

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Tereza Tichá

Vývoj LC-MS/MS metody pro současné stanovení melperonu a tiapridu v lidském séru
a dialyzátu

Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of
melperone and tiapride in human serum and dialysate

Diplomová práce

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

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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 dne 10. května 2025

Bc. Tereza Tichá

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout LC-MS/MS metodu vhodnou k současnému stanovení melperonu a tiapridu v lidském krevním séru a dialyzátu za účelem pochopení farmakokinetiky obou látek u pacientů podstupujících hemodialýzu.

V rámci této diplomové práce byla provedena optimalizace hmotnostního spektrometru a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Zjištěné optimální parametry byly následující: chromatografická kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm od společnosti Agilent Technologies (USA). Mobilní fáze obsahovala jako vodnou složku 0,1% kyselinu mravenčí (složka A) a jako organickou složku acetonitril okyselený 0,1% kyselinou mravenčí (složka B), průtok mobilní fáze byl 0,45 ml/min, teplota kolony byla 40 °C a teplota na dávkovači byla 15 °C. Nastříkovaný objem vzorku na kolonu byl 1 μl. Doba analýzy byla 10 minut za podmínek gradientové eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v). Sledované MRM přechody v pozitivním módu o nejvyšších intenzitách byly následující: melperon: 264,1 → 165,1 ($Q_1 = -30,0$ V, $CE = -20,0$ V, $Q_3 = -17,0$ V), melperon D4: 268,3 → 169,2 ($Q_1 = -14,0$ V, $CE = -21,0$ V, $Q_3 = -18,0$ V), tiaprid: 329,4 → 256,2 ($Q_1 = -10,0$ V, $CE = -22,0$ V, $Q_3 = -27,0$ V) a sultoprid: 355,4 → 112,2 ($Q_1 = -18,0$ V, $CE = -28,0$ V, $Q_3 = -21,0$ V).

Za optimalizovaných LC-MS/MS podmínek byla provedena částečná validace metody. Byly proměřeny kalibrační závislosti jak v séru, tak i v dialyzátu. Metoda byla lineární v koncentračním rozmezí 0,3 až 1250,0 ng/ml. Správnost a přesnost byla provedena na čtyřech koncentračních hladinách pokrývajících kalibrační rozsah. Správnost stanovení melperonu dosahovala hodnot od -19,5 do 11,4 %, přesnost byla v rozmezí 0,8 až 11,7 %. Správnost stanovení tiapridu se pohybovala mezi 2,6 až 18,5 %, přesnost byla v rozmezí 0,9 až 3,4 %. Výsledky správnosti a přesnosti jsou v souladu s kritérii pro bioanalytické aplikace. Matriční efekt na stanovení melperonu byl od 94,1 do 105,6 % a vliv matrice na stanovení tiapridu byl 92,1 až 108,1 %. Výtěžnost melperonu byla 91,9 až 105,0 % a výtěžnost tiapridu byla 90,5 až 103,8 %. Metodu lze také považovat za selektivní, jelikož stanovení tiapridu a melperonu v séru a dialyzátu nebylo ovlivněno interferujícími látkami.

Klíčová slova: LC-MS/MS, melperon, tiaprid, lidské krevní sérum, lidský dialyzát

Abstract

The aim of this diploma thesis was to develop an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of melperone and tiapride in human blood serum and dialysate in order to understand the pharmacokinetics of both compounds in patients undergoing hemodialysis.

In this diploma thesis the mass spectrometer and high-performance liquid chromatography method were optimized. The optimal parameters were as follows: chromatographic column Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm from Agilent Technologies (USA). The mobile phase contained 0,1% formic acid as aqueous component (component A) and acetonitrile with 0,1% formic acid as organic component (component B), the flow rate of mobile phase was 0,45 ml/min, the column temperature 40 °C, the temperature in an autosampler 15 °C. The sample injection volume was 1 μl. The analysis time was 10 minutes under gradient elution conditions (time: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v). The following MRM transitions in positive mode of highest intensity were monitored: melperone: 264,1 → 165,1 ($Q_1 = -30,0$ V, $CE = -20,0$ V, $Q_3 = -17,0$ V), melperone D4: 268,3 → 169,2 ($Q_1 = -14,0$ V, $CE = -21,0$ V, $Q_3 = -18,0$ V), tiapride: 329,4 → 256,2 ($Q_1 = -10,0$ V, $CE = -22,0$ V, $Q_3 = -27,0$ V) and sultopride: 355,4 → 112,2 ($Q_1 = -18,0$ V, $CE = -28,0$ V, $Q_3 = -21,0$ V).

Under optimized LC-MS/MS conditions, a partial validation of the method was performed. Calibration curves were measured both in serum and in dialysate. The method was linear over the concentration range of 0,3 to 1250,0 ng/ml. Accuracy and precision were evaluated at four concentration levels covering the calibration range. The accuracy of melperone determination ranged from -19,5 to 11,4 %, the precision was from 0,8 to 11,7 %. The accuracy of tiapride determination ranged from 2,6 to 18,5 %, precision was from 0,9 to 3,4 %. The results for accuracy and precision were in accordance with the criteria for bioanalytical applications. The matrix effect on melperone determination was from 94,1 to 105,6 %, the matrix effect on tiapride determination was from 92,1 to 108,1 %. The recovery of melperone was in range of 91,9-105,0 % and the recovery of tiapride was from 90,5 to 103,8 %. This method is also considered selective, as the determination of melperone and tiapride was not affected by interfering substances.

Key words: LC-MS/MS, melperone, tiapride, human blood serum, human dialysate

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a také trpělivost během laboratorního měření a sepsování této diplomové práce.

Další poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Melperon.....	11
2.1.1	Využití melperonu	11
2.1.2	Stanovení melperonu.....	12
2.2	Tiaprid.....	13
2.2.1	Využití tiapridu.....	14
2.2.2	Stanovení tiapridu	14
2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
2.3.1	Typy kapalinové chromatografie	17
2.3.2	Trendy v kapalinové chromatografii.....	18
2.4	Hmotnostní spektrometrie.....	19
2.4.1	Iontové zdroje	19
2.4.2	Hmotnostní analyzátory	20
2.4.3	Detektory	20
2.4.4	LC-MS/MS	20
2.4.5	Trendy v hmotnostní spektrometrii.....	22
3	Experimentální část.....	23
3.1	Použité chemikálie a instrumentace.....	23
3.2	Příprava vzorků.....	24
3.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	24
3.2.2	Příprava interních standardů	24
3.2.3	Příprava směsných vzorků	24
3.2.4	Kalibrace	25
3.2.5	Vyhodnocení validačních parametrů.....	26
3.2.6	Měření reálných vzorků	28
4	Výsledky a diskuze.....	29
4.1	Optimalizace hmotnostního spektrometru	29

4.2	Optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie	34
4.3	Kalibrační závislost.....	40
4.4	Validace	43
4.4.1	Správnost a přesnost	43
4.4.2	Matriční efekt.....	44
4.4.3	Výtěžnost	45
4.4.4	Selektivita	45
5	Závěr.....	50
	Literatura.....	51

Seznam použitých zkratk a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ESI	elektrosprejová ionizace
FL	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ICR	iontově cyklotronová rezonance
IT	iontová past
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
LIT	lineární iontová past
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MF	mobilní fáze
M_r	relativní molekulová hmotnost
MRM	sledování více reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	kapalinová chromatografie s normálními fázemi
PDA	detektor fotodiodového pole
Q1	první kvadrupól
q2	kolizní cela
Q3	třetí kvadrupól

QqQ	trojitý kvadrupól
RE	relativní chyba
RP-HPLC	kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast

1 Úvod

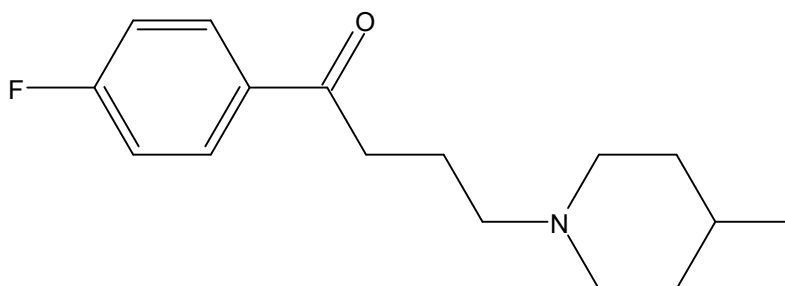
Melperon a tiaprid jsou atypické antipsychotické látky, které působí na dopaminové receptory. Melperon se využívá především k léčbě schizofrenie, L-DOPA indukované psychózy u pacientů trpících Parkinsonovou chorobou a emoční stability. Tiaprid se také prokázal efektivní v léčbě schizofrenie, navíc má antidepresivní a antiulcerózní účinky. Proto je využíván také při terapii žaludečních vředů nebo podráždění zažívacího traktu v důsledku psychosomatického stresu.

V České republice je kombinace tiapridu a melperonu běžně předepisována k léčbě deliria. Zatímco farmakokinetika tiapridu byla částečně popsána u zdravých osob a některých skupin pacientů, údaje o pacientech s poruchou funkce ledvin nebo podstupujících hemodialýzu zůstávají vzácné. Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s Všeobecnou fakultní nemocnicí v Praze. Cílem této diplomové práce bylo vyvinout LC-MS/MS metodu, která je vhodná k současnému stanovení melperonu a tiapridu v lidském krevním séru a dialyzátu. Získaná data patientských vzorků budou sloužit k pochopení farmakokinetiky obou látek u pacientů podstupujících hemodialýzu.

2 Teoretická část

2.1 Melperon

Melperon (Obr. 1) je fluorované neuroleptikum z chemické třídy butyrofenonů [1].



Obr. 1: Strukturní vzorec melperonu ($M_r = 263,35$).

2.1.1 Využití melperonu

Melperon je efektivní antipsychotický lék, který se používá k léčbě schizofrenie, L-DOPA indukované psychózy u pacientů trpících Parkinsonovou chorobou, napětí, emoční stability a paranoidní ideace u alkoholiků [2]. Melperon se řadí mezi atypická antipsychotika, která jsou charakterizována nízkou afinitou k dopaminovým receptorům D2 a relativně vysokou afinitou k serotoninovým receptorům 5-HT [3]. Na rozdíl od typických antipsychotik jsou atypická schopna produkovat antipsychotický efekt při dávkách, které způsobují minimální extrapyramidové vedlejší účinky [4]. Extrapyramidové symptomy souhrnně označují různé poruchy hybnosti, kam se řadí například akatizie a tardivní dyskineze [5]. Atypická antipsychotika také zlepšují negativní symptomy, nezvyšují hladinu prolaktinu a prokázaly se jako efektivní v léčbě pacientů s farmakorezistentní schizofrenií [4]. Mezi další atypická antipsychotika patří také například klozapin, olanzapin a risperidon [6]. Naopak zástupci typických antipsychotik jsou haloperidol, chlorpromazin a thioridazin [7].

Melperon má široké spektrum neuroleptických účinků a prokázal se jako účinný i při léčbě senilní demence [8]. Vzhledem k jeho sedativním účinkům je melperon také podáván geriatrickým pacientům trpícím insomnií [9].

Antipsychotika včetně melperonu jsou považována za předmět zájmu kvůli jejich možnému zneužívání a podílu na letálních intoxikacích a sebevraždách [10].

2.1.2 Stanovení melperonu

Melperon je obvykle stanovován společně s řadou dalších antipsychotik v lidských tkáních a tělních tekutinách jako je například krev, moč a vlasy [11]. Melperon byl také stanoven v lumbální cerebrospinální tekutině [12], krysím mediálním prefrontálním kortexu a dialyzátu [13]. Vzhledem k zneužívání melperonu spojeného s letální intoxikací jsou pro stanovení běžné také postmortální matrice [14].

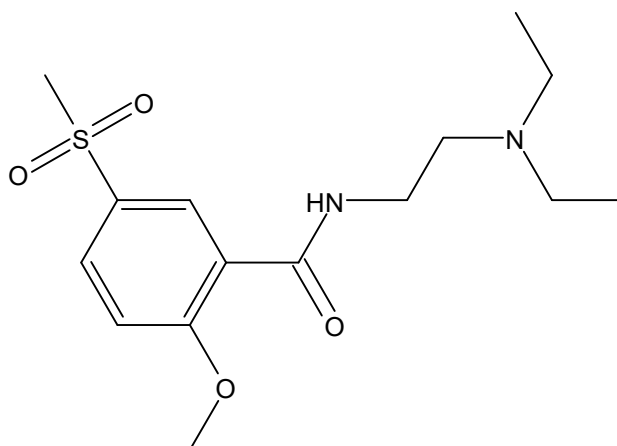
Zlatým standardem analýzy léčiv v oblasti forezních věd byla dlouhou dobu plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), jelikož poskytuje vysokou citlivost a selektivitu. S nástupem nízkodávkových neuroleptik na trh vzrostly požadavky na více komplexní screening, a proto byly zavedeny nové alternativní metody analýzy. Velmi se osvědčila kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) využívající elektrosprej (ESI) a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). ESI a APCI jsou měkké ionizační techniky a umožňují MS analýzu bez předchozí derivatizace analytů. LC-MS/MS umožňuje analýzu sloučenin o vysoké molekulové hmotnosti a velmi vysoké polaritě, což ji činí užitečnou metodou k identifikaci metabolitů [11]. U stanovení antipsychotik včetně melperonu je obvykle preferována ionizace elektrosprejem oproti APCI, jelikož ESI dosahuje vyšší citlivosti. Vysoká citlivost hmotnostní tandemové detekce již téměř nahradila UV detektory, fluorescenční detektory i elektrochemickou detekci v oblasti analýzy antipsychotických látek [15]. V Tab. 1 jsou uvedeny příklady stanovení melperonu.

