

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Johana Neumannová

Vývoj HPLC-MS/MS metody pro stanovení L-dopa v lidském krevním séru
Development of a HPLC-MS/MS method for determination of L-dopa in human blood serum

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 6.4. 2022

Neumannová Johana

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní tandemovou detekcí (HPLC-MS/MS) pro stanovení L-dopy v lidském krevním séru. Levodopa je prekurzor dopaminu a používá se obecně pro léčbu Parkinsonského syndromu.

V rámci diplomové práce byla provedena optimalizace tandemové hmotnostní detekce a optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Nalezené optimální parametry jsou následující: chromatografická kolona HALO 90 Å Penta-HILIC (150 x 2,1 mm; 2,7 μm), Advanced Materials Technology (USA). Použitá mobilní fáze byla směs složená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu (složka B) za gradientové eluce. Celková doba analýzy byla 12,50 minut, průtok MF byl 0,4 ml min⁻¹, nastříkovan byl vzorek o objemu 5 μl, teplota na dávkovači byla 15 °C a teplota kolony byla 30 °C. V diplomové práci byly sledovány následující MRM přechody v pozitivním módu:

1. levodopa: m/z 198,1 → m/z 152,1 (Q1: -10 V, CE: -16 V, Q3: -28 V)
2. deuterovaná levodopa (IS): m/z 201,1 → m/z 155,2 (Q1: -10 V, CE: -14 V, Q3: -28 V)

Iontový zdroj byl nastaven následovně: průtok nebulizačního plynu 3 l min⁻¹, průtok sušícího plynu 10 l min⁻¹, teplota vnitřního prostoru 300 °C, napětí na kapiláře 3 000 V, teplota desolvatační kapiláry 250 °C.

V závěru práce byla provedena analýza matričního efektu. Bylo zjištěno, že vliv matričního efektu na stanovení L-dopy v lidském krevním séru se pohybuje kolem 50 %.

Klíčová slova:

optimalizace, levodopa, deuterovaná levodopa, HPLC-MS/MS, lidské krevní sérum

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on the development of a high-performance liquid chromatography in conjunction with tandem mass spectrometry detection (HPLC-MS/MS) for the determination of L-dopa in human blood serum. Levodopa is a dopamine precursor and is generally used to treat Parkinson's syndrome.

The tandem mass spectrometry detection and the high-performance liquid chromatography method were optimized. The optimal conditions were as follows: HALO 90 Å Penta-HILIC column (150 x 2,1 mm; 2,7 µm), Advanced Materials Technology (USA). The mobile phase used was a mixture composed of 0,1% formic acid (component A) and acetonitrile (component B) under gradient elution. The total analysis time was 12,50 minutes, the flow rate was 0,4 ml min⁻¹, a 5 µl sample was injected, the autosampler temperature was 15 °C and the column temperature was 40 °C. The following MRM transitions in positive mode were monitored:

1. levodopa: m/z 198,1 → m/z 152,1 (Q1: -10 V, CE: -16 V, Q3: -28 V)
2. deuterated levodopa (IS): m/z 201,1 → m/z 155,2 (Q1: -10 V, CE: -14 V, Q3: -28 V)

The setting of the ion source was as follows: the nebulization gas flow 3 l min⁻¹, the drying gas flow 10 l min⁻¹, the internal temperature 300 °C, the capillary voltage 3 000 V, the desolvation capillary temperature 250 °C.

In the end of the work, an analysis of the matrix effect was performed. It was found that the influence of the matrix effect on the determination of L-dopa in a human blood serum is around 50 %.

Key words:

optimization, levodopa, deuterated levodopa, HPLC-MS/MS, human blood serum

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, PhD. za odborné vedení této diplomové práce a za cenné rady a jeho ochotu jak během sepisování práce, tak během výzkumu.

V neposlední řadě bych zde chtěla vyjádřit díky také mé rodině a nejbližším za umožnění mého studia a za jejich neutuchající podporu a pomoc.

OBSAH

1	Úvod	10
1.1	Metabolomika a její rozdělení	10
1.1.1	Cílená metabolomika	11
1.1.2	Necílená metabolomika	11
1.2	Technika LC-MS/MS	12
1.2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	12
1.2.2	Hmotnostní spektrometrie	13
1.3	Cílový analyt – Levodopa	17
1.3.1	Parkinsonova choroba	18
1.3.2	Dávkování levodopy a komplikace léčby	19
1.4	Stanovení levodopy v biologickém materiálu	20
2	Experimentální část	31
2.1	Instrumentace	31
2.2	Použité chemikálie	32
2.3	Příprava vzorků	32
2.3.1	Levodopa, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)-L-alanin	32
2.3.2	L-dopa (D ₃), 3-(3,4-Dihydroxyfenyl-2,5,6-d ₃)-L-alanin	32
2.3.3	Vzorek obsahující biologickou matici (spikovaný vzorek, referenční matrice)	33
2.4	Příprava pufrů	35
2.4.1	Mravenčan amonný, 10 mM, pH = 3,8	35
3	Výsledky a diskuze	36
3.1	Optimalizace tandemové hmotnostní detekce	36
3.2	Optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie	44
3.2.1	Chromatografická kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18	44
3.2.2	Chromatografická kolona ACE [®] Excel [®] C ₁₈ -Amide	46
3.2.3	Chromatografická kolona Atlantis [™] dC ₁₈	49
3.2.4	Chromatografická kolona Atlantis [™] PREMIER BEH C ₁₈ AX	50
3.2.5	Chromatografická kolona ACQUITY UPLC [®] BEH HILIC	52
3.2.6	Chromatografická kolona ACQUITY UPLC [®] BEH AMIDE	56
3.2.7	Chromatografická kolona HALO 90 Å Penta-HILIC	58

3.3	Matriční efekt.....	61
4	Závěr.....	63
5	Použitá literatura	65

Seznam symbolů a zkratk

API	ionizace za atmosférického tlaku (z angl. Atmospheric Pressure Ionization)
AX	aniontová výměna (z angl. Anion Exchange)
BEH	hybridní fáze s ethylenovým můstkem (z angl. Ethylene Bridged Hybrid)
CE	kolizní energie (z angl. Collision Energy), [V]
DA	dopamin
DAD detektor	detektor diodového pole (z angl. Diode-Array Detector)
DPA _d SV	diferenční pulzní adsorpční stripovací voltametrie (z angl. differential pulse adsorptive stripping voltammetry)
ESI	elektrosprejová ionizace (z angl. Electrospray Ionization)
FIA	průtoková injekční analýza (z angl. Flow Injection Analysis)
FLD	fluorescenční detektor (z angl. Fluorescence Detector)
FT	Fourierova transformace (z angl. Fourier Transform)
GC	plynová chromatografie (z angl. Gass Chromatography)
HILIC	kapalinová chromatografie s hydrofilními interakcemi (z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
IS	vnitřní standard (z angl. Internal Standard)
L-dopa	levodopa
L-dopa (D ₃)	deuterovaná levodopa
LIT	lineární iontová past (z angl. Linear Ion Trap)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (z angl. Liquid-Liquid Extraction)
LNAA	skupina velkých neutrálních aminokyselin (z angl. Large Neutral Amino Acids)
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti ku náboji
MALDI	laserová desorpční ionizace s matricí (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
ME	Matriční efekt
MF	Mobilní fáze

MRM	mód sledování vícero reakcí (z angl. Multiple Reaction Monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
MS/MS; MSMS; MS ²	tandemová hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)
MS ⁿ	hmotnostní spektrometrie s vícenásobnou fragmentací
NPLC	chromatografie s normálními fázemi (z angl. Normal Phase Liquid Chromatography)
PFPA	kyselina perfluoropentanová
PN	Parkinsonova choroba
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	kvadrupól (z angl. Quadrupole)
QqQ, TQMS	trojitý kvadrupólový analyzátor (z angl. Triple Quadrupole Mass Spectrometer)
RPLC	chromatografie s obrácenými fázemi (z angl. Reversed Phase Liquid Chromatography)
SF	stacionární fáze
SRM	mód sledování vybrané reakce (z angl. Selected Reaction Monitoring)
TOF	průletový analyzátor (z angl. Time-of-Flight)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

1 Úvod

1.1 Metabolomika a její rozdělení

Metabolomika představuje analýzu biologického vzorku, tzv. metabolomu, v němž je zkoumán veliký soubor nízkomolekulárních látek, které se v daném čase a za daného stavu v biologickém vzorku nacházejí. Metabolom zahrnuje na rozdíl od genomu mnohem menší počet jednotlivých chemických individuí (metabolom zahrnuje asi 2500 metabolitů, kdežto genom zahrnuje cca. 30 000 genů).¹ Jako metabolom je označována komplexní sada metabolitů, které vznikají velkým počtem reakcí souhrnně označovaným pojmem metabolismus. Je to tedy soubor všech intracelulárních i extracelulárních nízkomolekulárních látek, které vznikly přeměnou chemických sloučenin pomocí metabolických drah v živém systému. Tyto nízkomolekulární látky jsou potřebné pro růst a normální funkci buňky.² V praxi představuje metabolomika významnou analytickou výzvu, protože na rozdíl od genomových a proteomických metod má za cíl zkoumat molekuly, které mají odlišné fyzikální vlastnosti (liší se například v polaritě - v metabolomu nalezneme ve vodě rozpustné organické kyseliny, ale i např. nepolární lipidy). Díky neustálému vývoji analytických přístrojů se mohou v metabolice používané metody stále zlepšovat.³

Metabolomika je rozvíjející se vědní disciplína, která se používá k odhalení fyziologických a patologických metabolických změn a je hojně využívána k identifikaci biomarkerů různých onemocnění.⁴ Určité patologické metabolity jsou jedním ze signálů onemocnění, protože jejich množství v biologických vzorcích přímo souvisí s patogenními mechanismy. Současné metabolomické technologie přesahují rámec standardních technik klinické chemie – díky tomu můžeme běžně měřit desítky až stovky metabolitů s vynikající přesností. To je vhodné zejména pro nalezení časných metabolických indikátorů onemocnění, díky nimž víme o onemocnění jedince dříve, než jsou příznaky klinicky zjevné.³

Metabolomika se dělí na metabolomiku cílenou a metabolomiku necílenou. Cílená metabolomika využívá již dříve definovaných metabolitů, které jsou analyzovány charakteristickými přechody v tandemovém hmotnostním spektrometru. Necílená metabolomika používá data získaná z analyzátorů, které měří přesnou hmotu. Analyzované

látky jsou neznámé a dále se pracuje především s informacemi o přesné hmotě a s informacemi o retenci látek na koloně.⁵

1.1.1 Cílená metabolomika

Cílená metabolomika se zabývá měřením definovaných skupin chemicky charakterizovaných a biochemicky anotovaných metabolitů za účelem zkoumání specifických metabolických cest nebo k ověření biomarkerů identifikovaných pomocí necílené metabolomiky. Cílený metabolomický přístup vyžaduje apriorní znalosti sledovaných metabolitů a známých sloučenin a je založen na znalosti specifických předdefinovaných signálů pro dané metabolity. Díky této znalosti můžeme následně pomocí analytických technik (MS/MS či GC-MS) přesně určit relativní množství a koncentraci daného metabolitu. Nevýhodou cíleného přístupu je, že nezahrnuje globální profilování metabolomu.⁶

Cílená metabolomika je zatížena obtížnou srovnatelností s měřením dat pocházejícím z více zdrojů/experimentů. Obtížná srovnatelnost pochází z neznámé „historie“ vzorku, může být způsobena například nerepresentativním odběrem či nejednotnými kroky v preanalytické fázi. Dalším důvodem přispívajícím k obtížné srovnatelnosti je matrice vzorku, která se více či méně liší vzorek od vzorku. Popisovaná obtížná srovnatelnost je velkou nevýhodou pro dlouhodobé studie validace biomarkerů, a proto bylo v mnoha případech přistoupeno ke stanovení absolutních koncentrací metabolitů pomocí interních (přidáno ke vzorku před extrakcí) nebo externích (přidáno ke vzorku po extrakci) standardů.⁷

Hmotnostní spektrometrie se v cílené metabolomice používá především ve třech formátech: GC-MS, FIA-MS/MS a HPLC-MS/MS.⁷

1.1.2 Necílená metabolomika

Necílené metabolomické studie jsou charakterizovány současným měřením velkého počtu metabolitů v každém vzorku. Tato strategie vylučuje potřebu předchozí specifické hypotézy o konkrétní sadě metabolitů a místo toho analyzuje globální metabolomický profil. V důsledku toho jsou studie charakterizovány generováním velkého množství dat. Tato data se vyznačují nejen svým objemem, ale také svou složitostí, a proto je zapotřebí vysoce výkonných bioinformatických nástrojů. Cílem necílené metabolomiky je tedy změřit co nejvíce

metabolitů v daném vzorku, a to i včetně dříve neznámých metabolitů. Je to důležitá metoda především pro charakteristiku „otisku prstu“ biologického vzorku.⁸

1.2 Technika LC-MS/MS

1.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejčastěji používaných separačních technik, které se používají v mnoha různých oblastech k usnadnění identifikace a kvantifikace látek v různých matricích. Pro citlivé a selektivní stanovení stopových množství farmaceuticky aktivních sloučenin v biologických vzorcích a jejich dávkových formách se široce používají techniky kapalinové chromatografie s různými režimy detekce.⁹

1.2.1.1 Typy kapalinové chromatografie

Dva základní typy kapalinové chromatografie jsou chromatografie s normálními fázemi (NPLC) a chromatografie s reverzními fázemi (tj. chromatografie s obrácenými fázemi, RPLC), dalším známým typem je kapalinová chromatografie s hydrofilními interakcemi (HILIC). V chromatografii s normálními fázemi se používají polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze, kdežto v chromatografii s reverzními fázemi se používají nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Chromatografie s polární stacionární fází je historicky starší, a proto nese označení „chromatografie s normálními fázemi“. Dnes se častěji využívá chromatografie s reverzními fázemi, jelikož ji lze využít pro podstatně širší okruh analytů a typů vzorků oproti chromatografii s normálními fázemi. Běžně používané mobilní fáze jsou voda, acetonitril, methanol, ethanol, cyklohexan, hexan (rozpuštědla jsou napsána v řadě podle klesající polarity) a jako stacionární fáze jsou obvykle používány reverzní stacionární fáze typu C18.¹⁰

Vzorek tvořený velmi hydrofilní látkou nemusí být v systému s reverzními fázemi zadržován, naproti tomu v systému s normálními fázemi může být velmi dobře zadržován, bohužel se ale v systému s normálními fázemi typicky používají nevodná rozpouštědla, ve kterých jsou velmi hydrofilní látky nerozpustné. Řešením těchto problémů může být použití HILIC. Jedná se o alternativu k výše zmíněným dvěma technikám kapalinové chromatografie.¹¹ Termín HILIC poprvé navrhl Alpert v roce 1990 a v posledních letech se o tuto techniku

významně zvýšil zájem. HILIC je způsob fungování v HPLC, který je odlišný jak od režimu s reverzními fázemi, tak od režimu s normálními fázemi. Stacionární fáze HILIC vychází ze systému s normálními fázemi, jedná se o polární stacionární fázi, používá se například oxid křemičitý, nemodifikovaný silikagel či modifikovaný silikagel s navázanými nejrůznějšími skupinami. Mobilní fáze v HILIC je složena z polárních rozpouštědel, obvykle je složena z acetonitrilu a z vody, podíl organického rozpouštědla je však vždy vyšší (cca. $\geq 60\%$). Z výše zmíněného vyplývá, že použitá stacionární fáze je polárnější než mobilní fáze.¹² V podstatě se tedy jedná o chromatografii v systému normálních fází, jejíž mobilní fáze obsahuje vodu. Eluční pořadí analytů je od nejméně polárních po nejvíce polární.¹¹ HILIC tedy obrací pořadí eluce, což usnadňuje separaci velmi polárních látek od interferencí, jako jsou složky matrice, a také zvyšuje specifitu a citlivost metody.¹² Retenční mechanismus se jeví jako složitý, jelikož zahrnuje sekundární elektrostatické, hydrofobní a vodíkové vazebné interakce, které závisí na použitých podmínkách - například na složení mobilní fáze. Předpokládá se, že na povrchu fáze HILIC je přítomna vrstva vody a k retenci dochází interakcí polárních analytů s touto stabilní vrstvou vody.¹² Tradiční chromatografie s reverzní fází se tedy používá při separaci nepolárních až mírně polárních molekul, zatímco režim HILIC (kapalná chromatografie s hydrofilní interakcí) je technika volená pro mírně až silně polární metabolity.¹³

1.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je všestranný analytický nástroj, díky kterému lze nejen určit molekulovou hmotnost neznámé látky, ale je možné i identifikovat neznámou látku, určit její prvkové složení a v některých případech určit také její strukturu.¹⁴

Různé techniky využívající hmotnostní spektrometrii mohou vykazovat různý stupeň hmotnostního rozlišení, například od jednotkové hmotnosti na kvadrupólových přístrojích až po techniky vyššího rozlišení, jako jsou Fourierova transformace hmotnostní spektroskopie (FT-MS) nebo GC-Orbitrap. Hmotnostní spektrometr může být vybaven jedním analyzátozem či případně více analyzátozem, díky nimž je pak možné zvýšit rozlišení spektrometru. Druhý analyzátor (MS_2) se používá k měření hodnoty m/z výsledných fragmentových iontů, čímž se získá MS/MS neboli MS^2 spektrum. Dále můžeme přidat ještě třetí analyzátor, ve kterém je disociován fragmentový iont z MS_2 a je zaznamenáno jeho spektrum $MS/MS/MS$ neboli

tzv. MS³ spektrum. Hromadné analyzátory lze uspořádat do série v prostoru (tandemový kvadrupól, Q-TOF přístroje) nebo v čase (iontové pasti).⁷

1.2.2.1 Hmotnostní analyzátory

Důležitou částí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor. V hmotnostním analyzátoru dochází za vakua k separaci iontů podle jejich m/z a zároveň dochází k propouštění dostatečného množství příslušných iontů, které dopadají na detektor a ten v závislosti na množství iontů vyvolá signál. Je známo více druhů analyzátorů, které lze rozdělit do tří skupin. Do první z nich patří skenující analyzátory, které kontinuálně v čase separují ionty o určité m/z a tyto vybrané ionty dále vysílají k detektoru. Jako zástupce této skupiny lze jmenovat kvadrupólové analyzátory či sektorové přístroje. Druhá skupina je typická transmisí všech iontů do letové trubice ve stejném čase. Teprve až v letové trubici dochází k separaci iontů podle rozdílné doby letu k detektoru. Hlavním zástupcem této skupiny je průletový analyzátor (TOF). Poslední skupinu tvoří analyzátory, které zachytávají ionty v cele či v iontové pasti (iontová past, iontová cyklotronová rezonance). Tyto analyzátory s použitím Fourierovi transformace kombinují analyzátor a detektor v jedné měřící cele.^{15,14} Poměrně často jsou používány tzv. hybridní instrumenty, které se získávají spojením různých hmotnostních analyzátorů. Jedná se například o trojitý kvadrupól (QqQ), kvadrupól/lineární iontová past (Q-LIT), kvadrupól/průletový analyzátor (Q-TOF) či průletový analyzátor/průletový analyzátor (TOF-TOF).¹⁶

1.2.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

S rozšířením ionizace elektrosprejem (ESI) a s rozšířením laserové desorpce (ionizace za účasti matrice, MALDI) vzrostla i potřeba fragmentovat ionty za účelem strukturní analýzy, kvantitativní analýzy a za účelem studia fyzikálně-chemických vlastností iontů, čemuž dopomáhá tandemová hmotnostní spektrometrie. Tandemová hmotnostní spektrometrie je dvojího typu:

1. Dva hmotnostní analyzátory za sebou – tj. tandemová hmotnostní spektrometrie v prostoru.
2. Jeden hmotnostní analyzátor, který nejprve zachytí specifický ion, následně ho excituje a změří hmotnostní spektrum vzniklých produktů – tj. tandemová hmotnostní spektrometrie v čase.

