurzoru, ze kterého vznikl.

Sken produktových iontů (SIM/SCAN)

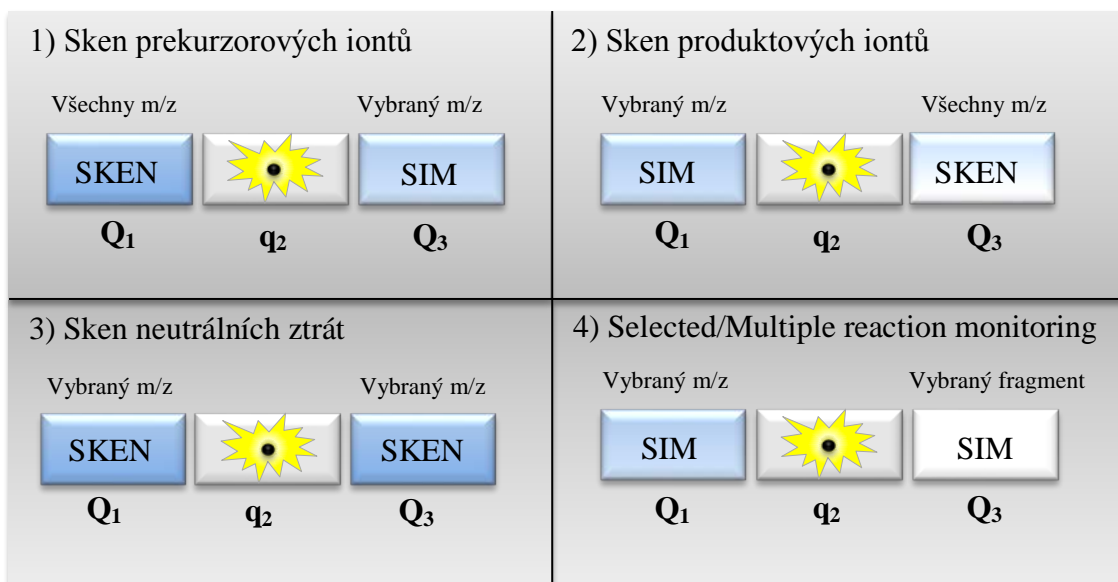
První kvadrupól specifickým nastavením m/z propouští do kolizní cely pouze vybraný prekurzor, kde dochází k vytvoření fragmentů. Třetí kvadrupól je nastaven ve „full-scan“ módu, tudíž detekuje všechny sekundární produkty vzniklé z jednoho primárního prekurzorového (rodičovského) fragmentu. Tento sken se používá při zjišťování struktury analytu.

Sken neutrálních ztrát (SCAN/SCAN)

Oba kvadrupóly současně skenují, čímž lze zjistit hmotnostní ztrátu neutrální molekuly u dvojice iontů (prekurzoru a produktu). Zjištěná ztráta je charakteristická pro určité skupiny látek.

Selected/multiple reaction monitoring (SRM,MRM)

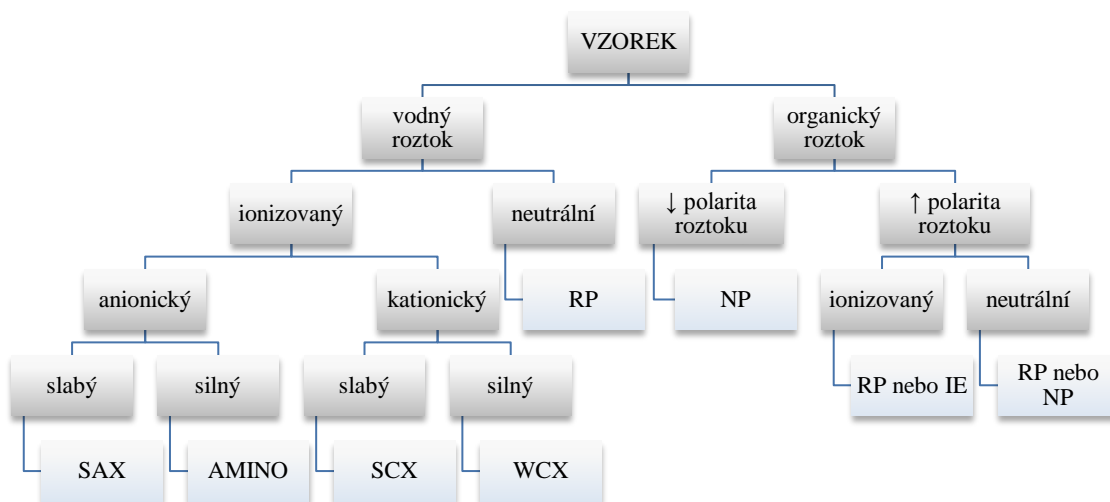
V prvním analyzátoru je vybrán ion prekurzoru, aby byl následně v kolizní cele fragmentován, a ve třetím kroku sledován pouze vybraný fragmentový ion. Jelikož je tato reakce nejselektivnější, je SRM vhodný zejména pro kvantitativní analýzu [23][24]. Schéma jednotlivých módů znázorňuje obrázek 3.7.



Obrázek 3.7: Možnosti nastavení trojitého kvadrupólu.

3.3 Extrakce na tuhé fázi (SPE, solid phase extraction)

Extrakce na tuhou fázi je široce používanou metodou pro přípravu vzorků k analýze farmaceuticky významných látek v biologické matrici. Oproti konvenční extrakci z kapaliny do kapaliny nabízí SPE několik výhod – nižší spotřeba rozpouštědla, efektivní zakoncentrování vzorku, vysoká výtěžnost, úspora času a snadnější automatizace. Tato metoda je založena na rozdělování mezi vodnou a tuhou fází na základě nepolárních, polárních nebo iontových interakcí. SPE kolony jsou tedy dostupné v reverzním, normálním a iontově výměnném módu [25][26]. Pro dosažení vysoké účinnosti SPE je klíčový výběr vhodného sorbentu, vzhledem k analytu a roztoku matrice. Požadavky na takový sorbent zahrnují zachycení reprodukovatelného množství analytu a jeho následnou kompletní eluci z tuhé fáze. Proces sorpce musí být reverzibilní [27]. SPE metoda je velmi podobná kapalinové chromatografii, čemuž odpovídá i podobnost používaných kolon. Sorbenty jsou nejčastěji na bázi silikagelu, který je dále modifikován širokým spektrem různých skupin, rozhodujících o vlastnostech daného sorbentu. Extrakce na reverzní fázi je využívána pro polární roztoky vzorku matrice, přičemž extrahovaný analyt je spíše nepolární. Sorbenty s normální fází jsou naopak vhodné pro méně polární roztok s polárním analytem. Pro nabité sloučeniny je vhodné použít sorbenty iontově výměnné [28]. Při výběru sorbentu je důležité brát ohled také na použité rozpouštědlo. Postup při výběru ukazuje obrázek 3.8.



Obrázek 3.8: Postup při výběru sorbentu, vzhledem k použitému rozpouštědlu. SAX, SCX = strong anion (cation) exchanger, WCX = weak cation exchanger, IE = ion exchanger. Převzato a upraveno z [29].

3.3.1 Sorbenty používané v SPE

V současné době je na trhu velké množství druhů sorbentů. Z nejdůležitějších lze zmínit pro reverzní fázi používaný silikagel s navázanými oktylovými, oktadecylovými nebo fenylovými skupinami. Modifikace aminopropylem či diolovými skupinami jsou vhodné pro systém s normálními fázemi. Iontově výměnné sorbenty obsahují jednak ionizované funkční skupiny (kvarterní amoniové soli, sulfonové kyseliny) a ionizovatelné skupiny jako primární či sekundární amin nebo karboxylovou kyselinu.

Mezi novější postupy SPE extrakce patří sorpce pomocí materiálů s omezeným přístupem (RAM), kde dochází k zadržení částic pouze o určité velikosti, vzhledem k porositě sorpčního materiálu a interakcím (hydrofobním a elektrostatickým) malých molekul se stacionární fází. Potřeba selektivnější extrakce dala základ imunisorbentu, který je tvořen kovalentně vázanými protilátkami, a sorbentu s molekulárně vtištěnými polymery (MIPs), což jsou vysoce síťované polymery vytvořené specificky pro daný analyt. Vícemodální („Mixed mode“) sorbenty zase využívají k dosažení vyšší selektivity kombinaci sorpčních mechanismů, obsahují jak nepolární skupinu, tak iontově výměnnou [27][28].

3.3.2 Metodologie SPE

1) *Kondicionace, aktivace sorbentu*

Před aplikací vzorku je nutno sorbent připravit a zajistit vhodnou kontaktní polohu navázaných skupin (aktivace řetězců). Toto je umožněno pomocí kondicionačního činidla, kterým bývá rozpouštědlo či pufr stejného složení jako roztok, do kterého se daný analyt extrahuje.

2) *Aplikace vzorku*

Následuje aplikace vzorku na kolonu, přičemž analyt je zachycován na sorpčním materiálu. Tento proces je urychlován použitím podtlaku, nicméně vzorek by měl dostatečně dlouhou dobu protékat. Obzvláště při iontově výměnné extrakci by rychlý průtok ovlivnil zadržení analytu.

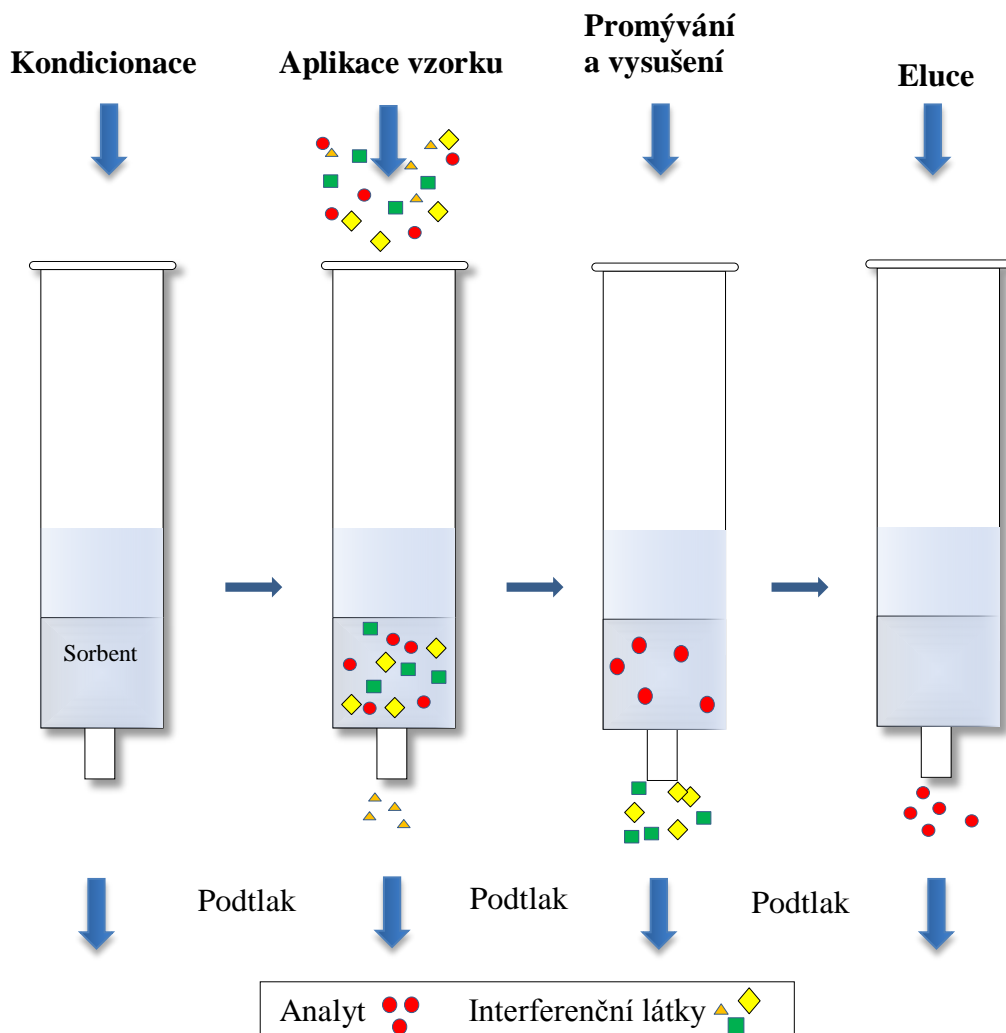
3) *Promývání*

Promývání vhodným rozpouštědlem zajišťuje eluci nežádoucích sloučenin bez vlivu na eluci analytu. Tato fáze je klíčová na celém procesu a je závislá na interakci analytu s vhodným sorbentem a na výběru promývacího rozpouštědla. Často jsou volbou rozpouštědla, ve kterých je analyt nerozpustný. Při použití iontově-výměnného či nepolárního sorbentu hraje roli také hodnota pH rozpouštědla.

4) *Eluce*

Cílem je nevyšší kvantitativní zisk analytu z extrakční kolony za použití co možná nejmenšího množství rozpouštědla. Opět je v tomto kroku nutná kontrola rychlosti průtoku [30][31].

Popsaný postup SPE je graficky znázorněn na obrázku 3.9.

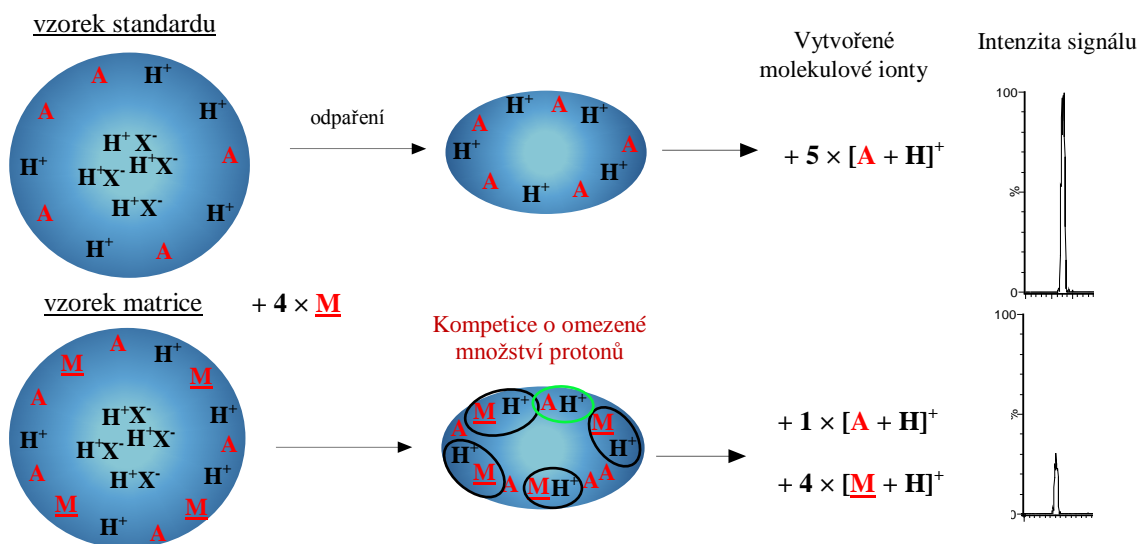


Obrázek 3.9: Postup extrakce na tuhé fázi.

3.4 Matricové efekty

V současné době, kdy se metoda LC-MS/MS stává nepostradatelnou v kvantitativní analýze, nabývá na důležitosti téma matricových efektů, což dokazuje i nárůst počtu publikací na toto téma. Matricové efekty se stávají jedním z hlavních příčin chyb v bioanalýze.

K výskytu matricových efektů dochází v případě, kdy molekuly matrice se shodným elučním časem zasahují do procesu ionizace analytu, přičemž zesilují či potlačují tento proces. Jakým způsobem je tohoto dosaženo, není v současnosti přesně známo, nicméně nejpravděpodobnější variantou se zdá být kompetice mezi analytem a netěkavou složkou matrice o pozici na vytvořených kapénkách při přechodu do plynného stavu (viz obr. 3.10). Potlačení ionizace je problematičtější, protože může docházet ke snížení citlivosti metody. Roli při výskytu ME hraje i polarita samotného analytu. Polárnější sloučeniny jsou náchylnější k ovlivnění matricí [32].



Obrázek 3.10: Mechanismus ovlivnění ionizace matricí [33].

3.4.1 Zdroje matricových efektů

Exogenní

Mezi exogenní zdroje matricových efektů řadíme látky používané během analýzy. Patří sem eluční činidla, rozpouštědla a aditiva používaná v kapalinové chromatografii, látky používané při syntéze sloučenin (rozpouštědla, stabilizátory), degradační produkty analytu vzniklé během přípravy vzorku, ale i nečistoty z laboratorního prostředí.

Endogenní

Mezi endogenní zdroje patří biologická matrice. Nejběžnějšími biologickými vzorky pro LC-MS/MS analýzu je plazma a moč, ovšem výjimkou nejsou ani sliny, žluč či stolice. Každý z těchto materiálů obsahuje rozdílné endogenní komponenty a vyžaduje individuální posouzení při přípravě vzorku.

Krevní plazma

Plazma je přibližně z 90 % tvořena vodou. Zbýlých 10 % tvoří proteiny (8 %), anorganické soli (0,9 %) a organické látky (1,1 %) jako lipidy, hormony, vitamíny a jiné. Proteinovou složku tvoří převážně albuminy, globuliny a fibrinogen. Vazba analytu na tyto proteiny může mít vliv na výtěžnost během přípravy vzorku, tudíž je nutné tyto proteiny odstranit, nejčastěji precipitací. Pokud jde o ostatní komponenty jako soli, cukry, aminokyseliny, lipidy či vitamíny, tyto látky lze odstranit pomocí extrakce buď na kapané či na tuhé fázi. Lipidy jsou považovány za největší problém co se týče vzorku plazmy. V plazmě se nacházejí tisíce různých lipidů. Konkrétně fosfolipidy se v plazmě vyskytují ve vysoké koncentraci. Tyto lipidy obsahují ionizovatelnou polární část, ve které se nachází negativně nabitá fosfátová skupina a kladně nabitá aminoskupina. Tyto skupiny jsou zodpovědné za potlačení ionizace jak v negativním, tak v pozitivním módu (ESI).

Moč

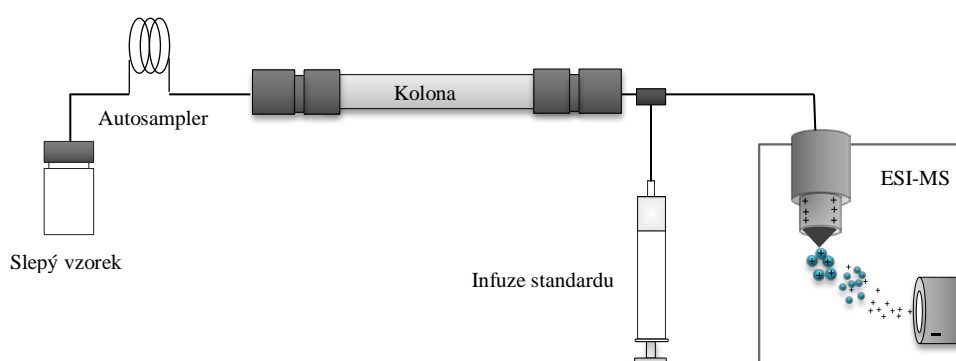
Ve srovnání s plazmou, moč obsahuje mnohem méně proteinů a interferujících komponent. Primárně obsahuje vysoce polární močovinu, anorganické soli, kreatinin a v malém množství cukry, proteiny, metabolity endogenních sloučenin a xenobiotika. Proto se zde matricové efekty objevují pouze v malém měřítku.

Ač z těchto informací o složení biologického materiálu lze předpokládat problematické sloučeniny, je třeba mít na paměti, že každý biologický materiál je individuální, vzhledem ke genetickým variacím, různému stádiu nemoci a výskytu ostatních xenobiotických sloučenin [34].

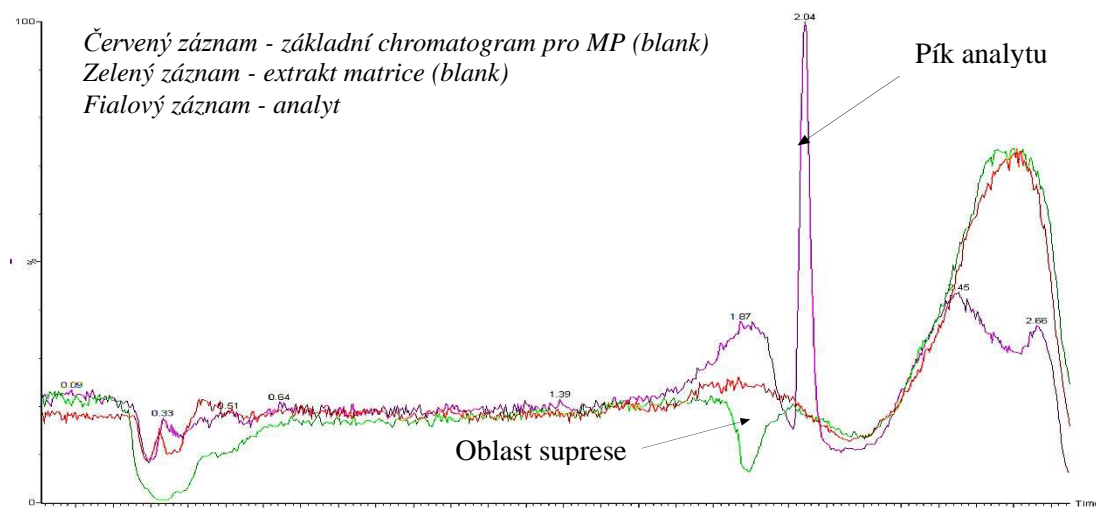
3.4.2 Určení matricových efektů

Metoda post-kolonové infuze

Tato metoda poskytuje pouze kvalitativní informaci o matricových efektech. Princip spočívá v nástřiku nejprve roztoku mobilní fáze a poté blankového extraktu matrice (matrice bez stanovované látky) na HPLC kolonu. Za současného konstantního přívodu analytu z infuze, umístěného za kolonou, vstupují do hmotnostního spektrometru (viz obr. 3.11). Ve výsledku se chromatogramy porovnají. Interference způsobené matricí se projeví vznikem negativních či pozitivních píků (potlačení či zesílení signálu), ve srovnání se záznamem mobilní fáze (viz obr. 3.12) [35].