Tab. 1: Příklady stanovení melperonu

matrice	kolona	mobilní fáze (A/B)	detekce	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
lidská krev [10]	Acquity UPLC HSST3 (2,1 × 100 mm, 1,8 μm)	ACN/0,1% HCOOH	ESI-MS/MS	–	5000
lidská krev a tkáň [14]	Luna C18 (2 × 150 mm, 5 μm)	H ₂ O/methanol (95/5, v/v)/ H ₂ O/methanol (3/97, v/v) + 10 mM CH ₃ COONH ₄ a 0,1% CH ₃ COOH	MS/MS	–	–
lidské sérum [16]	Acquity UPLC RP BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 μm)	2 mM CH ₃ COONH ₄ , 0,1% HCOOH v 5% ACN (v/v/v)/ 2 mM CH ₃ COONH ₄ , 0,1% HCOOH v 95% ACN	ESI-MS/MS	0,7	2,2
lidská krev [17]	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 mm, 5 μm)	50 mM HCOONH ₄ / 0,1% HCOOH v ACN, pH 3,5	ESI-MS/MS	–	10

2.2 Tiaprid

Tiaprid (Obr. 2) je benzamidový derivát, který působí jako selektivní antagonistu dopaminových D2/D3 receptorů [18].



Obr. 2: Strukturální vzorec tiapridu ($M_r = 328,43$).

2.2.1 Využití tiapridu

Tiaprid vykazuje antipsychotické, antidepressivní a antiulcerózní účinky s nízkým výskytem extrapyramidových účinků. Využívá se k léčbě deprese, schizofrenie a psychopatologie stárnutí. Tiaprid také pomáhá léčit žaludeční a duodenální vředy, podrážděné tlusté střevo v důsledku psychosomatického stresu a závratě [19].

Tiaprid se prokázal jako efektivní také při terapii abstinenčních příznaků při odvykání alkoholu. Studie naznačují pozitivní efekt tiapridu v prevenci relapsu u pacientů závislých na alkoholu, snížení neurotických příznaků a vyšší sebevědomí. Vzhledem k tomu, že tiaprid nemá antikonvulzivní účinky, tak musel být podáván společně s karbamazepiny, aby bylo zabráněno abstinenčním záchvatům [20].

Tiaprid jako atypické antipsychotikum se používá i při léčbě agrese, nepříjemných stavů extrémního vzrušení, dyskineze a bolestí hlavy. Podává se také k léčbě tikových poruch, Tourettova syndromu [21] a koktání u dětí [18].

Tiaprid je považován za klinicky bezpečnou látku, avšak jeho pravděpodobný vliv na celkový vývoj mozku a zrání dopaminergního systému nebyl zatím prozkoumán [18].

2.2.2 Stanovení tiapridu

Psychoaktivní látky jsou obvykle stanovovány v lidské krvi ve směsi s látkami, které mají podobné farmakologické účinky nebo pocházejí ze stejné chemické třídy. Důvodem kombinované terapie je snížení rizika několika nežádoucích účinků, které se mohou objevovat při vysokých dávkách léčiv, jako je zvýšené riziko náhlé srdeční smrti spojené s antipsychotiky nebo serotoninová toxicita u antidepressiv [22].

Pro analýzu substituovaných benzamidů v biologických tekutinách je dostupných mnoho analytických metod, příkladem je spektrofluorometrické stanovení, plynová chromatografie (GC) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí a HPLC s fluorescenční detekcí [23]. K analýze tiapridu společně s dalšími deriváty benzamidů se využívají rutinně HPLC metody s UV a fluorescenční detekcí. Tyto metody však často vyžadují komplikovanou extrakci na tuhé fázi nebo extrakci kapalina – kapalina a následnou úpravu extraktu před stanovením. Tyto metody jsou proto časově náročné a obvykle i špatně reprodukovatelné [23]. Proto byla uvedena také

stanovení prostřednictvím GC-MS a HPLC-MS metod, která jsou vysoce citlivá, avšak vyžadují nákladné investice [23]. LC-MS/MS se v posledních letech stala velmi důležitou metodou v oblasti toxikologických analýz, jelikož kombinuje vyšší selektivitu díky hmotnostní detekci, snazší přípravu vzorku a možnost přímé analýzy roztoků na rozdíl od GC [22]. V Tab. 2 je uveden přehled několika vybraných stanovení tiapridu.

Tab. 2: Příklady stanovení tiapridu

matrice	kolona	mobilitní fáze (A/B)	detekce	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
lidská krev [22]	Hypersil Gold aQ (2,1 × 100 mm, 3 µm)	0,1% HCOOH/MeOH	ESI-MS/MS	0,5	1,7
lidské sérum [23]	TSKgel Super-ODS (2 × 100 mm, 2,5 µm)	ACN + 150 mM NaH ₂ PO ₄ (5/95, v/v) + 50 mM NaClO ₄ / ACN + 150 mM NaH ₂ PO ₄ (12/88, v/v) + 50 mM NaClO ₄	FL	4	–
lidská plazma [24]	Discovery HS-F5 (4 × 250 mm, 5 µm)	ACN/0,01 M fosfátový pufr (6/4, v/v)/ ACN/0,01 M fosfátový pufr (3/7, v/v)	PDA-FL	–	–
lidská plazma [25]	Atlantis HILIC Silica (3 × 50 mm, 5 µm)	ACN/ HCOONH ₄ (94/6, v/v), pH 3,0	MS/MS	–	1,0

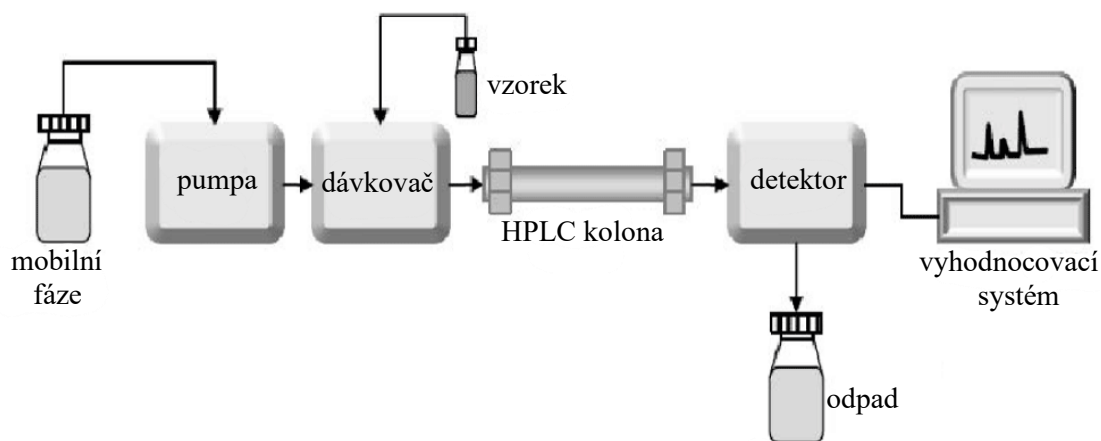
Pro rychlé, citlivé a selektivní stanovení tiapridu v lidské plazmě byla vyvinuta metoda hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) s tandemovou hmotnostní detekcí [25]. Ke stanovení a separaci tiapridu byla vyvinuta a validována také metoda využívající kapilární zónovou elektroforézu (CZE), která je jednoduchá a rychlá. Touto metodou CZE bylo dosaženo limitu detekce 2,7 µg/ml a limitu kvantifikace 9,0 µg/ml pro tiaprid [26]. Tiaprid byl stanoven i pomocí vysoce citlivé chemiluminiscenční metody využívající průtokovou injekci, přičemž limit detekce tiapridu byl 0,01 µg/ml [27]. Také byla popsána selektivní elektroda z polyvinylchloridové membrány ke stanovení tiapridu. Tato elektroda prokázala dobrou selektivitu vůči tiapridu s ohledem na některé anorganické a organické sloučeniny. Elektroda byla použita ke stanovení tiapridu v lidské moči a iontoforézním roztoku [28].

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z anglického High-Performance Liquid Chromatography) je analytická technika, která se využívá k separaci, identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek přítomných ve vzorku [29]. Jedná se o jednu z nejvíce využívaných metod ve farmaceutickém, biotechnologickém, enviromentálním, polymerním a potravinářském průmyslu [30].

Separace jednotlivých chemických látek ve směsi vzorku je založena na rozdílné distribuci látek mezi mobilní fází (MF) a stacionární fází (SF). Separace probíhá v separační koloně, která je naplněna stacionární fází, přičemž mobilní fáze do kolony proudí pod vysokým tlakem. Po aplikaci vzorku se analyty, na základě odlišné afinity jednotlivých analytů ke stacionární fází, pohybují rozdílnou rychlostí a oddělují se. Separace pomocí HPLC závisí především na parametrech mobilní fáze jako je polarita, rychlost průtoku, pH a složení. Vliv na separaci má však také povaha stacionární fáze a vlastnosti matrice vzorku [31].

Základní instrumentaci HPLC (Obr. 3) systému tvoří zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku ve formě manuálního nástřikového ventilu nebo autosampleru, chromatografická kolona, detektor a vyhodnocovací systém [32]. Mezi nejčastěji používané detektory ve spojení s metodou HPLC patří UV/Vis detektory a hmotnostně-spektrometrické detektory, také se někdy využívá fluorescenční a elektrochemické detekce nebo detektorů fotodiodového pole [33].



Obr. 3: Schéma základní instrumentace HPLC (převzato a upraveno [30]).

2.3.1 Typy kapalinové chromatografie

Dle druhu interakce mezi analytem a stacionární fází, typem stacionární fáze a složením mobilní fáze rozlišujeme několik módů kapalinové chromatografie. Nejvíce populárním typem je chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC, z anglického Reverse-Phase Chromatography). RP-HPLC obsahuje nepolární stacionární fázi, kterou nejčastěji tvoří alkylové řetězce navázané na povrch nosiče, kterým je silikagel. Nejpoužívanější SF jsou oktadecylové (C18) nebo oktylové (C8). Mobilní fáze má více polární charakter než stacionární, obvykle ji tvoří směs vody a organického rozpouštědla jako například acetonitril nebo methanol. Polární analyty eluují rychleji, zatímco nepolární analyty jsou více zadržovány stacionární fází [30]. Druhým typem je chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC, z anglického Normal-Phase Chromatography). U NP-HPLC dochází k separaci na základě afinity analytů k polárnímu povrchu stacionární fáze, kterou bývá nejčastěji silikagel, přičemž mobilní fáze je nepolární. Čím je analyt polárnější, tím více bude zadržován v polární stacionární fází a bude eluovat později [30]. Slibnou alternativou ke dvěma výše zmíněným klasickým typům chromatografie je hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC). HILIC kombinuje stacionární fáze používané v NP-HPLC a mobilní fáze využívané v RP-HPLC [34]. Polární SF bývá například nemodifikovaný silikagel, aminové a diolové stacionární fáze. A mobilní fázi tvoří minimálně ze 70 % organická složka, obvykle acetonitril, a malé procento vodného roztoku, pufru nebo jiného polárního rozpouštědla [30]. HILIC lze úspěšně použít k analýzám polárních látek jako jsou farmaceutické látky, malé polární molekuly, metabolity, návykové látky, sacharidy, aminokyseliny, proteiny a toxiny [34].

Dalšími chromatografickými módy jsou iontově výměnná chromatografie (IEC), molekulová vylučovací chromatografie (SEC) a afinitní chromatografie. Retence u IEC je založena na přitažlivosti mezi rozpuštěnými ionty a nabitými místy, která jsou vázána na stacionární fázi (iontoměniče). Ionty o stejném náboji jako je náboj nabitých míst na koloně se nepřitahují, na koloně jsou zadržovány rozpuštěné ionty s opačným nábojem. Zadržené ionty lze z kolony eluovat změnou podmínek rozpouštědla, například zvýšením koncentrace roztoku, změnou pH roztoku nebo změnou teploty na koloně. IEC je vhodná pro separaci anorganických a organických iontů ve vodném roztoku [30]. Podstatou SEC je rozdělování molekul podle jejich velikostí v koloně, která je naplněna porézním gelem.

Menší molekuly jsou zachyceny v pórech gelu, a proto mají delší retenční čas než větší molekuly, které nemohou pronikat do pórů a jsou unášeny mobilní fází. SEC se využívá primárně k analýze velkých molekul jako jsou například proteiny a polymery. Jedná se o široce používanou techniku v oblasti určení molekulové hmotnosti polysacharidů a terciární a kvartérní struktury purifikovaných proteinů [30]. Posledním typem z uvedených je afinitní chromatografie, která spočívá v kovalentní vazbě specifického ligandu na pevný nosič. Typickými afinitními ligandy jsou protilátky, enzymy, hormony a receptory. Tato technika se vzhledem ke své selektivitě a jednoduchosti využívá k izolaci a purifikaci mnoha biomolekul, biofarmaceutik a dalších látek [35].

2.3.2 Trendy v kapalinové chromatografii

Od roku 2004, kdy byla ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, z anglického Ultra-High-Performance Chromatography) komerčně uvedena na trh, stále roste její využití v různých odvětví průmyslu [36]. Ve srovnání s klasickým HPLC systémem UHPLC dosahuje vyšší rychlosti analýz, citlivosti a rozlišení. Hlavním rozdílem je, že vysokotlaká čerpadla v UHPLC systémech mohou dosahovat tlaku 1000 barů i více na rozdíl od konvenčních HPLC systémů, které dosahují maximálně 400 barů. Takto vysoké tlaky v UHPLC vznikají díky částicím menším než 2 μm , kterými jsou kolony plněny. Menší částice dosahují lepšího rozlišení a účinnosti separace. Také zajišťují rychlejší separace na kratších kolonách a zvyšují citlivost vzhledem k vzniku užších a vyšších píků [37]. UHPLC systémy navíc umožňují detekci analytů o velmi nízkých koncentracích, jelikož je zlepšen poměr signálu k šumu. Vstříkovaný objem vzorku je výrazně snížen, aniž by došlo ke snížení citlivosti a také je snížena spotřeba mobilních fází ve srovnání s klasickou HPLC technikou [38].

Dalším trendem jsou monolytické kolony, které jsou tvořené jediným kusem polymerního materiálu, což umožňuje velmi rychlý průtok mobilní fáze, aniž by došlo k výraznému nárůstu zpětného tlaku a ztrátě separační účinnosti. Monolytické kolony umožňují rychlé separace i pro velké molekuly jako jsou například proteiny a nukleové kyseliny [39].

Dalším z trendů v kapalinové chromatografii je miniaturizace HPLC systémů, která získává velkou pozornost především kvůli point-of-care aplikacím v oblasti medicíny, forenzních věd, vnitřní bezpečnosti a biomedicíny. Cílem zmenšení analytického systému

je co nejekonomičtější provoz, jelikož miniaturizací poklesne spotřeba vzorku a reagentů. Miniaturizace má však také řadu nevýhod, mezi které patří snížená robustnost, což může vést k nižší reprodukovatelnosti analýz v porovnání s konvenční HPLC. S pokračujícím vývojem mikro-HPLC systémů a automatizací provozu se však očekává, že tyto problémy budou překonány [40].