V tandemové hmotnostní spektrometrii v prostoru se používají nejméně dva hmotnostní analyzátoři v sérii. První z nich vybírá prekurzorový ion a druhý skenuje produkty, které vznikly aktivací ve srážkové komoře umístěné v oblasti mezi analyzátoři, která je naplněná neutrálním plynem (argon, dusík). V tandemové hmotnostní spektrometrii v čase se jedná o postupné manipulování iontů v iontových pastech. Ionty se nejprve z iontového zdroje přivádí do pasti a jsou zachycené v periodickém radiofrekvenčním elektromagnetickém poli. Poté při izolaci prekurzoru dochází ke změně výsledného pole, pouze ionty prekurzoru si zachovávají stabilní energii. K aktivaci dochází většinou srážkami s plynem přítomným v pasti (často se používá helium). Nakonec jsou produkty v iontových pastech zachyceny a následně vypuzeny do detektoru.¹⁷

Tandemová hmotnostní spektrometrie má rozdíl od klasické hmotnostní spektrometrie několik výhod, mezi něž patří např. lepší poměr signálu k šumu (což snižuje limit kvantifikace), širší lineární rozsah kvantifikace, lepší přesnost a reprodukovatelnost (zejména při měření nízkých koncentrací analytů).¹⁸

V literatuře se tandemová hmotnostní spektrometrie nejčastěji označuje jako MS/MS, MSMS či MS². Koncept tandemové hmotnostní spektrometrie lze rozšířit na vícenásobnou fragmentaci MSⁿ, nejčastěji se ale používá dvojstupňové uspořádání, a to ať už kvůli příliš vysoké ceně přístroje pro vícenásobnou fragmentaci nebo kvůli snižování iontového proudu ztrátami při průletu jednotlivými analyzátoři. Měření v tandemové hmotnostní spektrometrii je možné rozdělit do tří kroků. V prvním kroku se nejprve izoluje iont prekurzoru, následně se (ve druhém kroku) iont prekurzoru aktivuje (nejčastěji srážkami ve srážkových komorách - kvadrupólové a hexapólové srážkové komory) a dojde k vybuzení vnitřní energie iontu (může k tomu dojít např. srážkou s neutrálním plynem, ozáření iontů v ultrafialové či infračervené oblasti). Po aktivaci dochází k rozpadu iontu. Ve třetím kroku se jednotlivé vzniklé fragmenty analyzují.¹⁷

Trojité kvadrupólový analyzátor (TQMS nebo QqQ) se řadí mezi nízkorozlišovací analyzátoři a na rozdíl od klasického kvadrupólového analyzátoru se liší počtem hmotnostních filtračních kvadrupólů. Jedná se o tandemový hmotnostní spektrometr složený ze dvou kvadrupólových hmotnostních analyzátorů (Q₁ a Q₃), mezi nimiž je kolizní cela (Q₂). První z kvadrupólů (Q₁) slouží pro izolaci prekurzorových iontů, druhý kvadrupól (Q₂) představuje kolizní celu, ve které dochází k fragmentaci daných iontů pomocí reakčního plynu, například

argonu. Třetí kvadrupól (Q_3) slouží pro izolaci a pro skenování produktových iontů.¹⁹ Trojitý kvadrupólový spektrometr lze použít k získání strukturálních informací nebo ke kvantifikaci - často se používá pro kvantifikaci malých molekul v biologických matricích díky jeho vynikající selektivitě a citlivosti.²⁰

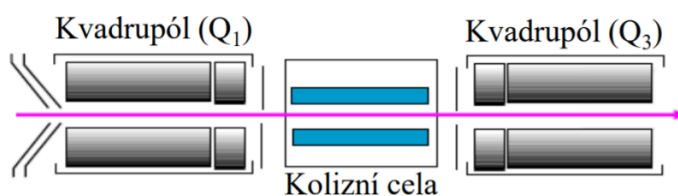


Schéma 1: Trojitý kvadrupól¹⁶

Tandemová hmotnostní spektrometrie v prostoru používá několik skenovacích postupů, které nelze provést pouze s jedním analyzátozem. Jedná se především o tyto skenovací postupy (funkce):

(1) Sledování produktových iontů

Jedná se o sken produktů či sken dceřiných iontů. První analyzátor je nastaven na poměr m/z určitého prekurzoru, zatímco druhý analyzátor měří všechny ionty vzniklé z prekurzoru aktivovanými srážkami – je tedy změřeno plné spektrum fragmentovaných iontů z prekurzoru.

(2) Sledování neutrální ztráty

Při tomto typu měření se hledají všechny ionty, u kterých došlo ke zmenšení o stejnou nominální hodnotu hmotnosti (např. se může jednat o ztrátu vody, která odpovídá snížení hmotnosti o hodnotu rovnou 18 Da). Při použití této metody skenují oba analyzátoři stejně s konstantním rozdílem m/z .

(3) Sledování prekurzorových iontů

Tímto způsobem se získávají informace o všech iontech, které po aktivaci vytvořili fragment o stejném poměru m/z . První z analyzátorů skenuje celé spektrum, zatímco druhý analyzátor je nastaven pouze na příslušný poměr m/z .

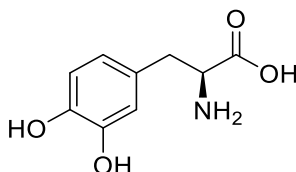
(4) Sledování vybraných reakcí (SRM) a sledování více reakcí (MRM)

Při sledování vybraných reakcí je pro daný časový úsek první analyzátor nastaven na poměr m/z prekursoru a druhý analyzátor na poměr m/z produktu. V případě, kdy je sledováno více fragmentačních reakcí (sledování více reakcí), musí oba analyzátoři rychle přeskočit na následující sledované páry iontů. Ani jeden z analyzátorů v tomto případě neskenuje plné spektrum. Monitorovány jsou tedy pouze jeden nebo dva vybrané páry prekursor + produkt. Pokud je monitorováno více reakcí než pouze jedna, pak se toto monitorování nazývá monitorování více reakcí (MRM).

Všeobecně se tandemové hmotnostní spektrometry velmi často používají ve farmaceutickém průmyslu, v klinických laboratořích a dále se hojně používají při zjišťování kontaminace potravin či pro sledování kvality životního prostředí.¹⁷

1.3 Cílový analyt – Levodopa

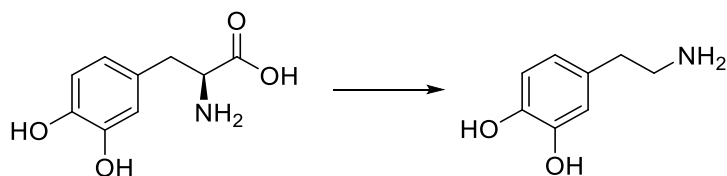
Levodopa (L-dopa) je aminokyselina ze skupiny velkých neutrálních aminokyselin (LNAA), kam patří tyrosin, fenylalanin, tryptofan, leucin, izoleucin a valin. Jedná se o přirozeně se vyskytující L-izomer aminokyseliny 3,4-dihydroxyfenylalaninu. Struktura levodopy je ukázána na Obr. 1.²¹



Obrázek 1: Struktura L-dopa. Zdroj: Vlastní zpracování.

Důležitost levodopy spočívá v tom, že se jedná o prekursor dopaminu, který má antiparkinsonické vlastnosti. Levodopa je tedy prolečivo, které je pomocí DOPA-dekarboxylasy konvertováno na dopamin (viz Obr. 2) a může procházet přes hematoencefalickou bariéru.²² Samotné podávání dopaminu není možné, neboť dopamin velmi obtížně přechází přes hematoencefalickou bariéru. Jakmile je levodopa dopravena do mozku, je zde dekarboxylována na dopamin a stimuluje dopaminergní receptory, čímž kompenzuje vyčerpaný přísun endogenního dopaminu, který je pozorovaný u pacientů s Parkinsonovou chorobou. Aby se zajistilo, že adekvátní koncentrace levodopy dosáhne centrálního nervového

systému, podává se L-dopa současně s karbidopou, inhibitorem dekarboxylasy, který nepřekračuje hematoencefalickou bariéru, čímž se snižuje dekarboxylace a inaktivace levodopy v periferních tkáních a současně se tak zvyšuje dodávka dopaminu do centrální nervové soustavy.^{22,23}



Obrázek 2: Konverze levodopy pomocí DOPA-dekarboxylasy na dopamin. Zdroj: Vlastní zpracování.

Levodopa se jako léčivo nepoužívá pouze pro léčbu Parkinsonovy choroby (PN), ale obecně pro léčbu parkinsonského syndromu, který je součástí dalších nemocí. Avšak většina onemocnění s parkinsonským syndromem (70-80 %) je tvořena PN, zbytek činí onemocnění, kde je součástí jejich obrazu parkinsonský syndrom.²⁴

Levodopa je hlavním pilířem léčby Parkinsonovy choroby již více než 40 let. Zavedením prekurzoru dopaminu do léčby PN byla vylepšena životní prognóza onemocnění. Před zavedením levodopy do léčby byla úmrtnost pacientů s PN v průměru třikrát vyšší než úmrtnost v celé populaci. Po zavedení levodopy do léčby koncem šedesátých let 20. století došlo k poklesu úmrtnosti, a to v průměru na 1,4násobek oproti úmrtnosti v celé populaci. Průměrná doba přežití před zavedením levodopy byla asi osm let, v současnosti se tato doba zvýšila až na čtrnáct let.²⁵

1.3.1 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je běžná neurodegenerativní porucha (druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění po Alzheimerově chorobě) postihující přibližně 1 % populace ve věku nad 60 let, je to jedna z nevléčitelných, a ne zcela objasněných chorob. PN postihuje více muže, poměr nemocných mužů vůči ženám je přibližně 3:2.²⁶ Jedná se o poruchu, která je charakterizována motorickou symptomatologií, ta se projevuje třesem v klidovém stavu, bradykinezi, rigiditou, posturální nestabilitou, sklopeným držení těla. Klinické spektrum onemocnění je rozsáhlejší a zahrnuje širokou škálu nemotorických symptomů, včetně

kognitivních a behaviorálních symptomů, poruch spánku, autonomních dysfunkcí, senzorických symptomů, únavy, může dojít i k poruše čichu, ke zvýšenému pocení a slinění, či k depresi.²⁷

Hlavními neuropatologickými rysy PN jsou ztráta dopaminergních neuronů v *Substantia nigra* (černá substance) a depozice specifických agregátů cytoplazmatických proteinů, známých jako Lewyho tělíska.²⁷ Výše zmíněný neuromediátorový deficit způsobuje dysregulaci činnosti přímé a nepřímé motorické dráhy.²⁸ *Substantia nigra* je struktura bazálních ganglií umístěná ve středním mozku, která hraje nezastupitelnou roli v řízení pohybu a ve které se tvoří dopamin, který je následně transportován pomocí výběžků nervových buněk z černé substance do oblasti bazálních ganglií – tzv. *striatum* (žíhané jádro). Z žíhaného jádra je dopamin později uvolňován do synapsí. V případě, že je dopaminu nedostatek, *striatum* spolehlivě nepracuje a dochází k poruše regulace hybnosti.²⁹ Lewyho tělíska jsou mikroskopické útvary tvořené shluky bílkovin. Jedná se o abnormální agregaci bílkovin. Pokud je v buňce neuronu přítomno Lewyho tělísko, dochází k hromadění proteinu, který inhibuje opravnou funkci. Opravná funkce je pak značně snížena až potlačena, což může vyvolat buněčnou smrt.³⁰

1.3.2 Dávkování levodopy a komplikace léčby

Levodopa se obvykle nepoužívá pro iniciální léčbu PN, pacientům je podávána v případech, kdy předcházející léčba již není dostatečně účinná či pokud není možné nasadit agonisty dopaminu. Nejprve jsou pacientům podávány nízké dávky levodopy (cca. 50-100 mg/den), které se postupně zvyšují o 100 mg po 4–7 dnech do doby, než dojde k dosažení uspokojivého symptomatického efektu. Lékové formy levodopy jsou různé – standardně se podávají kapsle a tablety či tablety s prodlouženým uvolňováním.^{31,32}

Účinky levodopy u PN jsou jedním z nejzáhadnějších jevů v medicíně. Zpočátku levodopa snižuje symptomy a příznaky onemocnění po celý den a vrací pacienta do plnohodnotného života. Při pokračující léčbě levodopou se objevují výkyvy v motorické reakci - pacient si obvykle všimá nežádoucích účinků na konci každého dávkovacího cyklu. Následně se antiparkinsonská reakce stává méně předvídatelnou ve vztahu k dávkování a často je doprovázena dyskinezí.³³

Jedním z několika problémů dlouhodobé terapie levodopou je její schopnost zvyšovat a zároveň i udržovat zvýšené plazmatické hladiny homocysteinu. Homocystein je látka s prokázaným negativním vztahem k cévním chorobám, kognitivní dysfunkci a k demenci.³⁴

1.4 Stanovení levodopy v biologickém materiálu

Velké množství výzkumných skupin se zabývalo stanovením levodopy v biologickém materiálu, a to různými technikami a způsoby, vybrané z nich jsou podrobněji probrány níže. Pro přehlednost a snadné srovnání jednotlivých použitých HPLC-MS/MS metod jsou v Tab. 1 vypsány důležité rozdíly v jednotlivých přístupech. V Tab. 2 jsou porovnány jiné než HPLC-MS/MS techniky použité pro stanovení L-dopy mezi sebou - jsou zde uvedeny výhody/nevýhody použití dané techniky.

Tabulka 1: Souhrnná tabulka znázorňující rozdíly v použitých metodách HPLC-MS/MS jednotlivých výzkumných skupin pro stanovení levodopy

Studie - autoři	César a kol. ³⁵	Vilhena a kol. ³⁶	Chi a kol. ³⁷
Druh matrice	lidská plazma	lidská plazma	kryší plazma
Technika	HPLC - MS/MS	HPLC - MS/MS	HPLC-MS/MS
Druh chromatografie	RPLC	HILIC	RPLC
Typ kolony	ACE C18 (50 x 4,6 mm i.d.; velikost částic 5 µm)	Atlantis HILIC (150 x 2,1 mm, 3 m, Waters, USA)	Agilent Zorbax SB-Aq (100 x 3,0 mm, 3,5 µm)
Mobilní fáze	0,2% HCOOH; CH ₃ CN	Vodný roztok 0,05% HCOOH + 3 mmol/l HCOONa; CH ₃ CN	1,0 M HCOONH ₄ + HCOOH + CF ₃ (CF ₂) ₃ COOH (1 000:10:5:1); CH ₃ CN
Průtok	0,2 ml min ⁻¹	0,2 ml min ⁻¹	0,8 ml min ⁻¹
Injekční objem	10 µl	5 µl	10 µl
Extrakce vzorku	srážení - kyselina chloristá	PVDF filtr	LLE (směs ethylacetátu a n-butylalkoholu)
Vnitřní standard	methyldopa	deuterovaná levodopa	deuterovaná levodopa
Limit kvantifikace	50 ng ml ⁻¹	75 ng ml ⁻¹	50 ng ml ⁻¹

Vývoj a validace vysoce výkonné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro simultánní kvantifikaci levodopy a karbidopy v lidské plazmě³⁵

César a kol.³⁵ vyvinuli a zvalidovali citlivou, rychlou a vysoce účinnou metodu pro simultánní kvantifikaci levodopy a karbidopy v lidské plazmě s použitím HPLC-MS/MS. Pro zpracování plazmy byl použit jednoduchý krok srážení proteinu s kyselinou chloristou a jako vnitřní standard (IS) byla použita methyldopa. Analýzy byly prováděny za použití kolony ACE C18 (50 x 4,6 mm i.d.; velikost částic 5 µm) při 18 °C, mobilní fáze byla připravena z 0,2% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (90:10) při průtoku 0,2 ml min⁻¹. Analýza trvala 6 minut a injekční objem činil 10 µl. Tandemový hmotnostní spektrometr na principu trojitého kvadrupólu v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM) byl nastaven na detekci iontových přechodů m/z 198,1 → m/z 107,0 pro levodopu. Měření bylo provedeno v režimu pozitivní ionizace. Metoda byla validována a ukázala se jako lineární, precizní a přesná při měření v rozsahu 50 – 5 000 ng ml⁻¹, spodní limit kvantifikace metody je tedy 50 ng ml⁻¹.