Obrázek 3.11: Metoda post-kolonové infuze.

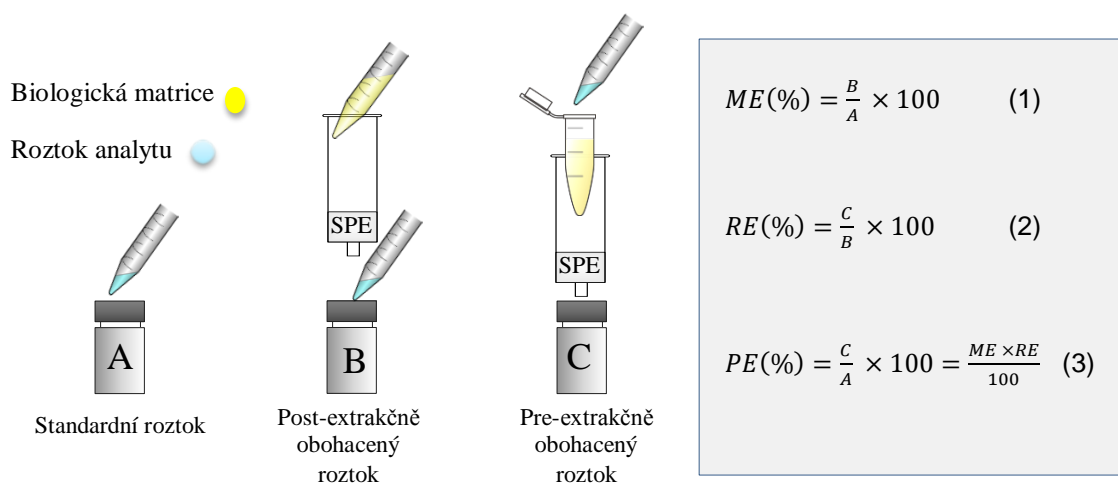


Obrázek 3.12: Chromatogram post-kolonové infúze. V tomto případě, oblast suprese nekoliduje s píkem analytu, tudíž by bylo možné metodu použít pro analýzu této látky. Nicméně, jedná se o hraniční případ. V případě analýzy metabolitů této látky je nutné znovu porovnat signál jednotlivých standardů metabolitů. Převzato a upraveno z [34].

Metoda post-extrakčního přidavku

Pro kvantitativní hodnocení vlivu matricových efektů lze použít metodu post-extrakčního přidavku (viz obr. 3.13). Signál analytu standardního roztoku je porovnáván s post-extrakčně přidaným (spikovaným) analytem. Liší se tedy přítomností matrice. Rozdíl opět indikuje buď potlačení či zesílení signálu.

Vztah pro výpočet matricových efektů ukazuje následující obrázek 3.13 (1), hodnota $ME(\%) > 100$ indikuje zesílení ionizace, zatímco $ME(\%) < 100$ potlačení ionizace. Dále je možné hodnotit výtěžnost extrakce (Extraction Recovery - RE) (2) a účinnost celého procesu (Process Efficiency – PE) (3) [35].



Obrázek 3.13: Metoda post-extrakčního přidavku.

Metoda porovnání směrníc kalibračních křivek

Třetí způsob používaný pro zjištění matricových efektů spočívá ve srovnání směrníc kalibračních křivek standardních roztoků a roztoků matrice s přidavkem standardu. Jedná se o metodu kvantitativní. Rozsah potlačení či zesílení signálu odpovídá rozdílu hodnot těchto dvou směrníc. Pokud se tedy matricové efekty nevyskytují, směrnice dosahují stejných hodnot v rámci experimentální chyby měření [36].

3.4.3 Eliminace matricových efektů

Eliminaci matricových efektů lze provést na několika následujících úrovních:

Příprava vzorku

Běžně používané metody přípravy vzorku jsou extrakce na tuhé fázi (SPE), extrakce kapalin-kapalina (LLE) a precipitace proteinů. Metoda precipitace je oblíbená pro její rychlost a jednoduchost. Používá se zejména pro vzorky plazmy. Nespecificky odstraňuje velkou část nežádoucích látek, zejména proteinů, nicméně v mnoha případech nedosahuje optimální čistoty extraktu, obzvláště pokud se jedná o fosfolipidy, které jsou precipitací hůře odstranitelné. Jako vhodná precipitační činidla slouží acetonitril či metanol. Extrakční metody (SPE, LLE) jsou specifitější, a tudíž poskytují lepší účinnost, co se týče čistoty extraktu. Nutno ale podotknout, že v případě podobnosti struktury nežádoucích interferentů a analytu může dojít k zakoncentrování obou látek, tedy i této nežádoucí sloučeniny. Snížení matricových efektů docílíme také prostým naředěním vzorku s ohledem na dostatečnou citlivost metody [36][37].

Chromatografie

Další prostor pro ovlivnění matricových efektů je na úrovni chromatografie. Pokud se zde projeví efekt matrice, nejčastěji z důvodu ko-eluce s analytem, proto lze tyto efekty minimalizovat dosažením větší účinnosti separace. Vhodný výběr kolony s ohledem na analyt a co nejselektivnější separaci může být účinným nástrojem proti ME. Perspektivní v tomto směru může být hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), kde jsou déle zadržovány polární analyty a jsou tak lépe separovány od látek matrice s krátkým elučním časem [34]. V případě chromatografie na reverzních fázích bývají interferencemi obvykle nejvíce zasaženy látky eluující na počátku, tedy vysoce polární látky, a na konci elučního gradientu, kdy eluují látky na koloně silně zadržované. Proto je doporučováno zvolit takové podmínky, aby se analyt eluoval mezi těmito rizikovými oblastmi. Eluční oblast lze ovlivnit změnou složení mobilní fáze, jejím pH či změnou gradientu. Zlepšení chromatografické separace změnou techniky (UHPLC oproti HPLC) je také vhodný nástroj k eliminaci vlivu matrice [35][37].

Hmotnostní spektrometrie

Ovlivnění na úrovni hmotnostní spektrometrie se zdá být jednodušší řešení, jelikož při úpravě MS podmínek není nutná následná změna celé procedury, jako v případech předchozích zásahů. K potlačení signálu dochází rozdílně v pozitivním a v negativním ionizačním módu. Stejně tak konstrukce zdroje a typ ionizační techniky vykazují rozdíly v ovlivnění ME. Změna ionizační techniky, obzvláště u ESI-MS bývá účinnou strategií k potlačení ME. Negativní mód je více specifický a bývá méně náchylný k efektům matrice. Co se týče obecně ionizačních technik, APCI ve srovnání s ESI bývá rovněž méně citlivá ke vlivům matrice. Ještě lepší se v tomto ohledu zdá být fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [35].

Metoda vnitřního standardu

Použití vnitřního standardu je nejběžnější způsob, jak se vypořádat s maticovými efekty. Jako vnitřní standard lze použít jednak isotopicky značený vnitřní standard (IS - internal standard) či strukturní analog daného analytu, u kterého ovšem hrozí odlišný vliv matrice, a tím i rozdílná účinnost ionizace. U isotopicky značeného vnitřního standardu je několik atomů analytu nahrazeno stabilními izotopy jako ^2H (D), ^{13}C , ^{15}N nebo ^{17}O . Takovýto vnitřní standard má tedy téměř totožnou strukturu s analytem, tudíž by se tyto dvě látky v průběhu jak extrakce, tak LC-MS analýzy měly chovat stejně a podléhat stejným vlivům matrice. Efekt matrice v tomto případě neovlivňuje poměr Analyt/IS, nicméně může být ovlivněna mez stanovitelnosti [34][38].

3.5 Validace analytické metody

Validace analytické metody zahrnuje série testů a zkoušek, které mají za cíl prokázat vhodnost vyvíjené metody pro zamýšlený účel. Dané podmínky validace stanovuje celosvětově několik institucí. Proto je nejprve nutné zvážit, za jakým účelem bude metoda využita a dle toho zvolit autoritu, pomocí jejíchž předpisů bude metoda schvalována. Na validaci HPLC-MS metody jsou kladeny požadavky zahrnující parametry shrnuté v tabulce 3.3. Následuje jejich stručný popis a limity daných autorit v procesu validace. Mezi hlavní autority patří ICH (International Conference on Harmonisation), americká FDA (Food and Drug Administration) a EMA (European Medicines Agency).

Parametr validace	Popis	Vyjádření	Autority					
			ICH	USFDA		EMA		
Selektivita	Schopnost metody přesně určit daný analyt za přítomnosti všech komponent vzorku.	Dle chromatogramu	✓	≥ 6	Nespecifikováno - bez interakce		≥ 6	< 20% LLOQ analytu
Linearita	Schopnost poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku.	Korelační koeficient (rovnice přímky)	5	≥ 6	± 15% (kal. body) ± 20% (pro LOQ)		≥ 6	± 15% (kal. body) ± 20% (pro LOQ)
Správnost	Míra shody se správnou referenční hodnotou.	[% RSD], [% výtěžnost]	3x3	3x5	± 15% (pro QC vz.) ± 20% (pro LOQ)		4x5	± 15% (pro QC vz.) ± 20% (pro LOQ)
Přesnost	Těsnost shody daných měření za předepsaných podmínek.	[% RSD]	3x3	3x5	≤ 15% (pro QC vz.) ≤ 20% (pro LOQ)		4x5	≤ 15% (pro QC vz.) ≤ 20% (pro LOQ)
Limit detekce	Nejnižší koncentrace analytu, která může být detekována.	[g.ml ⁻¹]	LOD	x	-		x	-
Limit kvantifikace	Nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena.	[g.ml ⁻¹]	LOQ	LLOQ, ULOQ	Správnost ± 20% Přesnost ≤ 20%		LLOQ, ULOQ	Správnost ± 20% Přesnost ≤ 20%
Matricové efekty	Schopnost ovlivnit ionizaci analytu maticí vzorku.	%	x	x	-		6	≤ 15% (pro QC vz.)
Přenos	Přenos analytu mezi vzorky.	%	x	x	-		✓	< 20% LLOQ analytu
Robustnost	Míra ovlivnění změnami parametrů metody.	-	✓	x	-		x	-
Rozsah	Interval mezi horní a dolní koncentrační hladinou, ve kterém jsou splněna kritéria pro správnost a přesnost.	[g.ml ⁻¹]	x	x	-		✓	Určen LLOQ a ULOQ

Tabulka 3.3: Parametry validace. LLOQ - dolní limit kvantifikace, ULOQ - horní limit kvantifikace. U jednotlivých autorit je uveden počet koncentračních hladin s následnými limity [39][40][41].

3.6 Entekavir

Entekavir je analog guanosinu, který patří do skupiny syntetických nukleosidů. Tato skupina hraje v současné době důležitou roli při terapii chronické hepatitidy B. Aktuálně jsou v ČR schváleny čtyři přípravky analogů jak nukleosidů, tak nukleotidů - lamivudin, adefovir, dipivoxil, tenofovir a entekavir [42][43].

3.6.1 Hepatitida B

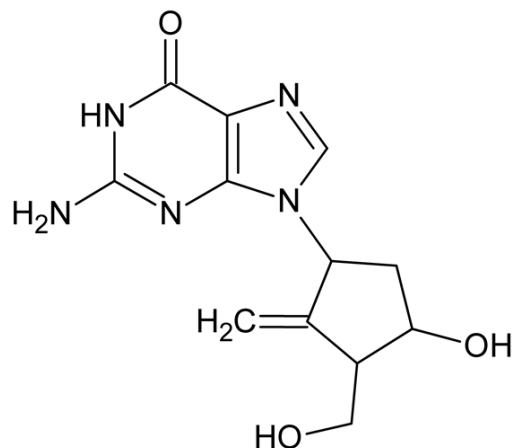
Hepatitida B je onemocnění způsobené DNA viry. Jedná se o nejrozšířenější formu hepatitidy. Toto onemocnění je celosvětovým problémem. Zasažena byla více než třetina lidské populace a na následky tohoto onemocnění umírá ročně kolem 600 tisíc lidí [44][45]. Účinným prostředkem v potlačení a eradikaci viru hepatitidy B je vakcinace očkovací látkou, kterou je rekombinantní HBs antigen. Virus je vysoce infekční, k přenosu dochází parenterálně, sexuálně a perinatálně. Vyskytuje se v akutní i v chronické formě, do které může po 6 měsících přecházet. Tato forma je nebezpečná zejména kvůli možnému asymptomatickému průběhu a zvýšenému riziku vzniku jaterní cirhózy a rakoviny jater. Farmakoterapeuticky významné je především stádium chronické, přičemž léčba akutního stádia je spíše symptomatická.

3.6.2 Mechanismus účinku

Entekavir je v těle kinázami fosforylován na aktivní trifosfátovou formu, jenž zasahuje do replikačního procesu viru hepatitidy B (HBV). Replikaci virového genomu ovlivňuje v několika následujících krocích. Nukleosidová analoga obecně soutěží s přirozenými nukleosidy ve vazbě na HBV - DNA polymerázu, inkorporují se do nově vznikajícího řetězce, což má za následek předčasné ukončení syntézy vlákna DNA. Entekavir zabraňuje také samotnému primování při reverzní transkripci, což je výhodné oproti většině ostatních analogů, které do primovacího procesu nezasahují (lamivudin). Dále blokuje DNA dependentní DNA syntézu, což je závěrečný krok v syntéze virové DNA. Je třeba říci, že entekavir, stejně jako všechna léčiva v současnosti používaná k terapii chronické HBV, nevyлéčí tuto chorobu, nicméně potlačí virus HBV, čímž lze předejít vážným komplikacím [46][47][48].

3.6.3 Struktura

Entekavir je analog guanosinového nukleosidu chemického názvu 2-amino-9-[(1S,3R,4S)-4hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methylidencyklopentyl]-3H-purin-6-on (viz obr. 3.14). Je to bílá, krystalická, nehyroskopická látka, izolovaná jako monohydrát. Entekavir obsahuje tři chirální centra, přičemž se syntetizuje jako 1S, 4S, 3R enantiomer. Molekulová hmotnost entekaviru je 277,28 [49][50].



Obrázek 3.14: Struktura entekaviru.

3.6.4 Metody stanovení entekaviru

Doposud bylo publikováno pouze několik málo metod stanovení entekaviru (viz tab. 3.4). Nejpoužívanější metodou je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Použité metody využívaly stanovení na reverzní fázi C18. Z přípravy vzorku se nejvíce uplatnila extrakce na tuhé fázi. Co se týče mobilní fáze, byla použita jak izokratická, tak gradientová eluce s mobilními fázemi o bazickém i kyselém pH. Limit kvantifikace publikovaných metod se pohyboval v nižších hladinách, vzhledem k zakoncentrování vzorku a použití vyšších nastříkovaných objemů, což ovšem není výhodné z hlediska výskytu matricových efektů. Následující metody využívají jako vnitřní standard strukturní analogy entekaviru, které mnohdy nedosahují ideální správnosti a přesnosti v porovnání s izotopicky značeným vnitřním standardem [51][52][53].

Metoda	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Ionizační mód, analyzátor	Vnitřní standard	Matrice	Příprava vzorku	Objem vzorku	Doba analýzy	Limit kvantifikace	Reference
LC-MS/MS	RP - Xterra MS C18 (2,1 x 50 mm, 5 µm)	A – 5 mM NH ₄ HCO ₂ +15 % NH ₄ OH v H ₂ O B - v MeOH (gradientová eluce) pH = 10,5	ESI+, QqQ	Lobukavir	lidská plazma	SPE	1 ml	4 min.	5 pg/ml	[51]
LC-MS/MS	RP - Xbridge-C18 (4,6 x 50 mm, 5 µm)	10 mM NH ₄ HCO ₂ / MeOH (85:15) (izokratická eluce) pH = 10,5	ESI+, QqQ	Lamivudin	lidská plazma	SPE	500 µl	5 min.	50 pg/ml	[52]
LC-MS/MS	RP - Hanbon® Lichrospher C18 (2,0 x 150 mm, 5 µm)	A - 0.1 % kyselina octová/0,2 mmol octan amonný v H ₂ O B - v ACN (gradientová eluce) kyselé pH	ESI+, Q	Acyklovir	lidská plazma	SALLE	500 µl	10 min.	50 pg/ml	[53]
LC-MS/MS	HILIC - Acquity BEH Amide (2,1 x 100 mm, 1,7 µm)	5 mM octan amonný/ ACN (25:75) (izokratická eluce) pH = 4,0	ESI+, QqQ	Entekavir C ₂ ¹³ N ¹⁵	potkaní moč	SPE	1 ml	2 min.	100 pg/ml	Vyvíjená metoda [54]

Tabulka 3.4: Metody stanovení entekaviru pomocí LC-MS [51][52][53][54].

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Standardní látky

Entekavir

Santa Cruz Biotechnology, $\geq 99\%$

$C_{12}H_{15}N_5O_3$, Mr 277,28

Entekavir – $C_2^{13}N^{15}$

Toronto Research Chemicals, Canada, $\geq 99\%$

$C_{10}C_2^{13}H_{15}N_4N^{15}O_3$, Mr 280,26

4.1.2 Chemikálie

Ultračistá voda, za použití Milli-Q (Millipore USA)

Acetonitril, LC-MS Chromasolv[®], $\geq 99,9\%$, Fluka Analytical

Kyselina octová, $\geq 99\%$, Fluka Analytical

Kyselina mravenčí, 98 – 100 %, Merck

Hydroxid amonný, pro LC-MS, $\geq 25\%$ ve vodě, Fluka Analytical

Metanol, LC-MS Chromasolv[®], $\geq 99,9\%$, Fluka Analytical

Puf 4,01, technický, WTW, Trace

Puf 7,00, technický, WTW, Trace

4.1.3 Přístrojové vybavení

UHPLC systém, Acquity-Ultraperformance LC, Waters, ČR

Hmotnostní detektor, Trojitý quadrupól Quattro Micro, Waters, ČR

Chromatografické kolony

Acquity UPLC[®] BEH C 18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm), Waters, ČR

Acquity UPLC[®] BEH Amide (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm), Waters, ČR

PH metr - pH 212, Hanna instrument, Fischer Scientific, ČR

Extrakční SPE kolona, HLB Oasis Waters

Magnetická míchačka, RET basic, IKA[®], DE

Mikropipety se špičkami, Biohit, ČR

Analytické váhy, Sartorius, DE

Filtrační zařízení, Millipore, USA

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Příprava standardních roztoků

Do vialky byl odvážen přibližně 1 mg standardu entekaviru (zaznamenána přesná navážka) a přidán 1 ml vody. Tím bylo dosaženo koncentrace 10^{-3} g/ml. Pro přípravu roztoku o nižší koncentrační hladině (10^{-4} g/ml) bylo použito 100 μ l roztoku koncentrovanějšího (10^{-3} g/ml) a doplněno rozpouštědlem na 1ml. Jako rozpouštědla byly použity roztoky - 75% ACN ve vodě pro HILIC a 5% ACN ve vodě pro RP. Stejným způsobem bylo postupováno do hodnoty koncentrace 10^{-10} g/ml, přičemž koncentrace $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml byla připravena z 50 μ l roztoku 10^{-5} g/ml a doplněním 950 μ l rozpouštědla (ACN). Také bylo dosaženo koncentrace až $5 \cdot 10^{-10}$ g/ml. Roztoky bylo nutno vzhledem ke stabilitě uchovávat v chladničce.

4.2.2 Příprava vodných složek mobilních fází

Kyselina mravenčí 0,1 %, 0,05 % a 0,01 %

Tyto roztoky byly připraveny pipetováním příslušných objemů – 200 μ l (0,1%), 100 μ l (0,05%) a 20 μ l (0,01%) koncentrované kyseliny mravenčí do 200 ml odměrné baňky, přičemž v baňce bylo přibližně 190 ml vody a po odpipetování kyseliny byla baňka doplněna vodou po rysku.

Kyselina octová 0,1 %, 0,05 % a 0,01 %

Tyto roztoky byly připraveny pipetováním příslušných objemů – 200 μ l (0,1%), 100 μ l (0,05%) a 20 μ l (0,01%) koncentrované kyseliny octové do 200 ml odměrné baňky, přičemž v baňce bylo přibližně 190 ml vody a po odpipetování kyseliny byla baňka doplněna vodou po rysku.

Mravenčan amonný pH 3,5 (5 mM, 1 mM a 0,5 mM)

Nejprve byl připraven nejkoncentrovanější roztok (5 mM) mravenčanu přidávkem 47,16 μ l kyseliny mravenčí do kádinky s přibližně 200 ml vody. Do tohoto objemu byl přidáván roztok hydroxidu amonného 25% do požadované hodnoty pH, tedy 3,5. Připravený roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn vodou po rysku. Nižší koncentrační hladiny byly připraveny ředěním. Pro 1 mM roztok bylo z 250 ml odebráno 50 ml, aby byl tento objem následně převeden do 250 ml baňky a doplněn vodou po rysku. Pro 0,5 mM roztok platí stejný postup s výjimkou pipetovaných objemů, místo 50 ml bylo pipetováno 25 ml.