2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z anglického Mass Spectrometry) je analytická technika, která je využívána pro kvantitativní i kvalitativní aplikace v řadě různorodých oblastí. Hmotnostní spektrometry se skládají z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru částic [41].

2.4.1 Iontové zdroje

Iontový zdroj napomáhá přeměně analytů v pevné nebo kapalně fázi na nabitě částice v plynném skupenství, které mohou po svém vzniku fragmentovat. Výsledkem ionizace jsou kladně nebo záporně nabitě molekulární ionty ($M^{+\bullet}$, $M^{-\bullet}$) a aduktové ionty ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, ...) [42].

Nejčastěji používaným iontovým zdrojem ve spojení kapalinové chromatografie s MS je měkká ionizační technika zvaná elektrosprejová ionizace (ESI) [41]. ESI spočívá v aplikaci silného elektrického pole na elektrodu za atmosférického tlaku. S postupným odpařováním rozpouštědla se na hrotu sprejovací kapiláry, do které vstupuje vzorek s analytem, tvoří Taylorův kužel, ze kterého proudí nabitě kapky ve formě spreje. ESI je poměrně univerzální a vyznačuje se vysokou robustností v rutinních analýzách [42].

Měkkou ionizaci zajišťuje i ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), která se často používá k analýze proteinů a jiných makromolekul [42]. K ionizaci nepolárních sloučenin se hodí chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [43].

Příkladem tvrdé ionizační techniky je elektronová ionizace, kdy vzniká obvykle kladně nabitý radikál molekuly a jeho fragmentační spektrum, ze kterého lze identifikovat analyzovanou sloučeninu. Elektronová ionizace se často využívá ve spojení s GC-MS [42].

2.4.2 Hmotnostní analyzátory

Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou následně transportovány do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) [41]. Hmotnostní analyzátory dělíme na skenující, průletové a iontové pasti.

Mezi skenující hmotnostní analyzátory se řadí kvadrupóly a sektorové přístroje. Kvadrupólový analyzátor tvoří čtyři tyče, na které je vložena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí. Na základě velikosti vloženého napětí v daný moment oscilují ionty s určitým poměrem m/z po stabilní trajektorii k detektoru, který je zachytí. Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích a do detektoru se nedostanou [42].

Další skupinou jsou průletové analyzátory, které převádí všechny ionty současně do letové trubice, kde se separují na základě odlišné doby letu k detektoru. Do této skupiny patří analyzátor doby letu (TOF).

Posledním typem jsou analyzátory, které zachycují ionty v cele či pasti. Do této skupiny patří iontové pasti, iontově cyklotronová rezonance (ICR) a orbitrap [42].

2.4.3 Detektory

Separované ionty jsou detekovány iontovým detektorem. Elektrické signály produkované detektorem jsou následně zpracovány za vzniku hmotnostních spekter. Detekované ionty mohou odpovídat původním molekulám, jejich fragmentům nebo molekulovým aduktům. Dle poměru m/z a vzniklých fragmentů lze z hmotnostních spekter identifikovat molekuly s vysokou selektivitou [41].

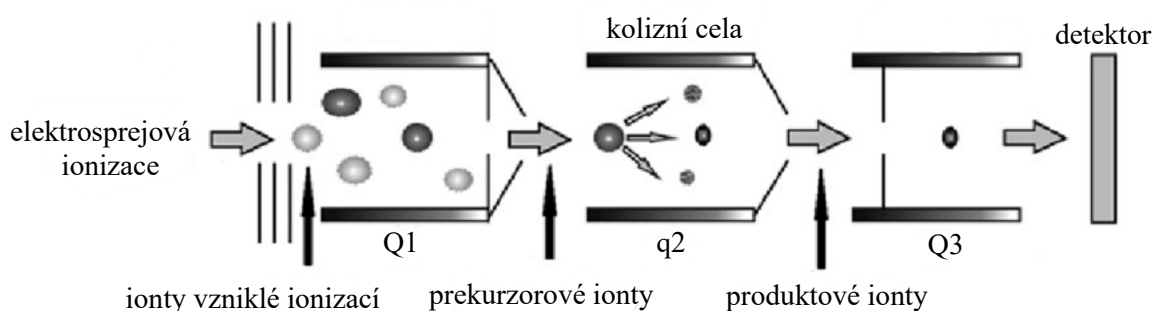
Obvykle se používají elektronové násobiče, které obsahují sérii dynod, které po dopadu elektronů na jejich povrch vyvolají sekundární emisi, jejíž výsledkem je znásobení počtu elektronů [42].

2.4.4 LC-MS/MS

Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) je nepostradatelnou analytickou metodou, která má široké spektrum využití. LC-MS/MS se v klinických laboratořích využívá například k terapeutickému monitorování léků, novorozeneckému screeningu, referenčním metodám a v toxikologii. Tato metoda navíc

dosahuje vysoké úrovně citlivosti, specifity a robustnosti, také umožňuje měření více analytů současně [44].

Tandemová hmotnostní spektrometrie využívá dva a více hmotnostních analyzátorů zapojených za sebou. Nejčastěji používaným uspořádáním je LC-MS/MS s trojitým kvadrupólem (QqQ, Obr. 4). Po ionizaci vzorku v iontovém zdroji jsou prekurzorové ionty vedeny do prvního kvadrupólu (Q1), který funguje jako hmotnostní filtr a propouští jen ty prekurzorové ionty, které odpovídají určitému poměru m/z . Vybraná hmota přechází do druhého kvadrupólu (q2), který pracuje jako kolizní cela. Pod vlivem kolizní energie se prekurzorové ionty srážejí s molekulami či atomy kolizního plynu, kterým bývá dusík nebo argon. V důsledku srážek dochází k fragmentaci prekurzorových iontů na produktové, které následně vstupují do třetího kvadrupólu (Q3), který podobně jako Q1 působí jako filtr hmoty a propouští k detektoru jen ionty o určitém poměru m/z [42].



Obr. 4: Princip tandemové hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem (převzato a upraveno [45]).

Trojité kvadrupól poskytuje 4 základní druhy skenů. Prvním je sken produktových iontů, kdy Q1 prochází ion o určité m/z do kolizní cely, kde dochází k fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou detekovány detektorem. Dalším je sken prekurzorových iontů, kde naopak přes Q1 prochází všechny ionty do kolizní cely, kde jsou poté fragmentovány. Q3 následně propouští pouze produktové ionty o zvolené m/z . Při skenu neutrálních ztrát skenují současně Q1 i Q3 ionty se stálým rozdílem m/z . Sleduje se neutrální fragment, jehož m/z odpovídá stálému rozdílu. Posledním uvedeným skenem je MRM (Multiple reaction monitoring), kdy Q1 propouští prekurzorové ionty o daném poměru m/z , které

jsou fragmentovány při optimální kolizní energii na produktový ion o nejvyšší intenzitě a daném m/z , který Q3 prochází do detektoru [42].

2.4.5 Trendy v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) se řadí mezi trendy MS z důvodu dosažení vysokého hmotnostního rozlišení a přesnosti. HRMS poskytuje komplexnější informace o přesné molekulové hmotnosti, chemickém složení a detailní molekulové struktuře dané sloučeniny. Oproti klasické tandemové hmotnostní spektrometrii lze HRMS navíc použít k rozlišení izobarických sloučenin [46]. HRMS se mimo jiné využívá ve výzkumu životního prostředí k identifikaci a kvantifikaci kontaminantů a biologických metabolitů [47]. Nejvyššího rozlišení bylo dosaženo prostřednictvím víceprůchodového analyzátoru doby letu, orbitrapu a ICR s Fourierovou transformací [48].

Dalším trendem MS je iontová mobilitní spektrometrie, která separuje ionty podle jejich 3D struktury, například dle tvaru, pozice jader a elektronické struktury. Iontová mobilitní spektrometrie se využívá především k separaci izomerních nebo izobarických sloučenin [49].

Mezi MS trendy se řadí také hybridní hmotnostní analyzátory používané v tandemové hmotnostní spektrometrii. Jako hybridní jsou označovány analyzátory, které využívají různé typy hmotnostních analyzátorů pro první a druhou fázi hmotnostní analýzy. Cílem při návrhu hybridního přístroje je nakombinovat odlišné výkonnostní charakteristiky různých typů hmotnostních analyzátorů do jednoho spektrometru. Tyto charakteristiky zahrnují například hmotnostní rozlišovací schopnost a rychlost analýzy. Nejčastěji používaným hybridním hmotnostním analyzátozem je QqQ (trojitý kvadrupól), případně Q/TOF (kvadrupól/analyzátor doby letu), QIT/TOF (kvadrupól-iontová past/analyzátor doby letu) a LIT/TOF (lineární iontová past/analyzátor doby letu) [50].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a instrumentace

Chemikálie:

- Melperon hydrochlorid 50 mg, Toronto Research Chemicals Inc (Kanada)
- Melperon hydrochlorid-D4 2,5 mg, Toronto Research Chemicals Inc (Kanada)
- Tiaprid hydrochlorid 50 mg, Dr. EhrenstorferTM (Německo)
- Sultopride hydrochlorid 10 mg, Toronto Research Chemicals Inc (Kanada)
- Kyselina mravenčí $\geq 99\%$, HiPerSolv CHROMANORM[®], LC-MS čistota (VWR Chemicals, Velká Británie)
- Methanol, Honeywell, LC-MS CHROMASOLV[®] čistota $\geq 99,9\%$ (Německo)
- Acetonitril, Honeywell, LC-MS CHROMASOLV[®] čistota $\geq 99,9\%$ (Německo)
- Voda, HiPerSolv CHROMANORM[®], LC-MS čistota (VWR Chemicals, Francie)

Instrumentace:

- Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr, LCMS-8045, Shimadzu (Japonsko)
- Chromatografická kolona InfinityLab Poroshell HPH-C8 $50 \times 2,1$ mm, $2,7 \mu\text{m}$, Agilent (USA)
- Chromatografická kolona Accucore Phenyl-X $150 \times 4,6$ mm, $2,6 \mu\text{m}$, Thermo Fisher Scientific (USA)
- Chromatografická kolona Acquite UPLC BEH Amide $100 \times 2,1$ mm, $1,7 \mu\text{m}$, Waters (USA)
- Chromatografická kolona ZORBAX SB-Aq $150 \times 2,1$ mm, $1,8 \mu\text{m}$, Agilent Technologies (USA)
- Automatické pipety, Socorex (Švýcarsko)
- Ultrazvuková lázeň, Elmasonic S15 H, Elma (Německo)
- Homogenizátor CHS Vortex, Chromservis s.r.o. (Česká republika)
- Mini centrifuga ROTILABO[®] GustoTM, Carl Roth (Německo)
- Analytické váhy Entris[®], Sartorius (Německo)

Programy:

- MS Excel
- Labsolutions, Shimadzu (Japonsko)

3.2 Příprava vzorků

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky melperonu, izotopicky značeného melperonu D4, tiapridu a sultopridu o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny následujícím způsobem. Na analytických vahách byl odvážen přibližně 1 mg analytu. K navážce bylo přidáno příslušné množství methanolu, poté byly vialky s jednotlivými analyty uzavřeny a vzorky byly rozpuštěny v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut bez zahřívání. Vzniklé zásobní roztoky jednotlivých analytů o koncentraci 1 mg/ml byly následně desetkrát zředěny methanolem na koncentrace 100 µg/ml, 10 µg/ml a 1 µg/ml.

3.2.2 Příprava interních standardů

Do lahve se šroubovacím uzávěrem bylo přidáno 50 ml acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí, poté bylo přidáno 100 µl zásobního roztoku izotopicky značeného melperonu D4 o koncentraci 10 µg/ml a 100 µl zásobního roztoku sultopridu o koncentraci 10 µg/ml. Vzniklý roztok byl promíchán. Koncentrace interních standardů byla 20 ng/ml.

3.2.3 Příprava směsných vzorků

Směsný vzorek melperonu, izotopicky značeného melperonu D4 a tiapridu o koncentraci 50 ng/ml byl připraven ze zásobních roztoků výše uvedených analytů o koncentraci 1 µg/ml, vody o LC-MS čistotě a acetonitrilu. Dále byl připraven směsný vzorek melperonu a tiapridu o koncentraci 15,625 ng/ml. Tento směsný vzorek byl připraven ze zásobního roztoku analytů o koncentraci 10 µg/ml, který byl zředěn acetonitrem na koncentraci 500 ng/ml. Smícháním zásobního roztoku o koncentraci 500 ng/ml, vody a acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí vznikl směsný vzorek o požadované koncentraci 15,625 ng/ml. Obdobně byl připraven směsný vzorek všech 4 analytů – melperon, melperon D4, tiaprid a sultoprid o koncentraci 15,625 ng/ml, kde byl acetonitril nahrazen roztokem obsahujícím interní standardy o koncentraci 20 ng/ml. Směsný vzorek melperonu a tiapridu o koncentraci 10 ng/ml pro HILIC chromatografii byl připraven ze zásobních roztoků analytů o koncentraci 1 µg/ml a byl naředěn acetonitrem.

3.2.4 Kalibrace

Byly připraveny dvě kalibrační řady o 13 kalibračních bodech, jedna řada byla připravena v séru a druhá v dialyzátu. Složení kalibračních roztoků je uvedeno v Tab. 3.

Zásobní roztoky melperonu a tiapridu použité ke kalibraci byly připraveny následujícím postupem. Smícháním 50 μl melperonu o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a 50 μl tiapridu o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ vznikl první zásobní roztok s koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$. Tento roztok byl zředěn pětkrát acetonitrilem za vzniku druhého zásobního roztoku o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, který byl následně zředěn dvakrát acetonitrilem na koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$. Ředěním dvojkovou řadou byly připraveny i zbylé zásobní roztoky ke kalibraci.