Příprava vzorku probíhala následovně: Ke vzorku plazmy o objemu 250 µl bylo přidáno 50 µl IS (2 000 ng ml⁻¹ methyldopy) a 50 µl 2M kyseliny chloristé. Následně byl vzorek promíchán na přístroji vortex a poté odstředěn na centrifuze při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při 5 °C. Získaný supernatant byl přenesen do vialky a do chromatografického systému byl vstříknut alikvot o objemu 10 µl.³⁵

Nová metoda HILIC-MS/MS pro simultánní analýzu karbidopy, levodopy a jejich metabolitů v lidské plazmě³⁶

Ve studii provedené v Brazílii vědeckou skupinou pod vedením paní doktorky Vilhena³⁶, byla místo chromatografie na reverzní fázi použita hydrofilní interakční chromatografie. Cílem této studie bylo vyvinout metodu využívající systém HILIC a detekci MS/MS pro současné stanovení karbidopy, levodopy a jejich metabolitů (3-o-methyldopa a dopaminu) v lidské plazmě. Hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem byla provozována v režimu MRM za použití elektrosprejové ionizační techniky, u levodopy byly sledovány přechody m/z 198,2 → m/z 181,2 (pro detekci) a m/z 198,2 → m/z 152,1 (pro kvantifikaci). Po

jednoduché přípravě vzorků srážením bílkovin byla k oddělení za izokratických podmínek použita kolona Atlantis HILIC (150 × 2,1 mm, 3 m, Waters, USA), stacionární fáze v této koloně je oxid křemičitý, mobilní fáze byla vytvořena smísením acetonitrilu a vody v poměru 79:21 a byla do ní přidána 0,05% kyselina mravenčí a mravenčan sodný (o koncentraci 3 mmol l⁻¹). Teplota kolony byla nastavena na 25 °C, izokratický průtok činil 200 µl min⁻¹ a injekční objem byl 5 µl. Jako vnitřní standard pro kvantifikaci byla použita deuterovaná levodopa.³⁶

Kalibrační vzorky byly připraveny přidáním 50 µl pracovního roztoku (levodopa, karbidopa, dopamin, 3-o-methyldopa) a 50 µl vnitřního standardu pro kvantifikaci ke 400 µl plazmy (blank). Následně bylo ke vzorkům přidáno ještě 1500 µl acetonitrilu, který obsahoval 0,05% kyselinu mravenčí a mravenčan sodný (3 mmol l⁻¹). Takto připravené kalibrační vzorky byly promíchány na přístroji vortex po dobu tří minut a následně byly odstředěny na centrifuze při 36 000 otáčkách za minutu po dobu dvaceti minut, teplota na centrifuze byla nastavena na 5 °C. Alikvot supernatantu byl před vstříkáním přefiltrován přes polyvinylidenfluoridový injekční filtr. Pro ochranu sledovaných analytů před degradací byly všechny vzorky připraveny za nízké expozice světla. Kalibrační křivka byla proměřena v rozmezí koncentrací 75-800 ng ml⁻¹ pro levodopu.³⁶

Vzorky byly připraveny tak, že nejprve bylo 400 µl plazmy pipetováno do 2ml polypropylenové zkumavky, ke každému vzorku bylo následně přidáno 50 µl roztoku vnitřního standardu (deuterovaná levodopa) a směs byla promíchána na přístroji vortex po dobu jedné minuty. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 1550 µl acetonitrilu obsahujícího 0,05% kyselinu mravenčí a mravenčan amonný o koncentraci 3 mmol l⁻¹, vzorky byly promíchány na přístroji vortex po dobu tří minut a odstředěny na centrifuze při 36 000 otáčkách za minutu při 5 °C po dobu dvaceti minut. Alikvot supernatantu byl před injekcí přefiltrován přes polyvinylidenfluoridový injekční filtr.³⁶

Kvantifikace levodopy a karbidopy v krysí plazmě pomocí LC – MS/MS: Klíčová role iontového párování v chromatografii na reverzní fázi³⁷

Ve studii provedené Chi a kol.³⁷ byla simultánně stanovena levodopa a karbidopa v krysí plazmě pomocí LC-MS/MS za pomoci ionto-párového činidla - kyseliny perfluoropentanové (PFPA). Použitá mobilní fáze v chromatografii byla složena ze dvou roztoků. První roztok

obsahoval vodu, 1M mravenčan amonný, kyselinu mravenčí a PFPA v objemovém poměru 1 000:10:5:1 (složka A). Druhý roztok byl složen pouze z čistého acetonitrilu (složka B). Koncentrace zásobních roztoků levodopy a karbidopy byla pro oba roztoky $200 \mu\text{g ml}^{-1}$, ředění bylo provedeno pomocí 1% roztoku disiřičitanu sodného ve vodě. Analyzovaným vzorkem byla krysí plazma, k níž byl ihned po odběru přidán antikoagulant. Před započítáním analýzy byl ke vzorku (kvůli stabilizaci levodopy a karbidopy) přidán 25% roztok disiřičitanu sodného v objemovém poměru 10:1 (tj. 10 ml krysí plazmy a 1 ml 25% roztoku disiřičitanu sodného). Pro extrakci levodopy a karbidopy ze vzorku plazmy byla použita extrakce kapalina-kapalina (LLE) za pomoci směsi ethylacetátu a n-butylalkoholu v poměru 1:1. Do směsi byl navíc přidán 1% roztok PFPA.

Hmotnostní spektrometrická detekce byla provedena na API 6500 trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometru od AB Sciex (Ontario, Kanada). Detekce byla provedena v režimu MRM využívající přechody z protonované molekuly při m/z 198 \rightarrow m/z 152 pro levodopu a m/z 201 \rightarrow m/z 154 pro L-dopa (D_3). Všechny separace byly provedeny na koloně Agilent Zorbax SB-Aq (100 \times 3,0 mm, 3,5 μm) za izokratických podmínek, mobilní fáze se skládala z 96 % z roztoku A a zbylé 4 % tvořil roztok B, průtok mobilní fáze byl nastaven na $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ a injekční objem vzorku byl 10 μl .

Vyvinutá metoda byla úspěšně validována v rozmezí 50–10 000 ng ml^{-1} pro levodopu a 25–5 000 ng ml^{-1} pro karbidopu s použitím levodopy- d_3 a karbidopy- d_3 jako vnitřních standardů.³⁷

Vysoce citlivé stanovení levodopy pomocí adsorpční stripovací voltametrie na modifikované skelné uhlíkové elektrodě³⁸

Levodopu je možné stanovit i pomocí jiných technik než je LC-MS/MS, Górska Anna s její laboratorní skupinou stanovili levodopu pomocí adsorpční stripovací voltametrie na modifikované skelné uhlíkové elektrodě.³⁸ Pro modifikaci skelné uhlíkové elektrody byl použit Nafion, saze a ruthenium. Signál levodopy získaný na modifikované elektrodě byl 12x vyšší ve srovnání s nemodifikovanou skelnou uhlíkovou elektrodou.

Ve studii byla popsána vysoce citlivá adsorpční stripovací voltametrická metoda pro stanovení levodopy ve farmaceutických produktech (Madopar 125 – 100 mg v kapsli a

Madopar 62,5 – 50 mg v tabletě). Na základě získaných výsledků ze studie byla vypočtena mez detekce, která měla hodnotu 17 nM (3,4 ng ml⁻¹) a limit kvantifikace, který byl 56 nM (11 ng ml⁻¹). Oproti výše uvedeným HPLC-MS/MS metodám má voltametrie mnoho výhod. Je relativně levná, analýza vzorků je snadná a rychlá. Navíc se jedná o vysoce citlivou metodu, která umožňuje dosažení velmi nízkých detekčních limitů. Nevýhodou voltametrie je příprava pracovní elektrody, pasivace elektrod a následné čištění.³⁸

Současné stanovení sérových koncentrací levodopy, dopaminu, 3-O-methylidopy a α-methylidopy pomocí HPLC³⁹

Na italské univerzitě v Sieně byla vyvinuta metoda pro současné stanovení sérových koncentrací levodopy, dopaminu, 3-O-methylidopy a α-methylidopy pomocí HPLC s UV detekcí a s fluorimetrickou detekcí.³⁹

Krevní sérum bylo připraveno dvěma způsoby. V prvním způsobu přípravy vzorku (bez derivatizace) bylo 250 μl krevního séra extrahováno 125 ml 2M kyseliny chloristé. Extrakt byl odstředěn na centrifuze (10 minut, 5 000 g). Supernatant (20 μl) byl injektován do HPLC. Druhý způsob (s derivatizací) byl stejný jako první až na poslední krok, kdy supernatant nebyl nadávkován do HPLC, ale byl neutralizován 2M uhličitánem draselným (výsledné pH se nacházelo v rozmezí 6-6,5). Dále byl supernatant odstředěn na centrifuze (10 minut, 5 000 g) a byl smíchán s 20mM hexakynoželezitanem draselným, acetonitrilem a s 0,1M difenoxyethanem. Vzniklá směs byla inkubována (37 °C, 40 minut). Alikvot získané směsi (20 μl) byl nastříknut na HPLC.

Pro separaci analytů obsažených ve vzorku připraveným postupem bez derivatizace byla použita MF složená z různých poměrů 0,02M pufru fosforečnanu draselného (pH 2,5) a methanolu (poměry byly měněny dle gradientového elučního profilu). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml min⁻¹. Pro fluorimetrickou detekci byla vlnová délka excitace 270 nm a vlnová délka emise 320 nm. UV detekce byla proměřena při 230 nm. Pro separaci derivatizovaných sloučenin byla použita MF složená z 50mM TRIS o pH 7, z methanolu a z acetonitrilu (8:1:1; průtok MF 1 ml min⁻¹). Pro fluorimetrickou detekci byla vlnová délka excitace 345 nm a vlnová délka emise 485 nm.

V případě použití nederivatizovaného vzorku měly obě detekční metody dobrou reprodukovatelnost, jejich citlivost byla odlišná. UV detektor dokázal detekovat analyty v koncentračním rozmezí nmol ml^{-1} , kdežto metoda detekce nativní fluorescence sloučenin umožňuje měřit koncentrace o tři řády nižší (pmol ml^{-1}).

V případě použití derivatizovaného vzorku je získána vyšší citlivost detekce i oproti detekci nativní fluorescence. Vyšší citlivost je zajištěna přeměnou molekuly katecholaminu na vysoce fluorescenční derivát – benzoxazol. Jedna ze sledovaných sloučenin, 3-O-methyl dopa, nereaguje s derivatizačním činidlem, takže současné stanovení čtyř sloučenin není možné.

UV spektrofotometrický detektor je levná a rychlá detekční metoda. Lze pomocí něho zaznamenat spektrum celé látky, a je možné sdružovat signály několika fotodiod a optimalizovat tak spektrální rozlišení. Na rozdíl od MS/MS detektoru jde o detektor nedestruktivní, nedosahuje však takové citlivosti. Fluorescenční detektor je také nedestruktivní, zároveň je vysoce selektivní a jeho citlivost je vyšší oproti UV detektoru.³⁹

Jednorázový elektrochemický senzor pro rychlé stanovení levodopy⁴⁰

Bergamini a kol.⁴⁰ představili návrh aplikace elektrochemického senzoru se zlatou sítotiskovou elektrodou pro monitorování L-dopy ve stacionárním systému i v průtoku. Hlavní výhody tohoto elektrodového systému tkví v jeho nízké ceně, potenciální přenositelnosti, jednoduchosti ovládání a spolehlivosti. Navíc se lze vlivem jednorázového použití vyhnout pasivaci elektrod z opakovaného použití stejného povrchu elektrody pro následné analýzy.

Voltametrická a amperometrická měření byla provedena v konvenční elektrochemické cele a v systému mikropřtokových cel, na které byla k potenciostatu připojena sítotisková zlatá elektroda. Zásobní roztok $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním referenčního standardu L-dopy v demineralizované vodě. Nosným elektrolytem byl acetátový pufr ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$; pH 3,0). Navržená metoda byla testována pro stanovení L-dopy ve dvou farmaceutických formulacích – v tabletách Sinemet® a Prolopa®.

Elektrochemickou oxidací L-dopy na zlaté sítotiskové elektrodě při +0,8 V v acetátovém pufru (pH 3,0) při průtokové rychlosti $14,1 \text{ ml min}^{-1}$ byla získána lineární kalibrační křivka v rozmezí od $1,5 \cdot 10^{-6}$ do $6,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, detekční limit metody byl $9,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

Pomocí elektrooxidace L-dopy při +0,63 V v acetátovém pufru (pH 3,0) na zlaté sítotiskové elektrodě ve stacionárním systému je možné získat lineární kalibrační křivku od $9,9 \cdot 10^{-5}$ do $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹, detekční limit metody je $6,8 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹.

Oproti detekci L-dopy pomocí HPLC-MS/MS je elektrochemický senzor levný, přenositelný a jednoduše se ovládá. Naopak mezi nevýhody patří jeho nízká citlivost (a to i oproti DAD detektoru, UV/VIS detektoru, či fluorescenčnímu detektoru ve spojení s HPLC).⁴⁰

Jednorázový elektrochemický biosenzor pro stanovení L-dopa v neředěném lidském séru⁴¹

V další ze studií byl navržen jednorázový elektrochemický biosenzor pro stanovení L-dopy v neředěném lidském séru.⁴¹ Tento biosenzor je založen na použití uhlíkových nanotrubiček - modifikované sítotiskové elektrody pokryté elektropolymerizovaným polythioninovým filmem na jejichž povrchu je umístěna vnější zesíťovaná vrstva obsahující tyrosinázu. Další pokrytí senzoru vrstvou Nafion umožňuje použití senzoru přímo na lidské sérum (bez předchozí úpravy). Pokrytí polymerní vrstvou bylo provedeno z důvodu vysoce nestabilního amperometrického signálu získaného na nepotaženém senzoru v séru, většinou v důsledku chemické oxidace referenční elektrody. Důležité je také poukázat na relevanci polythioninové vrstvy. Bez polythioninové vrstvy vykazoval příslušný biosenzor velmi nestabilní proud.

Elektrochemická měření pro stanovení L-dopy byla provedena kápnutím 100 µl vzorku na povrch elektrody a aplikací konstantního potenciálu -0,31 V (tzv. redukční potenciál). Princip fungování biosenzorů pro stanovení L-dopy spočívá v použití imobilizované tyrosinázy, která katalyzuje oxidaci L-dopy na orthochinon a následně dochází k redukci orthochinonu, což vede ke vzniku proudu s redukčním potenciálem stanoveným pomocí cyklických voltametrických experimentů. V důsledku toho je zaznamenaný proud přímo úměrný koncentraci L-dopy. Funkční vztah závislosti proudu na koncentraci L-dopy byl lineární v rozmezí koncentrací 0,8-22 µM ($\approx 0,16$ -4,3 mg l⁻¹). Mez detekce metody byla 2,5 µM ($\approx 0,49$ mg l⁻¹).

Jednorázový elektrochemický biosenzor má některé důležité výhody, mezi něž patří nízká cena stanovení, přenositelnost biosenzoru, dávkování pouze malého objemu vzorků.

Další velkou výhodou je možnost stanovovat L-dopu bez nutnosti předúpravy vzorku a jednorázové použití biosenzoru, které zabraňuje pasivaci elektrod při opakovaném použití.⁴¹

Tabulka 2: Souhrnná tabulka popisující výhody a nevýhody použití jednotlivých technik pro stanovení L-dopy. Údaje o jednotlivých metodách byly získány z výše uvedených publikací v kapitole 1.4, kde jsou tyto techniky a jednotlivé metody podrobněji popsány.

Technika	Výhody	Nevýhody
HPLC-MS/MS	vysoká citlivost (až 1 pg ml ⁻¹) selektivita a univerzálnost; možnost analýzy složitých směsí v komplikovaných maticích	vysoká cena; nároky na čištění; destruktivní technika
HPLC-UV/VIS ³⁹	aplikovatelnost pro širokou škálu látek; nízká cena; rychlost analýzy; rozsáhlé knihovny spekter; nedestruktivní	nízká citlivost (5 ng ml ⁻¹); absorbance rozpouštědel způsobuje drift základní linie
HPLC-FLD ³⁹	nedestruktivní; selektivní; specifický (výběr vhodné excitační a emisní λ); vyšší citlivost (až 3 pg ml ⁻¹ , oproti UV/VIS)	omezené použití – pouze fluoreskující látky
DPAdSV ³⁸	snadná a rychlá analýza vzorků; nízká cena; vysoká citlivost	nutná příprava pracovní elektrody; pasivace elektrody a následné čištění; nemožnost použití pro NP-HPLC
Senzor se zlatou sítotiskovou elektrodou ⁴⁰	nízká cena; přenositelnost; snadné ovládání; jednorázovost (vyhnutí pasivaci elektrod); rychlost měření	nízká citlivost (10 μ g ml ⁻¹); nutná úprava senzoru sloužícího pro jednoúčelovou analýzu; nutná úprava vzorku
Elektrochemický biosenzor ⁴¹	nízká cena; přenositelnost; selektivita odezvy; rychlost měření; jednorázovost (vyhnutí pasivaci elektrod); dávkování malého objemu vzorku; vysoká reprodukovatelnost	nízká citlivost (0,1 μ g ml ⁻¹); není nutná předúprava vzorku

Z výše uvedené Tab. 2 je zřejmé, že největší citlivosti dosahuje technika HPLC-MS/MS. Jedná se ale o techniku nákladnou a destruktivní. Vysokou citlivost splňuje i technika HPLC-FLD. Adsorpční stripovací voltametrie na modifikované skelné uhlíkové elektrodě je také metoda vysoce citlivá, ale její nevýhodou je příprava pracovní elektrody a pasivace pracovní elektrody při opakované analýze. Elektrochemické senzory/biosenzory jsou nejméně citlivé techniky pro stanovení L-dopy. Tuto nevýhodu ale dohánějí jednoduchostí jejich použití, krátkou dobou analýzy a jejich přenositelností z místa na místo.