Mravenčan amonný pH 10 (5 mM, 1 mM a 0,5 mM)

Nejprve byl připraven nejkoncentrovanější roztok mravenčanu (5 mM) přidavkem 1576 μl roztoku hydroxidu amonného 25 % do kádinky s přibližně 200 ml vody. Do tohoto objemu byl přidáván roztok kyseliny mravenčí do požadované hodnoty pH, tedy 10. Připravený pufr byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn vodou po rysku. Nižší koncentrační hladiny byly připraveny ředěním. Pro 1 mM roztok bylo z 250 ml odebráno 50 ml, aby byl tento objem následně převeden do 250 ml baňky a doplněn po rysku vodou. Pro 0,5 mM roztok byl použit stejný postup s výjimkou pipetovaných objemů, místo 50 ml bylo pipetováno 25 ml.

Octan amonný pH 4 (5 mM, 1 mM a 0,5 mM)

Nejprve byl připraven nejkoncentrovanější roztok octanu (5 mM) přidavkem 71,3 μl kyseliny octové do kádinky s přibližně 200 ml vody. Do tohoto objemu byl přidáván roztok hydroxidu amonného do požadované hodnoty pH, tedy 4. Připravený pufr byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn vodou po rysku. Nižší koncentrační hladiny byly připraveny ředěním. Pro 1 mM roztok bylo z 250 ml odebráno 50 ml, aby byl tento objem následně převeden do 250 ml baňky a doplněn po rysku vodou. Pro 0,5 mM roztok platí stejný postup s výjimkou pipetovaných objemů, místo 50 ml bylo pipetováno 25 ml.

Octan amonný pH 10 (5 mM, 1 mM a 0,5 mM)

Nejprve byl připraven nejkoncentrovanější roztok (5 mM) octanu přidavkem 1927 μl roztoku hydroxidu amonného 25 % do kádinky s přibližně 200 ml vody. Do tohoto objemu byl přidáván roztok kyseliny octové do požadované hodnoty pH, tedy 10. Připravený pufr byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn vodou po rysku. Nižší koncentrační hladiny byly připraveny ředěním. Pro 1 mM roztok bylo z 250 ml odebráno 50 ml, aby byl tento objem následně převeden do 250 ml baňky a doplněn po rysku vodou. Pro 0,5 mM roztok platí stejný postup s výjimkou pipetovaných objemů, místo 50 ml bylo pipetováno 25 ml.

Hydroxid amonný 0,1 %, 0,01 %

Roztoky amoniaku o koncentraci 0,1 % a 0,01 % byly připraveny ze zásobního roztoku (10 %) tak, že byl odpipetován 1 ml (100 μl) do 100 ml baňky a doplněn vodou.

4.2.3 Optimalizace nastavení hmotnostního spektrometru

Jako hmotnostní spektrometr byl použit trojitý kvadrupól. Ionizace byla provedena elektrosprejem, nastaveným v pozitivním módu. Optimalizace hmotnostního spektrometru proběhla jak pro RP, tak pro HILIC nejprve vhodným nastavením iontového zdroje. Rozsah zkoumaných parametrů shrnuje tabulka 4.1.

Optimalizovaný parametr	Rozsah zkoumaných parametrů
Napětí - kapilára [kV]	0,5 - 4,5
Napětí - vstupní kužel [V]	10 - 45
Napětí - extraktor [V]	0 - 20
Napětí - RF čočka [V]	0 - 5
Teplota - desolvatace [°C]	200 - 450
Průtok - desolvatační plyn [L.h ⁻¹]	100 - 1000
Průtok – plyn na vstupním kuželu [L.h ⁻¹]	50 - 200

Tabulka 4.1: Přehled optimalizovaných parametrů iontového zdroje (ESI).

Dále následovala optimalizace kolizní energie. Skenem produktových iontů bylo nejprve nutné zjistit dané fragmenty zkoumaného prekurzoru. (viz tab. 4.2) U vybraného prekurzoru byla následně měřena produktová spektra při různých hodnotách kolizní energie za účelem zjištění její optimální hodnoty. Jako kolizní plyn byl použit argon.

SRM	Prekurzor [m/z]	Fragment [m/z]
SRM 1	277,9	152,2
SRM 2	277,9	135,2
SRM 3	277,9	128,2
SRM 4	277,9	110,2

Tabulka 4.2: Optimalizace kolizní energie – zkoumané fragmenty.

4.2.4 Optimalizace UHPLC podmínek

Předmětem optimalizace UHPLC bylo najít vhodnou mobilní a stacionární fázi. Vzhledem ke struktuře entekaviru byly k následné optimalizaci použity kolony Acquity BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m) pro reverzní chromatografii a Acquity BEH Amide (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m) pro hydrofilní interakční chromatografii. Co se týče výběru vodné složky, byly pro optimalizaci použity mravenčan a octan amonný ve třech koncentračních úrovních o dvou různých hodnotách pH, dále kyselina mravenčí, octová a hydroxid amonný ve dvou koncentračních hladinách (viz obr. 5.5). Jako slabá oplachová kapalina (weak wash) byl zvolen acetonitril 20 % pro reverzní chromatografii a 80% pro HILIC. Jako silná oplachová kapalina (strong wash) byl použit taktéž acetonitril v koncentraci 100 % pro RP i HILIC. Parametry nastavení UHPLC metod shrnuje následující tabulka 4.3.

Stacionární fáze	ACQUITY BEH C18	ACQUITY BEH AMIDE
Mobilní fáze	zkoumaná vodná složka/ACN	zkoumaná vodná složka/ACN
Průtok (ml/min)	0,300	
Nastříkovaný objem (μ l)	2,0	
Eluce	Izokratická	

Tabulka 4.3: Parametry UHPLC.

4.2.5 Optimalizace přípravy vzorku

K extrakci na tuhé fázi z biologického vzorku byla vzhledem ke struktuře analyzované látky vybrána kolona Waters Oasis HLB. Optimalizace tohoto procesu zahrnovala především kroky promytí a eluce. Zkoušeným činidlem byl acetonitril v různých koncentracích (viz tab. 4.4).

Kondicionace	Aplikace vzorku	Promytí	Eluce
1ml ACN + 1ml H ₂ O	500 μ l vzorku	10, 20, 30, 40 % ACN, H ₂ O	70, 75, 80, 85, 90 % ACN v H ₂ O

Tabulka 4.4: Optimalizace procesu extrakce na tuhé fázi.

4.2.6 Validace metody

Metoda byla validována dle parametrů ICH (International Conference on Harmonisation) znázorněných v tabulce 4.5.

Validační parametry	Standardní roztoky entekaviru	Obohacené vzorky potkaní moči
SST	+	
Linearita	+	+
LOD	+	+
LOQ	+	+
Správnost		+
Přesnost		+
Matricové efekty		+
Selektivita		+
Přenos		+

Tabulka 4.5: Přehled parametrů validace.

Opakovatelnost nástřiku byla provedena ve třech koncentračních hladinách. Kalibrační křivka byla sestavena na základě měření standardních roztoků entekaviru a vzorků potkaní moči s přidavkem entekaviru v rozsahu 0,05 - 500 ng/ml. Pro analýzu parametrů jako správnost, přesnost, výtěžnost a určení matricových efektů byly připraveny tři série vzorků. Jednak standardní kalibrační roztoky, matricové kalibrační vzorky, jenž byly po přípravě podrobeny SPE a vzorky připravené z eluátu moči s post-extrakčně přidaným standardem (viz tab. 4.6).

Standardní kalibrační body	Pre-extrakční přidavek (matricové kalibrační vzorky)		Post-extrakční přidavek	
	10^{-9}	$3x$	10^{-9}	$2x$
10^{-9} 100 μ l 10^{-8} standardu ENT + 9 μ l 10^{-6} IS v H_2O + 891 μ l 75% ACN	10^{-9} 1536 μ l potkaní moči + 32 μ l standardu ENT $5 \cdot 10^{-8}$ + 32 μ l IS $5 \cdot 10^{-7}$	$3x$	10^{-9} 960 μ l eluátu + 20 μ l standardu $5 \cdot 10^{-8}$ + 20 μ l IS $5 \cdot 10^{-7}$	$2x$
10^{-8} 100 μ l 10^{-7} standardu ENT + 9 μ l 10^{-6} IS v H_2O + 891 μ l 75% ACN	10^{-8} 1536 μ l potkaní moči + 32 μ l standardu ENT $5 \cdot 10^{-7}$ + 32 μ l IS $5 \cdot 10^{-7}$	$3x$	10^{-8} 960 μ l eluátu + 20 μ l standardu $5 \cdot 10^{-7}$ + 20 μ l IS $5 \cdot 10^{-7}$	$2x$
10^{-7} 100 μ l 10^{-6} standardu ENT + 10 μ l 10^{-6} IS v H_2O + 891 μ l 75% ACN	10^{-7} 1536 μ l potkaní moči + 32 μ l standardu ENT $5 \cdot 10^{-6}$ + 32 μ l IS $5 \cdot 10^{-7}$	$3x$	10^{-7} 960 μ l eluátu + 20 μ l standardu $5 \cdot 10^{-6}$ + 20 μ l IS $5 \cdot 10^{-7}$	$2x$

Tabulka 4.6: Postup přípravy vzorků.

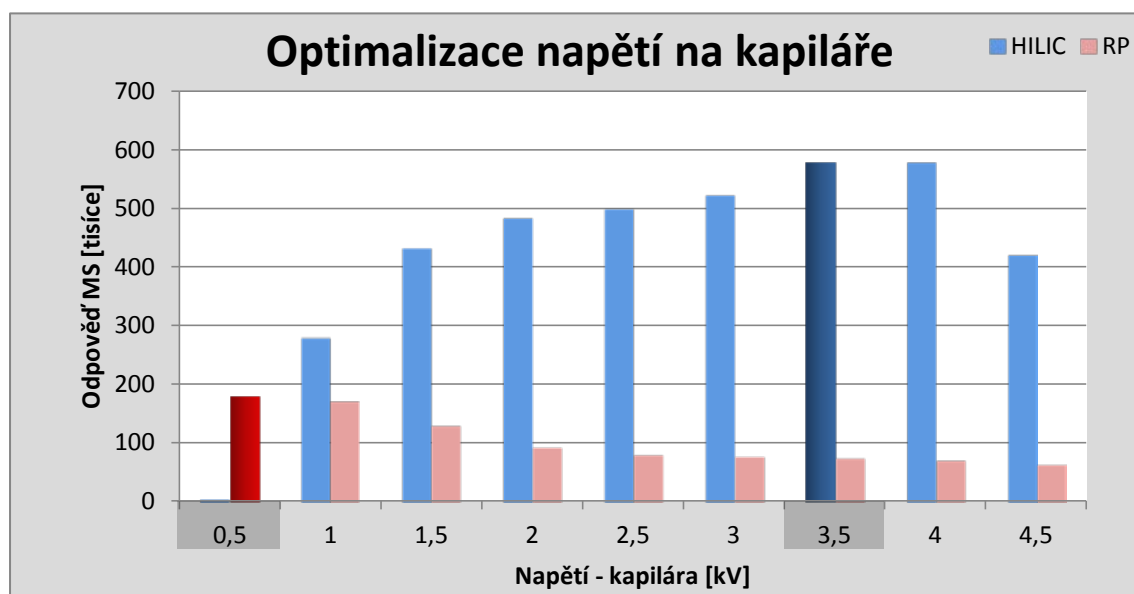
5 Výsledky a diskuze

5.1 Optimalizace MS a MS/MS

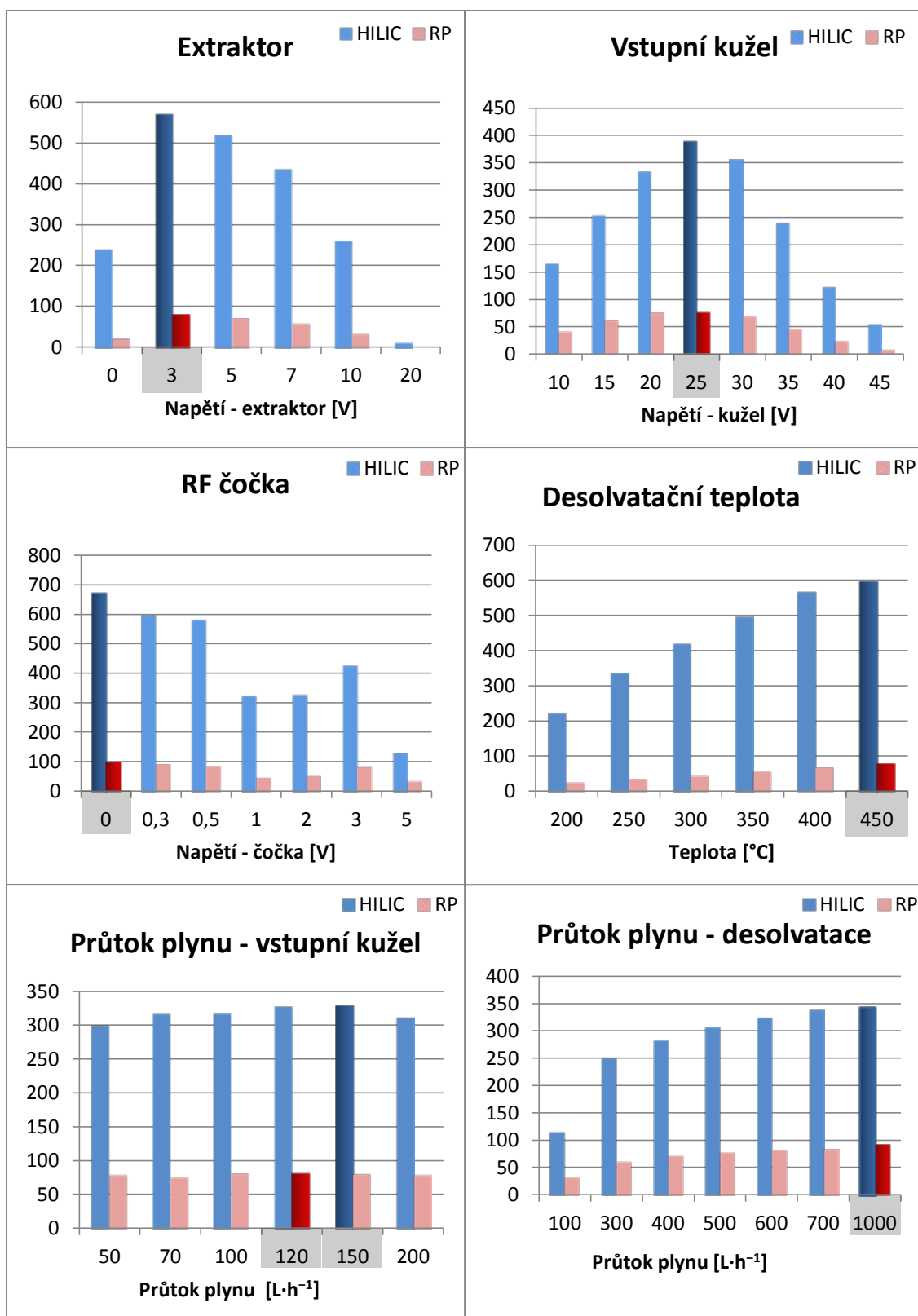
Na počátku vývoje metody bylo úkolem najít vhodnou kolonu pro UHPLC separaci. Vzhledem ke struktuře stanovované láky se zdálo být výhodné použít hydrofilní interakční chromatografii, tudíž jednou z variant byla HILIC kolona. Druhou variantou byla běžně používaná kolona pro reverzní chromatografii. Jeden z hlavních cílů této práce bylo porovnat uvedené dvě metody za použití různých mobilních fází a v různém nastavení podmínek MS. Optimalizace MS podmínek v prvním kroku zahrnovala nastavení vhodných parametrů iontového zdroje (tab. 5.1), který byl nastaven na pozitivní mód. K výraznější změně nastavení HILIC oproti RP došlo pouze u napětí na kapiláře (viz obr. 5.1 a 5.2). Z důvodu nižší spotřeby desolvatačního plynu byl zvolen průtok 600 L.h⁻¹. Při vyšším průtoku se odpověď MS lišila jen nepatrně.

Parametr	Optimální nastavení - RP	Optimální nastavení - HILIC
Napětí - kapilára [kV]	0,5	3,5
Napětí - vstupní kužel [V]	25	25
Napětí - extraktor [V]	3	3
Napětí - RF čočka [V]	0,2	0,3
Teplota - zdroj [°C]	130	130
Teplota - desolvatace [°C]	450	450
Průtok plynu - desolvatace [L.h ⁻¹]	600	600
Průtok plynu - kužel [L.h ⁻¹]	120	150

Tabulka 5.1: Optimalizované parametry nastavení elektrospreje.

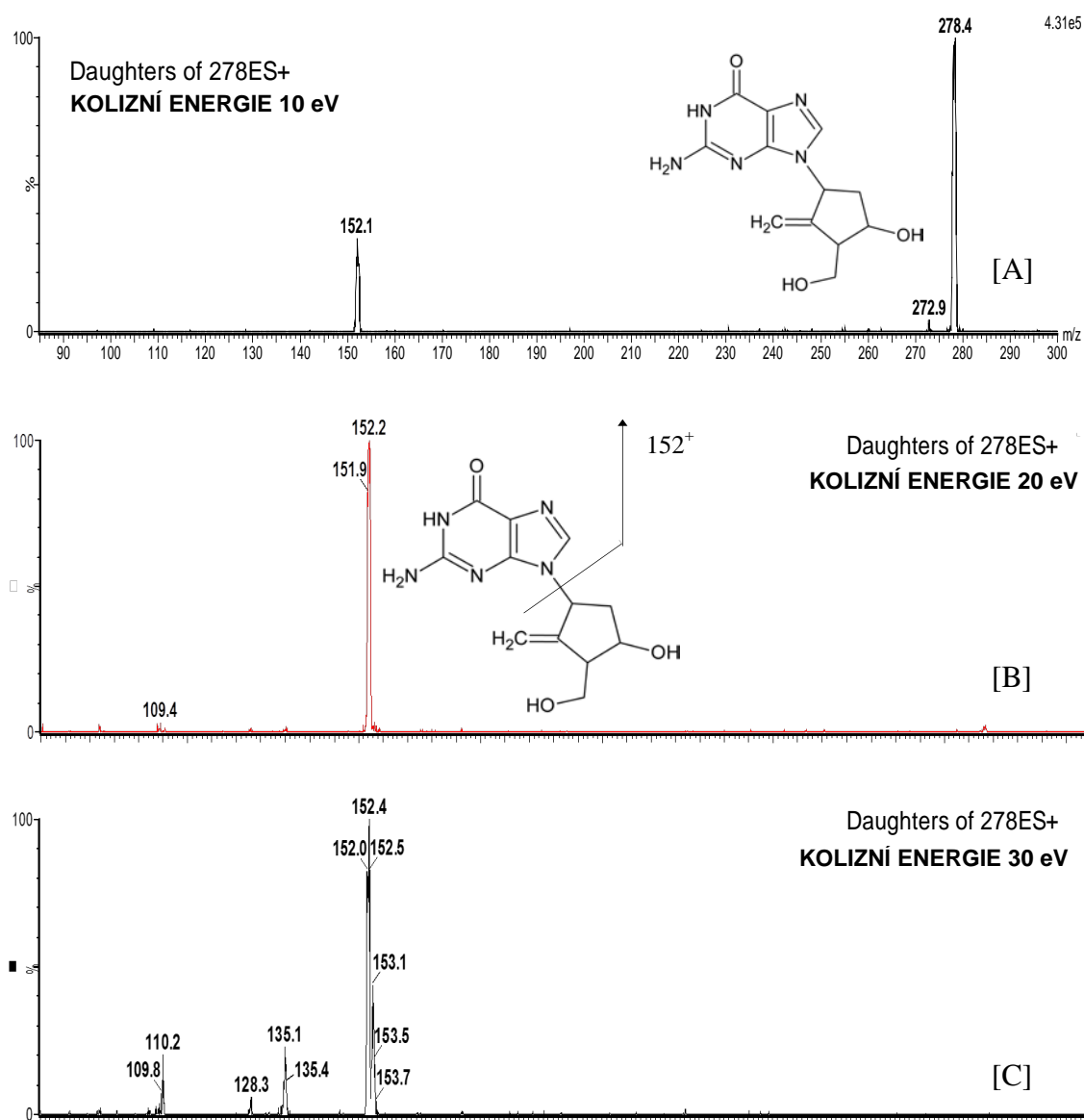


Obrázek 5.1: Optimalizace napětí na kapiláře.



Obrázek 5.2: Optimalizace parametrů iontového zdroje. Závislosti jednotlivých parametrů na ploše píku [tisíce].

Dalším úkolem bylo optimalizovat kolizní energii. Při skenu produktových iontů byly zjištěny fragmenty prekurzorového iontu. Obrázek 5.3 ukazuje sken produktových iontů při různých hodnotách kolizní energie. Při energii 10 eV je patrné, že vzhledem k výskytu prekurzorového iontu ve vysoké intenzitě, nedochází ještě k výrazné fragmentaci [A]. Při energii 20 eV došlo k rozsáhlejší fragmentaci. Výrazný signál poskytl pouze fragment s molekulovou hmotností 152 [B]. Tento fragment byl vzhledem k intenzitě signálu později použit při kvantifikaci. Energie 30 eV dala vzniknout několika dalším fragmentům o molekulové hmotnosti 135, 128 a 110, ovšem na úkor intenzity hlavního fragmentu [C].