Kalibrační roztoky byly připraveny v Eppendorf zkumavkách z 35 μl séra/dialyzátu, do kterého bylo napipetováno 5 μl zásobního roztoku melperonu a tiapridu o příslušné koncentraci a přidáno 120 μl roztoku obsahujícího interní standardy o koncentraci 20 ng/ml . Kalibrační roztoky byly poté 30 sekund míchány na vortexu a poté stočeny na centrifuze při 12500 RPM po dobu 8 minut. Následně byl vzniklý supernatant odebrán do HPLC vialky. Nejprve byla proměřena kalibrační řada v séru, přičemž každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát a mezi jednotlivé koncentrace byl vložen blank, který byl připraven smícháním 40 μl séra a 120 μl roztoku obsahujícího interní standardy o koncentraci 20 ng/ml . Obdobným způsobem byla změřena kalibrační řada v dialyzátu, kde blank tvořila směs 40 μl dialyzátu a 120 μl roztoku obsahujícího interní standardy o koncentraci $c = 20 \text{ ng/ml}$.

Tab. 3: Složení kalibračních roztoků

č. roztoku	c celková (ng/ml)	c v séru/dialyzátu (ng/ml)	c zásob. r. melperonu a tiapridu (ng/ml)	V zásob. r. melperonu a tiapridu (μl)	V IS (μl)	V séra/dialyzátu (μl)	V celkový (μl)
1	0,1	0,3	2,4	5	120	35	160
2	0,2	0,6	4,9	5	120	35	160
3	0,3	1,2	9,8	5	120	35	160
4	0,6	2,4	19,5	5	120	35	160
5	1,2	4,9	39,1	5	120	35	160
6	2,4	9,8	78,1	5	120	35	160
7	4,9	19,5	156,3	5	120	35	160
8	9,8	39,1	312,5	5	120	35	160
9	19,5	78,1	625,0	5	120	35	160
10	39,1	156,3	1250,0	5	120	35	160
11	78,1	312,5	2500,0	5	120	35	160
12	156,3	625,0	5000,0	5	120	35	160
13	312,5	1250,0	10000,0	5	120	35	160

3.2.5 Vyhodnocení validačních parametrů

V rámci validace analytické metody byla testována správnost a přesnost, selektivita, matriční efekt a výtěžnost.

Pro stanovení správnosti a přesnosti byly vybrány čtyři koncentrační hladiny pro každý analyt. Pro tiaprid byly zvoleny koncentrace 2,4 ng/ml, 19,5 ng/ml, 312,5 ng/ml a 1250,0 ng/ml. U melperonu byly vybrány koncentrace 0,3 ng/ml, 2,4 ng/ml, 19,5 ng/ml a 156,0 ng/ml. Roztoky o vybraných koncentracích byly připraveny dle výše uvedené Tab. 3. Pro každou koncentrační hladinu bylo připraveno pět replikátů v séru a pět replikátů v dialyzátu. Každý vzorek byl poté promíchán na vortexu 30 sekund a následně centrifugován při 12500 RPM po dobu 8 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán do HPLC vialek s insertem. Každý replikát byl do přístroje nastříknut třikrát a jednotlivé koncentrační hladiny byly proměřeny od nejnižší po nejvyšší koncentraci. Nejprve byly proměřeny připravené roztoky v séru, poté roztoky v dialyzátu, přičemž mezi přechodem od séra k dialyzátu byl čtyřikrát změřen blank, kterým byl acetonitril.

Správnost analytické metody byla vyjádřena jako relativní chyba (RE) v procentech a byla vypočtena dle vzorce:

$$RE = \frac{c(\text{naměřená}) - c(\text{očekávaná})}{c(\text{očekávaná})} \cdot 100 \quad (1)$$

Pro zjištění přesnosti analytické metody byla nejprve vypočtena směrodatná odchylka (SD) podle matematického vzorce:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

kde x_i jsou jednotlivá měření v souboru hodnot, \bar{x} aritmetický průměr souboru hodnot a n počet jednotlivých měření v souboru hodnot.

Poté byla vyjádřena přesnost metody jako relativní směrodatná odchylka (RSD) v procentech vztahem:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3)$$

Pro stanovení vlivu matričního efektu byly vybrány dvě koncentrační hladiny melperonu a tiapridu, a to 2,4 ng/ml a 312,5 ng/ml. Pro každou koncentraci byly připraveny tři vzorky simulující čistou matici, tedy vzorky, kde není přítomen žádný matriční efekt. Tyto vzorky se skládaly ze 120 μ l acetonitrilu, 35 μ l vody a 5 μ l zásobního roztoku o dané koncentraci. Poté byly připraveny tři vzorky reálné matrice pro každou koncentrační hladinu v séru i dialyzátu. Tyto vzorky byly připraveny smícháním 120 μ l acetonitrilu a 40 μ l matrice (sérum/dialyzát) v Eppendorf zkumavkách a následně byly po dobu 8 minut stočeny na centrifuze při maximálních otáčkách 12500 RPM. Poté bylo 155 μ l supernatantu převedeno do HPLC kónické vialky, kam bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku o požadované koncentraci. Každý replikát byl nastříknut třikrát od nejnižší koncentrace, přičemž mezi jednotlivé koncentrace bylo vloženo dvakrát měření blanku, kterým byl acetonitril.

Vliv matričního efektu (ME) v procentech byl vypočten dle vzorce:

$$ME = \left(\frac{A_1}{A_2} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

kde A_1 je plocha píku reálné post-protein spikované matrice a A_2 je plocha píku čisté matrice bez séra/dialyzátu.

Dalším ze stanovovaných analytických parametrů byla výtěžnost metody. Pro stanovení výtěžnosti byly zvoleny koncentrační hladiny melperonu a tiapridu 2,4 ng/ml a 312,5 ng/ml. Ke stanovení výtěžnosti byly využity výše popsané připravené vzorky reálné matrice ke stanovení matričního efektu. Dále byly připraveny tři vzorky o daných koncentracích v séru a dialyzátu spikováním před precipitací dle Tab. 3., které byly po 30 sekundách míchání na vortexu stočeny na centrifuze po dobu 8 minut při 12500 RPM. Poté byl supernatant přesunut do HPLC vialek s insertem. Každý replikát byl nadávkován třikrát od nejnižší koncentrace analytů v reálné matrice po nejvyšší koncentraci.

Výtěžnost analytické metody (R) byla vypočtena v procentech dle vztahu:

$$R = \left(\frac{A_2}{A_1} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

kde A_1 je plocha píku analytu v post-protein spikované matrici a A_2 plocha píku analytu ve vzorku matrice spikované standardem před precipitací proteinů.

Posledním ze stanovovaných parametrů byla selektivita metody. Pro stanovení selektivity byl připraven vyprecipitovaný vzorek séra, který obsahoval 40 μ l séra a 120 μ l acetonitrilu. Dále byl připraven vzorek dialyzátu smícháním 40 μ l dialyzátu a 120 μ l acetonitrilu. Nejprve byl změřen pětkrát blank, kterým byl acetonitril, poté se třikrát změřil vzorek séra a následně byl třikrát změřen vyprecipitovaný dialyzát.

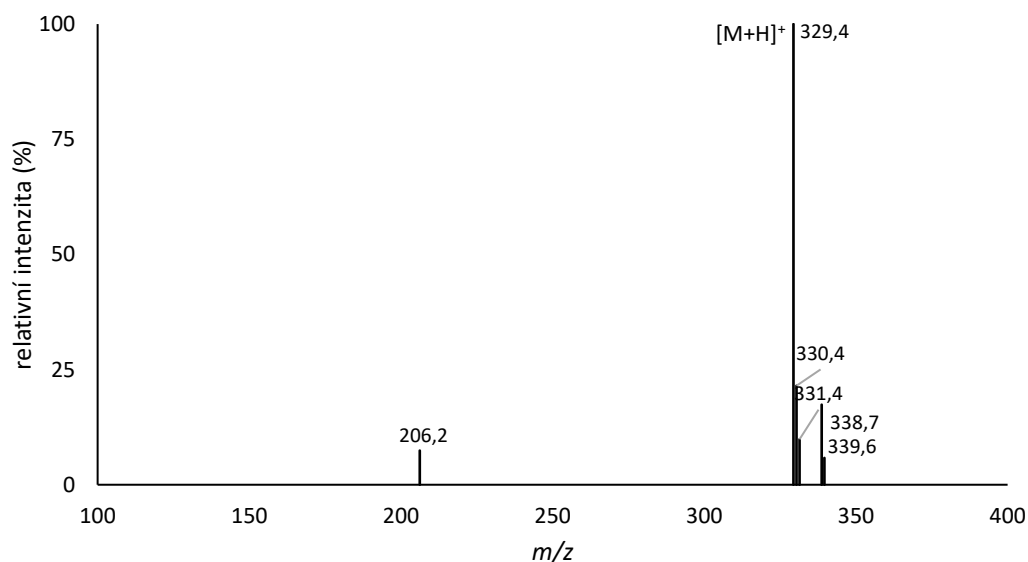
3.2.6 Měření reálných vzorků

Vzorky reálných pacientů byly připraveny smícháním 40 μ l séra/dialyzátu a 120 μ l roztoku obsahujícího interní standardy o koncentraci 20 ng/ml. Vzorky byly následně promíchány 30 sekund na vortexu a stočeny na centrifuze po dobu 8 minut při otáčkách 12500 RPM. Poté bylo 90 μ l supernatantu pipetováno do kónické HPLC vialky. Nejprve byl změřen čtyřikrát blank, kterým byl acetonitril, poté byly jednou změřeny všechny vzorky v séru, následně bylo opět vloženo čtyřikrát měření blanku a poté byly jednou proměřeny vzorky reálných pacientů v dialyzátu.

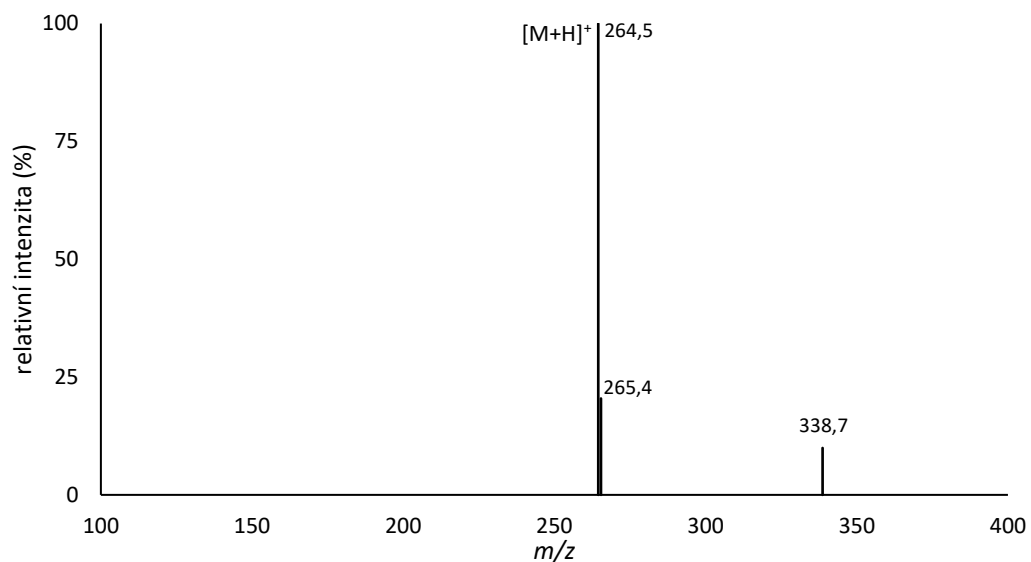
4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace hmotnostního spektrometru

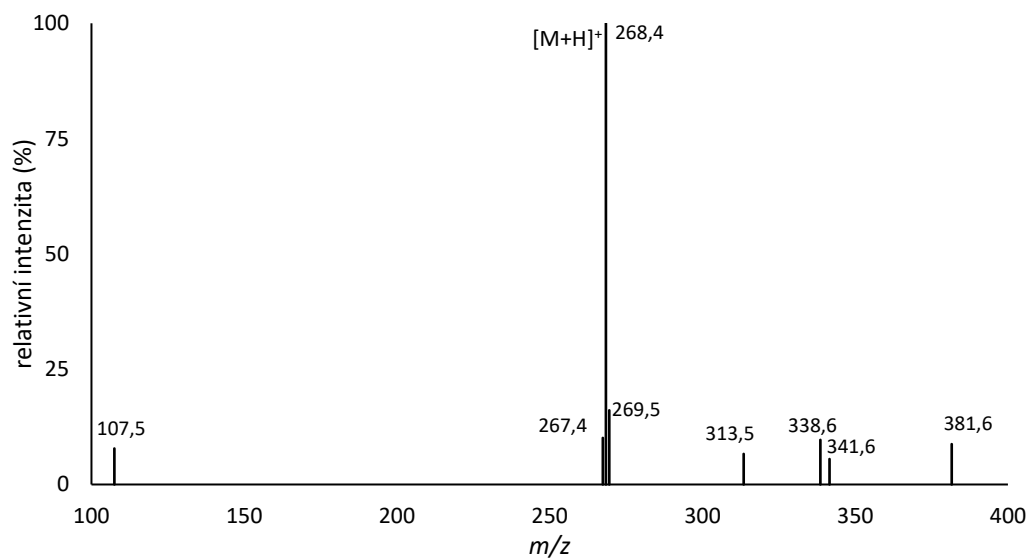
Vzhledem ke struktuře cílových analytů bylo pracováno v pozitivním módu s použitím ionizace elektrosprejem (ESI+). Cílem optimalizace hmotnostního spektrometru bylo získat vhodné MRM přechody pro všechny analyty a nastavit iontovou optiku tak, aby dané MRM přechody dosahovaly nejvyšších intenzit. Nejprve byly změřeny SCAN hmotnostní spektra tiapridu (Obr. 5), melperonu (Obr. 6), izotopicky značeného melperonu D4 (Obr. 7) a sultopridu (Obr. 8) o koncentracích 1 $\mu\text{g/ml}$ v hmotnostním rozmezí 100-400 m/z . Roztoky standardů byly do MS vpraveny pomocí UHPLC (bez kolony). Podmínky optimalizace byly následující: mobilní fáze methanol (70 %) a 0,1% kyselina mravenčí (30 %), průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, doba analýzy 2 minuty a objem nástřiku 0,2 μl (0,1 μl pro sultoprid). Z hmotnostních spekter je patrné, že všechny analyty se primárně nabíjejí jako adukty s vodíkem ve formě $[\text{M}+\text{H}]^+$. Tyto adukty dosahovaly nejvyšších intenzit, a proto byly vybrány jako prekurzorové ionty pro další optimalizaci.