2 Experimentální část

2.1 Instrumentace

Praktická část práce byla měřena na instrumentu Shimadzu LCMS-8045 (Kjóto, Japonsko), pro separaci byly vyzkoušeny a použity tyto kolony:

- Chromatografická kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 od firmy Agilent Technologies (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,9 μm
- Chromatografická kolona ACE[®] Excel[®] C₁₈-Amide od firmy Advanced Chromatography Technologies (Skotsko) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm
- Chromatografická kolona Atlantis[™] dC₁₈ od firmy Waters (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 3 μm
- Chromatografická kolona Atlantis[™] PREMIER BEH C₁₈ AX od firmy Waters (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm
- Chromatografická kolona ACQUITY UPLC[®] BEH HILIC od firmy Waters (Irsko) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm
- Chromatografická kolona ACQUITY UPLC[®] BEH AMIDE od firmy Waters (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm
- Chromatografická kolona HALO 90 Å Penta-HILIC od firmy Advanced Materials Technology (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 15,0 cm s velikostí částic 2,7 μm

Pro přípravu zásobních roztoků standardů analytů a pro úpravu vzorků byly použity tyto instrumenty:

- Analytické váhy, Entris[®], Sartorius, Německo
- Homogenizátor, VORTEX, Chromservis, Česká republika
- Odstředivka, Ependorf MiniSpin, USA
- Ultrazvukový sonikátor, Elma S15H, Elmasonic, Německo
- pH metr, 3540 pH/conductivity meter, Jenway, Velká Británie
- Magnetická míchačka, Velp Scientifica, Itálie

2.2 Použité chemikálie

- Voda, LC-MS čistota, Sigma Aldrich, Německo
- Acetonitril, CHROMASOLV™, LC-MS čistota $\geq 99,9\%$, Honeywell, Francie
- Methanol, CHROMASOLV™, LC-MS čistota $\geq 99,9\%$, Honeywell, Francie
- Kyselina mravenčí, 98% p. a., LC-MS čistota, Honeywell, Francie
- Mravenčan amonný, LC-MS čistota $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, Německo
- Levodopa, certifikovaný referenční materiál, farmaceutický sekundární standard, Sigma Aldrich, Německo
- L-Dopa-(phenyl-d₃), čistota $> 98\%$, Sigma Aldrich, Německo

2.3 Příprava vzorků

2.3.1 Levodopa, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)-L-alanin

Pro experiment zaměřený na optimalizaci detekce tandemovou hmotnostní spektrometrií bylo naváženo na analytických vahách 1,6 mg levodopy. Následně bylo k navážce přidáno 1,6 ml 1% roztoku kyseliny mravenčí. Vzorek byl promíchán na přístroji vortex a následně byl vložen do ultrazvukové lázně, kde byl ponechán po dobu 10 minut. Koncentrace vzniklého roztoku byla 1 mg ml^{-1} . Následně byl vzniklý vzorek pro optimalizaci naředěn za pomoci směsi 0,1% kyselina mravenčí:methanol (v poměru 5:5, v/v) tak, aby výsledná koncentrace levodopy ve vzorku byla $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Pro následné experimenty (volba kolony) byl připraven vzorek navážením 2,4 mg levodopy na analytických vahách. Navážka byla následně rozpuštěna pomocí 2,4 ml 1% roztoku kyseliny mravenčí. Vzorek byl promíchán na přístroji vortex a následně byl vložen do ultrazvukové lázně, kde byl ponechán po dobu 10 minut. Koncentrace vzniklého roztoku byla 1 mg ml^{-1} . Následně byl vzniklý vzorek pro optimalizaci naředěn za pomoci směsi 0,1% kyselina mravenčí:acetonitril (v poměru 2:8, v/v) tak, aby výsledné koncentrace levodopy ve vzorku byly $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a 500 ng ml^{-1} .

2.3.2 L-dopa (D₃), 3-(3,4-Dihydroxyfenyl-2,5,6-d₃)-L-alanin

Pro experiment zaměřený na optimalizaci detekce tandemovou hmotnostní spektrometrií bylo naváženo na analytických vahách 1,2 mg L-dopa (D₃). Následně bylo

k navážce přidáno 1,2 ml 1% roztoku kyseliny mravenčí. Vzorek byl promíchán na přístroji vortex a následně byl vložen do ultrazvukové lázně, kde byl ponechán po dobu 10 minut. Koncentrace vzniklého roztoku byla 1 mg ml^{-1} . Následně byl vzniklý vzorek pro optimalizaci naředěn za pomoci směsi 0,1% kyselina mravenčí:methanol (v poměru 5:5, v/v) tak, aby výsledná koncentrace L-dopa (D_3) ve vzorku byla $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

2.3.3 Vzorek obsahující biologickou matici (spikovaný vzorek, referenční matrice)

Pro přípravu vzorku obsahující biologickou matici byl nejprve připraven roztok levodopy a roztok interního standardu (deuterované levodopy).

Pro přípravu roztoku levodopy bylo na analytických vahách naváženo 2,0 mg levodopy. Následně bylo k navážce přidáno 2,0 ml roztoku složeného z methanolu a z 1 M kyseliny chlorovodíkové (v poměru 5:5, v/v). Vzorek byl promíchán na přístroji vortex a následně byl vložen do ultrazvukové lázně, kde byl ponechán po dobu 10 minut. Koncentrace vzniklého roztoku byla 1 mg ml^{-1} . Poté byl vzniklý vzorek naředěn za pomoci směsi 0,1% kyselina mravenčí:methanol okyselený 0,1% kyselinou mravenčí (v poměru 5:5, v/v) tak, aby výsledná koncentrace levodopy ve vzorku byla $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a 500 ng ml^{-1} .

Následně bylo na analytických vahách naváženo 1,5 mg interního standardu (deuterovaná levodopa). K navážce bylo přidáno 1,5 ml roztoku složeného z methanolu a z 1M kyseliny chlorovodíkové (v poměru 5:5, v/v). Vzorek byl promíchán na přístroji vortex a následně byl vložen do ultrazvukové lázně, kde byl ponechán po dobu 10 minut. Koncentrace vzniklého roztoku byla 1 mg ml^{-1} . Poté byl vzniklý roztok IS naředěn nejprve na koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ samotným 0,1% roztokem kyseliny mravenčí, dále byl vzorek IS naředěn na koncentraci 100 ng ml^{-1} pomocí acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí.

Vzorek obsahující biologickou matici s koncentrací levodopy $833,33 \text{ ng ml}^{-1}$ byl připraven smícháním $25 \text{ } \mu\text{l}$ lidského krevního séra + $180 \text{ } \mu\text{l}$ interního standardu o koncentraci 100 ng ml^{-1} + $5 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku vzorku levodopy o koncentraci $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Dále byl připraven vzorek obsahující biologickou matici s koncentrací levodopy $83,33 \text{ ng ml}^{-1}$ smícháním $25 \text{ } \mu\text{l}$ lidského krevního séra + $180 \text{ } \mu\text{l}$ interního standardu o koncentraci 100 ng ml^{-1} + $5 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku vzorku levodopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} . Díky velkému množství acetonitrilu obsaženému v

přidaném roztoku IS došlo v obou roztocích k vysrážení proteinů. Oba vzorky byly promíchány na homogenizátoru a odstředěny na centrifuze (12 minut, 12 500 otáček za minutu). Vzniklé supernatanty byly následně převedeny do kónické HPLC vialky.

Mezi další připravené vzorky obsahující biologickou matici patří vzorky pro analýzu matričního efektu (8 vzorků). Matriční efekt byl proměřen za pomoci tří různých krevních sér – tj. krevních sér získaných od třech různých pacientů. Postup přípravy těchto vzorků je uveden v následujících odstavcích.

Nejprve byl pro analýzu matričního efektu připraven vzorek L-dopy bez krevního séra. Ve vialce bylo smícháno 30 μl destilované vody a 180 μl acetonitrilu okyseleného 1% kyselinou mravenčí. Následně byl vzniklý roztok promíchán na přístroji vortex. Do HPLC vialky bylo odpipetováno 60 μl promíchaného roztoku, ke kterému bylo následně přidáno 5 μl roztoku L-dopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} . Výsledná koncentrace L-dopy v připraveném vzorku byla 38,5 ng ml^{-1} . Stejným způsobem byl připraven druhý vzorek, do kterého ale nebyl přidán roztok L-dopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} , ale 5 μl roztoku L-dopy o koncentraci 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Výsledná koncentrace L-dopy v druhém připraveném vzorku byla 769 ng ml^{-1} .

Následně byly připraveny vzorky L-dopy obsahující krevní sérum. Krevní séra byla získána od třech různých pacientů, dohromady tedy bylo připraveno 6 vzorků obsahujících krevní sérum. Z krevního séra od jednoho pacienta byly připraveny dva vzorky, které se lišily koncentrací L-dopy (v prvním byla koncentrace L-dopy 38,5 ng ml^{-1} , ve druhém 769 ng ml^{-1}). Tyto vzorky byly připraveny následovně: Ve vialce bylo smícháno 30 μl příslušného krevního séra a 180 μl acetonitrilu okyseleného 1% kyselinou mravenčí. Poté byl roztok promíchán na přístroji vortex a odstředěn na centrifuze (12 minut, 12 500 otáček za minutu). Do kónické HPLC vialky bylo odpipetováno 60 μl vzniklého supernatantu, ke kterému bylo následně přidáno 5 μl roztoku L-dopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} . Výsledná koncentrace L-dopy v připraveném vzorku obsahujícím krevní sérum byla 38,5 ng ml^{-1} . Stejným způsobem byl připraven druhý vzorek, do kterého ale nebyl přidán roztok L-dopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} , ale 5 μl roztoku L-dopy o koncentraci 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Výsledná koncentrace L-dopy v druhém připraveném vzorku obsahujícím krevní sérum byla 769 ng ml^{-1} . Identický postup přípravy vzorků byl použit i pro další dvě krevní séra získaná od dvou různých pacientů.

2.4 Příprava pufrů

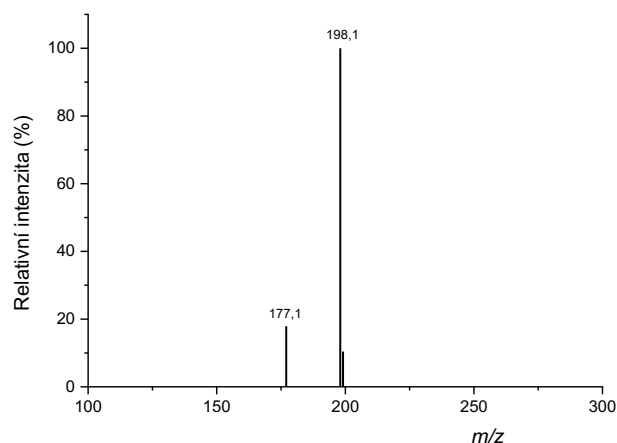
2.4.1 Mravenčan amonný, 10 mM, pH = 3,8

Na analytické váze bylo naváženo přesně 0,3153 g pevného mravenčanu amonného. Navážka byla kvantitativně převedena do 0,5 l deionizované vody a roztok byl promíchán. Následně byla nádoba s roztokem dána na 10 minut do ultrazvukového sonikátoru. Požadované pH bylo získáno pomocí titrace kyselinou mravenčí. Během titrace bylo pH měřeno pH metrem.

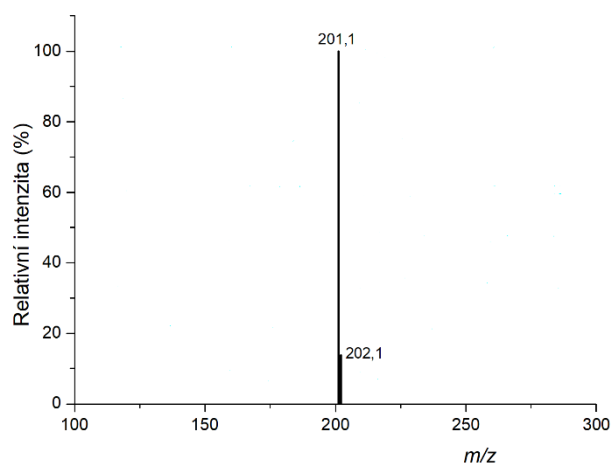
3 Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace tandemové hmotnostní detekce

Cíle optimalizace hmotnostního spektrometru byly dva. Prvním z cílů je nalezení specifických přechodů mezi prekurzorovým a produktovým iontem daného analytu a druhým z cílů je nalezení vhodného nastavení iontové optiky tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti měření. Experimenty zaměřené na optimalizaci byly provedeny za využití standardního roztoku levodopy a standardního roztoku L-dopa (D_3), oba roztoky byly připraveny o koncentraci $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Nadávkovaný objem standardního roztoku levodopy byl $10 \mu\text{l}$, nadávkovaný objem L-dopa (D_3) byl $1,5 \mu\text{l}$. Na základě struktury analytů byl hmotnostní analyzátor nastaven na práci v režimu pozitivních iontů (mód ESI+). Na Obr. 3 lze vidět hmotnostní spektrum levodopy získané v hmotnostním rozmezí m/z 100-300. Z MS spektra je patrné, že nejintenzivnější m/z je 198,1. Tato hmota odpovídá aduktu s vodíkem ve formě $[M+H]^+$. Na Obr. 4 je uvedeno MS spektrum L-dopa (D_3). Nejintenzivnější hmota odpovídající aduktu $[M+H]^+$ je 201,1.



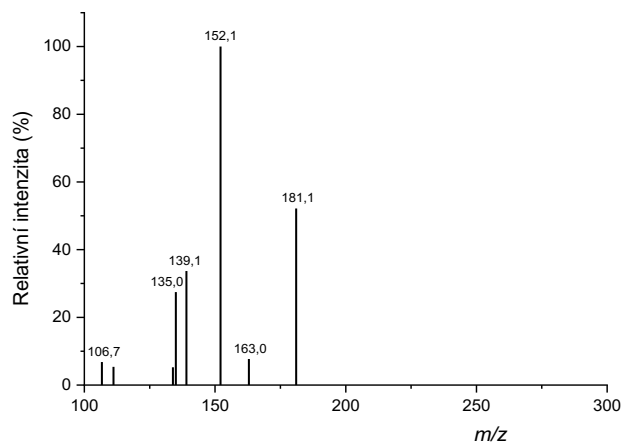
Obrázek 3: Hmotnostní spektrum levodopy naměřené v pozitivním módu. MF směs voda:methanol v poměru 3:7 (v/v), průtok MF 0,4 ml min⁻¹, nástřik 10 μl, skenováno v rozmezí 100-300 m/z.



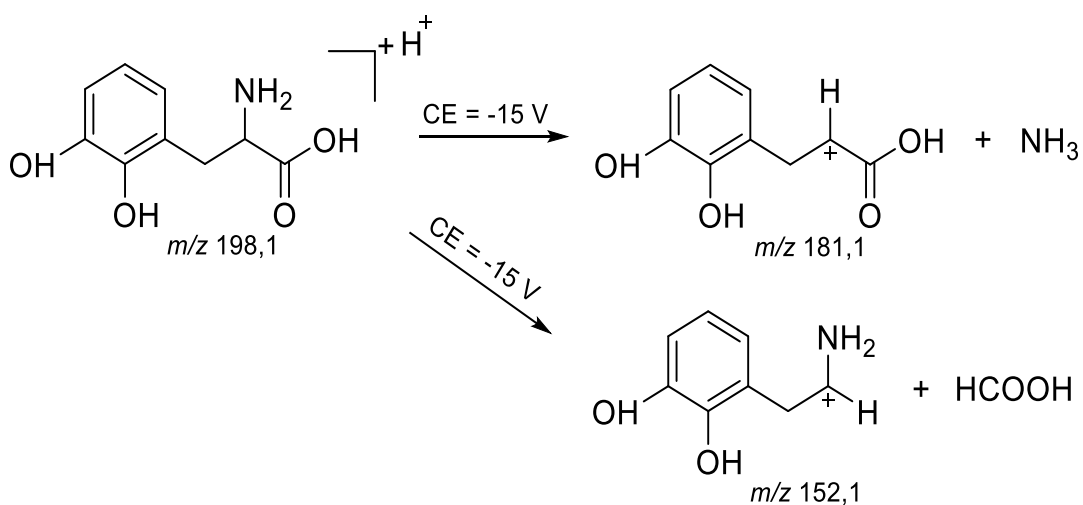
Obrázek 4: Hmotnostní spektrum L-dopa (D₃) naměřené v pozitivním módu. MF směs voda:methanol v poměru 3:7 (v/v), průtok MF 0,4 ml min⁻¹, nástřik 1,5 μl, skenováno v rozmezí 100-300 m/z.

Jelikož $[M+H]^+$ adukty obou analytů byly nejintenzivnější, tak byly zvoleny jako prekurzorové ionty. V následujícím experimentu byly tyto prekurzorové ionty štěpeny v kolizní cele. Na Obr. 5 můžeme vidět fragmentační MS spektrum vzniklé štěpením m/z 198,1 při kolizní energii -15 V. Nejintenzivnější fragment odpovídající hmotě 181,1 vzniká odštěpením neutrální molekuly amoniaku od $[M+H]^+$ prekurzorového iontu jak je zobrazeno na Obr. 6. Druhý nejintenzivnější fragment (m/z 152,1) vzniká odštěpením neutrální molekuly kyseliny mravenčí od $[M+H]^+$ prekurzorového iontu, jak je zobrazeno na témže obrázku. Na Obr. 7 je

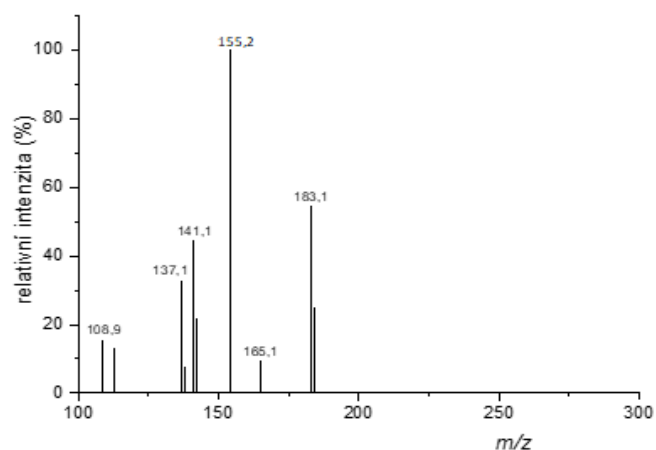
vynešeno fragmentační MS spektrum deuterované levodopy vzniklé štěpením m/z 201,1 při kolizní energii -15 V. Jednotlivé fragmenty jsou analogické fragmentům neznačené levodopy.



Obrázek 5: Fragmentační spektrum prekurzového iontu levodopy (198,1 m/z) získané v pozitivním módu při kolizní energii -15 V.

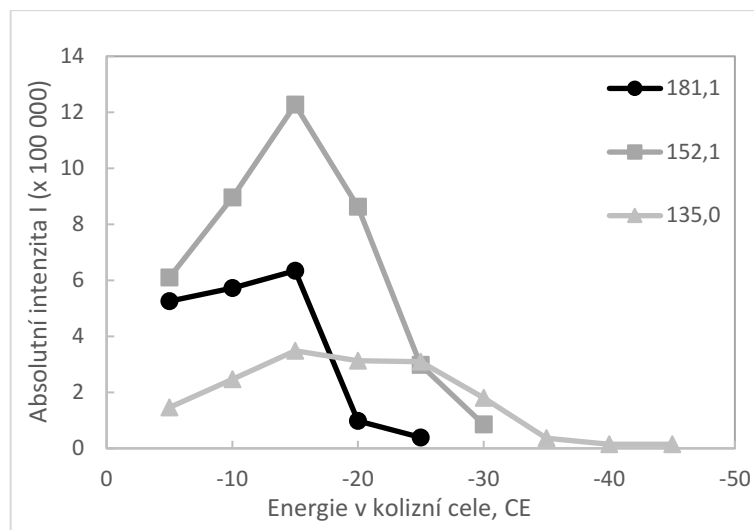


Obrázek 6: Fragmentační schéma levodopy vzniklé štěpením m/z 198,1 při kolizní energii -15 V.