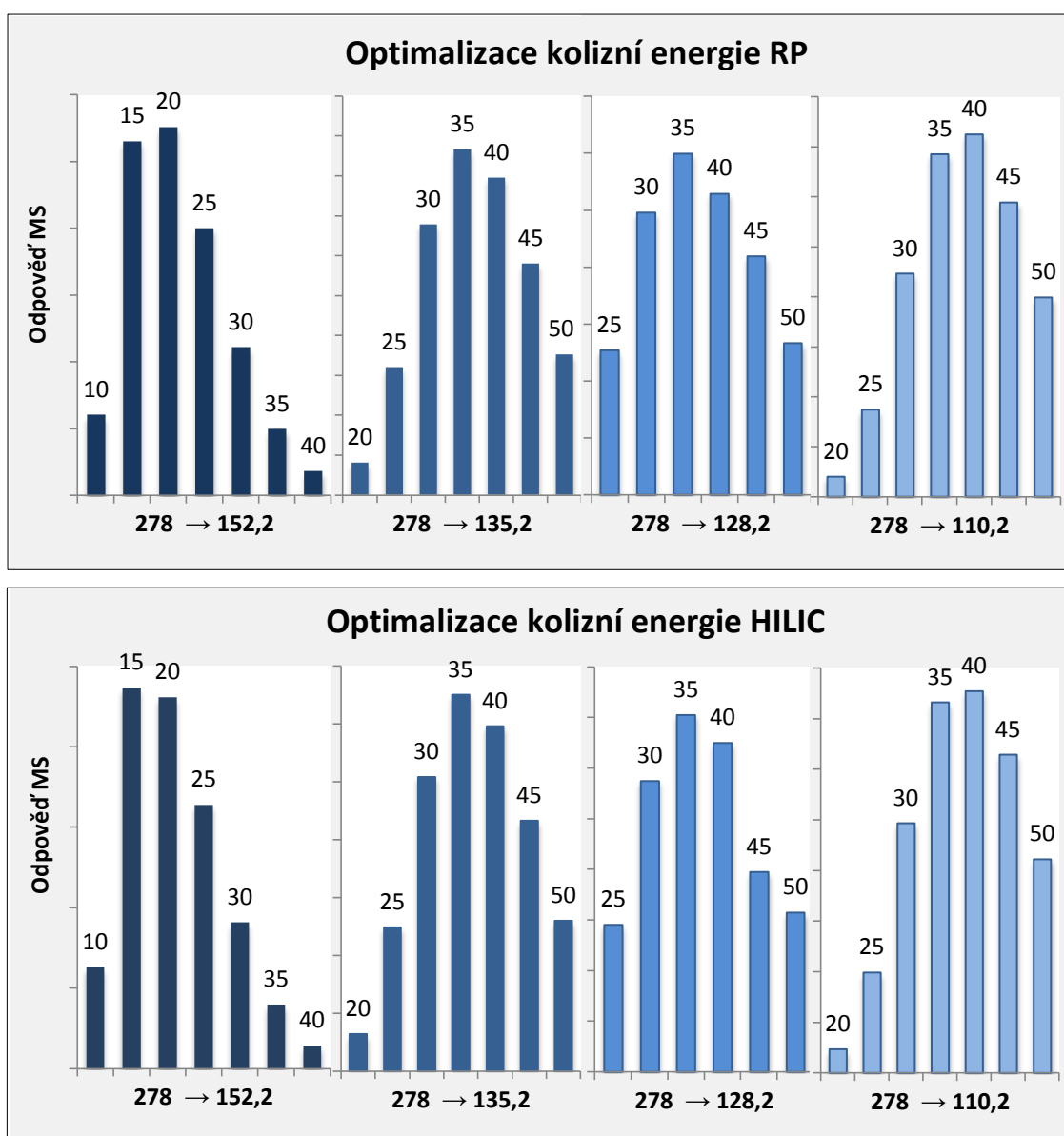


Obrázek 5.3: Sken produktových iontů entekaviru při různém nastavení kolizní energie.

Nejvyšší odpověď MS vykazoval fragment m/z 152,2, přičemž právě u tohoto fragmentu se kolizní energie u systému HILIC v porovnání RP mírně lišila (viz tab. 5.2 a obr. 5.4).

SRM	Cílový fragment [m/z]	Kolizní energie RP [eV]	Kolizní energie HILIC [eV]
SRM 1	152,2	20	15
SRM 2	135,2	35	35
SRM 3	128,2	40	40
SRM 4	110,2	35	35

Tabulka 5.2: Optimalizované hodnoty kolizní energie.



Obrázek 5.4: Optimalizace kolizní energie RP a HILIC.

5.2 Optimalizace UHPLC podmínek

Optimalizace UHPLC podmínek zahrnovala výběr vhodné stacionární fáze na základě retence analytu a odezvy MS, vzhledem ke zkoumaným mobilním fázím o vhodném složení.

Optimalizace mobilní fáze

Prvotním cílem bylo optimalizovat složení mobilní fáze s ohledem na retenční čas a na citlivost metody. Tabulka 5.3 shrnuje optimalizované parametry u HPLC podmínek.

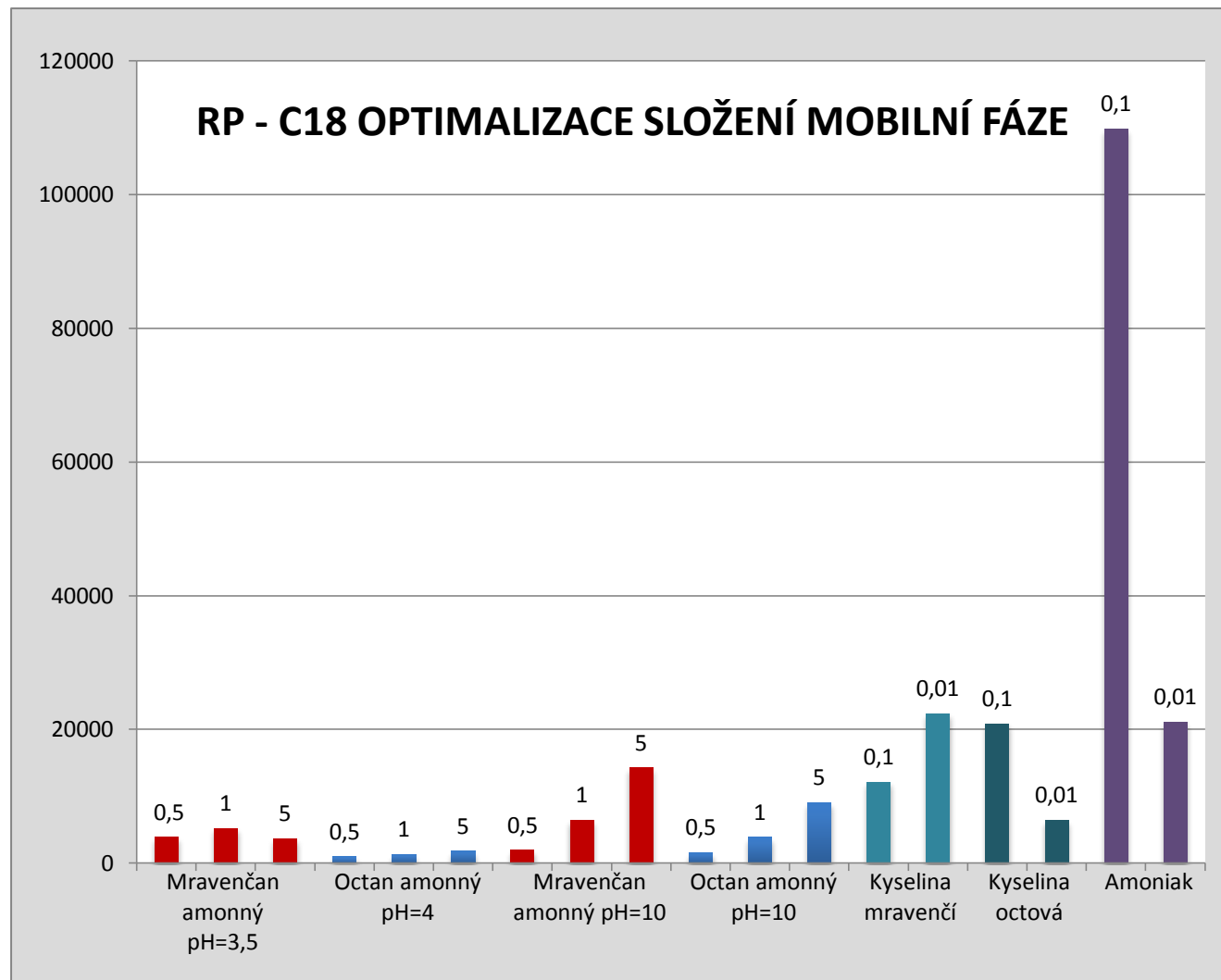
<i>Stacionární fáze</i>	ACQUITY UPLC BEH C18	HILIC BEH AMIDE
<i>Mobilní fáze</i>	Kyselina mravenčí 0,01% /ACN (96:4)	Octan amonný 5 mM pH = 4 /ACN (25:75)
<i>Průtok (ml/min)</i>	0,300	
<i>Nastříkovaný objem (μl)</i>	2,0	

Tabulka 5.3: *Optimalizované složení mobilní fáze.*

Optimalizace mobilní fáze pro chromatografii na reverzních fázích

Při zjišťování procentuálního zastoupení vodné a organické složky v mobilní fázi byly použity kyselina mravenčí 0,1 % tvořící vodnou složku, acetonitril a metanol zastupující složku organickou. Bylo zjištěno, že pro dostatečnou retenci entekaviru na koloně s reverzní fází je nutná převaha složky vodné s minimálně 90 % zastoupením v případě kombinace s acetonitrem. Acetonitril ve srovnání s metanolem poskytoval obdobnou citlivost, ale vzhledem ke tvaru píku, bylo jeho použití výhodnější. Ve výsledku bylo tedy zastoupení jednotlivých složek optimalizováno na 96 % vodné složky a 4 % složky organické. Co se týče výběru vodné složky, byly pro optimalizaci použity mravenčan a octan amonný ve třech koncentračních úrovních o dvou různých hodnotách pH, dále kyselina mravenčí, octová a hydroxid amonný (viz obr. 5.5). Následující Graf (obr. 5.5) znázorňuje odezvu detekce hmotnostního spektrometru v závislosti na použité mobilní fázi. Je zde patrné, že nejlepší odezvy dosáhl hydroxid amonný, který ovšem nespĺňoval požadavky na opakovatelnost metody, tudíž byla jako vhodná vodná složka při stanovení na reverzních fázích zvolena kyselina mravenčí 0,01 %. U použitých pufrů bylo možno pozorovat vyšší citlivost u bazických a koncentrovanějších roztoků.

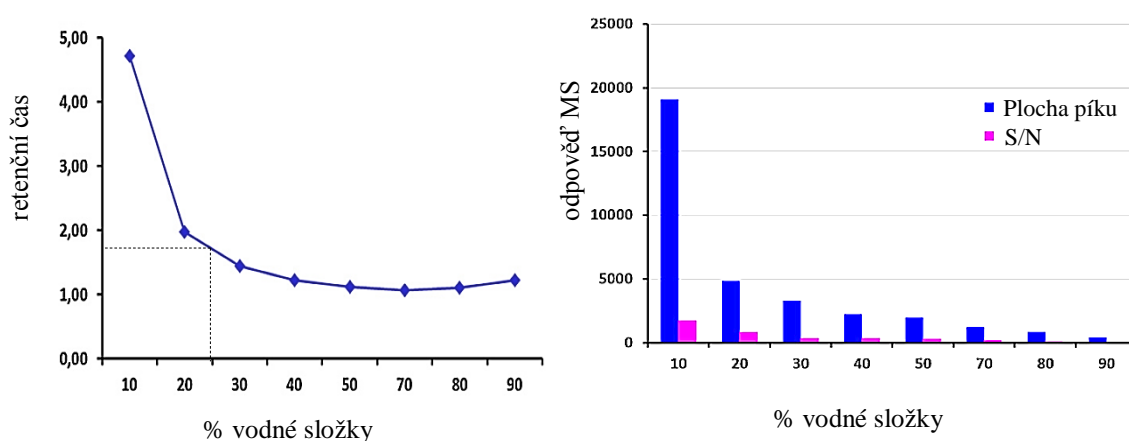
Mobilní fáze/ACN		Odpověď MS
pH = 3,5	mravenčan amonný 0,5 mM	3900
	mravenčan amonný 1 mM	5231
	mravenčan amonný 5 mM	3672
pH = 4	octan amonný 0,5 mM	959
	octan amonný 1 mM	1345
	octan amonný 5 mM	1787
pH = 10	mravenčan amonný 0,5 mM	1973
	mravenčan amonný 1 mM	6446
	mravenčan amonný 5 mM	14297
pH = 10	octan amonný 0,5 mM	1593
	octan amonný 1 mM	3854
	octan amonný 5 mM	9103
kyselina mravenčí 0,1		12182
kyselina mravenčí 0,01		22418
kyselina octová 0,1		20901
kyselina octová 0,01		6419
Amoniak 0,1		109906
Amoniak 0,01		21123



Obrázek 5.5: Optimalizace složení mobilní fáze - chromatografie na reverzních fázích.

Optimalizace složení mobilní fáze v hydrofilní interakční chromatografii

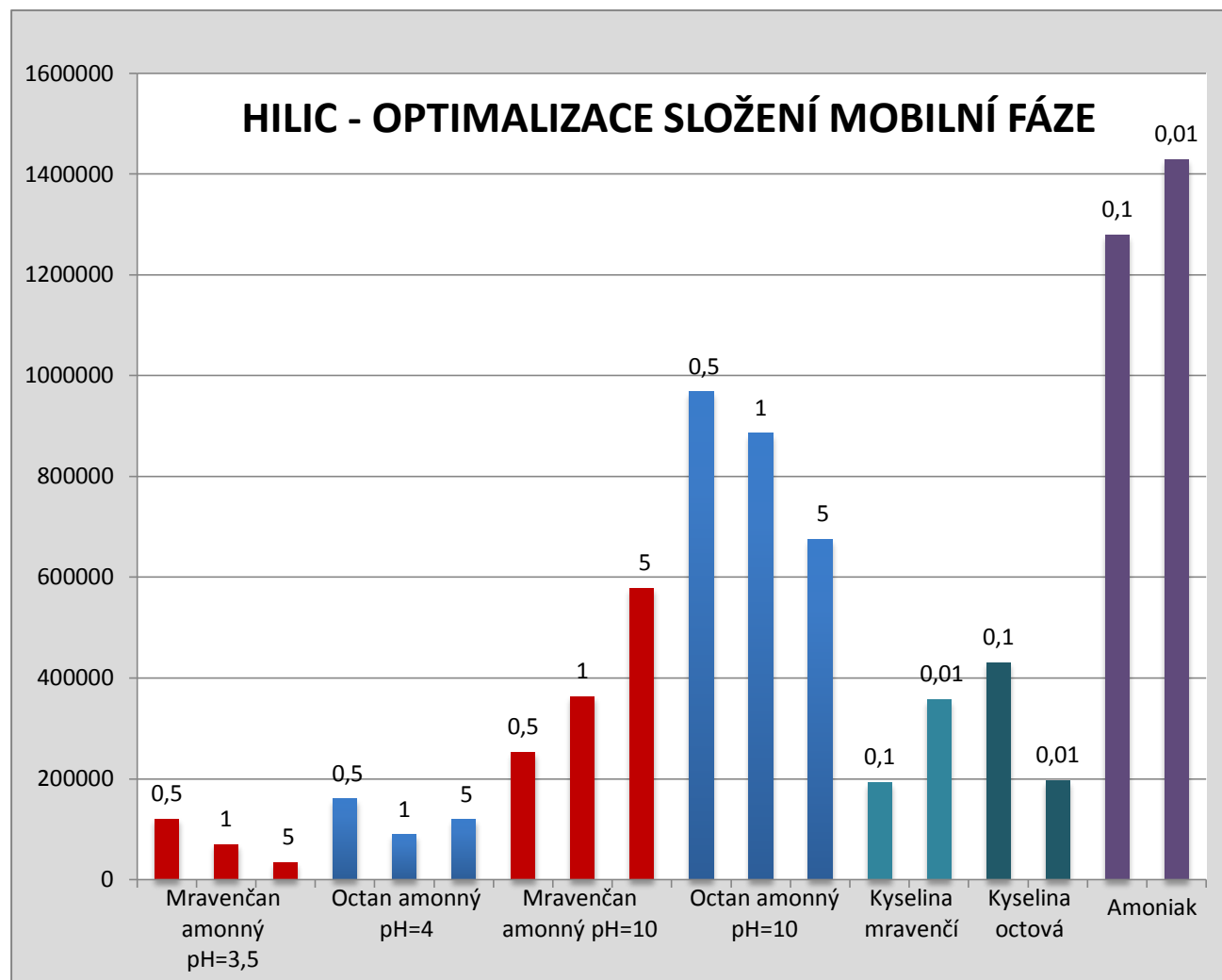
U HILIC metody pro stanovení entekaviru se opět nejprve pozoroval vliv procentuálního zastoupení vodné složky na retenční čas a na odezvu hmotnostního spektrometru (viz obr. 5.6). Z uvedených dat je zjevné výrazné zvýšení retenčního času nad 70 % organické složky (acetonitrilu). Zároveň dochází i ke zvýšení odezvy MS. Vzhledem k obvyklé délce analýzy byl zvolen jako optimální poměr 75 % acetonitrilu ku 25 % vodné složky, což odpovídá retenčnímu času kolem 1,5 minuty.



Obrázek 5.6: Vliv procentuálního zastoupení vodné složky na retenci a odpověď MS.

Pro optimalizaci vodné složky byla použita stejná činidla, jako v případě RP (viz obr. 5.7). Vzhledem k tomu, že se při HILIC metodě účastní na retenci hned několik mechanismů, vliv pH hrál důležitější roli oproti optimalizaci na RP. Z hlediska citlivosti detekce se opět jevila jako nejvhodnější látka hydroxid amonný, nicméně opět nevyhovoval z hlediska opakovatelnosti metody. Z tohoto důvodu nebylo vhodné použít ani pufrů o bazickém pH. Naopak vhodnou opakovatelnost vykazovala kyselina octová a pufrů o kyselém pH. Nakonec byly pro HILIC vybrány 3 látky (kyselina octová 0,1%, mravenčan amonný 0,5 mM a 5 mM) a jedna látka pro RP (kyselina mravenčí 0,01 %) k následné další analýze a porovnání v několika dalších kritériích. Dle posuzovaných parametrů jako opakovatelnost, citlivost, robustnost a správnost metody byl vybrán jako nejvhodnější octan amonný o koncentraci 5 mM o pH 4,0 pro kolonu HILIC. Parametry linearity všech čtyř látek znázorňují obr. 5.8, 5.9, 5.10 a 5.11.

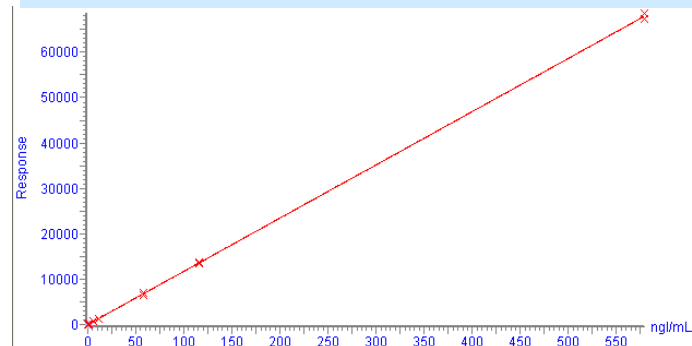
Mobilní fáze/ACN		Odpověď MS
pH = 3,5	mravenčan amonný 0,5 mM	121299
	mravenčan amonný 1 mM	70578
	mravenčan amonný 5 mM	35146
pH = 4	octan amonný 0,5 mM	160085
	octan amonný 1 mM	89704
	octan amonný 5 mM	119492
pH = 10	mravenčan amonný 0,5 mM	253415
	mravenčan amonný 1 mM	364493
	mravenčan amonný 5 mM	578922
pH = 10	octan amonný 0,5 mM	967642
	octan amonný 1 mM	885579
	octan amonný 5 mM	675142
kyselina mravenčí 0,1		192878
kyselina mravenčí 0,01		357469
kyselina octová 0,1		431370
kyselina octová 0,01		197346
Amoniak 0,1		1279465
Amoniak 0,01		1429504



Obrázek 5.7: Optimalizace složení mobilní fáze - hydrofilní interakční chromatografie.