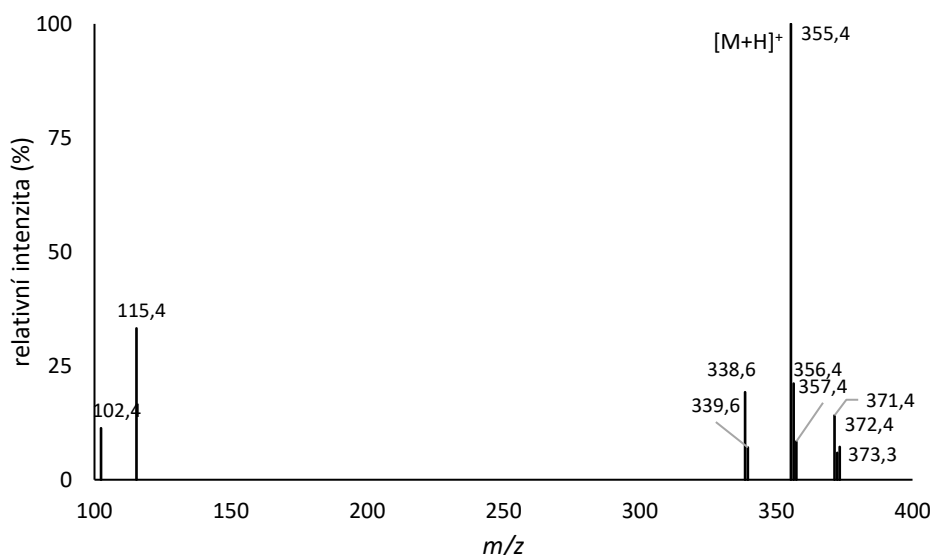
Obr. 5: Hmotnostní spektrum tiapridu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ měřené v pozitivním módu v rozmezí 100-400 m/z .



Obr. 6: Hmotnostní spektrum melperonu o koncentraci 1 µg/ml měřené v pozitivním módu v rozmezí 100-400 m/z.

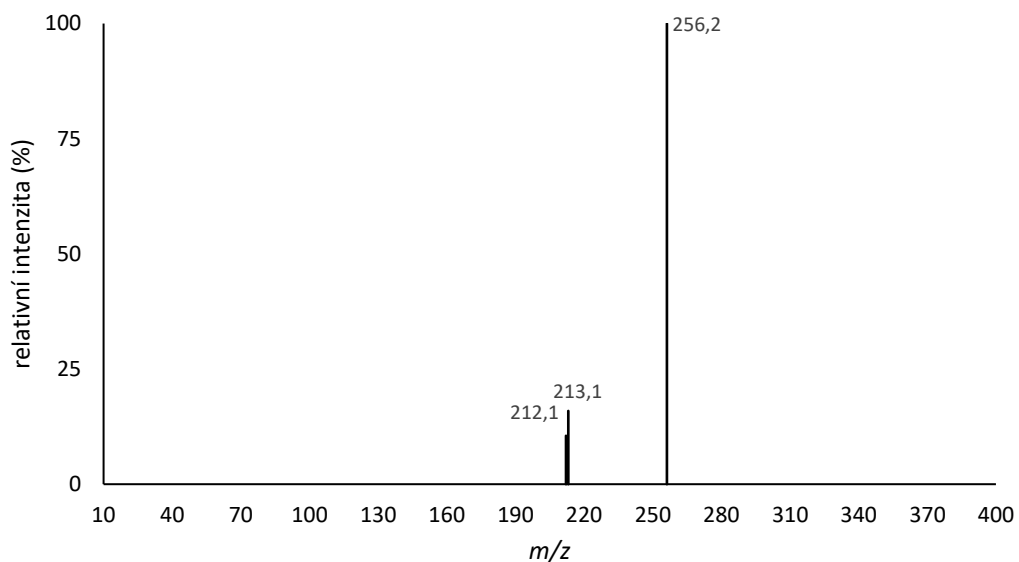


Obr. 7: Hmotnostní spektrum izotopicky značeného melperonu D4 o koncentraci 1 µg/ml měřené v pozitivním módu v rozmezí 100-400 m/z.

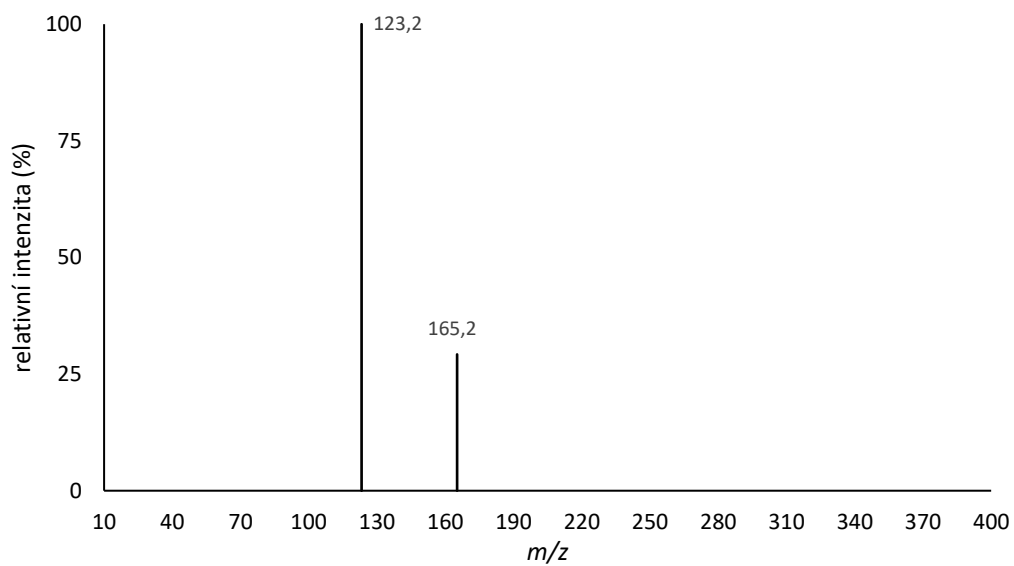


Obr. 8: Hmotnostní spektrum sultopridu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ měřené v pozitivním módu v rozmezí 100-400 m/z .

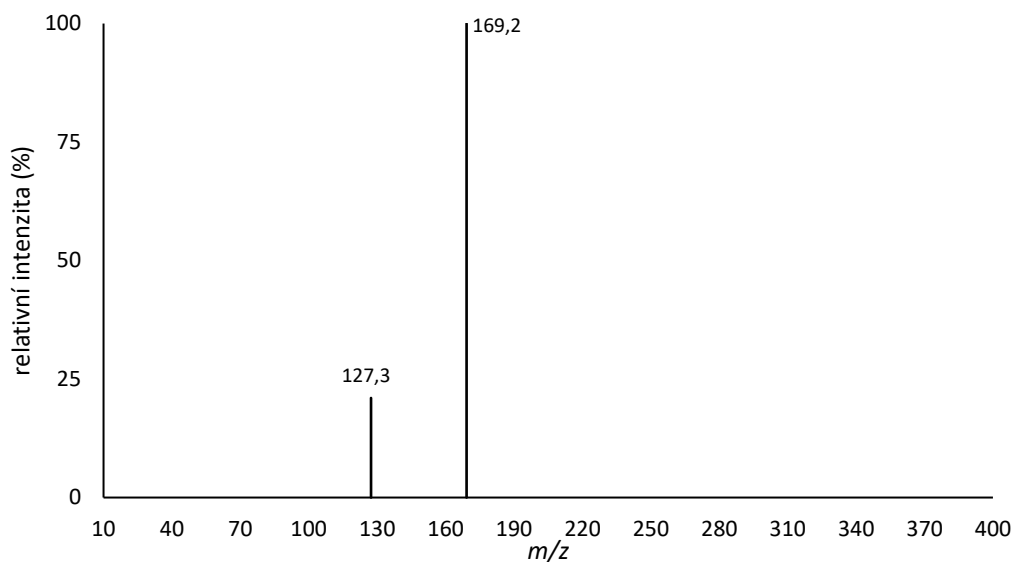
V dalším kroku optimalizace hmotnostního spektrometru byly hledány vhodné produktové ionty. Vybrané prekurzorové ionty, které odpovídaly $[M+H]^+$ iontům jednotlivých analytů, byly štěpeny v kolizní cele při hodnotách kolizní energie v rozsahu -40 V až -10 V s krokem po 5 V. Jednotlivá fragmentační hmotnostní spektra získaná při různých kolizních energiích byla porovnávána mezi sebou. Jako vhodná kolizní energie byla vybrána taková energie, při které vznikají nejintenzivnější fragmenty. Na Obr. 9 je vyneseno hmotnostní spektrum tiapridu vzniklé fragmentací m/z 329,4 při hodnotě kolizní energie -25 V. Obr. 10 zobrazuje hmotnostní spektrum produktových iontů melperonu, které vzniklo štěpením prekurzorového iontu s m/z 264,1 za použití kolizní energie -30 V. Fragmentační spektrum prekurzorového iontu izotopicky značeného melperonu D4 o m/z 268,3 při kolizní energii -20 V je znázorněno na Obr. 11. Hmotnostní spektrum sultopridu vzniklé štěpením 355,4 m/z při kolizní energii -30 V zobrazuje Obr. 12.



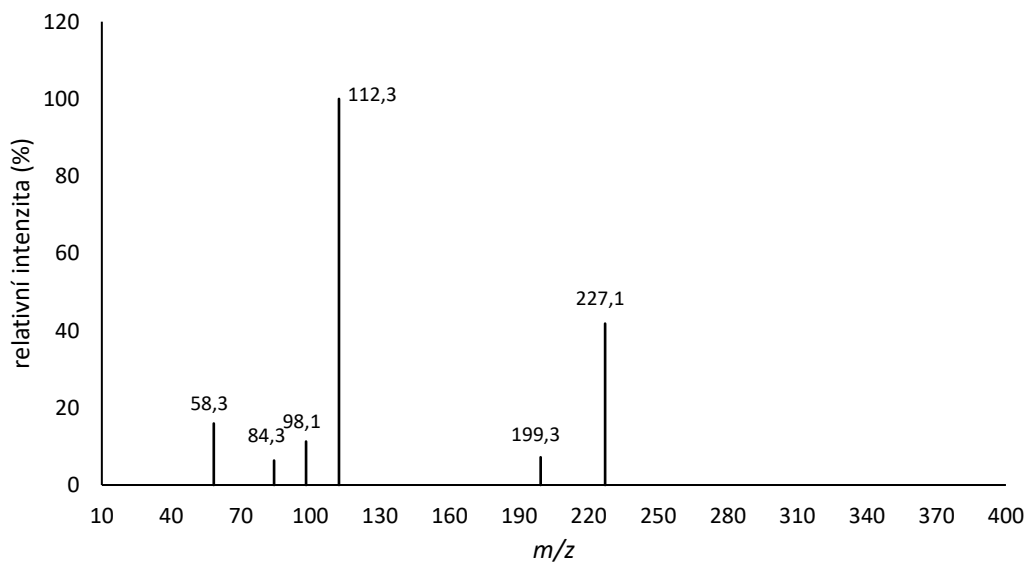
Obr. 9: Hmotnostní spektrum produktových iontů tiapridu při zadání prekurzorového iontu o 329,4 m/z při hodnotě kolizní energie -25 V měřené v pozitivním módu v rozmezí 10-400 m/z.



Obr. 10: Hmotnostní spektrum produktových iontů melperonu při zadání prekurzorového iontu o 264,1 m/z při hodnotě kolizní energie -30 V měřené v pozitivním módu v rozmezí 10-400 m/z.



Obr. 11: Hmotnostní spektrum produktových iontů izotopicky značeného melperonu D4 při zadání prekurzorového iontu o 268,3 m/z při hodnotě kolizní energie -20 V měřené v pozitivním módu v rozmezí 10-400 m/z.



Obr. 12: Hmotnostní spektrum produktových iontů sultopridu při zadání prekurzorového iontu o 355,4 m/z při hodnotě kolizní energie -30 V měřené v pozitivním módu v rozmezí 10-400 m/z.

Po výběru dvou vhodných produktových iontů a jejich vhodné kolizní energie pro každý analyt bylo optimalizováno nastavení iontové optiky tak, aby dané přechody poskytovaly nejvyšší odezvu (nejvyšší výtěžnost produktových iontů dopadajících na detektor). Jednotlivé MRM přechody pro každý analyt s optimálními hodnotami iontové optiky jsou uvedeny v Tab. 4. U každého analytu je první MRM přechod kvantifikační, a druhý je konfirmační.