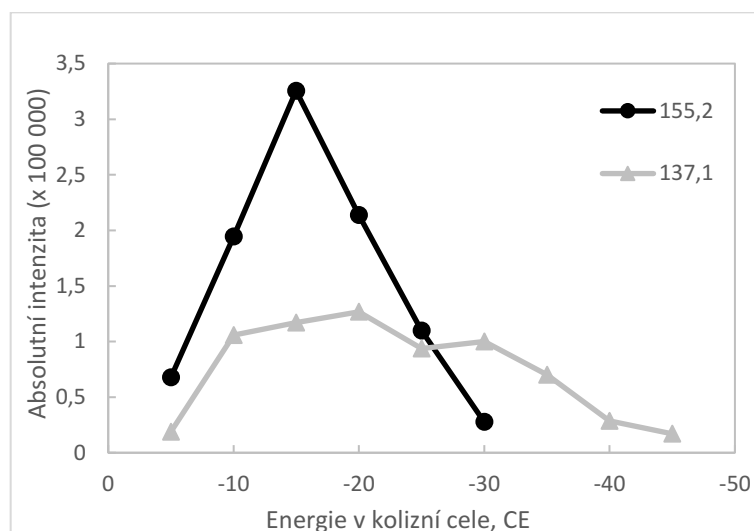


Obrázek 7: Fragmentační spektrum prekurzového iontu L-dopa (D_3) ($201,1$ m/z) získané v pozitivním módu při kolizní energii -15 V.

V následujícím kroku optimalizace byla měněna kolizní energie v rozsahu od -45 V do -10 V s krokem po 5 V. Cílem tohoto skenování bylo nalézt optimální kolizní energii, při které je produktový ion nejintenzivnější. Po nalezení vhodné CE byla tato energie dále ještě optimalizována po kroku 1 V \pm 5 V. Jako vhodné produktové ionty pro levodopu na základě intenzity byly vybrány ionty $181,1$; $152,1$ a $135,0$. Na Obr. 8 je uvedena závislost intenzity těchto iontů na hodnotě kolizní energie. Ion $181,1$ dosahoval nejvyšší intenzity při kolizní energii -14 V, ion $152,1$ při kolizní energii -16 V a ion $135,0$ při kolizní energii -15 V. Pro L-Dopa (D_3) byly vybrány ionty $155,2$ a $137,1$. Na Obr. 9 je uvedena závislost intenzity těchto iontů na hodnotě kolizní energie. Ion $155,2$ dosahoval nejvyšší intenzity při kolizní energii -14 V a ion $137,1$ při kolizní energii -15 V.

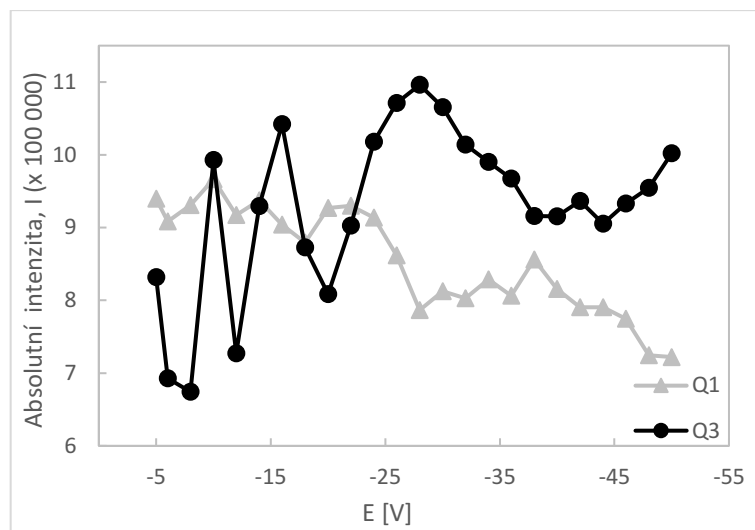


Obrázek 8: Graf závislosti intenzity píků produktových iontů na CE pro levodopa. Hodnoty m/z produktových iontů jsou 181,1, 152,1 a 135,0.

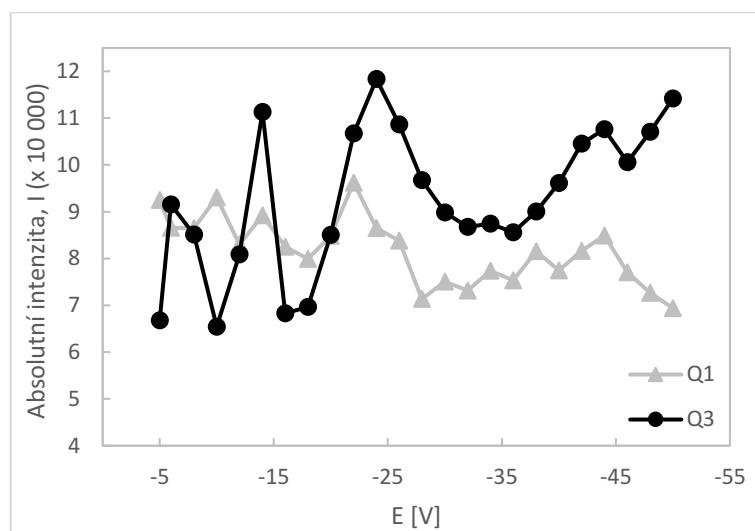


Obrázek 9: Graf závislosti intenzity produktových iontů na CE pro L-dopa (D_3). Hodnoty m/z produktových iontů jsou 155,2 a 137,1.

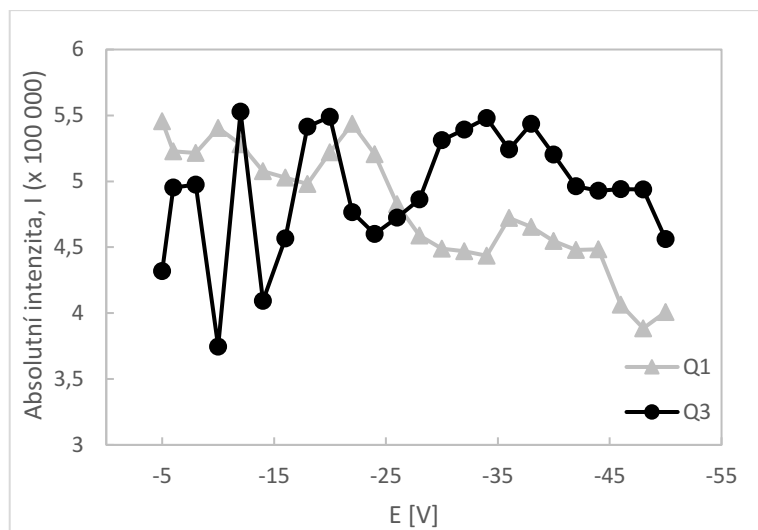
Následně byla provedena optimalizace nastavení iontové optiky před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím (Q3 Pre-bias) kvadrupólem. Při této optimalizaci byl MS nastaven již pro dané MRM přechody a bylo optimalizováno napětí v následujícím rozsahu: Q1: od -50 V do -5 V s krokem po 2 V; Q3: od -50 V do -5 V s krokem po 2 V. Grafy závislosti intenzity píků pro daný MRM přechod na vloženém napětí před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím (Q3 Pre-bias) kvadrupólem jsou pro levodopa znázorněny na Obr. 10-12 a pro L-dopa (D_3) na Obr. 13-14. Maximální hodnota intenzity pro dané MRM přechody odpovídá optimální hodnotě napětí pro Q1 a Q3 Pre-Bias, kdy je dosaženo nejvyšší výtěžnosti sledovaných iontů.



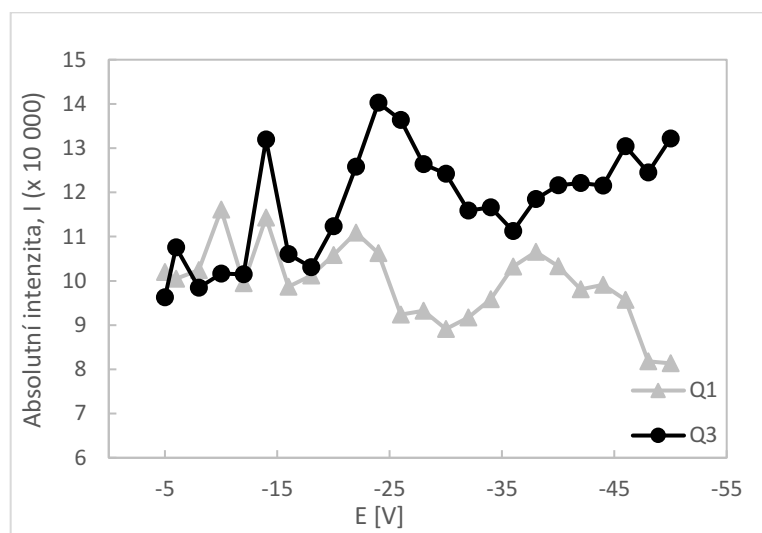
Obrázek 10: Graf závislosti intenzity MRM přechodu m/z 198,1 \rightarrow m/z 152,1 na vloženém napětí před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím (Q3 Pre-bias) kvadrupólem



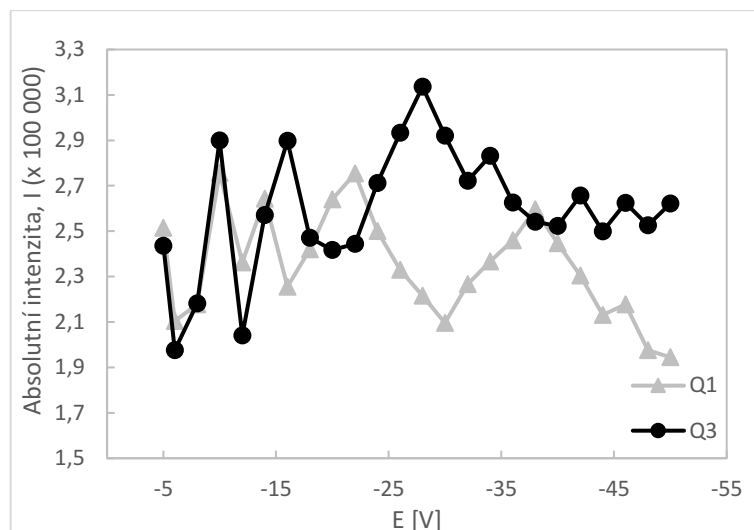
Obrázek 11: Graf závislosti intenzity MRM přechodu m/z 198,1 \rightarrow m/z 135,0 na vloženém napětí před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím (Q3 Pre-bias) kvadrupólem



Obrázek 12: Graf závislosti intenzity MRM přechodu m/z 198,1 \rightarrow m/z 181,1 na vloženém napětí před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím (Q3 Pre-bias) kvadrupólem



Obrázek 13: Graf závislosti intenzity MRM přechodu m/z 201,1 \rightarrow m/z 137,1 na vloženém napětí před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím (Q3 Pre-bias) kvadrupólem



Obrázek 14: Graf závislosti intenzity MRM přechodu m/z 201,1 \rightarrow m/z 155,2 na vloženém napětí před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím (Q3 Pre-bias) kvadrupólem

Pro levodopu byly získány celkem tři produktové ionty, pro L-dopa (D_3) byly získány dva produktové ionty. Hodnoty m/z produktových iontů, hodnoty m/z prekurzorových iontů, hodnoty kolizních energií, při kterých mají produktové ionty nejvyšší intenzitu, a optimální hodnoty nastavení iontové optiky Q1 Pre-bias a Q3 Pre-bias jsou uvedeny v Tab. 3.

Tabulka 3: Hodnoty m/z prekurzorových a produktových iontů, hodnoty kolizních energií při nejvyšší intenzitě produktových iontů a optimální hodnoty nastavení iontové optiky Q1 Pre-bias a Q3 Pre-bias.

Analyt	Prekurzor (m/z)	Produkt (m/z)	CE (V)	Q1 Pre-bias (V)	Q3 Pre-bias (V)
L-dopa	198,1	152,1	-16,0	-10,0	-28,0
		135,0	-15,0	-22,0	-24,0
		181,1	-14,0	-5,0	-12,0
L-dopa (D_3)	201,1	137,1	-15,0	-10,0	-24,0
		155,2	-14,0	-10,0	-28,0

3.2 Optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie

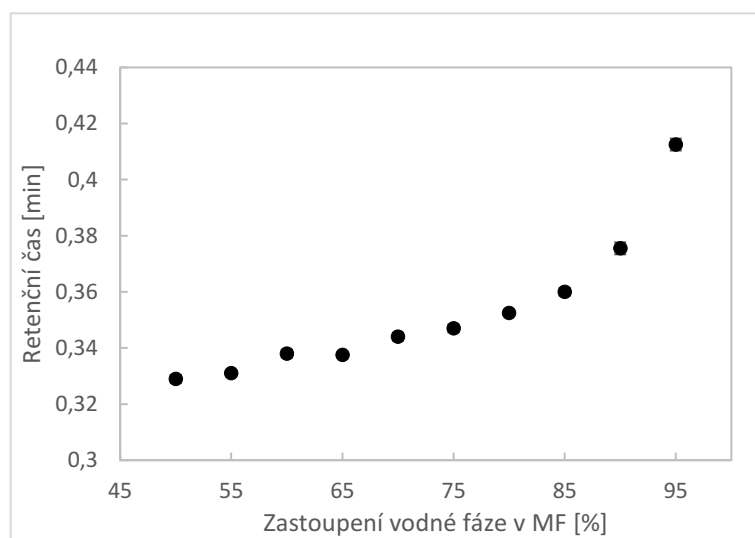
Při optimalizaci HPLC metody byly sledovány pouze nejvíce intenzivní MRM přechody, tj. u levodopy se jedná o MRM přechod m/z 198,1 \rightarrow m/z 152,1 a u deuterované levodopy o MRM přechod m/z 201,1 \rightarrow m/z 155,2. V rámci diplomové práce bylo vyzkoušeno celkem 7 chromatografických kolon (popis níže). Při výběru vhodné mobilní fáze se vycházelo z postupů publikovaných v odborné literatuře. Při vývoji metody se zkoušela jak chromatografie s reverzní fází, tak i hydrofilní interakční chromatografie.

3.2.1 Chromatografická kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18

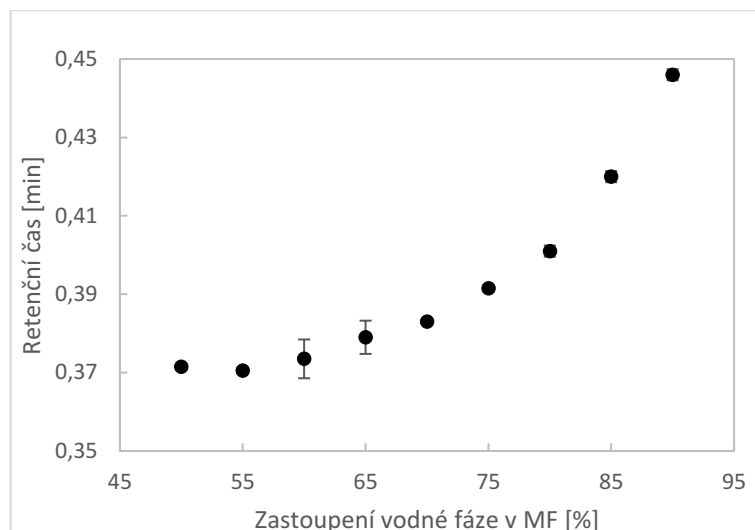
Jako první testovaná kolona byla zvolena kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 od firmy Agilent Technologies (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,9 μm . Jedná se o povrchově porézní standardní C18 kolonu s reverzní fází. Navázané povrchově porézní částice oxidu křemičitého (poroshell) mají pevné jádro oxidu křemičitého o velikosti 1,7 μm a porézní vnější vrstvu oxidu křemičitého o tloušťce 0,5 μm , na které je navázána oktadecylová fáze. Kolona byla vybrána proto, že dle výrobce poskytuje vyšší retenci pro polární látky v porovnání s klasickými C18 kolonami.

Byly vyzkoušeny dva druhy mobilní fáze. Nejprve byla vyzkoušena mobilní fáze složená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Pro separaci byly zvoleny následující podmínky: průtok MF 0,4 ml min^{-1} , nástřik 2 μl , celková doba analýzy 10 minut, teplota na dávkovači 15 $^{\circ}\text{C}$, teplota kolony 30 $^{\circ}\text{C}$. Nastříkovan byl vzorek levodopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} . Pro analýzu byla zvolena izokratická eluce a bylo vyzkoušeno různé procentuální zastoupení složky A a složky B v MF. Na Obr. 15 je vynesena závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF – se zvyšujícím se zastoupením vodné fáze v MF se nepatrně zvyšuje retenční čas levodopy. Z Obr. 15 vidíme, že levodopa eluuje při jakémkoliv poměru vodné a organické složky téměř za mrtvým časem kolony. Z těchto důvodů bylo použití této kolony s výše popsanou MF vyhodnoceno jako nevhodné a bylo přistoupeno k vyzkoušení jiné MF. Druhá vyzkoušená mobilní fáze byla složená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Methanol byl vyzkoušen z toho důvodu, že v systému obrácených fází má nižší eluční sílu oproti acetonitrilu a bylo očekáváno, že se díky tomu retenční čas polárního

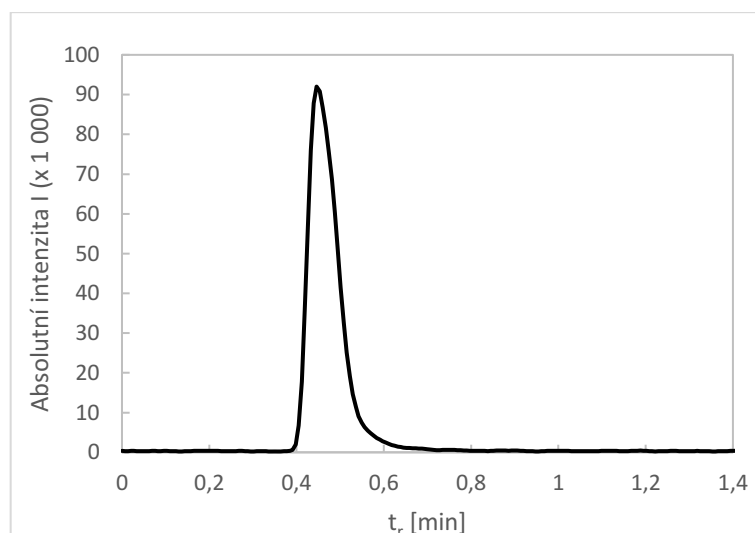
analytu v koloně zvýší. Byly zvoleny stejné podmínky jako pro analýzu s předchozí vyzkoušenou MF. Nastříkovan byl vzorek levodopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} a opět byla zvolena izokratická eluce při různém procentuální zastoupení složky A a složky B v MF. Na Obr. 16 je vynesena závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF. Bohužel ani při obměně acetonitrilu za methanol nedošlo k dostatečnému navýšení retenčního času levodopy a levodopa stále eluovala těsně za mrtvým časem kolony. Na Obr. 17 je znázorněn chromatogram levodopy při složení MF z 90 % z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z 10 % z methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Na chromatogramu lze vidět nízký retenční čas levodopy a nepatrné chvostování píku. Tato kolona byla vyhodnocena jako nevhodná.