	Name	Type	Std. Conc	RT	Area	Sec.Area	IS Area	Response	Detection Flags	ng/mL	%Dev	S/N
1	2011 11 22 RP blank cal4	Blank		1.632	22.022			22.022	bb	0.2		16.738
2	2011 11 22 RP blank cal5	Blank		1.617	26.319			26.319	bb	0.3		19.131
3	2011 11 22 RP blank cal6	Blank		1.627	22.995			22.995	MM	0.2		11.186
4	2011 11 22 RP CAL 10-10	Standard	0.116	1.617	41.278			41.278	bb	0.4	233.0	21.776
5	2011 11 22 RP CAL 10-10B	Standard	0.116	1.627	41.032			41.032	bb	0.4	231.2	24.857
6	2011 11 22 RP CAL 5 10-10	Standard	0.579	1.627	90.980			90.980	bb	0.8	39.7	41.223
7	2011 11 22 RP CAL 5 10-10B	Standard	0.579	1.612	91.133			91.133	bb	0.8	40.0	46.335
8	2011 11 22 RP CAL 10-9	Standard	1.158	1.592	151.418			151.418	bb	1.3	14.3	54.407
9	2011 11 22 RP CAL 10-9B	Standard	1.158	1.617	156.243			156.243	bb	1.4	17.9	58.543
10	2011 11 22 RP CAL 5 10-9	Standard	5.790	1.622	669.109			669.109	bb	5.7	-0.9	348.169
11	2011 11 22 RP CAL 5 10-9B	Standard	5.790	1.627	727.518			727.518	bb	6.2	7.7	108.730
12	2011 11 22 RP CAL 10-8	Standard	11.580	1.612	1309.138			1309.138	bb	11.2	-3.4	766.499
13	2011 11 22 RP CAL 10-8B	Standard	11.580	1.617	1365.602			1365.602	bb	11.7	0.8	727.355
14	2011 11 22 RP CAL 5 10-8	Standard	57.900	1.617	6559.281			6559.281	bb	55.9	-3.4	2296.267
15	2011 11 22 RP CAL 5 10-8B	Standard	57.900	1.612	6863.033			6863.033	bb	58.5	1.1	2808.358
16	2011 11 22 RP CAL 10-7	Standard	115.800	1.617	13484.257			13484.257	bb	114.9	-0.7	4741.321
17	2011 11 22 RP CAL 10-7B	Standard	115.800	1.617	13648.774			13648.774	MM	116.3	0.5	4582.134
18	2011 11 22 RP CAL 5 10-7	Standard	579.000	1.617	67324.289			67324.289	MM	573.8	-0.9	18351.811
19	2011 11 22 RP CAL 5 10-7B	Standard	579.000	1.612	68578.070			68578.070	MM	584.4	0.9	13825.774

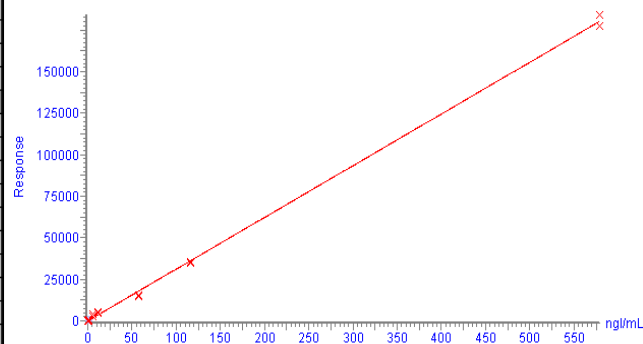
Compound name: ENTECAVIR
Correlation coefficient: $r = 0.999943$, $r^2 = 0.999886$
Calibration curve: $117.346 * x + -3.96789$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Obrázek 5.8: Kalibrační křivka - **RP** - kyselina mravenčí 0,01%.

#	Name	Type	Std. Conc	RT	Area	Sec.Area	IS Area	Response	Detection Flags	ng/mL	%Dev	S/N
1	2011 11 22 HILIC 2blank cal13											
2	2011 11 22 HILIC 2blank cal14B											
3	2011 11 22 HILIC 2blank cal15B											
4	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-10	Standard	0.116	1.975	92.967			92.967	bb	0.3	149.5	49.147
5	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-10B	Standard	0.116	1.995	119.243			119.243	MM	0.4	222.4	59.481
6	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-10	Standard	0.579	2.015	320.558			320.558	bb	1.0	76.2	125.821
7	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-10B	Standard	0.579	2.030	367.220			367.220	MM	1.2	102.1	159.106
8	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-9	Standard	1.158	2.040	829.294			829.294	bb	2.7	129.2	344.924
9	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-9B	Standard	1.158	2.040	986.318			986.318	bb	3.2	172.8	431.169
10	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-9	Standard	5.790	2.040	3918.142			3918.142	MM	12.6	117.2	1336.205
11	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-9B	Standard	5.790	2.040	2559.049			2559.049	MM	8.2	41.8	947.543
12	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-8	Standard	11.580	2.040	4664.318			4664.318	MM	15.0	29.3	2159.413
13	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-8B	Standard	11.580	2.035	5414.895			5414.895	MM	17.4	50.1	1871.550
14	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-8	Standard	57.900	2.035	14735.916			14735.916	MM	47.3	-18.3	5595.598
15	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-8B	Standard	57.900	2.030	15157.702			15157.702	MM	48.7	-15.9	5275.426
16	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-7	Standard	115.800	2.030	34719.250			34719.250	MM	111.5	-3.7	14706.190
17	2011 11 22 HILIC2 CAL 10-7B	Standard	115.800	2.030	35330.922			35330.922	MM	113.5	-2.0	12773.583
18	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-7	Standard	579.000	2.025	177256.922			177256.922	MM	569.4	-1.7	49699.465
19	2011 11 22 HILIC2 CAL 5 10-7B	Standard	579.000	2.020	184165.266			184165.266	MM	591.6	2.2	50113.805

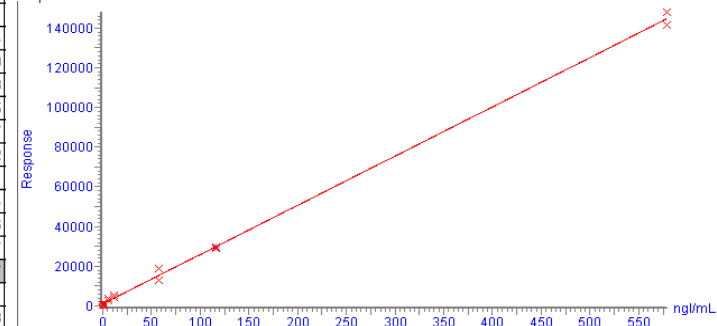
Compound name: ENTECAVIR
Correlation coefficient: $r = 0.999483$, $r^2 = 0.998965$
Calibration curve: $311.294 * x + 3.02158$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Obrázek 5.9: Kalibrační křivka - **HILIC** - kyselina octová 0,1%.

#	Name	Type	Std. Conc	RT	Area	Sec Area	IS Area	Response	Detection Flags	ngl/mL	%Dev	S/N
1	2011 11 25 HILIC blank cal4	Blank		1.577	4.120			4.120	bbl			4.520
2	2011 11 25 HILIC blank cal5	Blank		1.652	49.850			49.850	bbl			12.155
3	2011 11 25 HILIC blank cal6	Blank		1.602	56.214			56.214	bbl			16.749
4	2011 11 25 HILIC CAL 10-10	Standard	0.116	1.597	289.463			289.463	bbl			125.030
5	2011 11 25 HILIC CAL 10-10B	Standard	0.116	1.582	318.470			318.470	bbXI			127.510
6	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-10	Standard	0.579	1.567	863.399			863.399	MM			333.851
7	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-10B	Standard	0.579	1.536	800.585			800.585	bbl			361.604
8	2011 11 25 HILIC CAL 10-9	Standard	1.158	1.531	1109.263			1109.263	bb	0.0	-99.4	524.909
9	2011 11 25 HILIC CAL 10-9B	Standard	1.158	1.531	404.812			404.812	bbl			195.063
10	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-9	Standard	5.790	1.526	3630.771			3630.771	bb	10.2	75.8	1398.395
11	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-9B	Standard	5.790	1.526	2954.469			2954.469	bb	7.4	28.7	1388.107
12	2011 11 25 HILIC CAL 10-8	Standard	11.580	1.526	5147.557			5147.557	bb	16.3	40.7	2104.422
13	2011 11 25 HILIC CAL 10-8B	Standard	11.580	1.526	4395.761			4395.761	MM	13.3	14.5	2278.881
14	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-8	Standard	57.900	1.526	18997.639			18997.639	MM	72.2	24.6	7692.664
15	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-8B	Standard	57.900	1.526	12871.136			12871.136	bb	47.5	-18.0	5830.486
16	2011 11 25 HILIC CAL 10-7	Standard	115.800	1.526	28959.752			28959.752	bb	112.3	-3.0	9255.247
17	2011 11 25 HILIC CAL 10-7B	Standard	115.800	1.526	29504.869			29504.869	bb	114.5	-1.1	8616.017
18	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-7	Standard	579.000	1.526	141434.969			141434.969	bb	566.0	-2.2	21292.171
19	2011 11 25 HILIC CAL 5 10-7B	Standard	579.000	1.526	147953.297			147953.297	MM	592.3	2.3	24226.203

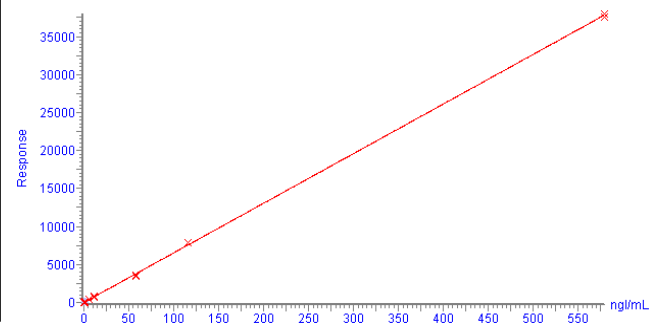
Compound name: ENTECAVIR
Correlation coefficient: $r = 0.999310$, $r^2 = 0.998620$
Calibration curve: $247.908 * x + 1107.65$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Obrázek 5.10: Kalibrační křivka - HILIC - octan amonný 0,5 mM pH = 4.

#	Name	Type	Std. Conc	RT	Area	Sec Area	IS Area	Response	Detection Flags	ngl/mL	%Dev	S/N
1	2011 11 22 HILIC blank cal4	Blank		1.531	3.511			3.511	bb	0.0		2.246
2	2011 11 22 HILIC blank cal5	Blank		1.441	0.647			0.647	bbl			1.194
3	2011 11 22 HILIC blank cal6	Blank		1.602	0.807			0.807	bbl			1.085
4	2011 11 22 HILIC CAL 10-10	Standard	0.116	1.506	23.009			23.009	MM	0.3	175.5	11.060
5	2011 11 22 HILIC CAL 10-10B	Standard	0.116	1.511	30.324			30.324	MM	0.4	272.2	13.116
6	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-10	Standard	0.579	1.516	51.107			51.107	bb	0.7	29.4	25.494
7	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-10B	Standard	0.579	1.511	43.962			43.962	bb	0.6	10.5	16.844
8	2011 11 22 HILIC CAL 10-9	Standard	1.158	1.511	74.907			74.907	bb	1.1	-3.8	32.305
9	2011 11 22 HILIC CAL 10-9B	Standard	1.158	1.516	93.342			93.342	bb	1.4	20.5	37.875
10	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-9	Standard	5.790	1.511	356.931			356.931	bb	5.4	-6.2	164.904
11	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-9B	Standard	5.790	1.506	360.506			360.506	bb	5.5	-5.3	200.166
12	2011 11 22 HILIC CAL 10-8	Standard	11.580	1.506	769.821			769.821	bb	11.8	1.5	378.442
13	2011 11 22 HILIC CAL 10-8B	Standard	11.580	1.506	724.895			724.895	bb	11.1	-4.5	373.156
14	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-8	Standard	57.900	1.506	3525.344			3525.344	bb	53.9	-6.9	959.284
15	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-8B	Standard	57.900	1.511	3501.186			3501.186	bb	53.6	-7.5	1849.641
16	2011 11 22 HILIC CAL 10-7	Standard	115.800	1.506	7891.152			7891.152	bb	120.8	4.3	3491.434
17	2011 11 22 HILIC CAL 10-7B	Standard	115.800	1.511	7857.979			7857.979	bb	120.3	3.8	3049.074
18	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-7	Standard	579.000	1.506	37968.750			37968.750	bb	581.2	0.4	10448.747
19	2011 11 22 HILIC CAL 5 10-7B	Standard	579.000	1.506	37616.664			37616.664	bb	575.8	-0.6	11757.764

Compound name: ENTECAVIR
Correlation coefficient: $r = 0.999915$, $r^2 = 0.999829$
Calibration curve: $65.3273 * x + 2.16684$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Obrázek 5.11: Kalibrační křivka - HILIC - octan amonný 5 mM pH = 4.

5.3 Optimalizace metody pro přípravu vzorku

Výběr vhodné extrakční kolony se zdál být zcela zásadním krokem při přípravě vzorku biologického materiálu. Používaná extrakční kolona HLB Oasis (1 ml, 30 mg) vykazovala vhodnou selektivitu vůči stanovované látce. Proces přípravy vzorku byl optimalizován následovně (viz tab. 5.4).

Waters OASIS HLB 1 ml, 30 mg			
Kondicionace	Aplikace vzorku	Promýání	Eluce
1 ml ACN + 1 ml H ₂ O	500 µl vzorku	2x1 ml H ₂ O	1 ml 75 % ACN

Tabulka 5.4: Postup při extrakci na tuhé fázi.

Při optimalizaci promývacího činidla byl nejprve použit acetonitril o koncentracích 10, 20, 30 a 40 % ve vodě. Nicméně již při nízké koncentraci (20 %) docházelo k nežádoucímu vymývání vzorku entekaviru z kolony, tudíž byla k promývacímu procesu zvolena voda, ve dvou krocích po 1 ml. Jako eluční činidlo byl zvolen acetonitril v koncentraci 75 % ve vodě, přičemž optimalizace proběhla se 70, 75, 80, 85, 90 % roztoky. Se zvyšující se koncentrací ACN se výtěžnost téměř neměnila. Vzhledem k tomu, že mobilní fáze HILIC byla ze 75 % složena z acetonitrilu, použití této koncentrace pro eluci analytu znamenalo urychlení analýzy vynecháním mnohdy časově náročného kroku odpařování a znovurozpuštění v mobilní fázi. Co se týče objemu elučního činidla, eluce 500 µl, byla nedostatečná, proto byl zvolen objem 1 ml. SPE eluát byl před analýzou filtrován přes stříkačkové filtry (0,22 µm).

5.4 Validace metody

Následující parametry validace byly zkoumány na optimalizovaném systému HILIC se stacionární fází Acquity BEH Amide o složení mobilní fáze: octan amonný 5 mM pH = 4/ACN (25:75). Jako vnitřní standard byl použit izotopicky značený entekavir - C₂¹³N¹⁵, jenž vykazoval dokonalou koeluci se standardem entekaviru, což je základní požadavek pro správnou kvantifikaci v UHPLC-MS analýze.

Opakovatelnost plochy píků a retenčního času.

V jednotlivých koncentračních hladinách byla v 6 sériích měřena opakovatelnost nástřiků, přičemž byl sledován retenční čas a plocha píků. Byla hodnocena relativní směrodatná odchylka (RSD). Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce 5.5.

	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml
Retenční čas [%RSD]	0,00	0,00	0,23
Plocha píku [%RSD]	1,81	2,48	3,65

Tabulka 5.5: Opakovatelnost nástřiků ve třech koncentračních hladinách.

Zkoušena byla také opakovatelnost mezi jednotlivými měřeními kalibračních křivek. Jednotlivé parametry včetně % RSD shrnuje tabulka 5.6.

	Inter-denní			
	Intra-denní			1. Kalibrační křivka
	1. Kalibrační křivka	2. Kalibrační křivka	3. Kalibrační křivka	
Rovnice regrese	61,8435x-112,522	60,9752x-105,119	62,0486x-118,828	65,3273x+2,16684
Korelační koeficient	0,9998	0,9997	0,9995	0,9998
Směrnice	61,8435	60,9752	62,0486	65,3273
Průměr směrnice	61,6224			62,5487
Směrodatná odchylka [%]	0,5698			1,9100
[RSD%]	0,92			
	3,05			

Tabulka 5.6: Opakovatelnost měření kalibračních křivek.

Přenos analytu (carry-over effect)

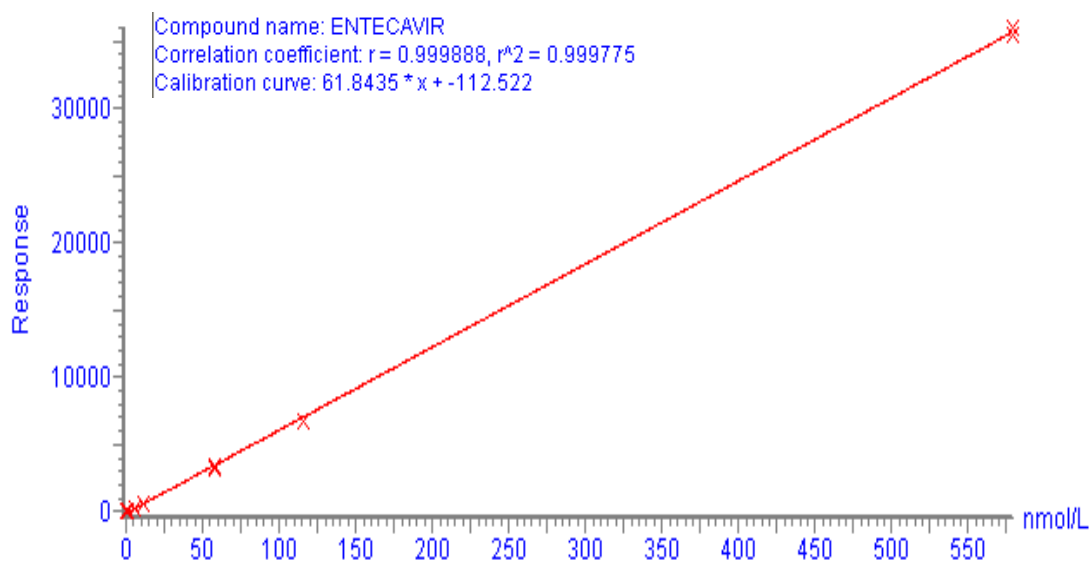
Jestli dochází k přenosu analytu mezi jednotlivými měřenými vzorky, bylo zjištěno vizuálně pomocí nástřiku samotné mobilní fáze. Byl pozorován velmi nízký výskyt přenosu analytu mezi nástřiky (< 0,5 %) při vyšší koncentraci entekaviru, řádově 500 ng/ml. Pro zamezení těchto efektů při stanovení neznámých vzorků o případném širším rozsahu koncentrací byl mezi tyto vzorky nastříknut pouze roztok mobilní fáze (blank).

Linearita a kalibrační rozsah

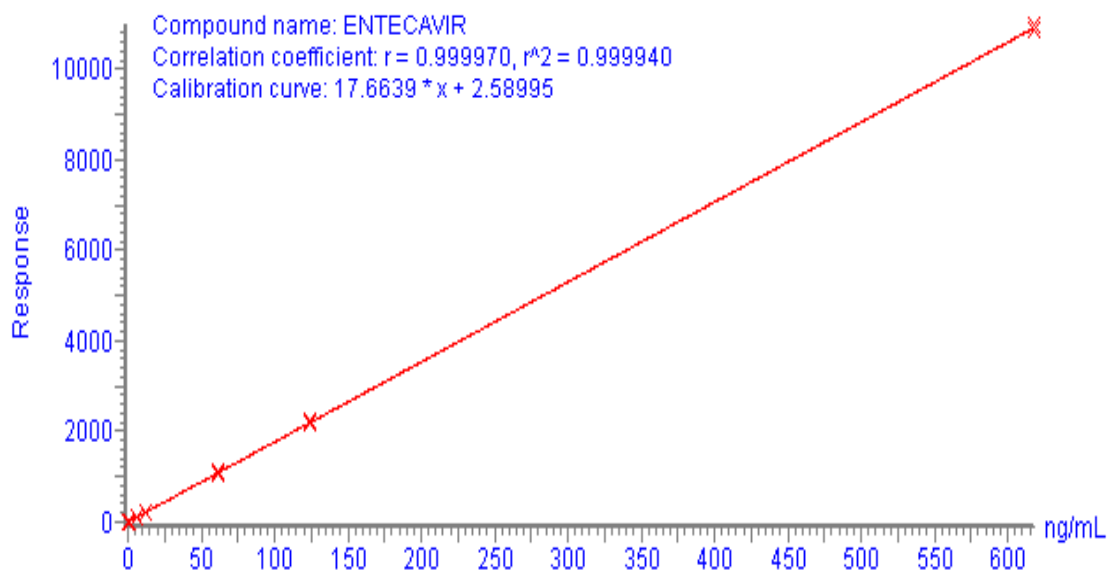
Linearita byla ověřena sestrojením jak standardní, tak matricové kalibrační křivky (viz obr. 5.12 a 5.13). Standardní kalibrační křivka měřená v rozsahu 50 pg - 500 ng/ml vykazovala stejně jako matricová výbornou linearitu s hodnotou korelačního koeficientu 0,9998. Matricová kalibrační křivka byla založena na měření roztoků potkaní moči s přidavkem standardů entekaviru v rozsahu 100 pg – 500 ng/ml o linearitě 0,9999. Shrnutí těchto parametrů s limity detekce a kvantifikace obsahuje tabulka 5.7. Vyšší limit kvantifikace u matricových vzorků lze vysvětlit ředěním v průběhu elučního procesu extrakce na tuhé fázi. Na kolonu bylo aplikováno 500 µl vzorku, následně byl analyt eluován 1 ml 75 % acetonitrilu.

	Standardní kalibrační křivka	Matricová kalibrační křivka
Korelační koeficient	0,9998	0,9999
Limit detekce	15 pg/ml	30 pg/ml
Limit kvantifikace	50 pg/ml	100 pg/ml
Rozsah	50 pg – 500 ng/ml	100 pg – 500 ng/ml

Tabulka 5.7: Validační parametry - linearita a kalibrační rozsah.