Tab. 4: Optimální hodnoty napětí iontové optiky pro hlavní přechody tiapridu, melperonu, izotopicky značeného melperonu D4 a sultopridu

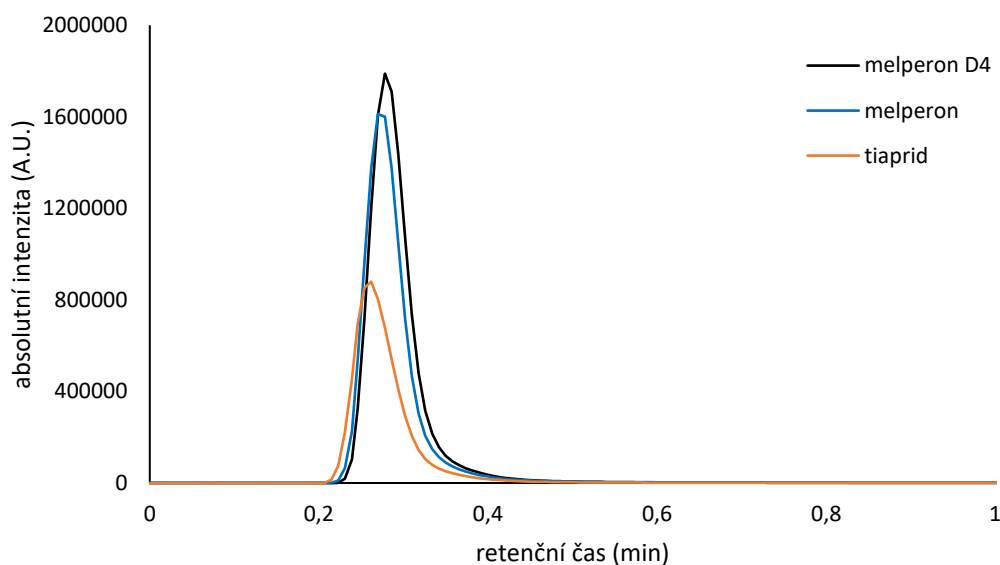
analyt	prekurzor m/z	produkt m/z	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
tiaprid	329,4	256,2	-10,0	-20,0	-27,0
	329,4	213,1	-10,0	-37,0	-23,0
melperon	264,1	165,1	-30,0	-20,0	-17,0
	264,1	95,1	-30,0	-53,0	-16,0
melperon D4	268,3	169,2	-14,0	-21,0	-18,0
	268,3	99,1	-30,0	-53,0	-17,0
sultoprid	355,4	112,2	-18,0	-28,0	-21,0
	355,4	134,2	-10,0	-51,0	-23,0

4.2 Optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie

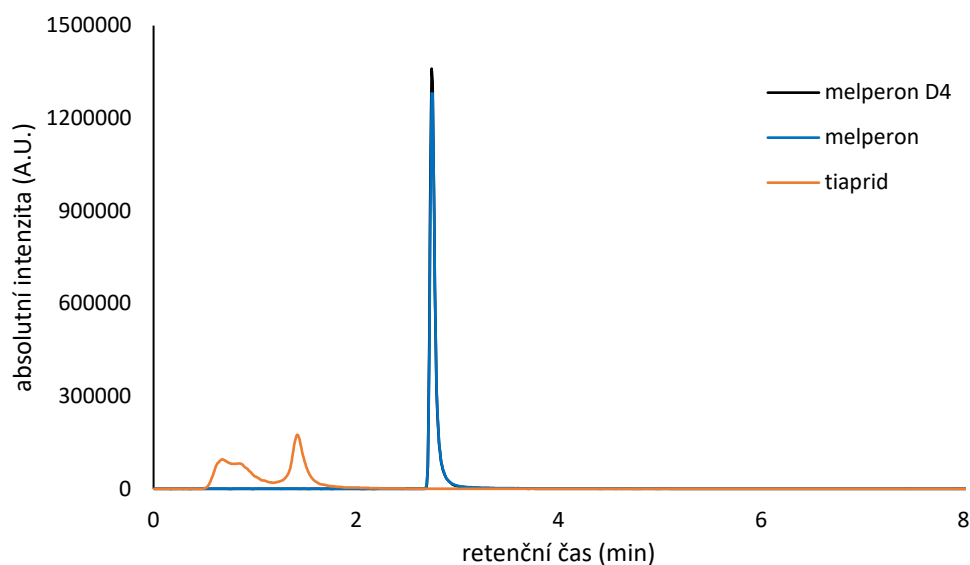
V rámci optimalizace HPLC byly využity nejintenzivnější MRM přechody jednotlivých analytů, které jsou uvedeny výše v Tab. 4. Iontový zdroj byl nastaven tak, aby docházelo k odpaření mobilní fáze. Jednotlivé parametry iontového zdroje byly následující: průtok sušícího plynu 10 l/min, průtok nebulizačního plynu 3 l/min, teplota zdroje 300 °C a teplota desolvatační kapiláry 250 °C. Při optimalizaci HPLC byly testovány 4 chromatografické kolony. Tři kolony pracovaly v režimu chromatografie s reverzními fázemi a jedna v režimu hydrofilní interakční kapalinové chromatografie.

První testovanou kolonou byla chromatografická kolona InfinityLab Poroshell HPH-C8 50 × 2,1 mm, 1,7 μm od společnosti Agilent Technologies. Jde o kolonu na bázi hybridních sorbentů, což zajišťuje vysokou stabilitu i při vysokém pH a dle výrobce je

vhodná i k analýze polárních látek. Mobilní fáze se skládala z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu (složka B). Podmínky separace byly následující: nástřik 1 μ l, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, doba analýzy 9 minut, teplota kolony 40 °C a teplota na dávkovači 15 °C. Na kolonu byl nastříknut směsný vzorek tiapridu, melperonu a izotopicky značeného melperonu D4 o koncentraci 50 ng/ml. Separace probíhala za podmínek gradientové eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-6,5-9,0 min, A: 40-40-5-5-40-40 % v/v). Průběh analýzy za těchto podmínek je uveden na Obr. 13. Je zřejmé, že melperon i tiaprid nejsou na koloně zadržováni a eluují s mrtvým časem kolony. Zvýšení obsahu vodné složky v mobilní fázi na 80 obj. % způsobilo zadržení melperonu, který měl retenci kolem 1,5 min, ale polárnější tiaprid stále eluoval s mrtvým časem kolony. Chromatogram získaný dalším navýšením vodné složky v mobilní fázi na 95 obj. % můžeme vidět na Obr. 14. Retence melperonu se zvýšila na 2,8 min, ale zároveň došlo k významnému rozmytí píku tiapridu, jelikož vysoké procento vodné složky mobilní fáze v gradientu nebylo kompatibilní s rozpouštědlem vzorku, ve kterém převažovala organická složka – acetonitril. Tato kolona byla vyhodnocena jako nevhodná pro analýzu melperonu a tiapridu.

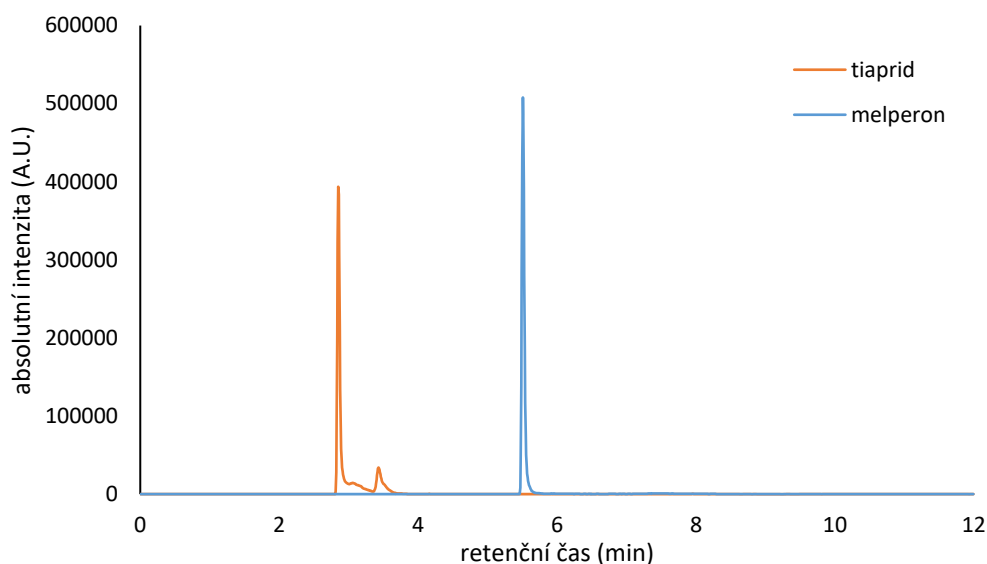


Obr. 13: Chromatogram směsného vzorku tiapridu, melperonu a melperonu D4 o koncentraci 50 ng/ml, kolona InfinityLab Poroshell HPH-C8 50 × 2,1 mm, 1,7 μ m (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a MeOH (B), průtok 0,5 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-6,5-9,0 min, A: 40-40-5-5-40-40 % v/v).



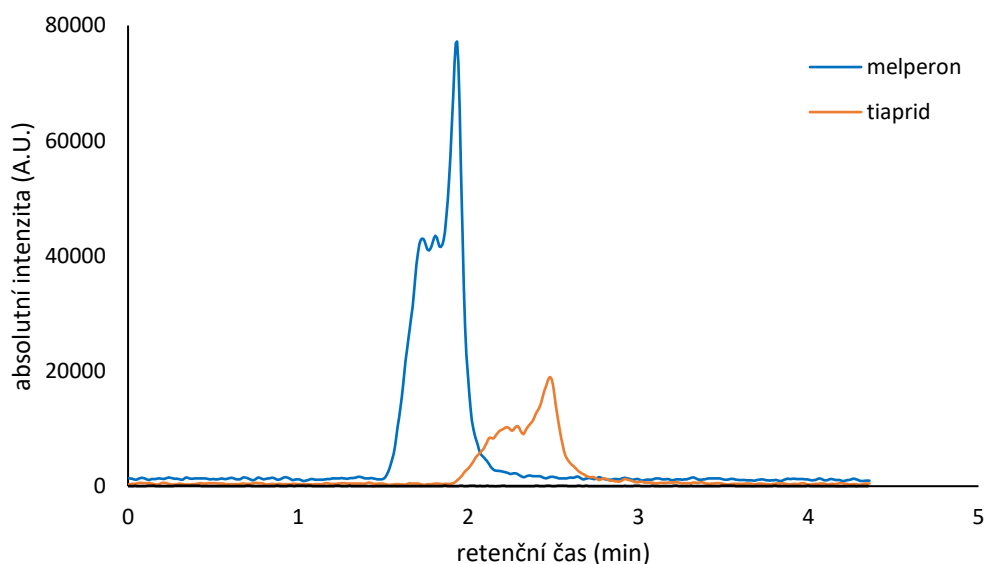
Obr. 14: Chromatogram směsného vzorku tiapridu, melperonu a melperonu D4 o koncentraci 50 ng/ml, kolona InfinityLab Poroshell HPH-C8 50 × 2,1 mm, 1,7 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a MeOH (B), průtok 0,5 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-6,5-9,0 min, A: 95-95-5-5-95-95 % v/v).

Další testovanou kolonou byla HPLC kolona Accucore Phenyl-X 150 × 4,6 mm, 2,6 μm od firmy Thermo Fisher Scientific. Jedná se o kolonu o širším průměru a větší velikosti částic oproti předchozí. Předpokládali jsme, že tato fenylová kolona by mohla interagovat s benzenovou strukturou tiapridu pomocí π - π interakce a mohla by tedy zvýšit retenci tiapridu. Byla testována řada gradientových programů, kdy jako vodná složka mobilní fáze byla použita 0,1% kyselina mravenčí (složka A) a jako organická složka methanol, nebo acetonitril (složka B). Retence a tvar píku melperonu byl dostačující, ale tvar píku tiapridu byl nevyhovující za všech testovaných podmínek. Jako příklad je uvedena analýza směsi tiapridu a melperonu o koncentraci 15,625 ng/ml (Obr. 15) za následujících podmínek: nástřik 1 μl, průtok mobilní fáze 0,6 ml/min, teplota kolony 40 °C a gradientová eluce (čas: 0,0-2,0-5,0-6,0-6,5-12,0 min, A: 90-90-5-5-90-90 % v/v).



Obr. 15: Chromatogram vzorku tiapridu a melperonu o koncentraci 15,625 ng/ml, kolona Accucore Phenyl-X 150 × 4,6 mm, 2,6 μm (Thermo Fisher Scientific), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN (B), průtok 0,6 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-2,0-5,0-6,0-6,5-12,0 min, A: 90-90-5-5-90-90 % v/v).

Vzhledem k polaritě tiapridu a předchozímu chování v RP-HPLC byla také vyzkoušena HILIC chromatografie, pro kterou byla použita kolona Acquite UPLC BEH Amide 100 × 2,1 mm, 1,7 μm od firmy Waters. Separace byla provedena za podmínek izokratické eluce, kdy mobilní fázi tvořila z 5 % složka A (0,1% kyselina mravenčí) a z 95 % složka B (acetonitril). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min, nástřik 0,1 μl vzorku melperonu a tiapridu o koncentraci 10 ng/ml, teplota na koloně 30 °C a teplota na dávkovači 15 °C. Na Obr. 16 je znázorněn průběh separace melperonu a tiapridu HILIC chromatografií. Retenční pořadí je opačné než u RP-HPLC, tedy polárnější tiaprid eluuje až za melperonem. Zároveň oba analyty mají široké, nesymetrické a rozdvojené píky. Tato kolona nebyla také vhodná k analýzám tiapridu a melperonu.

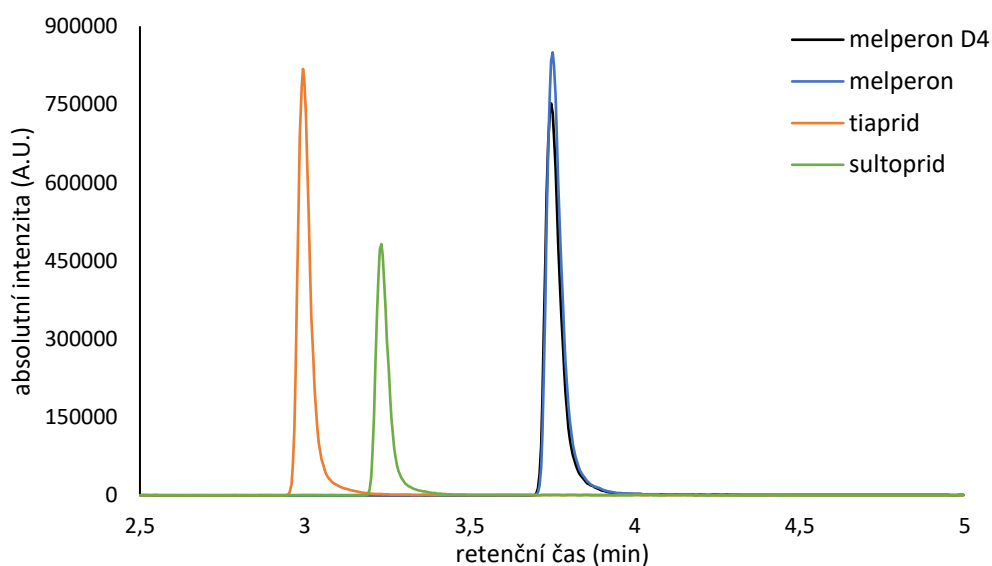


Obr. 16: Chromatogram vzorku tiapridu a melperonu o koncentraci 10 ng/ml, kolona Acquite UPLC BEH Amide 100 × 2,1 mm, 1,7 μm (Waters), MF:0,1% HCOOH (A) a ACN (B) (5/95 (v/v)), průtok 0,4 ml/min, teplota kolony 30 °C, izokratická eluce.