Obrázek 15: Závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF. MF je složená z různého poměru 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B).



Obrázek 16: Závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF. MF je složena z různého poměru 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B).



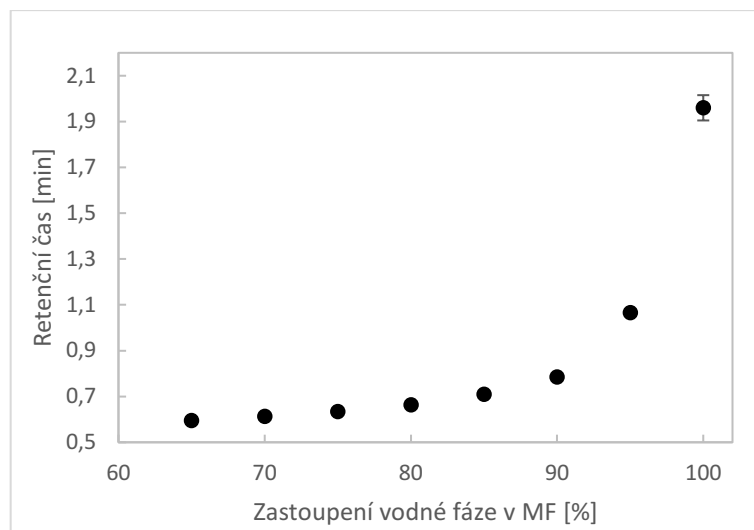
Obrázek 17: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,9 \mu\text{m}$), Agilent; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B), 90/10 (v/v); průtok MF $0,4 \text{ ml min}^{-1}$; nástřik $2 \mu\text{l}$; teplota autosampleru $15 \text{ }^\circ\text{C}$; teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2 Chromatografická kolona ACE® Excel® C₁₈-Amide

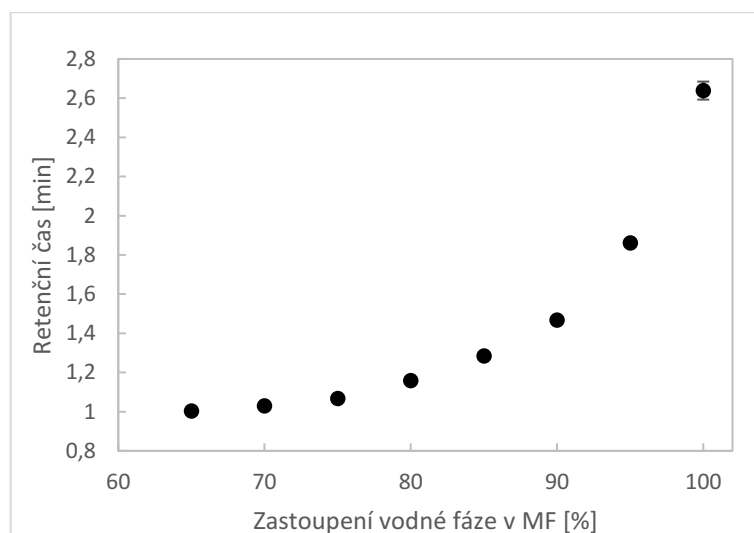
Další testovaná kolona je kolona ACE® Excel® C₁₈-Amide od firmy Advanced Chromatography Technologies (Skotsko), kolona má vnitřním průměrem 2,1 mm a délku 10,0 cm, velikost částic v koloně je $1,7 \mu\text{m}$. Jedná se o kolonu obsahující amid, který je navázán mezi silikagelem a oktadecylovým řetězcem. Dle výrobce by navázaný amid měl zvyšovat

retenci polárních sloučenin a poskytovat alternativní selektivitu. Kolona je kompatibilní se 100% vodnou složkou.

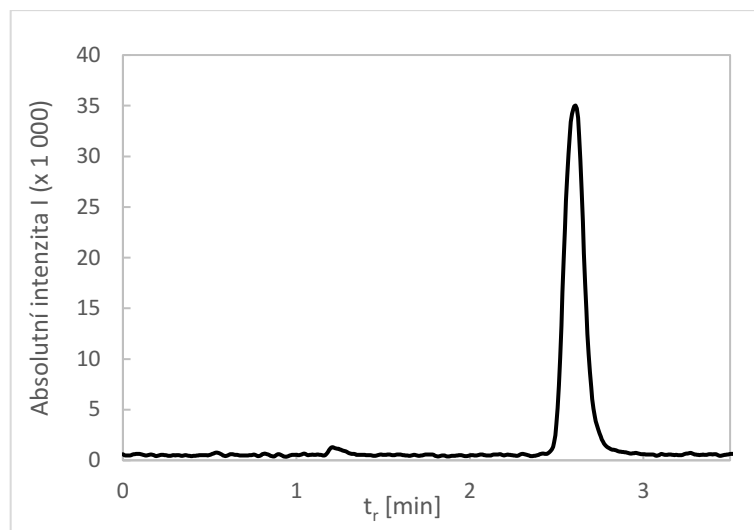
Vyzkoušené mobilní fáze byly stejné jako u kolony uvedené v kapitole 3.2.1 (kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18), tj. nejprve byla vyzkoušena MF složená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B), následně byla vyzkoušena MF složená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Pro analýzu byly zvoleny následující podmínky: průtok MF $0,3 \text{ ml min}^{-1}$, nástřik $1,5 \mu\text{l}$, celková doba analýzy 10 minut, teplota na dávkovači $15 \text{ }^\circ\text{C}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Nastřikován byl vzorek levodopy o koncentraci 500 ng ml^{-1} . Pro analýzu byla zvolena izokratická eluce a bylo vyzkoušeno různé procentuální zastoupení složek A a složek B v MF. Na Obr. 18 je vynesena závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF (MF je složená z 0,1% kyseliny mravenčí a z acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí). Ze závislosti je zřejmý posun retenčního času levodopy oproti předchozí vyzkoušené koloně a také je možné pozorovat navýšení retence se zvyšujícím se procentuálním zastoupením vodné fáze v MF. V případě, kdy byla MF tvořená ze 100 % vodnou fází, došlo k navýšení retenčního času až na 2 minuty. Na Obr. 19 je vynesena závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF (MF je složená z 0,1% kyseliny mravenčí a z methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí). I v tomto případě byl acetonitril nahrazen methanolem z důvodu nižší eluční síly methanolu (retenční čas polárního analytu by se tak měl v koloně zvýšit). Ze závislosti je patrný nárůst retenčního času levodopy oproti retenčnímu času levodopy při použití první vyzkoušené MF, nárůst je ale poměrně nízký. V případě, kdy byla MF tvořená ze 100 % vodnou fází, došlo k navýšení retenčního času na 2,7 minuty. I když se retence levodopy s použitím 100% vodné složky v mobilní fázi zvýšila, tak byla tato kolona vyhodnocena jako ne zcela vhodná, neboť 100% vodná složka není úplně kompatibilní s vysokým obsahem organické složky v nástřikovém roztoku po precipitaci proteinů a zároveň vznikla obava o životnost kolony při tomto složení mobilní fáze. Na Obr. 20 je ukázán chromatogram levodopy při složení MF ze 100 % z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A).



Obrázek 18: Závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF. MF je složená z různého poměru 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B).



Obrázek 19: Závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF. MF je složená z různého poměru 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B).



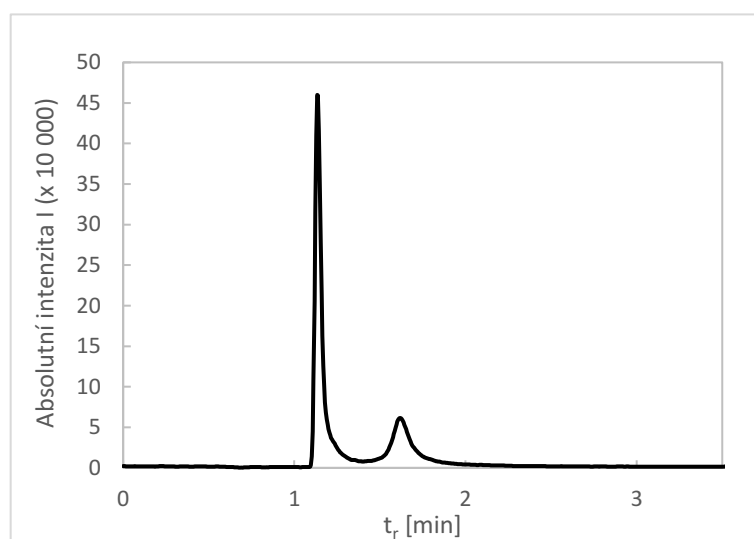
Obrázek 20: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona ACE[®] Excel[®] C₁₈-Amide (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies; MF složená ze 100 % z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A); průtok MF 0,3 ml min⁻¹; nástřik 1,5 μl; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

3.2.3 Chromatografická kolona Atlantis[™] dC₁₈

Jako třetí v pořadí byla testována kolona Atlantis[™] dC₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 3 μm), Waters. Kolona Atlantis[™] dC₁₈ obsahuje difunkčně vázané ligandy C₁₈, které byly optimalizovány pro použití s vysoce vodnými mobilními fázemi, včetně MF tvořené 100% vodnou složkou.

U této kolony byla zvolena mobilní fáze tvořená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z čistého acetonitrilu (složka B). Pro separaci byly zvoleny následující podmínky: průtok MF 0,4 ml min⁻¹, nástřik 1,5 μl, celková doba analýzy 10 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 30 °C. Nastříkovan byl vzorek levodopy o koncentraci 500 ng ml⁻¹. Díky předchozím zkušenostem s retencí levodopy bylo rovnou přistoupeno k měření s vyšším zastoupením vodné fáze v MF. Nejprve byla použita MF složená z 90 % ze složky A a z 10 % ze složky B. Levodopa eluovala ihned za mrtvým časem. Následně byla vyzkoušena jako mobilní fáze pouze vodná složka v podobě 0,1% kyseliny mravenčí. Na Obr. 21 je vynesena chromatogram levodopy, MF byla složena ze 100 % složkou A. Z chromatogramu je patrná nízká retence levodopy, přestože byla MF složena pouze z vodné složky. Dále je možné pozorovat chvostování chromatografického píku a zároveň je na chromatogramu zaznamenán další pík

způsobený nekompatibilitou nástřikového roztoku se 100% vodnou mobilní fází. Tato chromatografická kolona byla vyhodnocena jako nevhodná pro další analýzu.



Obrázek 21: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona AtlantisTM dC₁₈ (100 × 2,1 mm; 3 μm), Waters; MF složená ze 100 % z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1,5 μl; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

3.2.4 Chromatografická kolona AtlantisTM PREMIER BEH C₁₈ AX

Čtvrtou vyzkoušenou kolonou byla kolona AtlantisTM PREMIER BEH C₁₈ AX od firmy Waters (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm. Jedná se o kolonu s reverzní fází, která se od obvyklých C₁₈ kolon s reverzní fází liší tím, že má na povrchu SF dodatečný kladný náboj. Tento kladný povrchový náboj přítomný na SF může poskytovat zvýšenou retenci aniontů, jako jsou např. ionizované kyseliny, a sníženou retenci kationtů, jako jsou např. protonované báze.

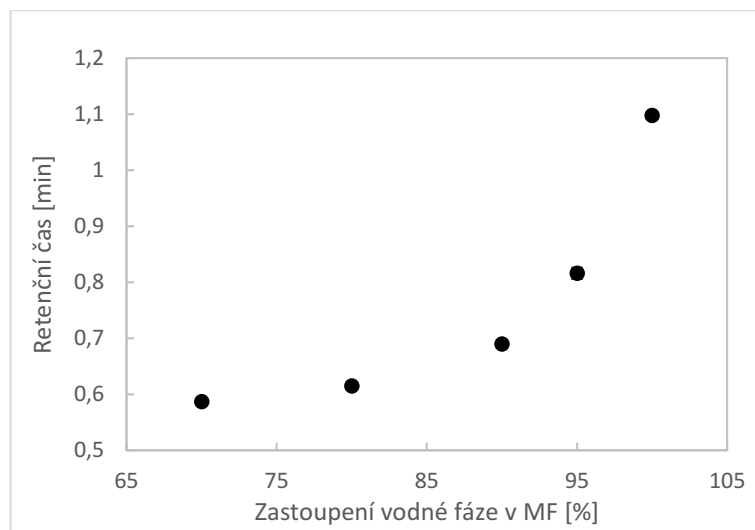
Levodopa se řadí mezi aminokyseliny a má na svém řetězci navázány dvě typické funkční skupiny pro aminokyseliny - karboxylovou funkční skupinu (-COOH) a aminovou funkční skupinu (-NH₂). V závislosti na pH roztoku se mohou obě funkční skupiny vyskytovat v disociované nebo nedisociované podobě. V prostředí s pH v rozmezí 2-8 se levodopa chová jako amfion, tj. obojetný ion. Při vyšším pH než je pH 8 se uvolní proton i z aminoskupiny a obě dvě funkční skupiny se nachází ve stavu konjugované zásady. Naopak při nižším pH než je pH 2 skupina -NH₂ váže proton a karboxylová skupina zůstává v nerozdisociovaném stavu (-COOH).

Kolona Atlantis™ PREMIER BEH C₁₈ AX byla vybrána proto, že bylo předpokládáno, že za námi zvolených podmínek by mohl analyt interagovat se stacionární fází nejen pomocí hydrofobních interakcí, ale také pomocí iontové interakce.

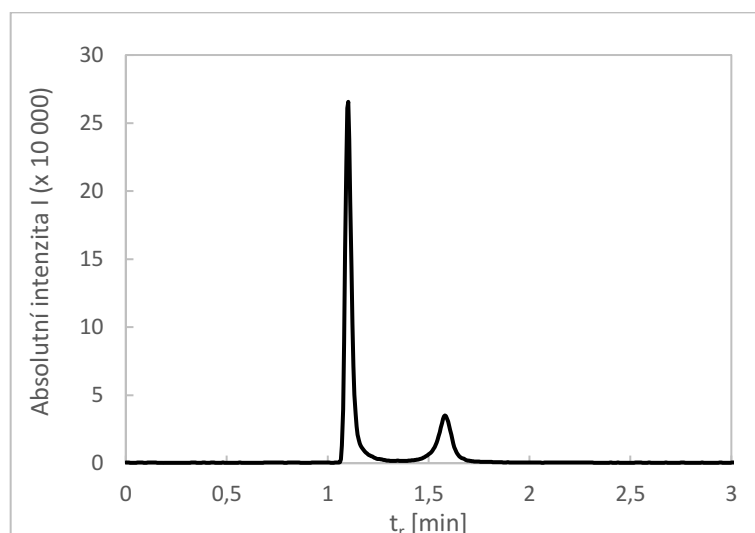
Nejprve byla vyzkoušena MF složená z různých poměrů 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z čistého acetonitrilu (složka B). Byly zvoleny následující podmínky: průtok MF 0,4 ml min⁻¹, nástřik 1 µl, celková doba analýzy 10 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 30 °C. Nastřikován byl vzorek levodopy o koncentraci 500 ng ml⁻¹. Vzhledem k předchozím zkušenostem s retencí levodopy bylo rovnou přistoupeno k měření s vyšším zastoupením vodné fáze v MF. Na Obr. 22 je vynesena závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF – se zvyšujícím se zastoupením vodné fáze v MF se dle očekávání zvyšuje i retenční čas levodopy. Retenční čas levodopy je stále nízký, přestože bylo předpokládáno jeho zvýšení vlivem přitažlivé elektrostatické síly mezi kladně nabitým povrchem SF a záporně nabitou funkční skupinou -COO⁻. Na Obr. 23 je uveden chromatogram levodopy při složení MF ze 100 % z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A). Na chromatogramu vidíme nízkou retenci levodopy a rozmytý chvostující pík vzhledem k nekompatibilitě nástřikového roztoku a MF.

V dalším kroku byla 0,1% kyselina mravenčí nahrazena 10mM mravenčanovým pufrům o pH 3,8 (příprava pufru viz kapitola 2.4.1). Složka B v MF zůstala beze změny (tj. sestávala opět z čistého acetonitrilu). Mravenčan amonný byl vybrán proto, že má vyšší iontovou sílu a mohl by určitým způsobem ovlivňovat iontové interakce.

Dále byla tedy testována mobilní fáze složená z 90 % z 10 mM pufru mravenčanu amonného (složka A) a z 10 % z čistého acetonitrilu. Za tohoto složení mobilní fáze došlo k nepatrnému zvýšení retence levodopy o 0,75 minut (oproti předchozí analýze, ve které byla použita MF složená z 0,1% kyseliny mravenčí a z acetonitrilu). Pravděpodobně došlo k tomu, že pufr s vyšší iontovou silou (oproti předchozí vyzkoušené MF) mírně potlačil elektrostatickou repulzivní sílu mezi kladně nabitým povrchem SF a pozitivně nabitou aminoskupinou. Nicméně, ať při použití pufru nebo kyseliny mravenčí jako vodné složky mobilní fáze, byla retence levodopy nízká, a tedy tato kolona byla nevhodná pro daný účel.



Obrázek 22: Závislost retenčního času na zastoupení vodné fáze v MF. MF je složená z různého poměru 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z čistého acetonitrilu (složka B).