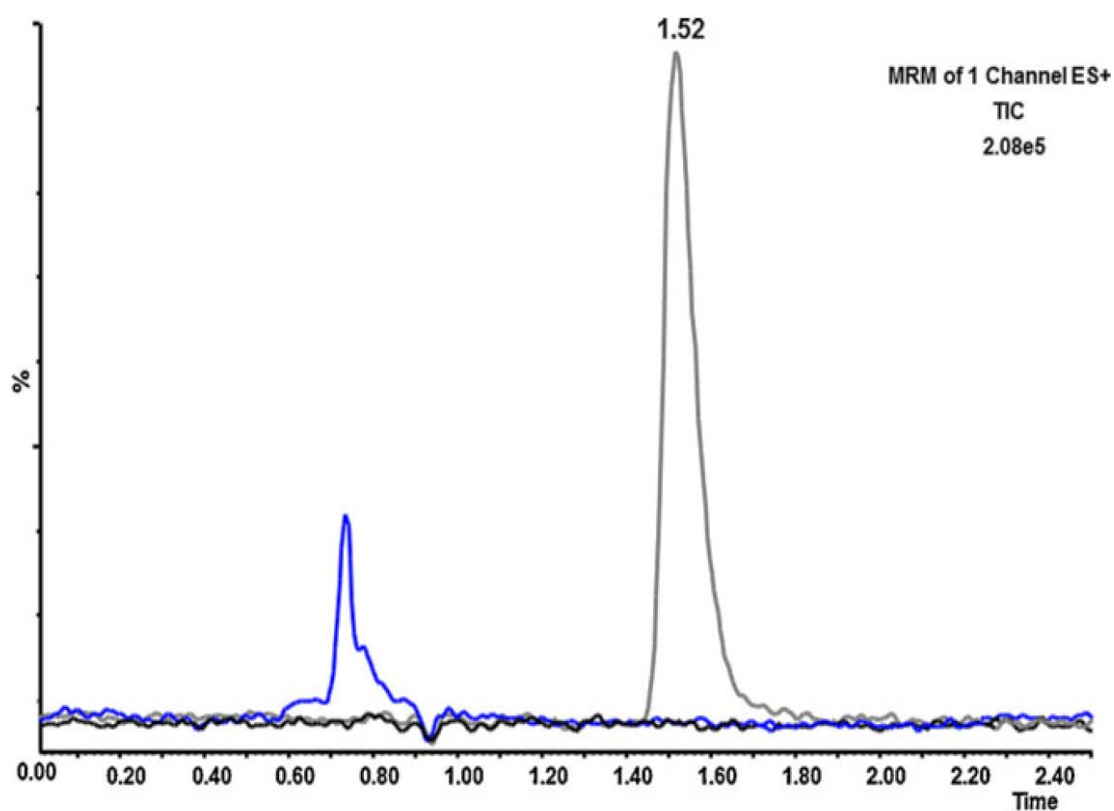
Obrázek 5.12: Standardní kalibrační křivka



Obrázek 5.13: Matricová kalibrační křivka.

Matricové efekty

Matricové efekty byly stanoveny dvěma způsoby. Byla použita metoda post-kolonové infuze a metoda post-extrakčního přidavku. Metodou post-kolonové infuze (viz obr. 5.14) byly porovnány chromatogramy standardu entekaviru, použité mobilní fáze a vzorek moči (blank) po SPE. Z porovnaných chromatogramů je patrný vliv matricového efektu v retenčním čase okolo 0,72. Vzhledem k tomu, že se retenční čas entekaviru pohyboval podstatně dále na chromatogramu (1,52), při této metodě post-kolonové infuze nebylo pozorováno ovlivnění analýzy matricovými efekty.



Obrázek 5.14: Určení matricových efektů metodou post-kolonové infuze.
Modrá – Vzorek moči (po SPE), *šedá* – standard EV, *černá* – pouze mobilní fáze.

Při druhé metodě, kdy byly roztoky s post-extrakčním přidavkem analytu porovnány se standardními roztoky, nebyly matricové efekty taktéž ve výrazné míře pozorovány (< 15 %). Tabulka 5.8 ukazuje výskyt matricových efektů na jednotlivých koncentračních hladinách.

Přesnost, správnost, výtěžnost

Metoda taktéž poskytla dobré výsledky, co se týče přesnosti, správnosti a výtěžnosti. Správnost metody potvrzovala méně než 5 % chyba, výtěžnost se pohybovala v intervalu 87 – 109 %. Přesnost byla stanovena pomocí relativní směrodatné odchylky do 3 %.

KONCENTRACE	MATRICOVÉ EFEKTY [%]	VÝTĚŽNOST [%]	EFEKTIVNOST [%]	PŘESNOST [%RSD]	SPRÁVNOST [% CHYBY]
10-9	90,6	87,2	79,1	2,9	4,1
10-8	85,7	100,2	85,9	3,1	-4,6
10-7	94,9	108,5	103,0	0,9	-1,2

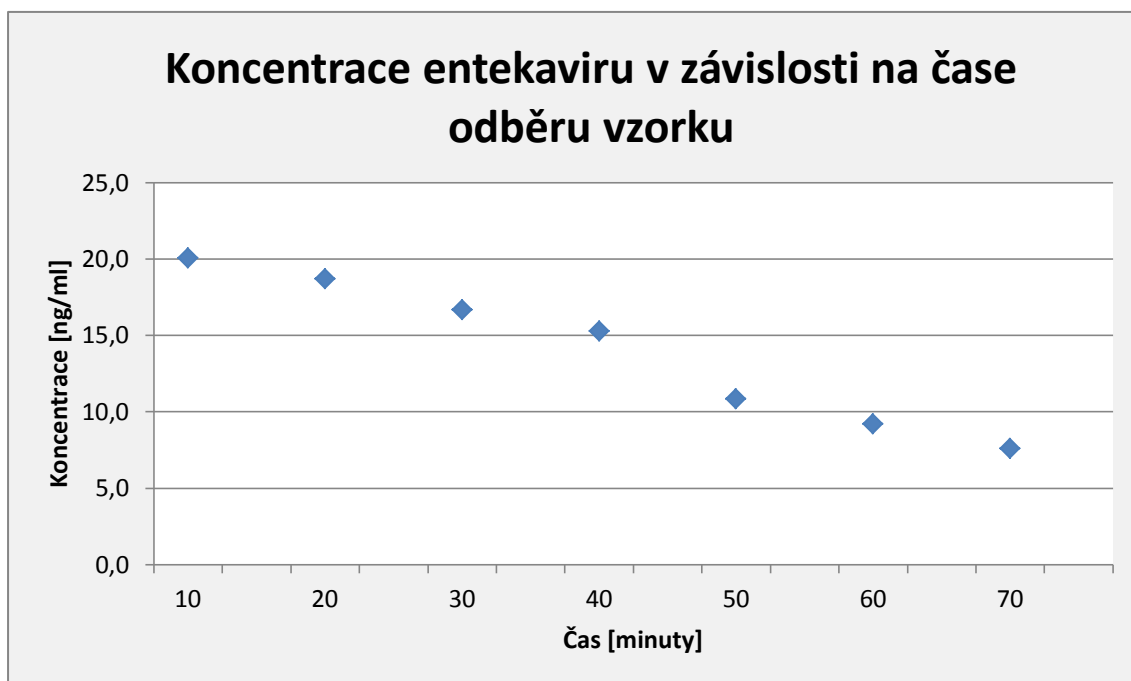
Tabulka 5.8: Validací parametry v jednotlivých koncentračních hladinách.

5.5 Reálné vzorky

Za použití vnitřního standardu a matricové kalibrační křivky (viz obr. 5.13) byly kvantifikovány reálné vzorky, které byly získány z experimentů pomocí metody perfundované ledviny potkana. Každý vzorek byl dvakrát analyzován a z průměrů ploch píků byla vypočtena koncentrace. Tabulka 5.9 znázorňuje naměřené koncentrace v ng/ml v různém čase odběrů vzorků. Je patrné, že s narůstajícím časem odběru vzorku koncentrace entekaviru klesá (viz obr. 5.15). Při výpočtu výsledné koncentrace bylo nutné počítat s naředěním vzorku během SPE a tedy násobit koncentraci dvěma. Stanovené koncentrace reálných vzorků entekaviru byly naměřeny ve validovaném koncentračním rozmezí (100 pg – 500 ng/ml), vysoko nad limitem kvantifikace.

Vzorek	Čas odběru vzorku (min.)	Koncentrace u 2 měřených vzorků [ng/ml]	Výsledná koncentrace [ng/ml]
VZOREK 1	10	9,6	20,1
		10,4	
VZOREK 2	20	9,6	18,7
		9,1	
VZOREK 3	30	8,5	16,7
		8,2	
VZOREK 4	40	7,4	15,3
		7,9	
VZOREK 5	50	5,6	10,9
		5,2	
VZOREK 6	60	4,4	9,2
		4,8	
VZOREK 7	70	4,0	7,6
		3,6	

Tabulka 5.9: Stanovení reálných vzorků.



Obrázek 5.15: Stanovení koncentrace entekaviru v reálných vzorcích.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout dostatečně citlivou a rychlou metodu pro stanovení entekaviru s využitím UHPLC-MS/MS, což zahrnovalo optimalizaci jak na úrovni chromatografie, tak na úrovni hmotnostního spektrometru. Hlavní nástrojem pro získání citlivé a spolehlivé metody bylo použití hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), která vykazovala oproti srovnávané reverzní chromatografii vyšší správnost, citlivost a linearitu. Jako stacionární fáze byly vybrány UHPLC kolony Acquity BEH Amide (HILIC) a Acquity BEH C18 (RP). Mobilní fáze byly optimalizovány na složení octan amonný 5 mM pH = 4/ACN v poměru 25:75 pro metodu HILIC a kyselina mravenčí 0,01 % /ACN v poměru 96:4 pro reverzní chromatografii.

Na úrovni MS byly zvoleny optimální parametry iontového zdroje, v základním skenu byl nalezen nejvhodnější prekurzor a nastavena dostatečná kolizní energie pro získání nejlepší odezvy při SRM analýze. Pro získání analytu z biologické matrice byla s výhodou použita technika extrakce na tuhé fázi. K eluci analytu byl použit 75 % ACN, tudíž bylo možno vynechat krok odpařování, vzhledem k tomu, že mobilní fáze obsahuje ACN ve stejné koncentraci.

Nově vyvinutá metoda nabízí oproti již publikovaným metodám snížení doby analýzy při zachování dostatečné citlivosti a přesnosti. Limit detekce se pohybuje na vyšší úrovni (100 pg/ml) z důvodu dvojnásobného naředění analytu při SPE extrakci, nicméně tento krok byl jednou ze strategií, jak snížit vliv matricových efektů, které byly v předchozích pracích popsány jako jeden z hlavních problémů analýzy. Další strategie, jako je použití selektivní techniky extrakce vzorku (SPE), UHPLC separace, HILIC chromatografie a hlavně použití izotopicky značeného vnitřního standardu entekaviru C₂¹³N¹⁵ rovněž přispěly k eliminaci matricových efektů, jejichž vliv zjištěný metodou post-kolonové infuze a post-extrakčního přídatku byl zanedbatelný (< 15 %). Parametry jako citlivost (LOQ = 100 pg/ml), správnost (< 5% chyby), přesnost (< 3% RSD), výtěžnost (87 - 109 %), urychlení analýzy a eliminace matricových efektů svědčí o vhodnosti této metody pro stanovení entekaviru v biologickém materiálu.

7 Literatura

- [1] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784-1821.
- [2] K. J. Fountain, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 740-751.
- [3] Alpert, A.J, *J. Chromatogr. A* 449 (1990) 177-196.
- [4] J. Vacek, L. Onofrejevová, B. Klejdus, V. Kubáň, *Chem. listy* 103 (2009) 381-385.
- [5] www.sequant.com (01/2013).
- [6] *A Practical Guide to HILIC*, SeQuant, ISBN: 978-91-631-8370-6 (2006).
- [7] A. E. Karatapanis, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 2871–2879.
- [8] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1-25.
- [9] www.hplc.cz (01/2013).
- [10] P. Jandera, *Chemagazín* 2 (2011) 8-9.
- [11] B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231-247.
- [12] <http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-HILIC.html> (01/2013).
- [13] B.A. Olsen, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 113-122.
- [14] S. M. Han, *B. Chromatogr.* 11 (1997) 259–271.
- [15] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71-80.
- [16] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836-1848.
- [17] holcapek.upce.cz (02/2013).
- [18] J. S. Becker, *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and application*, ISBN 978-0-470-01-200-0 (2008).
- [19] <http://www.princeton.edu/chemistry/macmillan/group-meetings/SL-mass%20spect.pdf> (02/2013).
- [20] J. H. Gross, *Mass Spectrometry A*, ISBN 978-3-642-10709-2 (2011).
- [21] R. Ekman et al., *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation and applications*, ISBN: 978-0-471-71395 (2008).
- [22] M. Holčapek, *Sborník přednášek: Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie*, ISBN: 80-7194-390-8 (2001).
- [23] M. C. McMaster, *LC/MS practical user guide*, ISBN 978-0-471-65531-2 (2005).
- [24] http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_exper_vyzkum_cast3.pdf (02/2013).
- [25] H. Kataoka, *Trends. Anal. Chem.* 22 (2003) 232-244.
- [26] L. Nováková, H. Vlčková, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8-35.

- [27] S. Mitra, *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, ISBN: 978-0-471-32845-2 (2003).
- [28] www.sigmaaldrich.com, *Guide to solid phase extraction* (03/2013).
- [29] C. F. Poole, *Trends. Anal. Chem.* 22 (2003) 362-373.
- [30] J. R. Dean, *Extraction techniques in analytical sciences*, ISBN: 978-0-470-68250-0 (2003).
- [31] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, ISBN: 80-86369-07-2 (2003).
- [32] P. J. Taylor, *Clin Biochem.* 38 (2005) 328-334.
- [33] <http://www.slideshare.net/amitpatel745/matrix-effect-7614914>, D. Kumar, A. Patel, *Bioanalytical Research, Veeda CR* (03/2013).
- [34] T. G. Hall et al., *Tandem Mass Spectrometry – Application and Principles*, ISBN 978-953-51-0141-3 (2007).
- [35] H. Trufelli et al., *Mass Spectrometry Reviews* 30 (2011) 491-509.
- [36] F. Gosetti et al., *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3929-3937.
- [37] E. Chambers et al., *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 22-34.
- [38] E. Klapková, *Klin. Biochem. Metab.* 19 (2011).
- [39] L. Nováková, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 25-37
- [40] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf (04/2013).
- [41] G. A. Shabir, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 57-66.
- [42] J. Šperl, *Remedia* 15 (2005) 67-74.
- [43] J. Hobstová, A. Vitouš, *Česko-slovenská patologie* 47 (2011) 44-49.
- [44] D. Lavanchy, *J. Clin. Virol.* 34 (2005) S1-S3.
- [45] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html> (03/2013).
- [46] S. J. Matthews, *Clinical therapeutics* 28 (2006) 184-203.
- [47] J. Špičák, *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*, ISBN: 978-80-247-6769-7 (2007).
- [48] F. Zoulim, *J. Clin. Virol.* 36 (2006) 8-12.
- [49] www.drugbank.ca/drugs/DB00442 (03/2013).
- [50] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000623/WC500051985.pdf (03/2013).
- [51] D. Zhang, Y. Fu, J. P. Gale, A. F. Aubry, M. E. Arnold, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1027-1033.

- [52] B. R. Challa, B. Z. Awen, B. R. Chandu, S. Rihanaparveen, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 769-776.
- [53] F. J. Zhao, H. Tang, Q.H. Zhang, J. Yang, A. K. Davey, J.P. Wang, *J. Chromatogr. B* 881-882 (2012) 119-125.
- [54] L. Nováková, T. Gottvald, H. Vlčková, F. Trejtnar, J. Mandíková, P. Solich, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 237 – 243.

8 Přílohy

Příloha A

Journal of Chromatography A, 1259 (2012) 237-243

Práce byla v roce 2012 publikována v periodiku Journal of Chromatography A.

Journal of Chromatography A, 1259 (2012) 237-243



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Impact Factor (2011): **4.531**
(© Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012)

5-Year Impact Factor: **4.362**

Imprint: ELSEVIER
ISSN: 0021-9673



Highly sensitive fast determination of entecavir in rat urine by means of hydrophilic interaction chromatography–ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Lucie Nováková^{a,*}, Tomáš Gottvald^a, Hana Vlčková^a, František Trejtnar^b, Jana Mandíková^b, Petr Solich^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 1 April 2012

Keywords:
Entecavir
Hydrophilic interaction chromatography (HILIC)
UHPLC
MS/MS
Solid phase extraction
Rat urine

ABSTRACT

Entecavir is a deoxyguanosine nucleotide antiviral agent with the activity against hepatitis B virus (HBV). The agent possesses a polar structure, which is predetermined for hydrophilic interaction chromatography (HILIC). Novel, fast and sensitive HILIC–UHPLC method developed in this study included separation from matrix component on BEH Amide stationary phase by isocratic elution using binary mobile phase composed of acetonitrile/5 mM ammonium acetate pH 4.0 (75:25) at flow-rate 0.3 ml/min. Analysis under RP–UHPLC conditions was also possible on BEH C18 stationary phase with mostly aqueous binary mobile phase composed of (4:96) acetonitrile/0.01% formic acid. The comparison of sensitivity of the two UHPLC–MS/MS methods both using selected reaction monitoring (SRM) for quantitation revealed only slightly higher sensitivity for HILIC determination, however much better method linearity, repeatability and accuracy. HILIC separation mode provided also more convenient conditions for straightforward coupling with solid phase extraction (SPE). Entecavir was extracted on Oasis HLB cartridge (1 ml, 30 mg) and eluted by 75% acetonitrile in water, which is actually the HILIC mobile phase used in this study. Therefore the evaporation/reconstitution step was omitted, which substantially accelerated the sample preparation step. The method was validated using stable isotopically labeled internal standard entecavir- $C_2^{13}N^{15}$, which is the most appropriate internal standard. Validation results demonstrated good method accuracy (with <5% error, and 26% at LOQ), recovery (87–114%), precision (<4% RSD), selectivity and sensitivity (LOQ = 100 pg/ml). The matrix effects determined by both post-column infusion method as well as post-extraction addition method were negligible (<15%).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Entecavir is a novel antiviral agent used in the treatment of hepatitis B virus (HBV). It is approved for the therapy of chronic hepatitis B similarly as five other drugs including interferon α -2a, lamivudine, telbivudine, pegylated interferon α -2a and adefovir dipivoxil [1]. Entecavir (2-amino-9-[(1-*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methylindencyclopentyl]-3*H*-purin-6-one) is a guanine nucleoside analogue, that inhibits HBV DNA polymerase at both the priming and elongation steps required for viral replication [2,3].

Entecavir, as a small (MW = 277.12) and polar molecule ($\log P = -1.110$), represents a significant challenge in bio-analytical method development. Due to its properties entecavir is not well-suited for conventional reversed-phase (RP) HPLC analysis and will

only be retained on the column and resolved from matrix interferences at increased aqueous phase volume ratio. Such mostly aqueous mobile phases are however known to reduce the sensitivity of mass spectrometry (MS) detection. In spite of this fact, recently developed bio-analytical methods for determination of entecavir in human plasma have all used RP–HPLC [4–6]. All of them also applied LC–MS/MS using different approaches and various sample preparation steps, mostly solid phase extraction (SPE) or salting-out liquid–liquid extraction (SALLE). In spite of using RP separation mode, reported method sensitivity was at low pg/ml level due to sample pre-concentration and high injection volumes, which however led to serious matrix effects.

On the other hand, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is an interesting tool for the analysis of polar compounds difficult to be retained in conventional RP systems. It provides completely different selectivity, good peak shape, high retention of polar compounds and additionally higher sensitivity in LC–MS detection due to enhanced ionization process, which is induced by mostly organic mobile phases used in HILIC [7,8].

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 381.
E-mail address: nol@email.cz (L. Nováková).

The most challenging issue of reliable bio-analytical method is however its accuracy and precision, which might be negatively influenced by the presence of matrix effects. Their determination recently became an important part of bio-analytical method validation [9]. There are many approaches that enable to reduce or compensate matrix effects. Among the most important, selective sample preparation approaches, efficient chromatographic separation and quantitation using stable isotopically labeled internal standards (SIL-IS) should be mentioned [10,11]. The latter is unfortunately often omitted even in newly developed LC-MS assays probably due to high cost of these standards and sometimes difficult availability [4–6]. Nevertheless, the choice of appropriate internal standard was pointed out to be crucial in order to obtain reliable results with different batches of biological materials, even in those studies using deuterium labeled SIL-IS that are supposed to compensate for any method variance. In several studies it was demonstrated, that under certain conditions high level of matrix suppression affected the ionization of analyte and its isotopically labeled analogue differently due to slight difference in retention time between the analyte and SIL-IS [12–15]. This phenomenon is supposed to be induced by deuterium isotope effect due to a small change in lipophilicity when exchanging hydrogen atom for deuterium. In all reported cases matrix effect seriously affected method accuracy and precision. For this reason, ^{13}C -, ^{15}N - or ^{17}O -labeled compounds are considered to be more appropriate than deuterium labeled internal standards. In most cases internal standards that are only structural analogues might become inappropriate. The main requirement for appropriate LC-MS internal standard is its co-elution with the analyte in order to assure stable analyte/internal standard peak area ratio and thus sufficient method accuracy and precision [10,11].