Poslední z testovaných kolon byla UHPLC kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm od společnosti Agilent Technologies. Byla vyzkoušena řada gradientových programů a složení mobilní fáze. Optimální mobilní fáze obsahovala 0,1% kyselinu mravenčí (A) a acetonitril okyselený 0,1% kyselinou mravenčí (B). Podmínky finální metody byly následující: průtok mobilní fáze 0,45 ml/min, nástřik 1 μl, doba analýzy 10 minut, teplota kolony 40 °C a teplota na dávkovači 15 °C. Separace probíhala za podmínek gradientové eluce, jejíž gradientový program je uveden v Tab. 5. Aby bylo co nejvíce zamezeno kontaminaci iontového zdroje ostatními látkami ve vzorku, tak byl eluát vpouštěn do hmotnostního spektrometru jen mezi 2,5 až 5 minutami. Na Obr. 17 je znázorněn chromatogram směsného vzorku všech analytů – tiaprid, melperon, izotopicky značený melperon D4 a sultoprid o koncentraci 15,625 ng/ml. Z chromatogramu je patrné, že všechny analyty mají dostatečnou retenci, i když dochází k nepatrnému rozmývání analytů v zadní části píků.

Tab. 5: Gradientový program

t (min)	0,1% HCOOH (obj.%)	ACN s 0,1% HCOOH (obj.%)
0,0	90,0	10,0
1,0	90,0	10,0
5,0	10,0	90,0
6,0	10,0	90,0
7,0	90,0	10,0
10,0	90,0	10,0



Obr. 17: Chromatogram směsného vzorku tiapridu, melperonu, melperonu D4 a sultopridu o koncentraci 15,625 ng/ml, kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN s 0,1% HCOOH (B), průtok 0,45 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v).

Výše zmíněná chromatografická kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies) byla použita i pro měření kalibračních závislostí a stanovení analytických validačních parametrů za výše uvedených podmínek.

4.3 Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti byly sestrojeny pomocí vážené lineární regrese podle váhového faktoru $1/x^2$. Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka závislosti ploch pík melperonu a izotopicky značeného melperonu D4 na koncentraci melperonu při MRM přechodu $264,1 \rightarrow 165,1$ m/z v séru a poté v dialyzátu. Hodnoty směrnice, úseku a chyb jednotlivých kalibračních bodů melperonu v séru a v dialyzátu jsou uvedeny v Tab. 6. Z Tab. 6 je patrné, že chyby jednotlivých bodů kalibrace melperonu byly výrazně vyšší v dialyzátu, což mohlo být pravděpodobně způsobeno systematickou chybou při pipetování. Následně byla sestrojena kalibrační závislost ploch pík tiapridu a sultopridu na koncentraci tiapridu při MRM přechodu $329,4 \rightarrow 256,2$ m/z v séru a v dialyzátu. V Tab. 7 jsou uvedeny hodnoty směrnice, úseku a chyb kalibračních bodů tiapridu v séru a dialyzátu. Chyba jednotlivých kalibračních bodů jak v séru, tak v dialyzátu je přijatelná v rámci biologické variability jednotlivých pacientů.

Z těchto kalibrací byly následně vypočteny hodnoty přesnosti a správnosti metody a také koncentrace melperonu a tiapridu v reálných vzorcích pacientů ve spolupráci s Všeobecnou fakultní nemocnicí v Praze.

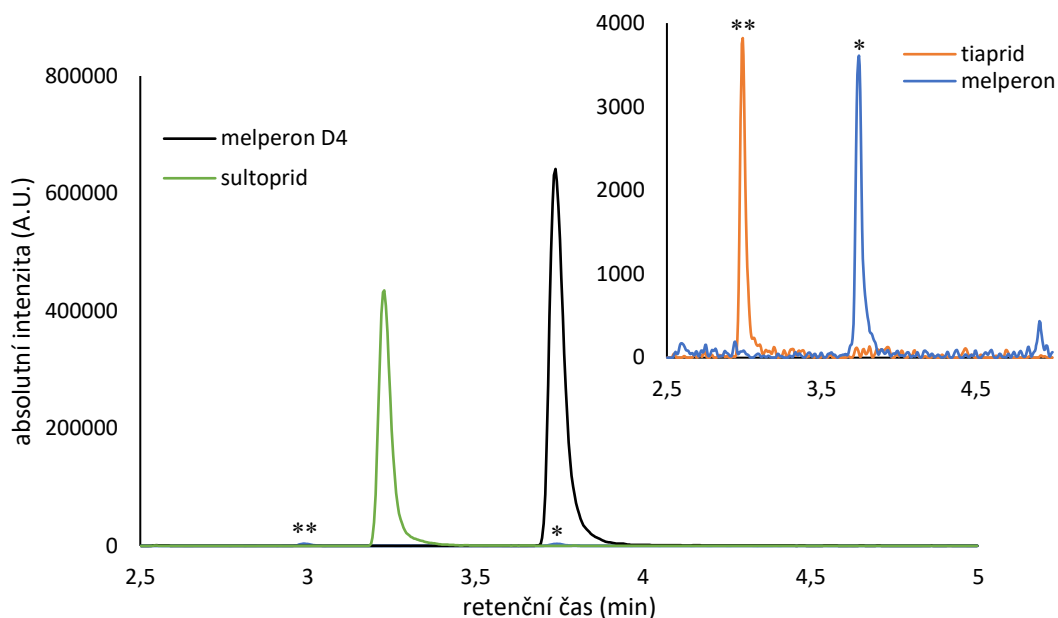
Tab. 6: Hodnoty směrnice, úseku a chyb jednotlivých kalibračních bodů melperonu v séru a dialyzátu

sérum		dialyzát	
koncentrace melperonu (ng/ml)	chyba kalibračních bodů (%)	koncentrace melperonu (ng/ml)	chyba kalibračních bodů (%)
0,3	4,5	0,3	13,1
0,6	-5,7	0,6	-26,2
1,2	-11,0	1,2	-38,5
2,4	-1,4	2,4	-21,2
4,8	-5,6	4,8	-20,4
9,8	-0,0	9,8	-16,9
19,5	5,0	19,5	-14,2
39,1	-8,8	39,1	-15,2
78,1	0,4	78,1	-21,7
156,3	2,7	156,3	-14,7
312,5	3,8	312,5	-17,7
625,0	4,3	625,0	-35,3
1250,0	7,8	1250,0	-1,0
směrnice	0,0174	směrnice	0,0209
úsek	0,0000	úsek	0,0047

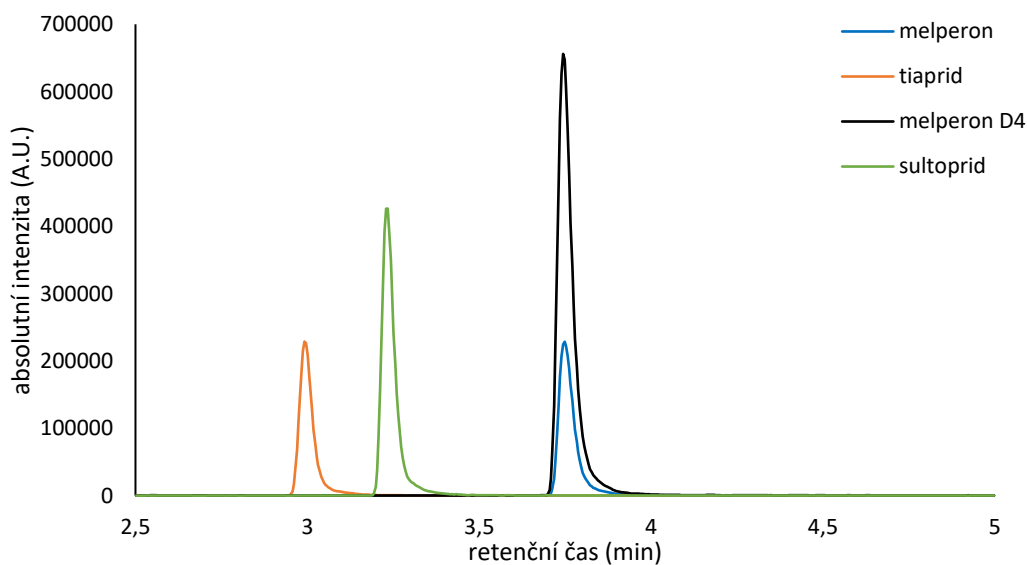
Tab. 7: Hodnoty směrnice, úseku a chyb jednotlivých kalibračních bodů tiapridu v séru a dialyzátu

sérum		dialyzát	
koncentrace tiapridu (ng/ml)	chyba kalibračních bodů (%)	koncentrace tiapridu (ng/ml)	chyba kalibračních bodů (%)
0,3	4,6	0,3	1,1
0,6	-13,0	0,6	0,6
1,2	-0,0	1,2	-12,1
2,4	1,9	2,4	0,8
4,8	-0,0	4,8	5,3
9,8	4,2	9,8	7,0
19,5	9,8	19,5	7,1
39,1	-2,6	39,1	5,8
78,1	4,4	78,1	0,5
156,3	3,8	156,3	4,8
312,5	1,4	312,5	-1,2
625,0	-4,4	625,0	-22,6
1250,0	-15,4	1250,0	-4,8
směrnice	0,0256	směrnice	0,0236
úsek	0,0017	úsek	0,0033

Na Obr. 18 je pro ilustraci zobrazen chromatogram vzorku tiapridu a melperonu o koncentraci 0,3 ng/ml v séru, což je nejnižší koncentrace v rozmezí kalibrace. Pro srovnání je na Obr. 19 uveden chromatogram vzorku melperonu a tiapridu o koncentraci 19,5 ng/ml v séru. Chromatogramy vzorků v dialyzátu vypadaly obdobně.



Obr.18: Chromatogram směsného vzorku tiapridu, melperonu, melperonu D4 a sultopridu o koncentraci 0,3 ng/ml v séru s detailem na melperon a tiaprid, kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN s 0,1% HCOOH (B), průtok 0,45 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v), * značí pík melperonu, ** značí pík tiapridu.



Obr.19: Chromatogram směsného vzorku tiapridu, melperonu, melperonu D4 a sultopridu o koncentraci 19,5 ng/ml v séru, kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN s 0,1% HCOOH (B), průtok 0,45 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v).

4.4 Validace

4.4.1 Správnost a přesnost

Správnost a přesnost analytické metody byla stanovena na čtyřech koncentračních hladinách pro každý analyt, přičemž každá koncentrační hladina byla připravena pětkrát v séru a pětkrát v dialyzátu, každý připravený vzorek byl nastříknut na kolonu třikrát. Výsledky správnosti a přesnosti stanovení melperonu jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Výsledky správnosti a přesnosti metody pro stanovení melperonu

	c (očekávaná) (ng/ml)	c (naměřená) ± SD (ng/ml)	RE (%)	RSD (%)
sérum	0,30	0,30 ± 0,01	11,4	2,6
	2,4	2,6 ± 0,1	8,5	2,4
	19,5	21,5 ± 0,3	10,1	1,4
	156,3	172,2 ± 1,6	10,2	0,9
dialyzát	0,30	0,30 ± 0,03	-15,8	11,7
	2,4	2,0 ± 0,1	-19,5	4,7
	19,5	17,4 ± 0,2	-11,0	1,3
	156,3	137,4 ± 1,6	-12,1	0,8

SD – směrodatná odchylka, RE – relativní chyba, RSD – relativní směrodatná odchylka

Správnost metody pro stanovení melperonu byla vyjádřena prostřednictvím relativní chyby. V séru dosahovala hodnot v rozsahu 8,5 až 11,4 %, v dialyzátu byla v rozmezí -19,5 až -11,0 %. Přesnost metody ke stanovení melperonu byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka, rozsah RSD v séru byl 0,9 až 2,6 %, v dialyzátu byl 0,8 až 11,7 %. Hodnoty správnosti a přesnosti splňují podmínky bioanalytické aplikace. V Tab. 9 jsou zobrazeny výsledky správnosti a přesnosti stanovení tiapridu.

Tab. 9: Výsledky správnosti a přesnosti metody pro stanovení tiapridu

	c (očekávaná) (ng/ml)	c (naměřená) ± SD (ng/ml)	RE (%)	RSD (%)
sérum	2,4	2,6 ± 0,1	6,5	2,7
	19,5*	–	–	–
	312,5	350,9 ± 4,0	12,3	1,2
	1250,0	1282,3 ± 17,9	2,6	1,4
dialyzát	2,4	2,7 ± 0,1	12,0	3,4
	19,5	23,1 ± 0,3	18,5	1,2
	312,5	367,4 ± 3,1	17,6	0,9
	1250,0	1439,3 ± 22,2	15,1	1,5

*SD – směrodatná odchylka, RE – relativní chyba, RSD – relativní směrodatná odchylka (*pro koncentraci tiapridu 19,5 ng/ml v séru nebyla stanovena správnost a přesnost z důvodu chyby při přípravě zásobního roztoku)*

Správnost a přesnost metody pro stanovení tiapridu v séru se podařilo stanovit pouze na třech koncentračních hladinách, u koncentrace 19,5 ng/ml došlo pravděpodobně k chybě při přípravě zásobního roztoku. RE byla v rozmezí 2,6 až 12,3 %, RSD byla v rozmezí 1,2 až 2,7 %. Správnost metody pro stanovení tiapridu v dialyzátu byla v rozsahu 12,0 až 18,5 %. Přesnost stanovení tiapridu ve tvaru RSD dosahovala hodnot od 0,9 do 3,4 %. Tyto hodnoty opět vyhovují kritériím bioanalytických aplikací.

4.4.2 Matriční efekt

Vliv matričního efektu (ME) byl stanoven na dvou koncentračních hladinách tiapridu a melperonu. Každá koncentrační hladina byla připravena třikrát v séru a třikrát v dialyzátu, každý připravený vzorek byl nastříknut do chromatografického systému třikrát. Matriční efekt byl vypočten z průměru hodnot získaných ze tří měření. Vliv matrice na stanovení tiapridu a melperonu je uveden v Tab. 10. Z vypočtených hodnot je patrné, že stanovení melperonu a tiapridu bylo ovlivněno maticí minimálně.