Obrázek 23: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona AtlantisTM PREMIER BEH C₁₈ AX (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF složená ze 100 % z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

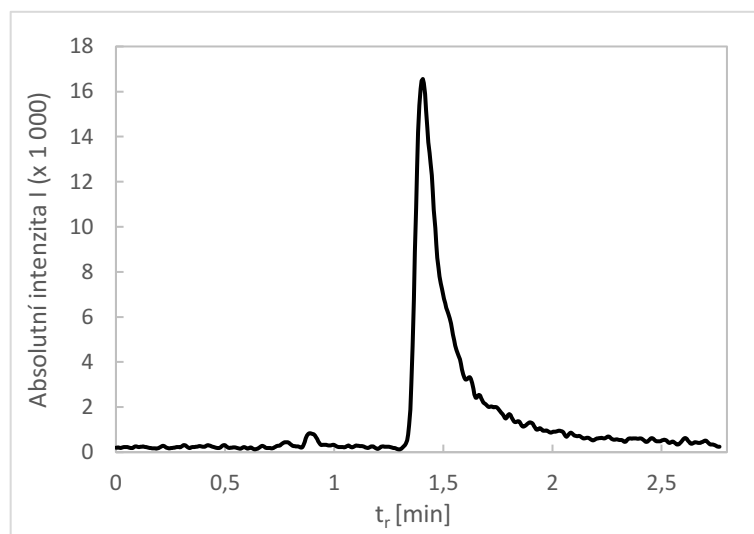
3.2.5 Chromatografická kolona ACQUITY UPLC® BEH HILIC

Po neúspěších s kolonami s reverzní fází, kdy nedocházelo k adekvátní retenci levodopy, bylo přistoupeno k vyzkoušení HILIC kolon.

První vyzkoušenou chromatografickou kolonou HILIC byla kolona ACQUITY UPLC® BEH HILIC od firmy Waters (Irsko) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm. Jedná se o hybridní kolonu s alkylovými skupinami inkorporovanými do silikagelové

matrice. BEH hybridní fáze (bridge ethylene hybrid) je fáze složená ze dvou monomerů: z tetraethoxysilanu a z bis(triethoxysilyl)ethanu, v němž jsou vmezeřeny ethylenové můstky.⁴²

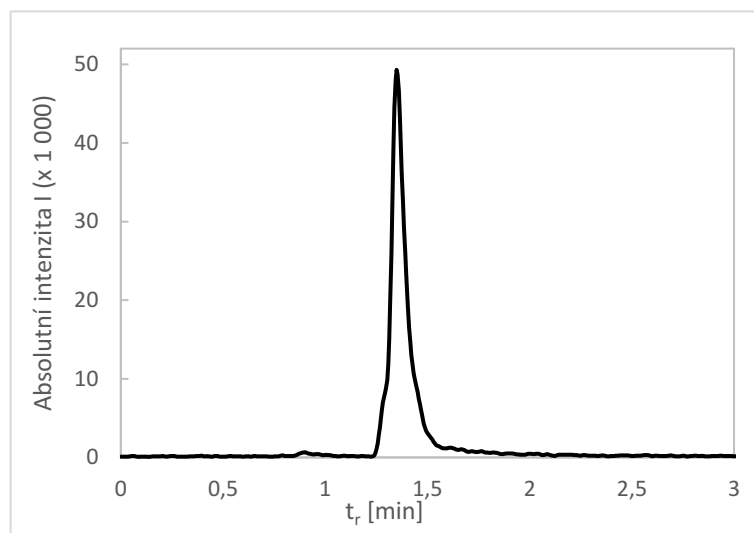
Nejprve byly vyzkoušeny počáteční testovací podmínky: MF byla složená z 20 % z čisté vody (složka A) a z 80 % z čistého acetonitrilu (složka B). Průtok MF byl nastaven na 0,4 ml min⁻¹ a byl nastříkovan vzorek o objemu 1 μl, celková doba analýzy byla 10 minut, teplota na dávkovači byla nastavena na 15 °C a teplota kolony na 30 °C. Nastříkovan byl vzorek levodopy o koncentraci 500 ng ml⁻¹. Pro analýzu byla zvolena izokratická eluce. Za zvolených podmínek by měla být karboxylová funkční skupina rozdisociovaná (-COO⁻) a aminová skupina by měla být kladně nabitá (-NH₃⁺). Nabité částice jsou hydrofilnější oproti jejich neutrálním formám a vlivem toho jsou v HILIC chromatografii více zadržovány. Na Obr. 24 je ukázán chromatogram levodopy změřený za výše zmíněných podmínek. Retence analytu je nízká a získaný chromatografický pík chvostuje. Chvostování je pravděpodobně způsobeno nežádoucími interakcemi mezi zbytkovými rozdisociovanými silanolovými skupinami a mezi pozitivně nabitou funkční skupinou -NH₃⁺.



Obrázek 24: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona ACQUITY UPLC® BEH HILIC (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs čisté vody (složka A) a acetonitrilu (složka B), 20/80 (v/v); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

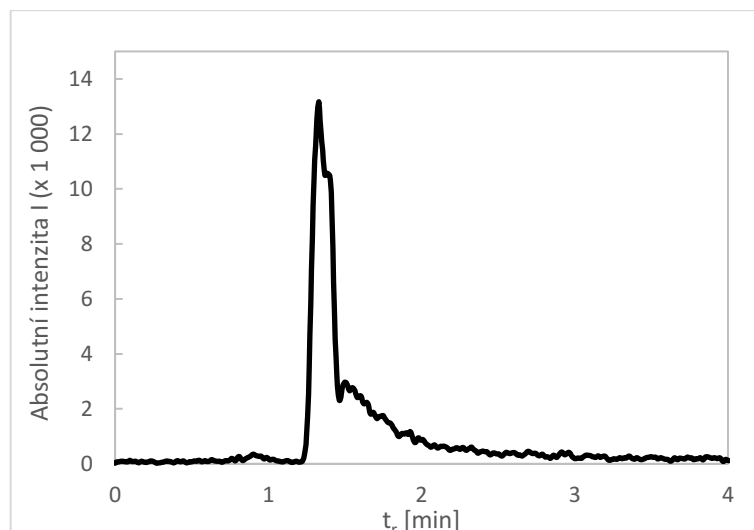
Následně bylo změněno složení MF, ostatní podmínky analýzy zůstávají beze změny. Mobilní fáze byla složená z 20 % z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z 80 % z čistého acetonitrilu (složka B). Na Obr. 25 je vynesena chromatogram levodopy změřený za upravených podmínek (upravené složení MF). Na chromatogramu lze vidět snížení retence levodopy

oproti předchozí analýze bez okyselené vodné složky v MF, ale zároveň je chromatografický pík symetričtější.



Obrázek 25: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona ACQUITY UPLC® BEH HILIC ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,7 \mu\text{m}$), Waters; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B), 20/80 (v/v); průtok MF $0,4 \text{ ml min}^{-1}$; nástřik $1 \mu\text{l}$; teplota autosampleru $15 \text{ }^\circ\text{C}$; teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Následně bylo vyzkoušeno změnit složku A v MF. Místo 0,1% kyseliny mravenčí byla MF složena z 20 % z 10 mM mravenčanu amonného (příprava pufru viz kapitola 2.4.1). Složení složky B zůstalo stejné. Další podmínky analýzy zůstaly nezměněny až na koncentraci nastříkovaného vzorku levodopy, kdy byl nastříkován vzorek o koncentraci $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pufr byl použit z důvodu robustnější tvorby vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze a zlepšení tvaru chromatografických píků.⁴³ Na Obr. 26 je chromatogram levodopy změřený při analýze, kdy byla MF složena z 20 % z 10 mM mravenčanu amonného (složka A) a z 80 % z čistého acetonitrilu (složka B). Z chromatogramu je patrné, že došlo k rozmytí chromatografického píku a ke zhoršení jeho tvaru. Retence analytu se ani v tomto případě nezvýšila.



Obrázek 26: MRM chromatogram levodopy o $c = 5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Kolona ACQUITY UPLC® BEH HILIC (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 10 mM mravenčanu amonného (složka A) a acetonitrilu (složka B), 20/80 (v/v); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

Nakonec byla vyzkoušena gradientová eluce namísto dosud zkoušené eluce izokratické s cílem zafokusovat pík levodopy do užší chromatografické zóny. Ostatní podmínky měření zůstaly nezměněné.

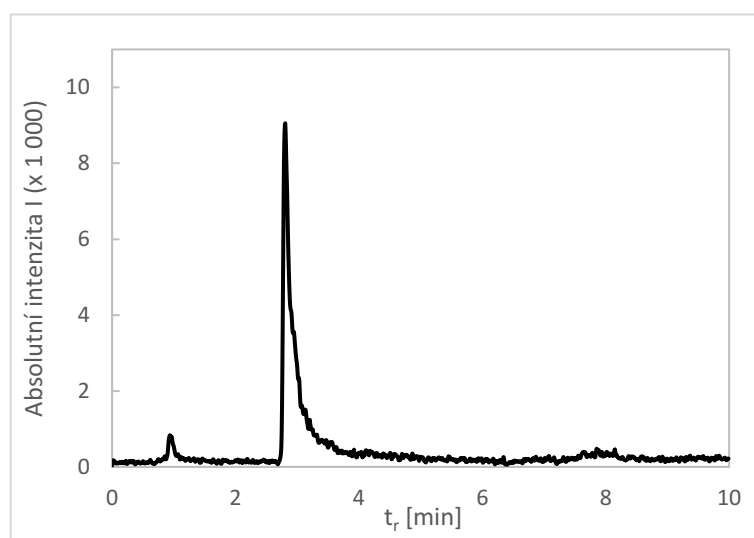
Jako MF pro gradientovou eluci byla použita MF složená z různých procentuálních zastoupení 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z čistého acetonitrilu (složka B). Při analýze byl použit gradientový profil uvedený v Tab. 4.

Tabulka 4: Popis gradientu, který byl použit pro analýzu na koloně ACQUITY UPLC® BEH HILIC a pro analýzu na koloně ACQUITY UPLC® BEH AMIDE

Fáze	Čas [min]	0,1% HCOOH [%]	CH ₃ CN [%]
1	0,00 - 1,00	10	90
2	1,00 - 3,00	60	40
3	3,00 - 5,00	60	40
4	5,00 - 5,50	10	90
5	5,50 - 10,00	10	90

Na Obr. 27 je vyneseno získaný chromatogram levodopy při gradientové eluci za výše zmíněných podmínek. Na získaném chromatogramu lze pozorovat navýšení retence levodopy, chvostování chromatografického píku se oproti izokratické eluci snížilo. Navýšení retence bylo však nedostatečné, a navíc získané píky ze dvou po sobě provedených analýzách za stejných podmínek nebyly dostatečně reprodukovatelné.

Z výše uvedených důvodů (zejména z důvodu vysokého chvostování) nebyla ani tato HILIC kolona vyhodnocena jako vhodná pro další měření.

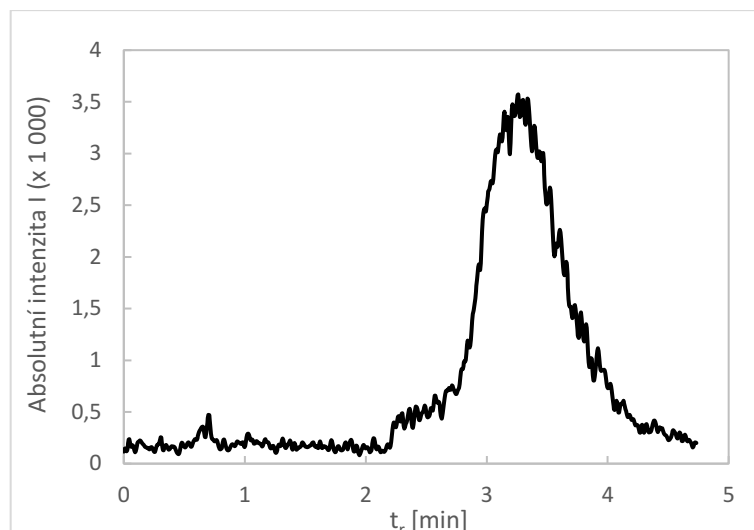


Obrázek 27: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona ACQUITY UPLC® BEH HILIC (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 10 mM mravenčanu amonného (složka A) a acetonitrilu (složka B), gradientová eluce (viz Tab. 4); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

3.2.6 Chromatografická kolona ACQUITY UPLC® BEH AMIDE

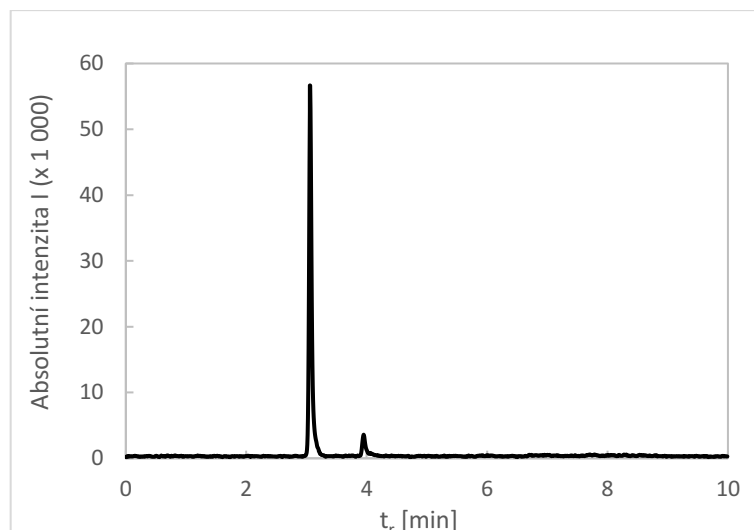
Druhou vyzkoušenou HILIC kolonou byla kolona ACQUITY UPLC® BEH AMIDE od firmy Waters (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm. Tato amidová kolona je vhodná pro separaci velmi polárních látek.⁴⁴

Nejprve byla vyzkoušena analýza s MF složenou z 20 % z 0,1% HCOOH (složka A) a z 80 % z čistého acetonitrilu (složka B). Pro separaci byly zvoleny následující podmínky: průtok MF 0,4 ml min⁻¹, nástřik 1 μl, celková doba analýzy 10 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 30 °C. Nastřikován byl vzorek levodopy o koncentraci 500 ng ml⁻¹. Na Obr. 28 je chromatogram levodopy za izokratické eluce získaný analýzou za výše zmíněných podmínek. Z chromatogramu je patrné, že pík levodopy je velmi široký a vykazuje nežádoucí chvostování.



Obrázek 28: MRM chromatogram levodopy o $c = 500 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona ACQUITY UPLC® BEH AMIDE (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B), 20/80 (v/v); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

Z tohoto důvodu bylo přistoupeno ke změně eluce z izokratické na gradientovou. Mobilní fáze použitá pro gradientovou eluci byla složená z různých procentuálních zastoupení 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Při analýze byl použit stejný gradientový profil jako u kolony ACQUITY UPLC® BEH HILIC (viz Tab. 4). Na Obr. 29 je znázorněn chromatogram levodopy získaný pomocí gradientové eluce za výše zmíněných podmínek. Retence levodopy je dostatečná, chromatografický pík je úzký, symetrický a nechvostuje. Kolona se zdála být optimální pro další měření.



Obrázek 29: MRM chromatogram levodopy o $c = 5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Kolona ACQUITY UPLC® BEH AMIDE (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B), gradientová eluce (viz Tab. 4); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1 μl ; teplota autosampleru 15 °C; teplota kolony 30 °C.

Následně byla na koloně provedena analýza spikovaného lidského krevního séra (vzorek obsahující biologickou matici). Podmínky separace zůstaly stejné kromě objemu nastříkaného vzorku, který byl 5 μl a kromě koncentrace levodopy ve spikovaném krevním séru, tj. ve vzorku obsahujícím biologickou matici (příprava viz kapitola 2.3.3). Koncentrace levodopy ve vzorku byla při prvním měření 833,33 ng ml⁻¹ a při druhém měření 83,33 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Získaný chromatografický pík levodopy při obou vyzkoušených koncentračních hladinách (833,33 ng ml⁻¹; 83,33 $\mu\text{g ml}^{-1}$) měl velmi nízkou intenzitu oproti vzorkům připraveným v čistých rozpouštědlech. Tento výrazný pokles intenzity je pravděpodobně způsoben matričním efektem. Endogenní látky nacházející se v krevním séru (v matici) nejspíše interagují a koeluují s levodopou, což snižuje ionizační účinnost a tím pádem intenzitu chromatografického píku levodopy. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k testování další HILIC kolony, která by mohla mít odlišnou selektivitu a tím pádem by došlo ke snížení negativního vlivu matričního efektu na ionizaci levodopy.

3.2.7 Chromatografická kolona HALO 90 Å Penta-HILIC

Poslední testovanou kolonou byla kolona HALO 90 Å Penta-HILIC od firmy Advanced Materials Technology (USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 15,0 cm s velikostí částic

2,7 μm . Tato stacionární fáze obsahuje pentan s pěti hydroxylovými skupinami nacházejícími se na částicích s pevným jádrem.⁴⁵

Díky zkušenostem s analýzou levodopy na předchozích chromatografických kolonách byla rovnou vyzkoušena gradientová eluce. Pro separaci byly zvoleny následující podmínky: průtok MF 0,4 ml min⁻¹, nástřik 5 μl , celková doba analýzy 12,50 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 30 °C. Nastřikován byl vzorek spikovaného krevního séra o koncentraci levodopy 83,33 ng ml⁻¹ (příprava viz kapitola 2.3.3). Mobilní fáze byla složená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). V rámci testování kolony bylo vyzkoušeno více gradientových profilů, jelikož bylo nutné gradientový profil optimalizovat tak, aby byla získána vhodná retenence levodopy a zároveň bylo potřeba, aby endogenní látky z krevního séra interagovaly s levodopou co nejméně. Nakonec byl při analýze použit optimalizovaný gradientový profil uvedený v Tab. 5.