The aim of this work was to develop simple, sensitive, rapid and reliable analytical approach for the determination of entecavir by means of UHPLC-MS/MS with the aim to reduce matrix effect influence. In order to reach the goal a combination of following approaches was employed: (1) extraction and clean-up of sample by SPE; (2) dilution of sample during sample preparation step; (3) efficient UHPLC separation due to sub-2-micron particles; (4) separation selectivity and enhanced ionization due to HILIC conditions; (5) MS/MS detection using SRM experiment and (6) quantitation using SIL-IS with ^{13}C and ^{15}N labeling. The biological material originated from experiments with perfused rat kidney aimed to study renal excretion mechanisms of entecavir.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Reference standard of entecavir was obtained from Santa Cruz Biotechnology, USA. Reference standard of entecavir- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N was provided by Toronto Research Chemicals, Canada. Formic acid (98–100%, LC-MS grade) was obtained from Merck. Acetic acid (99.9%, LC-MS grade, Fluka), ammonium hydroxide (>25%, LC-MS grade, Fluka) and acetonitrile LC-MS grade were provided by Sigma Aldrich. Ultra-pure water was obtained with a Milli-Q reverse osmosis Millipore (Bedford, MA, USA) and met the requirements of the European Pharmacopoeia.

2.2. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

The LC-MS system consisted of UHPLC Acquity UPLC system (Waters, Prague, Czech Republic) and Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Prague, Czech Republic). The UHPLC system consisted of an ACQ-binary solvent manager,

an ACQ-sample manager and an ACQ column thermostat, where the analytical column was kept at 30 °C. All injected solutions were stored in the auto-sampler at 4 °C. The partial loop with needle overfill mode was set up to inject 2 μl (using 5 μl loop). Acetonitrile was used as a strong wash (200 μl), and 20% acetonitrile in water (800 μl) was used as a weak wash solvent in RP mode. In HILIC mode 80% of acetonitrile in water (600 μl) was used as a weak wash while 100% acetonitrile was a strong wash solvent (200 μl). Under HILIC conditions entecavir was retained on Acquity BEH Amide (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) analytical column using isocratic elution by mobile phase consisting of acetonitrile and 5 mM ammonium acetate pH 4.0 (75:25) at flow-rate 0.3 ml/min. Under RP conditions entecavir was retained on Acquity BEH C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) analytical column using isocratic elution by mobile phase consisting of acetonitrile and 0.01% formic acid (4:96) at flow-rate 0.3 ml/min.

An MS/MS triple quadrupole system Quattro Micro (Micromass, Manchester, GB) was equipped with a Multiple-Mode Ionisation Source (ESCI). The conditions were finely tuned in both HILIC and RP separation mode. An ion source in HILIC method was set-up in ESI positive ion mode as follows: capillary voltage: 3500 V, ion source temperature: 130 °C, cone voltage: 25 V, extractor: 3.0 V and RF lens: 0.3 V. The desolvation gas was nitrogen at a flow of 600 l/h and at temperature of 450 °C. Nitrogen was also used as a cone gas (150 l/h) to prevent contamination of the sample cone. The conditions for RP method were similar, except for capillary voltage, which required much lower value of 500 V. The triple quadrupole was set up to the SRM (selected reaction monitoring) experiment monitoring a quantifier transition of 277.9 > 152.2 (collision energy 15 eV) and a qualifier transition of 277.9 > 135.2 (collision energy 35 eV) for entecavir. For the internal standard entecavir- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N the transition of 280.9 > 155.2 was monitored (collision energy 15 eV). The dwell times were 150 ms. Argon was used as a collision gas at the optimum collision energy of 15 V. MassLynx 4.1 software was used for data MS control and data gathering. QuanLynx software was used for data processing, peak integration and linear regression.

2.3. Preparation of standard solutions

Stock solutions of both reference standards were prepared by dissolution of entecavir or internal standard entecavir- $^{13}\text{C}_2$ ^{15}N in water at the concentration 1 mg/ml. The stock solutions were further diluted by appropriate dilution media, which corresponded to the composition of mobile phase (75% ACN in water for HILIC, 5% ACN in water for RP separation).

2.4. Preparation of rat urine samples

Rat urine samples were obtained from experiments with the perfused rat kidneys focused on an analysis of quantitative parameters and mechanisms of entecavir renal excretion. Wistar rats (BioTest, Konarovice, Czech Republic) were used as the organ donors. The experiments with animals were approved by the Ethical Committee of the Pharmaceutical Faculty, Charles University in Prague, and were carried out in compliance with the respective Czech laws concerning animal protection.

Blank rat urine samples were always spiked by minimum amount of standard solutions (<5% of the whole prepared volume) to prevent excessive dilution of biological material and misinterpretation of results.

The extraction of entecavir from rat urine was performed by means of solid phase extraction (SPE) on Waters Oasis HLB cartridge (1 ml, 30 mg). The SPE protocol was as follows: (1) the cartridge was activated by 1 ml of acetonitrile followed by conditioning by 1 ml of water. (2) 500 μl of rat urine sample containing internal standard

entecavir- $C_2^{13}N^{15}$ was loaded on SPE column, which was further (3) washed two times by 1 ml of water. (4) The sample was eluted by 1 ml of 75% acetonitrile in water. The eluate was filtrated through 0.22 μ m syringe filters and injected onto UHPLC system.

2.5. Method validation and system suitability test (SST)

The method was validated according to the requirements of ICH guidelines [16] using standard mixtures (SST, linearity, LOD and LOQ) and rat urine samples (linearity, LOD, LOQ, accuracy, precision, matrix effects, selectivity and carry-over effect). SST was performed under the optimized chromatographic conditions in both HILIC and RP mode. The repeatability of the injection of reference standard solution (retention time and peak area) was established in UHPLC-MS/MS measurements at three concentration levels and at LOQ.

Linearity was established using standard solution of entecavir serially diluted by mobile phase within the range 0.05–500 ng/ml. The same experiment was repeated with rat urine samples spiked by entecavir and internal standard followed by SPE procedure according to Section 2.4. For the determination of method accuracy QC (quality control) samples at three concentration levels (low \sim 1 ng/ml, medium \sim 10 ng/ml and high \sim 100 ng/ml) and at LOQ were used. The agreement between theoretical and measured value was confronted. For method precision, three determinations of entecavir concentration at three concentration levels and LOQ in spiked rat urine were performed. The % of RSD of three determinations, which describes the closeness of agreement between series of measurements, was calculated. For method recovery, spiked blank rat samples processed by SPE according to Section 2.4 and blank rat samples processed by SPE and then spiked by entecavir and IS were compared. The samples were spiked in triplicates at three concentration levels and at LOQ (the same as for accuracy). Matrix effects were determined using again post-extraction spiked blank rat urine samples compared to standard solutions. Their presence was also evaluated using post-column infusion method [10,11].

Method selectivity and carry-over effects among individual samples were checked by the injection of blank samples – (1) pure mobile phase or (2) blank rat plasma treated by SPE procedure according to Section 2.4. The selectivity and carry-over effect were evaluated by visual inspection of chromatograms.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of LC-MS conditions: HILIC versus RP mode

Initially, method optimization was performed in both HILIC and RP mode. Suitable LC-MS conditions, which provided sufficient retention of entecavir and high sensitivity, were searched. In both chromatographic modes a composition of mobile phase, a type and a concentration of an additive and finally all conditions of ion source set-up were finely tuned. Tested additives included: formic acid (0.1 and 0.01%), acetic acid (0.1 and 0.01%), ammonium hydroxide (0.1 and 0.1%), ammonium formate (5 mM, 1 mM and 0.5 mM at pH 3.5 and pH 10.0) and ammonium acetate (5 mM, 1 mM and 0.5 mM at pH 4.0 and pH 10.0).

Under RP conditions the retention of entecavir on BEH C18 stationary phase was only enabled when the % of water component (0.1% formic acid) was high enough. In the mixture of formic acid 0.1% and acetonitrile at least 90% of water component was necessary to obtain any retention. In the mixture with methanol at least 80% of water component was necessary. Both organic modifiers provided about the same sensitivity, therefore acetonitrile was finally chosen due to better peak shape. In spite of decrease in sensitivity compared to more organic mobile phase (about 2 \times

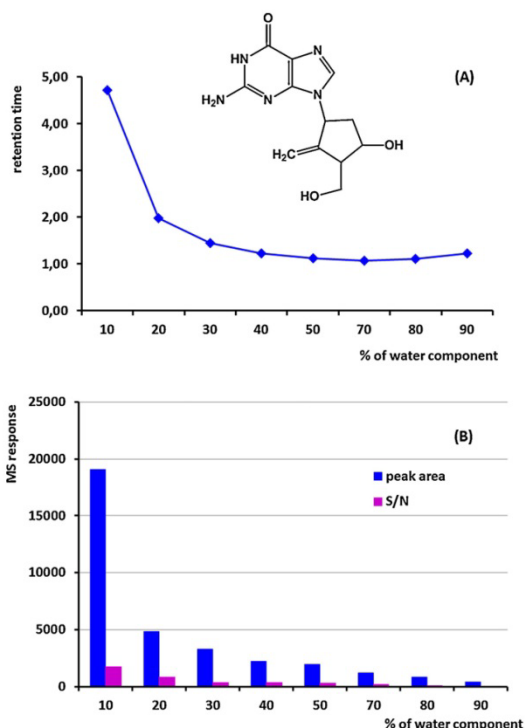


Fig. 1. The structure and retention behavior of polar entecavir under HILIC conditions (A) in correspondence with the response of mass spectrometry (peak area and S/N) (B).

compared to 50% acetonitrile), selected final composition was 96% of water component and 4% of acetonitrile. Further, individual additives were tested. An important influence on retention of entecavir was observed when the pH, concentration and additive types were varied. Entecavir was better retained at acidic pH. Retention was decreased at higher additive concentration at both basic and acidic pH.

The best sensitivity of MS detection under RP conditions was obtained with 0.1% ammonium hydroxide solution. Unfortunately, the response was very unrepeatable leading to % RSD of peak area > 50% in series of several injections. With all other tested additives the response was consistent and repeatable at both basic and acidic pH. When the salt additives were compared, better sensitivity was obtained also at basic pH for both ammonium acetate and ammonium formate, which is consistent with previously published results [5,6]. In our study however, much better results in terms of sensitivity were obtained with formic acid 0.01% and acetic acid 0.1%. Formic acid was finally selected due to slightly higher sensitivity at RP conditions.

HILIC separation was performed on BEH Amide stationary phase. Entecavir demonstrated typical behavior on BEH Amide stationary phase (Fig. 1A). It was retained at the concentration of acetonitrile > 60% and the retention increased very steeply above 80% of acetonitrile. Following this trend, also the response of mass spectrometer (expressed as peak area and S/N) increased substantially with increasing content of acetonitrile (Fig. 1B). In our case 75% of

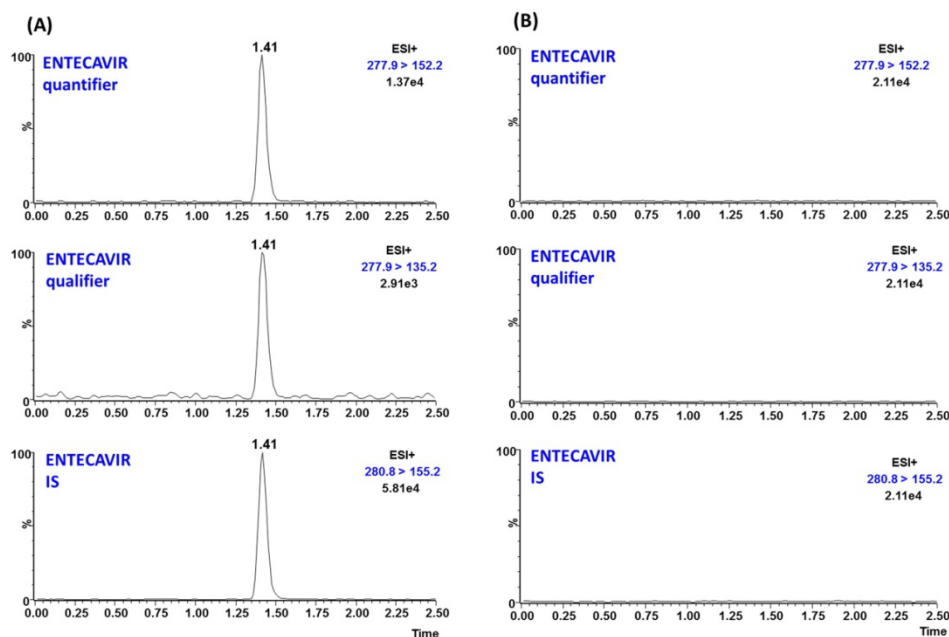


Fig. 2. A representative chromatogram of entecavir- $C_{2}^{13}N^{15}$ internal standard at concentration 50 ng/ml and entecavir at concentration 10 ng/ml showing both quantifier and qualifier SRM transition in standard solution (A). Perfect co-elution of both standards of entecavir could be noticed. Blank trace (mobile phase injection) demonstrating no carry-over effect (B).

acetonitrile provided retention time of 1.5 min, which was acceptable time for routine UHPLC analysis. Higher retention times were not required and moreover, the peak shape above 90% of acetonitrile became unacceptably wide. On the other hand, with 20% of acetonitrile or less RP mechanism has occurred leading to an increase in retention of entecavir, which was less significant compared to HILIC-guided interaction (Fig. 1A). Under HILIC conditions, thus the retention was mainly influenced by the % of acetonitrile in mobile phase, while the type and concentration of additives had influence only on intensity of mass spectrometry response. The retention time was just slightly increased with acids as additives and slightly decreased with ammonium hydroxide (the pKa of the most acidic group of entecavir is 14.22, while the one of the most basic group is 3.49). Therefore a partition is believed to be the main retention mechanism. Various concentrations of ammonium acetate and ammonium formate at different pH did not have any impact on retention, which contributed to high method robustness. In terms of method sensitivity, the best results were obtained with ammonium hydroxide, but similarly as in case of RP separation, they were not repeatable enough for practical use. Further, good response was obtained again with acetic acid 0.1%, ammonium acetate pH 4.0 at various concentrations and also with all other additives at basic pH. As the MS response stability appeared to be much better at acidic pH, acetic acid 0.1% and ammonium acetate pH 4.0 at concentration 5 and 0.5 mM were selected for final comparison of measurements in HILIC and for comparison with RP mode. At this point, all the parameters of ion source were finely tuned at both HILIC and RP conditions. The results indicated, that the set-up did not differ substantially except for the capillary voltage, which required higher value in HILIC mode (3500 V) and much lower value in RP mode (500 V). Following, four calibration curves were measured at optimized conditions, three in HILIC and one in

RP mode. Finally, HILIC separation mode using 5 mM ammonium acetate pH 4.0/acetonitrile mobile phase was selected due to following reasons: (1) good peak shape and retention for entecavir, (2) perfect repeatability of retention times and peak area, (3) high sensitivity, (4) good accuracy in the whole linear range (higher than acetic acid and RP mode), (5) better robustness, (6) significantly lower carry-over after injection of high concentrations compared to RP mode and finally (7) better compatibility of HILIC mobile phase with elution solvent for SPE. 75% acetonitrile was further strictly used as dilution media for all stock standard solutions. In HILIC the composition of sample dilution media must be very close to mobile phase composition, which is much more important here compared to other separation modes. It is also important to keep very low injection volume in order to maintain high separation efficiency, as was previously discussed by Guillard et al. [17]. For this reason the injection volume was only 2 μ l.

3.2. Optimization of sample preparation

The optimization of solid phase extraction procedure for entecavir was quite straightforward. Using standards, it was verified, that entecavir was well retained on Oasis HLB cartridge (1 ml, 30 mg), when loaded in water solution. This was extremely important, as the experiment with various washing solvents revealed, that only 10% acetonitrile present in washing solution already induces a significant release of entecavir (>20%) from the interaction with SPE sorbent. Therefore, only pure water was applied during washing step. Various elution solvents in the range 70–90% of acetonitrile were examined. The recovery was quite consistent, therefore 75% acetonitrile, which corresponded to the mobile phase composition was selected. Better recovery was obtained, when 500 μ l of loaded sample was eluted by 1 ml of elution solvent

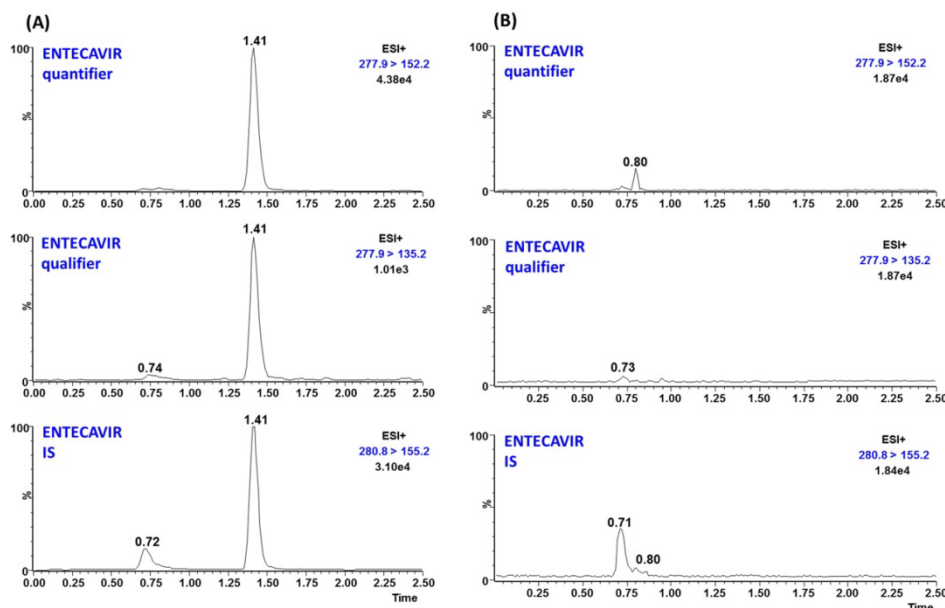


Fig. 3. A chromatogram of SPE extract from rat urine (A) and SPE extract of blank rat urine (B) demonstrating high efficiency of sample clean-up.

compared to lower volumes. Any entecavir was not observed in eluate, if this volume was further increased. Actually, the volume of 1 ml was practical for two reasons. First, it was easier to pass it through the syringe filter and collect sufficient amount and secondly, sample dilution might be one of the strategies to reduce matrix effects, if this is allowed by method sensitivity and sufficient concentration of analyte in target samples. After the filtration through 0.22 μm syringe filters the eluate was injected directly onto UHPLC system. The evaporation/reconstitution step might be omitted due to identical composition of eluate and mobile phase and naturally due to highly sensitive UHPLC–MS/MS method. As this step is often very time-consuming and might sometimes be complicated by bad solubility of analytes in reconstitution medium, the proposed sample preparation step is substantially accelerated and simplified. The exact details of SPE protocol are given in Section 2.4.

3.3. Method validation

Under optimized HILIC conditions the two standards entecavir and entecavir- $\text{C}_2^{13}\text{N}^{15}$ coeluted perfectly (Fig. 2A), which is a basic requirement for accurate quantification in LC–MS. Sample carry-over was verified by visual inspection of chromatograms of injected mobile phase. Very low carry-over (<0.5%) was observed only after injection of high concentrations of entecavir, such as 500 ng/ml. It was usually eliminated during subsequent blank injection. No carry-over effect was observed at concentrations ≤ 100 ng/ml (Fig. 2B). In order to prevent carry-over, blank injection of mobile phase was inserted between each two unknown samples due to wide linear range of the method.

Selective SRM quantitation together with SPE sample preparation step enabled to obtain interference-free chromatograms from rat urine samples (Fig. 3A). Method selectivity was verified by visual

inspection of chromatograms of blank rat urine processed by SPE (Fig. 3B). These chromatograms did not contain any interfering compound at retention time of entecavir. Some matrix interference were observed at the beginning of the chromatogram (t_R around 0.76 min, Fig. 3), however it did not influence determination of entecavir.

The results of method validation are shown in Table 1. The method provided excellent results in terms of repeatability, accuracy, precision and good results of recovery as well. Matrix effects were <15% or substantially lower in most cases (5–10%), which is also documented in Fig. 4 using post-column infusion method. The method provided perfect linearity ($r^2 \geq 0.9998$) using internal standard method in both standard solutions as well as matrix-matched calibration curves. Method sensitivity reached pg/ml levels with LOQ 50 pg/ml in standard solution and LOQ 100 pg/ml in rat samples, which is due to dilution during SPE step. These results of method sensitivity are in agreement with previously published methods for the determination of entecavir presented in Table 2. Actually, all these LC–MS/MS methods have even lower sensitivity taking into account injection volume and concentration factor. Presented newly developed method brings many advantages such as simplification of sample preparation step, lower need for sample than other SPE methods, better method reliability due to use of SIL-LS, lower presence of matrix effects and thus better accuracy and also short analytical run, which together with accelerated sample preparation step allows for higher sample through-put. Previously published methods pointed out especially complicated effect of matrix (about 40%) due to high sample volumes used for SPE extraction [5,6]. This issue might have serious impact to method accuracy and precision because only analogue internal standards were used. The effect might be pronounced with different batches of biological materials that might contain other components inducing matrix effects.

Table 1
Method validation results including SST parameters.

	Concentration level 100 ng/ml	Concentration level 10 ng/ml	Concentration level 1 ng/ml	Concentration level 0.1 ng/ml
SST results				
Retention time repeatability [% RSD]	0.00	0.00	0.23	0.00
Peak area repeatability [% RSD]	1.81	2.48	3.65	10.69
Validation results				
Method accuracy [% of error]	−1.2	−4.6	+4.1	+25.9
Method recovery [%]	108.6	100.2	87.3	114.4
Method precision [% RSD]	0.93	3.13	2.93	3.7
Matrix effects [% ME]	90.7	85.8	94.9	102.6
Results for standard calibration curve				
Method linearity	0.9998		0.9999	
Linear range	50 pg–500 ng/ml		100 pg–500 ng/ml	
LOD	15 pg/ml		30 pg/ml	
LOQ	50 pg/ml		100 pg/ml	

RSD = relative standard deviation, ME = matrix effects, LOD = limit of detection, LOQ = limit of quantitation.

Table 2
A comparison of the characteristics of bio-analytical methods for the determination of entecavir.

Method	Separation mode	Internal standard	Sample preparation	Sample volume	Concentration factor	Injection	Analysis time	LOQ	Reference
ESI-LC-MS/MS	RP, pH 10.5	Lamivudine	SPE	500 μ l	2 \times	20 μ l	5 min	50 pg/ml	[4]
ESI-LC-MS/MS	RP, pH 10.5	Lobucavir	96 well-plate SPE	1 ml (2 step)	10 \times	20 μ l	4 min	5 pg/ml	[5]
ESI-LC-MS/MS	RP, pH acidic	Acyclovir	SALLE	500 μ l	3.3 \times	5 μ l	10 min	50 pg/ml	[6]
ESI-LC-MS/MS	HILIC, pH 4.0	Entecavir- C ₂ ¹³ N ¹⁵	SPE	1 ml 500 μ l	10 \times 1/2 \times	2 μ l	2 min	100 pg/ml	Reported method

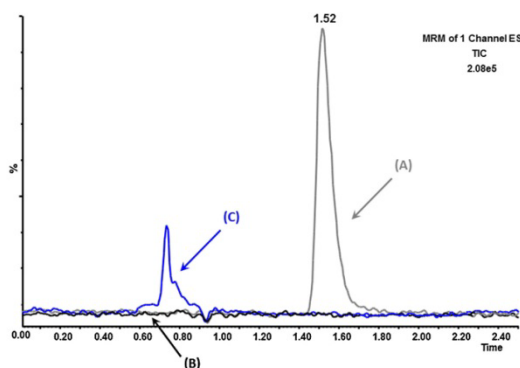


Fig. 4. Determination of matrix effects using post-column infusion method. An overlay of an injection of entecavir standard in mobile phase (A); an injection of pure mobile phase (B) and blank rat urine treated by SPE procedure (C). Positive matrix effects are observed at the beginning of the chromatogram. No matrix effect is present at retention time of entecavir.

3.4. Application to real samples

Rat urine samples obtained as described in Section 2.4 were processed by SPE directly after thawing cycle at laboratory temperature. Subsequently they were measured by HILIC-UHPLC-MS/MS method using SIL-IS and matrix-matched calibration curve for quantitation. The concentrations of entecavir in rat urine samples determined during this study were within the range 2.2–14.4 ng/ml which means well within the validation range and well above

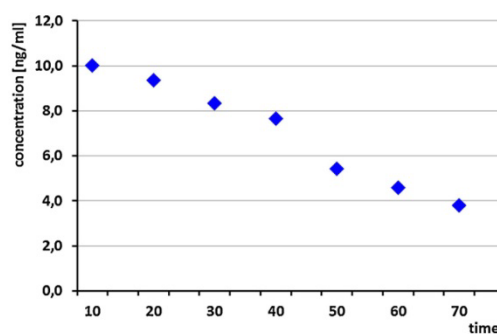


Fig. 5. Concentration–time profile of entecavir in rat urine. Samples were collected every 10 min within the perfusion period of 0–70 min.

method LOQ. An example of concentration–time profile of entecavir in rat urine is shown in Fig. 5.

4. Conclusions

A novel HILIC-UHPLC-MS/MS method for the determination of entecavir in rat urine was developed in this study. The HILIC method was compared to an RP-UHPLC-MS/MS method with the results revealing slightly higher sensitivity for HILIC. Moreover, in HILIC mode, better linearity and high accuracy in whole linear range was observed.

The sensitivity of developed UHPLC-MS/MS method was relatively higher compared to previously published works (Table 2). However, in analysis of real samples it was decreased due to (1) lower injection volumes needed in HILIC separation mode and (2)

dilution of sample during sample preparation step. This was however a part of strategy to reduce matrix effects, which were reported to be the most serious drawback of previously developed methods. By the combination of several approaches, that enable to reduce matrix effects (relatively selective SPE sample preparation step, efficient UHPLC separation, HILIC mode enabling different selectivity and high sensitivity, quantitation using selective SRM mode and SIL-IS with $C^{13}N^{15}$ labeling and finally sample dilution), resulting method provided accurate results with negligible matrix effects (Fig. 4) and still high sensitivity sufficient for the determination of entecavir in rat urine samples in spite of the dilution step.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge research projects of Charles University in Prague UNCE 17/2012, SVV/2012/265002 and SVV/2012/265003.

References

- [1] J.-H. Yan, M. Bifano, S. Olsen, R.A. Smith, D. Zhang, D.M. Grasela, F. LaCreta, J. Clin. Pharmacol. 46 (2006) 1250.
- [2] S.F. Innaimo, M. Seifer, G.S. Bisacchi, D.N. Standring, R. Zaher, R.J. Colonna, Antimicrob. Agents Chemother. 41 (1997) 1444.
- [3] R.J. Colonna, E.V. Genovesi, I. Medina, L. Lamb, S.K. Durham, M.L. Huang, L. Corey, M. Littlejohn, S. Locarnini, B.C. Tennat, B. Rose, J.M. Clark, J. Infect. Dis. 184 (2011) 1236.
- [4] B.R. Challa, B.Z. Awen, B.R. Chandu, S. Rihanaparveen, J. Chromatogr. B 879 (2011) 769.
- [5] D. Zhang, Y. Fu, J.P. Gale, A.F. Furby, M.E. Arnold, J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 1027.
- [6] F.-J. Zhao, H. Tang, Q.-H. Zhang, J. Yang, A.K. Davey, J.-p. Wang, J. Chromatogr. B 881–882 (2012) 119.
- [7] K.J. Fountain, J. Xu, D.M. Diehl, D. Morisson, J. Sep. Sci. 33 (2010) 740.
- [8] E. Goucher, A. Kicman, K. Wolff, N. Smith, S. Jickells, J. Sep. Sci. 33 (2010) 955.
- [9] Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, EMEA, London, UK, 2010.
- [10] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3929.
- [11] H. Trufelli, P. Palma, G. Famigliani, A. Cappiello, Mass Spectrom. Rev. 30 (2011) 491.
- [12] M. Jemal, A. Schuster, D.B. Whigan, Rapid. Commun. Mass Spectrom. 17 (2003) 1723.
- [13] E. Stokvis, H. Rosing, J.H. Beijnen, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 401.
- [14] S. Wang, M. Cyronak, E. Yang, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 701.
- [15] N. Lindegardh, A. Annerberg, N.J. White, N.P.J. Day, J. Chromatogr. B 862 (2008) 227.
- [16] International Conference on Harmonization (ICH), Q2 (R1): Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register (2005).
- [17] J. Ruta, S. Rudaz, D.V. McCalley, J.-L. Veuthey, D. Guillardme, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8230.

Příloha B

19th International Mass Spectrometry Conference

Práce byla prezentována na 19. konferenci IMSC formou posteru.



Kyoto International Conference Center
Saturday 15th September – Friday 21st September 2012

PWe-137
11:10 – 12:20

HILIC-UHPLC-MS/MS determination of entecavir in rat plasma, urine and plasma ultrafiltrate using various sample preparation techniques

Lucie Novakova¹, Hana Vlckova¹, Tomas Gottvald¹, Jaroslav Janak¹, Frantisek Trejtnar²,
Jana Mandikova², Petr Solich¹

¹Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Department of analytical chemistry, ²Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

Keywords:

entecavir, UHPLC, HILIC, MS/MS, biological material

Novel aspects:

A new HILIC UHPLC-MS/MS method for the determination of entecavir in various biological material was developed and validated. Several approaches were used to reduced matrix effects.

Abstract:

Entecavir is a novel deoxyguanosine nucleotide antiviral agent with activity against hepatitis B virus (HBV) . The agent possesses a polar structure, which might cause difficulties, when determined by conventional LC-MS methods. In this study RP-UHPLC method using BEH C18 stationary phase with mostly aqueous binary mobile phase composed of (4 : 96) acetonitrile/0.01% formic acid and HILIC-UHPLC method using BEH Amide stationary phase with binary mobile phase composed of acetonitrile/5 mM ammonium acetate pH 4.0 (75 : 25) at flow-rate 0.3 ml/min were compared in terms of sensitivity, linearity, repeatability and accuracy. The effect of various mobile phase additives (formic acid, acetic acid, ammonium acetate and ammonium formate at both acidic and basic pH) was carefully studied in both RP and HILIC method.

HILIC-UHPLC-MS/MS method demonstrated more favorable results and moreover, it provided more convenient conditions for straightforward coupling with solid phase extraction-based (SPE) sample preparation techniques. Several biological materials (rat urine, rat plasma and plasma ultrafiltrate of rats) were examined using various SPE-based extraction techniques (RP-SPE, ion-exchange SPE and microextraction by packed sorbent (MEPS) approach) .

The sensitivity of developed UHPLC-MS/MS method was relatively higher compared to previously published works. Method validation in terms of linearity, accuracy, precision, selectivity and matrix effects was performed for each of biological material. By the combination of several approaches, that enable to reduce matrix effects (relatively selective SPE sample preparation step, efficient UHPLC separation, HILIC mode enabling different selectivity and high sensitivity, quantitation using selective SRM mode and SIL-IS with C¹³N¹⁵ labeling and finally sample dilution) , resulting method provided accurate results with negligible matrix effects and still high sensitivity sufficient for the determination of entecavir in rat urine, plasma and plasma ultrafiltrate samples in spite of the dilution step during sample preparation.

The authors gratefully acknowledge the financial support of research projects of Charles University in Prague UNCE 17/2012 and PRVOUK.



HILIC-UHPLC-MS/MS determination of entecavir in rat plasma, urine and renal ultrafiltrate using various sample preparation techniques

Lucie Nováková¹, Hana Vlčková¹, Jaroslav Janák¹, Tomáš Gottwald¹, František Trejtnar,² Jana Mandíková², Petr Solich¹

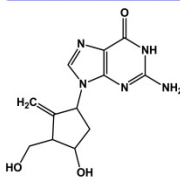
¹Department of Analytical Chemistry, ²Department of Pharmacology and Toxicology/Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Czech Republic, nol@email.cz

OVERVIEW

The purpose of this study was to develop fast, sensitive and reliable UHPLC-MS/MS method and sample preparation step for the quantification of polar analyte entecavir in biological materials (rat urine, plasma and renal ultrafiltrate). Various solid phase extraction (SPE) approaches were employed in the sample pre-treatment step in order to obtain accurate and precise quantification without the influence of matrix effects.

As a result, HILIC approach was chosen due to enhanced MS sensitivity, good retention and selectivity. Both conventional SPE (ion-exchange (IEX) and reversed-phase (RP)) and miniaturized version using microextraction by packed sorbent (MEPS) provided good results in sample pre-treatment.

INTRODUCTION AND THE AIM OF THE WORK



Entecavir is a novel deoxyguanosine nucleotide antiviral agent. It is approved for therapy of chronic hepatitis B. As a small (MW = 277.12) and polar molecule (log P = -1.110), entecavir represents a significant challenge in bio-analytical method development. Due to its properties, entecavir is not well-suited for conventional RP-HPLC analysis. It will only be retained on the column and resolved from the matrix interferences at increased aqueous phase volume ratio. However, such mostly aqueous mobile phases are known to reduce the sensitivity of MS detection. In spite of this fact, recently developed bio-analytical methods for the determination of entecavir in human plasma have all used RP-HPLC. All of them also applied LC-MS/MS using various sample preparation steps, mostly SPE or salting-out liquid-liquid extraction (SALLE). In spite of using RP separation mode, reported method sensitivity was at low pg/ml level due to sample pre-concentration and high injection volumes, which however lead to serious matrix effects.

The aim of this work was to develop simple, sensitive, rapid and reliable analytical approaches for the determination of entecavir by means of UHPLC-MS/MS with the aim to reduce matrix effect influence. In order to reach the goal a combination of following approaches was employed: (1) extraction and clean-up of sample by SPE (RP or IEX) and MEPS; (2) dilution of sample during sample preparation step; (3) efficient UHPLC separation due to sub-2-micron particles; (4) separation selectivity and enhanced ionization due to HILIC conditions; (5) MS/MS detection using SRM experiment and (6) quantitation using SIL-IS (stable isotopically labeled internal standard) with C¹³ and N¹⁵ labeling.

ANALYTICAL METHODS

INSTRUMENTS:

Acquity UPLC, Waters, ACQ-BSM ACQ SM, ACQ CO Quattro Micro, triple quadrupole mass analyser, Waters

ANALYTICAL COLUMNS:

Acquity Amide (2.1 x 100 mm, 1.7 µm), Waters Acquity BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm), Waters

MOBILE PHASE:

ACN/water component
water component: acetic acid (0.1 and 0.01%), formic acid, (0.1 and 0.01%), ammonium acetate and ammonium formate (0.5, 1 and 5 mM).

RP-SPE: rat urine

Oasis HLB cartridge (1 ml, 30 mg)

- (1) conditioning: 1 ml ACN + 1 ml of water
- (2) loading: 500 µl of rat urine sample
- (3) washing: 2 x 1 ml of water
- (4) elution: 1 ml of 75% ACN in water

filtration: 0.22 µm PTFE syringe filters



IEX-SPE: rat plasma

after protein precipitation with ACN: Waters Oasis MCX 3cc (3ml, 60mg)

- (1) conditioning: 1 ml ACN + 1 ml of water
- (2) loading: 2 ml of plasma precipitate
- (3) washing: 1 ml ACN + 1 ml 2% HCOOH
- (4) elution: 1 ml H₂O water/5% NH₄OH in ACN (05/95)
- (5) evaporation by N₂
- (6) reconstitution in 75% ACN in water

filtration: 0.22 µm PTFE syringe filters

MEPS: rat renal ultrafiltrate

MEPS PGC (HyperCarb) sorbent

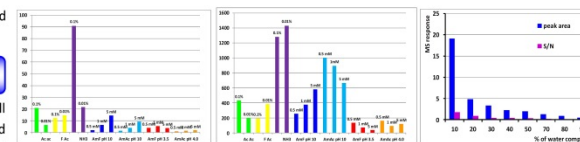
- (1) conditioning: 3 x 100 µl ACN 3 x 100 µl water
- (2) loading: 50 µl rat renal ultrafiltrate
- (3) washing: 100 µl water
- (4) elution: 100 µl 75% ACN in water

filtration: 0.22 µm PTFE syringe filters

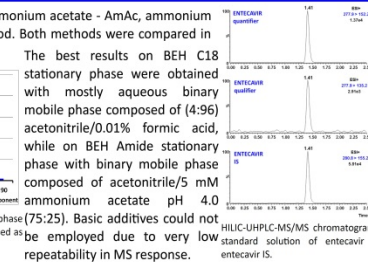


RESULTS: UHPLC-MS/MS

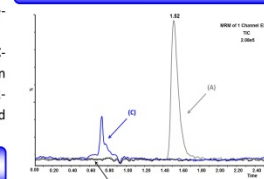
The effect of various mobile phase additives (formic acid - F Ac, acetic acid - Ac Ac, ammonia, ammonium acetate - AmAc, ammonium formate - AmF at both acidic and basic pH) was carefully investigated in both RP and HILIC method. Both methods were compared in terms of sensitivity, linearity, repeatability, precision (%RSD) and accuracy (% of recovery-RE).



The influence of mobile phase additives on peak area in RP UHPLC-MS/MS method. The best response was obtained for ammonia, but the repeatability was very poor.
The influence of mobile phase additives on the peak area in HILIC UHPLC-MS/MS method. The best response was obtained for basic peak area and S/N ratio, but the repeatability was very poor.
The influence of HILIC mobile phase composition on MS response expressed as peak area and S/N ratio.

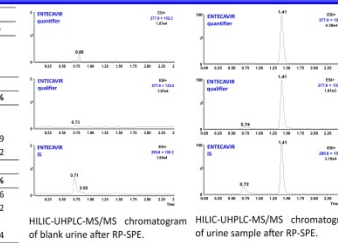


RESULTS: SAMPLE PREPARATION



Determination of matrix effects (ME) for urine sample using RP-SPE sample preparation procedure and UHPLC-HILIC-MS/MS method. (A) entecavir standard, (B) mobile phase, (C) SPE extracted blank urine.

Sample	Concentration	Linearity					
		Linearity	LOQ	LOD	RSD %	ME %	RE %
PLASMA	100 ng/ml	0.9992	500 pg/ml	100 pg/ml	1.9	99.4	97.3
	10 ng/ml				1.1	99.0	98.6
	1 ng/ml				4.1	105.6	79.6
RENAL ULTRAFILTRATE	100 ng/ml	0.9991	500 pg/ml	100 pg/ml	1.2	102.2	97.6
	10 ng/ml				2.6	99.8	98.7
	1 ng/ml				3.6	96.9	105.9
URINE	100 ng/ml	0.9999	100 pg/ml	30 pg/ml	0.9	90.7	108.6
	10 ng/ml				3.1	85.8	100.2
	1 ng/ml				2.9	94.9	87.3
	0.1 ng/ml				3.7	102.6	114.4



CONCLUSIONS

HILIC-UHPLC-MS/MS method demonstrated more favorable results than the RP-UHPLC-MS/MS. Moreover, it was more straightforward for coupling with SPE-based sample preparation techniques. Due to similarity of the composition of HILIC mobile phase and SPE eluates the evaporation step could be omitted in RP-SPE procedure and in MEPS procedure. By the combination of several approaches, that enable to reduce matrix effects, resulting method provided accurate results with negligible matrix effects and still high sensitivity sufficient for the determination of entecavir in rat urine, plasma and renal ultrafiltrate samples in spite of the dilution step during sample preparation. All SPE-based sample preparation approaches were found to be convenient for isolation and clean-up of entecavir from various biological materials.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of research projects of Charles University in Prague UNCE 17/2012 and PRVOUK. This publication is also a result of the project implementation: "Support of establishment, development, and mobility of quality research teams at the Charles University", project number CZ.1.07/2.3.00/30.0022, supported by The Education for Competitiveness Operational Programme (ECOP) co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic.



Obrázek B1: Ukázka posteru

Příloha C

21. Studentská vědecká konference

Hradec Králové 2013

Práce byla prezentována na 21. Studentské vědecké konferenci při Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy formou prezentace.

XXI. STUDENTSKÁ VĚDECKÁ KONFERENCE

DIPLOM

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
a
Spolek českých studentů farmacie



za
účast

Tomáš Gottvald

v sekci chemických věd



[Signature]
Prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc., děkan

[Signature]
Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, PhD., proděkan pro vědeckou činnost

[Signature]
Jakub Weber, za Spolek českých studentů farmacie

V Hradci Králové, 17. dubna 2013

Determination of entecavir in rat urine by solid phase extraction and UHPLC-MS/MS

Gottvald T¹, Vlčková H¹, Trejtnar F², Mandíková J², Solich P¹, Nováková L¹

¹Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry

²Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacology and Toxicology

e-mail: Gottvalt@faf.cuni.cz

Entecavir is a synthetic guanine nucleoside that plays important role in treatment of chronic hepatitis B virus infection. This work was focused on development of highly sensitive method to determine entecavir concentrations in rat urine. Quantitative determination of entecavir was carried out by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive ion electrospray mode. Triple quadrupole was set-up to selected reaction monitoring (SRM) mode. Entecavir C₂¹³N¹⁵, stable isotopically labeled internal standard, was used for quantitation.

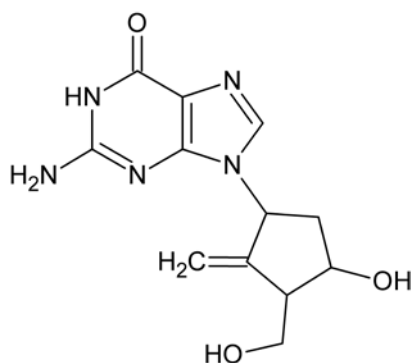


Fig. 1: The structure of entecavir.

Hydrophilic interaction chromatography seems to be a suitable technique for retention and separation of polar compounds present in analyzed sample. One of the main goals was to confirm this fact by comparison with commonly used reverse phase chromatography mode (RP-UHPLC) on BEH C18 stationary phase. Conditions for RP-UHPLC were optimized as follows: mobile phase composed of acetonitrile/0.01% formic acid (4:96). The HILIC conditions on BEH Amide stationary phase were optimized using isocratic elution with mobile phase composed of acetonitrile/5mM ammonium acetate pH 4.0 (75:25). HILIC method provided much better results in terms of linearity and repeatability.

Due to high polarity of entecavir Oasis HLB cartridge was chosen for solid phase extraction that was suitable preparation technique for the treatment of rat urine sample.

Advantageously entecavir was eluted by 75% acetonitrile in water, which was the same composition as HILIC mobile phase. Therefore, evaporation step could be omitted.

Several strategies were used to overcome matrix effect, such as UHPLC separation, HILIC chromatography, SPE sample pre-treatment, stable isotopically labeled internal standard and dilution step. Therefore, influence of matrix effects, which were determined by post-column infusion and post-extraction addition method, was negligible in this method. The following validation parameters demonstrated the suitability of this method for the determination of entecavir in rat urine – accuracy (< 5% error), recovery (87 – 109 %), precision (< 3% RSD), selectivity and sensitivity (LOQ = 100 pg/ml).