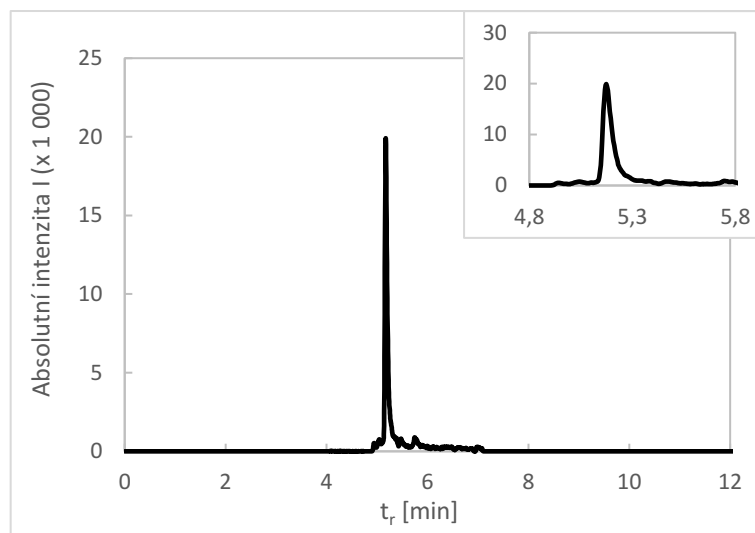
Tabulka 5: Popis gradientu, který byl použit pro analýzu na koloně HALO 90 Å Penta-HILIC

Fáze	Čas [min]	0,1% HCOOH [%]	CH ₃ CN [%]
1	0,00 - 3,00	10	90
2	3,00 - 6,00	60	40
3	6,00 - 8,00	60	40
4	8,00 - 8,50	10	90
5	8,50 - 12,50	10	90

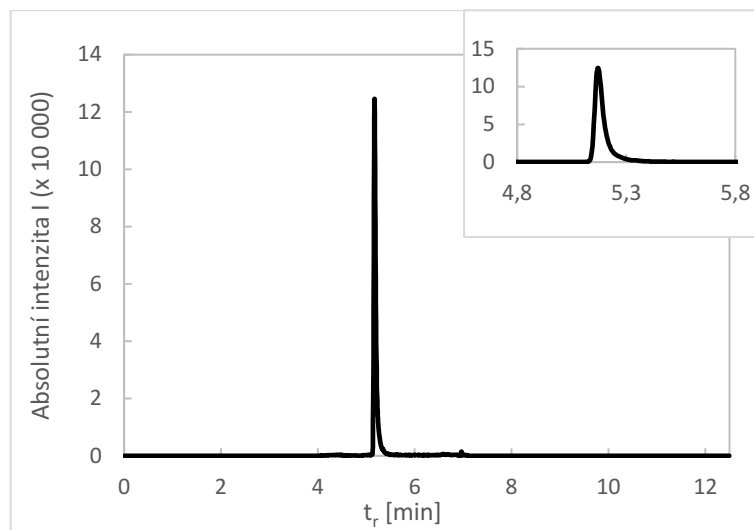
Aby bylo zabráněno možnému znečištění hmotnostního spektrometru látkami z matrice, byla mobilní fáze vpuštěna do hmotnostního spektrometru pouze mezi čtvrtou a sedmou minutou (v čase předpokládané retenence levodopy). Mimo tento časový úsek byla MF chytána do odpadu.

Na Obr. 30 je chromatogram vzorku krevního séra obohaceného levodopou na koncentraci 83,3 ng ml⁻¹ a na Obr. 31 je chromatogram vzorku krevního séra obohaceného deuterovanou levodopou (interním standardem) na koncentraci 83,3 ng ml⁻¹, oba byly získány při gradientové eluci za výše zmíněných podmínek. Chromatografické píky mají pěkný tvar, lze

vidět pouze nepatrné chvostování. Retenční čas levodopy se zvýšil, což bylo velmi žádoucí. Vliv matrice na ionizaci levodopy se rapidně snížil oproti předcházející koloně. Kolona HALO 90 Å Penta-HILIC byla vyhodnocena jako vhodná pro následující analýzy.



Obrázek 30: MRM chromatogram vzorku krevního séra obohaceného levodopou na $c = 83,3 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona HALO 90 Å Penta-HILIC ($150 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,7 \mu\text{m}$), Advanced Materials Technology; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B), gradientová eluce (viz Tab. 5); průtok MF $0,4 \text{ ml min}^{-1}$; nástřik $5 \mu\text{l}$; teplota autosampleru $15 \text{ }^\circ\text{C}$; teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Chromatogram v horním pravém rohu vznikl pouze přiblížením časové osy. Popisky os jsou u obou grafů stejné.



Obrázek 31: MRM chromatogram vzorku krevního séra obohaceného deuterovanou levodopou na $c = 83,3 \text{ ng ml}^{-1}$. Kolona HALO 90 Å Penta-HILIC ($150 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,7 \mu\text{m}$), Advanced Materials Technology; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B), gradientová eluce (viz Tab. 5); průtok MF $0,4 \text{ ml min}^{-1}$; nástřik $5 \mu\text{l}$; teplota autosampleru $15 \text{ }^\circ\text{C}$; teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Chromatogram v horním pravém rohu vznikl pouze přiblížením časové osy. Popisky os jsou u obou grafů stejné.

3.3 Matriční efekt

Vliv matričního efektu na stanovení L-dopy v lidském krevním séru byl vypočítán za pomoci vztahu (1):

$$ME (\%) = \left(\frac{A'}{A''} \right) \cdot 100, \quad (1)$$

kde ME je označení pro matriční efekt, A' znázorňuje plochu píku L-dopy přítomné ve vzorku obsahující lidské krevní sérum a A'' znázorňuje plochu píku L-dopy přítomné ve vzorku neobsahující lidské sérum (tj. plochu píku L-dopy přítomné v rozpouštědle).

Pro analýzu matričního efektu bylo připraveno celkem 8 vzorků (viz kapitola 2.3.3). Matriční efekt byl proměřen za pomoci tří různých krevních sér – tj. krevních sér získaných od třech různých pacientů.

Každý připravený vzorek byl nastříknut celkem čtyřikrát a získané plochy L-dopy byly zprůměrovány. Matriční efekt byl tedy vypočítán s průměrem hodnot získaným ze čtyř měření. Získané matriční efekty vyjádřené v procentech jsou uvedeny v Tab. 6.

Tabulka 6: Vypočtený vliv matrice (lidského krevního séra) na stanovení L-dopy. Hodnota ME byla vypočítána dle vzorce (1).

Koncentrace L-dopy	38,5 ng ml ⁻¹	769 ng ml ⁻¹
Matriční efekt [%]		
Krevní sérum A	48,9	44,2
Krevní sérum B	43,8	43,7
Krevní sérum C	44,0	53,0

Z výsledků matričního efektu uvedených v Tab. 6 je zřejmý poměrně velký vliv matrice (krevního séra) na stanovení L-dopy. Při stanovení L-dopy v lidském krevním séru můžeme očekávat pokles plochy píku až o polovinu oproti ploše píku získané při stanovení vzorku samotné L-dopy bez krevního séra. Při analýze matričního efektu nebyly pozorovány rozdílné hodnoty ME pro krevní séra získaná od různých pacientů a není pozorován vliv koncentrační hladiny L-dopy na ME.

4 Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostní tandemovou detekcí (HPLC-MS/MS) pro stanovení L-dopy v lidském krevním séru.

Nejprve byla provedena optimalizace tandemové hmotnostní detekce. Cíle optimalizace byly dva. Prvním z nich je nalezení specifických přechodů mezi prekurzorovým a produktovým iontem daného analytu (levodopa, deuterovaná levodopa) a druhým z cílů je nalezení vhodného nastavení iontové optiky tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti měření. Oba cíle optimalizace byly v diplomové práci splněny. Získané nejintenzivnější MRM přechody v pozitivním režimu byly následující:

1. levodopa: m/z 198,1 \rightarrow m/z 152,1 (Q1: -10 V, CE: -16 V, Q3: -28 V)
2. deuterovaná levodopa (IS): m/z 201,1 \rightarrow m/z 155,2 (Q1: -10 V, CE: -14 V, Q3: -28 V)

V další části diplomové práce byla provedena optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Při optimalizaci HPLC metody byly sledovány pouze výše uvedené nejvíce intenzivní MRM přechody analytů. V práci bylo vyzkoušeno 7 chromatografických kolon. Nejprve byla vyzkoušena chromatografie s reverzní fází a po neúspěších, kdy nedocházelo k adekvátní retenci levodopy, byla vyzkoušena hydrofilní interakční chromatografie. Jako optimální byla zvolena chromatografická kolona HALO 90 Å Penta-HILIC (150 x 2,1 mm; 2,7 μ m), Advanced Materials Technology (USA). Použitá mobilní fáze byla směs složená z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a z acetonitrilu (složka B). Zastoupení jednotlivých složek MF bylo postupně měněno podle gradientového profilu uvedeného v Tab. 5. Celková doba analýzy byla 12,50 minut, průtok MF byl 0,4 ml min⁻¹, nastříkovan byl vzorek o objemu 5 μ l, teplota na dávkovači byla 15 °C a teplota kolony byla 30 °C. Za těchto separačních podmínek došlo ke zvýšení retenčního času levodopy, což bylo velmi žádoucí, chromatografické píky měly pěkný tvar a pouze nepatrně chvostovaly.

V závěru práce byla provedena analýza vlivu matričního efektu na stanovení L-dopy v lidském krevním séru. Vlivem matričních efektů došlo ke snížení intenzity sledovaných analytů až o 53 % původní intenzity. Nebyly pozorovány rozdílné hodnoty ME pro krevní séra

získaná od různých pacientů a zároveň není pozorován vliv koncentrační hladiny L-dopy na ME.

Optimalizovaná HPLC-MS/MS metoda je připravená pro následnou validaci metody, kterou prozatím nebylo možno provést z důvodu vysoké kontaminace interního standardu neznačenou levodopou, tato kontaminace se pohybovala na hranici 15 %. Kalibrace a validace metody bude provedena až po dodání interního standardu odpovídající kvality.

5 Použitá literatura

- (1) Wojtowicz, P.; Janečková, H.; Friedecký, D.; Adam, T. Techniky metabolomiky v biomedicíně. *Chem. Listy* **2013**, *107* (1), 3–11.
- (2) Musilová, J.; Glatz, Z. Metabolomics – Basic Concepts, Strategies and Methodologies. *Chem. Listy* **2011**, *105* (10).
- (3) Clish, C. B. Metabolomics: An Emerging but Powerful Tool for Precision Medicine. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* **2015**, *1* (1). <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>.
- (4) Na, J.; Khan, A.; Kim, J. K.; Wadood, A.; Choe, Y. L.; Walker, D. I.; Jones, D. P.; Lim, C. S.; Park, Y. H. Discovery of Metabolic Alterations in the Serum of Patients Infected with Plasmodium Spp. by High-Resolution Metabolomics. *Metabolomics* **2019**, *16* (1), 9. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1630-2>.
- (5) Kramerius 5. Klinická biochemie a metabolismus : časopis České společnosti klinické biochemie <http://kramerius.medvik.cz/search/i.jsp?pid=uuid:bmc12032785-cd7dc9dd-ccb-4e33-87cc-27cbf4cb3fcb> (accessed 2020 -12 -06).
- (6) Zhang, X.; Zhu, X.; Wang, C.; Zhang, H.; Cai, Z. Non-Targeted and Targeted Metabolomics Approaches to Diagnosing Lung Cancer and Predicting Patient Prognosis. *Oncotarget* **2016**, *7* (39), 63437–63448. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11521>.
- (7) Griffiths, W. J.; Koal, T.; Wang, Y.; Kohl, M.; Enot, D. P.; Deigner, H.-P. Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (32), 5426–5445. <https://doi.org/10.1002/anie.200905579>.
- (8) Alonso, A.; Marsal, S.; Julià, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>.
- (9) UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters | SpringerLink <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10337-013-2477-8#citeas> (accessed 2021 -02 -19).
- (10) Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi 1.*; Praha, 2013.
- (11) Practical HPLC Method Development, 2nd Edition | Wiley <https://www.wiley.com/en-us/Practical+HPLC+Method+Development%2C+2nd+Edition-p-9780471007036> (accessed 2021 -02 -25).

- (12) Mitchell, C. R.; Bao, Y.; Benz, N. J.; Zhang, S. Comparison of the Sensitivity of Evaporative Universal Detectors and LC/MS in the HILIC and the Reversed-Phase HPLC Modes. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877* (32), 4133–4139. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.027>.
- (13) Gowda, G. A. N.; Djukovic, D. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2014**, *1198*, 3–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1258-2_1.
- (14) SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická Chemie*; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2019.
- (15) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed.; J. Wiley: Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
- (16) Poustka, J.; Praha, V. Aplikovaná hmotnostní spektrometrie (MS). **2019**, 110.
- (17) Sadílek, M. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chem. Listy* **2020**, *114* (2), 133–144.
- (18) Schreiber, A. Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples. 6.
- (19) Proteomics, C. Triple Quadrupole Mass Spectrometry <https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm> (accessed 2021 -03 -04).
- (20) Henry, H.; Sobhi, H. R.; Scheibner, O.; Bromirski, M.; Nimkar, S. B.; Rochat, B. Comparison between a High-Resolution Single-Stage Orbitrap and a Triple Quadrupole Mass Spectrometer for Quantitative Analyses of Drugs. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26* (5), 499–509. <https://doi.org/10.1002/rcm.6121>.
- (21) Contin, M.; Martinelli, P. Pharmacokinetics of Levodopa. *J. Neurol.* **2010**, *257* (S2), 253–261. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5728-8>.
- (22) PubChem. Levodopa <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6047> (accessed 2021 -10 -02).
- (23) Tomlinson, C. L.; Stowe, R.; Patel, S.; Rick, C.; Gray, R.; Clarke, C. E. Systematic Review of Levodopa Dose Equivalency Reporting in Parkinson’s Disease. *Mov. Disord.* **2010**, *25* (15), 2649–2653. <https://doi.org/10.1002/mds.23429>.

- (24) Neurol. praxi: Neurologie pro praxi, 2012, číslo 3
<https://www.neurologiepropraxi.cz/magno/neu/2012/mn3.php> (accessed 2021 -11 -07).
- (25) Roth, J.; Sekyrová, M.; Růžička, E. Parkinsonova Nemoc /. **1999**.
- (26) Bareš, Mud. M. DIAGNOSTIKA A KLINICKÉ PŘÍZNAKY PARKINSONOVY NEMOCI. **2001**, 3.
- (27) Kalinderi, K.; Fidani, L.; Katsarou, Z.; Bostantjopoulou, S. Pharmacological Treatment and the Prospect of Pharmacogenetics in Parkinson's Disease. *Int. J. Clin. Pract.* **2011**, 65 (12), 1289–1294. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2011.02793.x>.
- (28) Ahlskog, J. E.; Muentner, M. D. Frequency of Levodopa-related Dyskinesias and Motor Fluctuations as Estimated from the Cumulative Literature. *Mov. Disord.* **2001**, 16 (3), 448–458. <https://doi.org/10.1002/mds.1090>.
- (29) JEDLIČKA, P.; KELLER, O. *Speciální Neurologie*, 1.; Galén: Praha, 2005.
- (30) Arima, K.; Hirai, S.; Sunohara, N.; Aoto, K.; Izumiyama, Y.; Uéda, K.; Ikeda, K.; Kawai, M. Cellular Co-Localization of Phosphorylated Tau- and NACP/ α -Synuclein-Epitopes in Lewy Bodies in Sporadic Parkinson's Disease and in Dementia with Lewy Bodies. *Brain Res.* **1999**, 843 (1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01848-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01848-X).
- (31) PHARMANEWS | Odborné konference pro farmaceutické asistenty, lékárníky a sestry
<https://www.pharmanews.cz/clanek/terapie-parkinsonovy-nemoci-2/> (accessed 2021 -10 -04).
- (32) Současná strategie léčby Parkinsonovy nemoci – Geriatrie – Okruhy témat – Remedia – farmakoterapeutický časopis <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Geriatrie/Soucasna-strategie-lecby-Parkinsonovy-nemoci/8-13-gt.magarticle.aspx> (accessed 2021 -10 -02).
- (33) Schapira, A. H. V. Parkinson's Disease. *BMJ* **1999**, 318 (7179), 311–314. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7179.311>.
- (34) Valkovic, P.; Blazíček, P.; Benetin, J.; Kukumberg, P. Levodopa and Parkinson's Disease. *Čes. Slov. Neurol. Neurochir.* **2006**, 69, 183–188.
- (35) César, I. C.; Byrro, R. M. D.; de Santana e Silva Cardoso, F. F.; Mundim, I. M.; de Souza Teixeira, L.; Gomes, S. A.; Bonfim, R. R.; Pianetti, G. A. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–MS/MS Method for

- the Simultaneous Quantitation of Levodopa and Carbidopa in Human Plasma. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46* (9), 943–948. <https://doi.org/10.1002/jms.1973>.
- (36) Vilhena, R. de O.; Pontes, F. L. D.; Marson, B. M.; Ribeiro, R. P.; Carvalho, K. A. T. de; Cardoso, M. A.; Pontarolo, R. A New HILIC-MS/MS Method for the Simultaneous Analysis of Carbidopa, Levodopa, and Its Metabolites in Human Plasma. *J. Chromatogr. B* **2014**, *967*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.06.030>.
- (37) Chi, J.; Ling, Y.; Jenkins, R.; Li, F. Quantitation of Levodopa and Carbidopa in Rat Plasma by LC–MS/MS: The Key Role of Ion-Pairing Reversed-Phase Chromatography. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1054*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.001>.
- (38) Górska, A.; Paczosa-Bator, B.; Piech, R. Highly Sensitive Levodopa Determination by Means of Adsorptive Stripping Voltammetry on Ruthenium Dioxide-Carbon Black-Nafion Modified Glassy Carbon Electrode. *Sensors* **2021**, *21* (1), 60. <https://doi.org/10.3390/s21010060>.
- (39) Muzzi, C.; Bertocci, E.; Terzuoli, L.; Porcelli, B.; Ciari, I.; Pagani, R.; Guerranti, R. Simultaneous Determination of Serum Concentrations of Levodopa, Dopamine, 3-O-Methyldopa and α -Methyldopa by HPLC. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, *62* (4), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.10.018>.
- (40) Bergamini, M. F.; Santos, A. L.; Stradiotto, N. R.; Zanoni, M. V. B. A Disposable Electrochemical Sensor for the Rapid Determination of Levodopa. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39* (1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.03.014>.
- (41) Brunetti, B.; Valdés-Ramírez, G.; Litvan, I.; Wang, J. A Disposable Electrochemical Biosensor for L-DOPA Determination in Undiluted Human Serum. *Electrochem. Commun.* **2014**, *48*, 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.08.007>.
- (42) New, L.-S.; Chan, E. C. Y. Evaluation of BEH C18, BEH HILIC, and HSS T3 (C18) Column Chemistries for the UPLC-MS-MS Analysis of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Ophthalmic Acid in Mouse Liver and Human Plasma. *J. Chromatogr. Sci.* **2008**, *46* (3), 209–214. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.3.209>.
- (43) Guo, Y.; Gaiki, S. Retention and Selectivity of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (35), 5920–5938. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.052>.

- (44) ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm, 1/pk
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186004801-acquity-uplc-beh-amide-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html> (accessed 2022 -02 -07).
- (45) HALO® 90 Å Penta-HILIC 2.7 | HALO Penta HILIC Column. *HALO® Columns for Chromatography Separations.*