Tab. 10: Vliv matrice na stanovení melperonu a tiapridu

	ME – sérum (%)		ME – dialyzát (%)	
	melperon	tiaprid	melperon	tiaprid
c = 2,4 ng/ml	108,6	108,1	105,6	92,1
c = 312,5 ng/ml	94,1	95,7	102,7	98,8

4.4.3 Výtěžnost

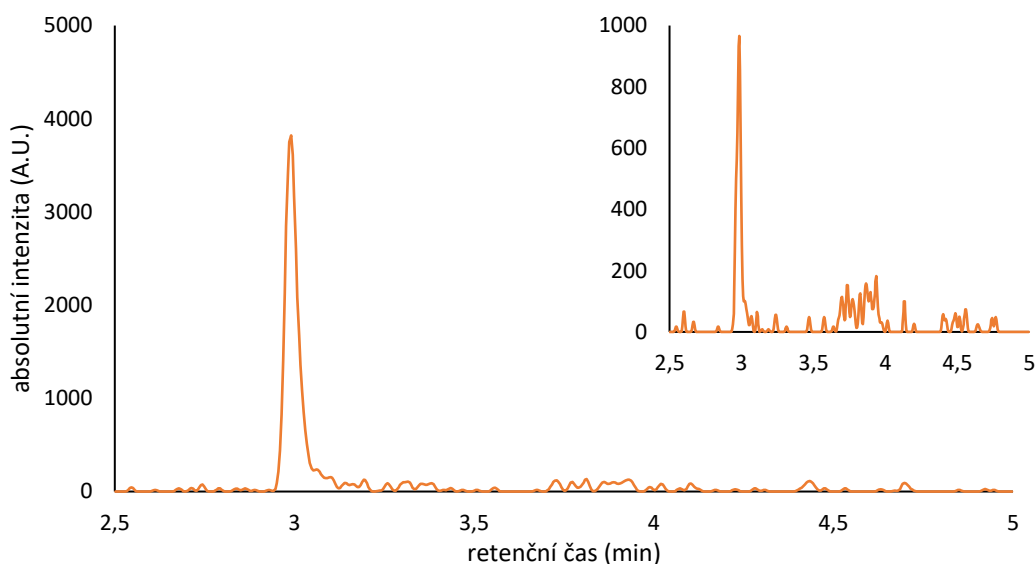
Obdobně jako vliv matričního efektu byla stanovena výtěžnost metody na dvou koncentračních hladinách. Každá koncentrační hladina byla připravena třikrát v séru a třikrát v dialyzátu, přičemž každý připravený vzorek byl na kolonu nastříknut třikrát. Výtěžnost byla vypočtena z průměrných hodnot získaných ze tří měření každého replikátu. Vypočtené hodnoty výtěžnosti melperonu a tiapridu jsou uvedeny v procentech v Tab. 11. Ze zjištěných hodnot je zřejmé, že tato metoda dosahuje velmi dobré výtěžnosti.

Tab. 11: Hodnoty výtěžnosti melperonu a tiapridu

	výtěžnost v séru (%)		výtěžnost v dialyzátu (%)	
	melperon	tiaprid	melperon	tiaprid
c = 2,4 ng/ml	92,8	90,5	94,9	95,8
c = 312,5 ng/ml	105,0	103,8	91,9	92,7

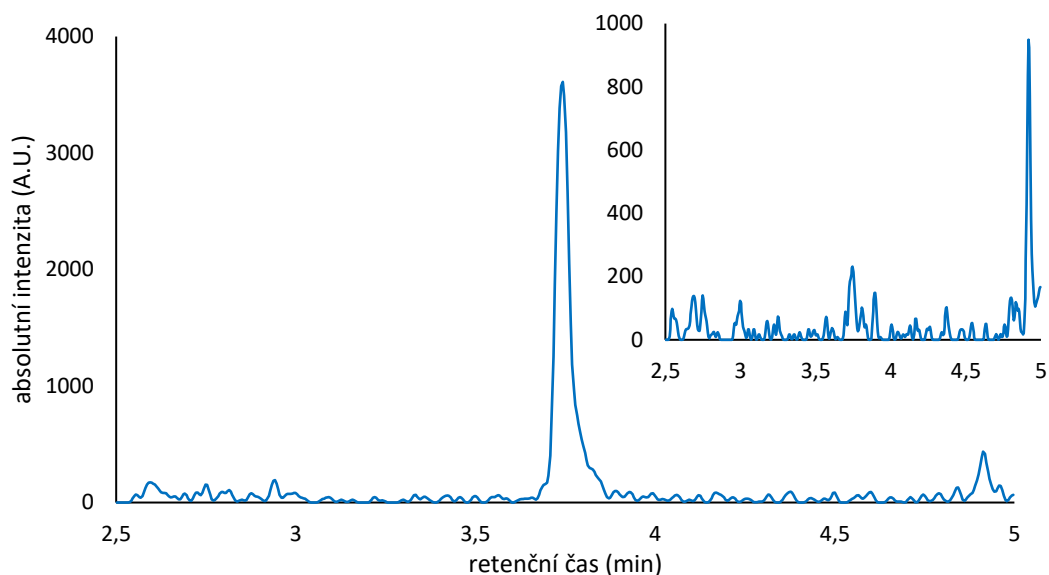
4.4.4 Selektivita

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost stanovit určitý analyt v komplexní směsi s určitou přesností a správností, aniž by byla ovlivněna přítomností interferujících látek [51]. Selektivita metody byla tudíž prokázána při měření správnosti a přesnosti. Dále byly pro ověření selektivity metody porovnávány MRM chromatogramy matric blanku s chromatogramy získanými proměřením nejnižší koncentrační hladiny kalibrační řady, kterou byla koncentrace tiapridu a melperonu 0,3 ng/ml. Z níže zobrazených chromatogramů je patrné, že tuto LC-MS/MS metodu lze považovat za selektivní, jelikož matrice blanku neobsahují interferující látky, které by eluovaly v retenčním čase stanovovaných analytů. Na Obr. 20 je zobrazen MRM chromatogram tiapridu o koncentraci 0,3 ng/ml v séru, který eluuje v retenčním čase 2,99 minuty s detailem na pík tiapridu v matrici blanku. Z grafu je patrné, že intenzita píku tiapridu je v blanku více než čtyřikrát nižší v porovnání s intenzitou píku tiapridu o koncentraci 0,3 ng/ml v séru, a proto nedochází k interferencím. V tomto případě se spíše jedná o malý přenos analytu z předchozích analýz.



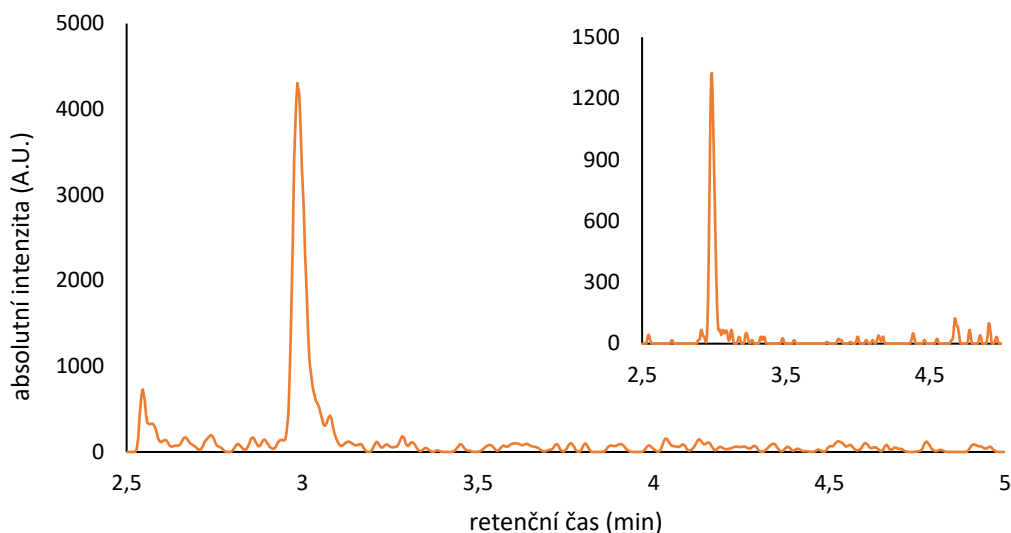
Obr. 20: MRM chromatogram tiapridu o koncentraci 0,3 ng/ml v séru s detailem na chromatogram matrice blanku, kolona kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN s 0,1% HCOOH (B), průtok 0,45 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v).

Na Obr. 21 je znázorněn MRM chromatogram melperonu o koncentraci 0,3 ng/ml v séru s retenčním časem 3,73 minuty s detailem na pík melperonu v blanku matrice. Opět můžeme pozorovat, že intenzity píku melperonu v blanku matrice jsou výrazně nižší a stanovení není ovlivněno interferencemi.



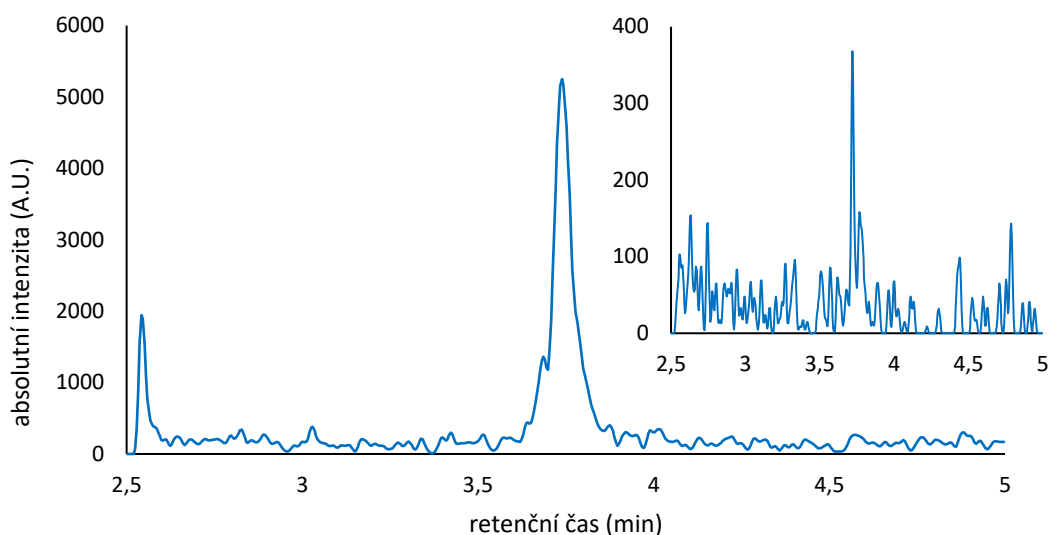
Obr. 21: MRM chromatogram melperonu o koncentraci 0,3 ng/ml v séru s detailem na chromatogram matrice blanku, kolona kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN s 0,1% HCOOH (B), průtok 0,45 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v).

Selektivita metody pro stanovení tiapridu a melperonu byla zjišťována také v dialyzátu. Na Obr. 22 je zobrazen MRM chromatogram tiapridu o koncentraci 0,3 ng/ml v dialyzátu s přiblížením na chromatogram blanku matrice.



Obr. 22: MRM chromatogram tiapridu o koncentraci 0,3 ng/ml v dialyzátu s detailem na chromatogram matrice blanku, kolona kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN s 0,1% HCOOH (B), průtok 0,45 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v).

Podobně jako v případě vzorků obsahujících sérum, tak i u dialyzátu je absolutní intenzita píku tiapridu v blanku matrice několikanásobně nižší a nedochází k interferencím. Pro porovnání vlivu interferencí je zde uveden poslední MRM chromatogram melperonu o koncentraci 0,3 ng/ml v dialyzátu s detailem na chromatogram blanku matrice (Obr. 23). Ani v tomto případě nejsou pozorovány interferující látky se stanovovanými analyty, a proto lze považovat metodu za selektivní při stanovení melperonu a tiapridu v séru i v dialyzátu.



Obr. 23: MRM chromatogram melperonu o koncentraci 0,3 ng/ml v dialyzátu s detailem na chromatogram matrice blanku, kolona kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm (Agilent Technologies), MF: 0,1% HCOOH (A) a ACN s 0,1% HCOOH (B), průtok 0,45 ml/min, teplota kolony 40 °C, gradientová eluce (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v).

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí vhodnou pro současné stanovení melperonu a tiapridu v lidském krevním séru a dialyzátu.

Prvním krokem byla optimalizace hmotnostního spektrometru pro měření v MRM módu. MRM přechody o nejvyšší intenzitě byly následující: melperon: 264,1 → 165,1 ($Q_1 = -30,0$ V, $CE = -20,0$ V, $Q_3 = -17,0$ V), melperon D4: 268,3 → 169,2 ($Q_1 = -14,0$ V, $CE = -21,0$ V, $Q_3 = -18,0$ V), tiaprid: 329,4 → 256,2 ($Q_1 = -10,0$ V, $CE = -22,0$ V, $Q_3 = -27,0$ V) a sultoprid: 355,4 → 112,2 ($Q_1 = -18,0$ V, $CE = -28,0$ V, $Q_3 = -21,0$ V).

Dále byla optimalizována vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Celkem byly testovány 4 chromatografické kolony. Optimální chromatografickou kolonou pro separaci tiapridu a melperonu byla kolona Zorbax SB-Aq 150 × 2,1 mm, 1,8 μm od společnosti Agilent Technologies (USA). Mobilní fáze se skládala z 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí (složka B), poměr složek mobilní fáze se měnil dle gradientového programu s celkovou dobou analýzy 10 minut (čas: 0,0-1,0-5,0-6,0-7,0-10,0 min, A: 90-90-10-10-90-90 % v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,45 ml/min a nástřik vzorku 1 μl. Teplota kolony byla temperována na 40 °C a teplota na dávkovači byla 15 °C.

Poté byla proměřena kalibrace v rozsahu koncentrací od 0,3 do 1250,0 ng/ml v séru a v dialyzátu. Z vybraných koncentračních hladin byly stanoveny základní analytické validační parametry. Správnost stanovení melperonu se pohybovala v rozmezí -19,5 až 11,4 % a přesnost byla 0,8 až 11,7 %. Správnost stanovení tiapridu dosahovala hodnot od 2,6 do 18,5 % a přesnost byla v rozmezí 0,9 až 3,4 %. Matriční efekt na stanovení melperonu byl od 94,1 do 105,6 %, vliv matrice na stanovení tiapridu byl 92,1 až 108,1 %. Výtěžnost melperonu dosahovala hodnot od 91,9 do 105,0 % a výtěžnost tiapridu byla 90,5 až 103,8 %. Metodu lze považovat za selektivní, jelikož stanovení tiapridu a melperonu v séru a dialyzátu nebylo ovlivněno interferujícími látkami.

Tato metoda byla následně použita k měření reálných vzorků ve spolupráci s Všeobecnou fakultní nemocnicí v Praze. Celkem bylo proměřeno touto metodou přibližně 130 vzorků séra a 30 vzorků dialyzátu.

Literatura

- [1] Günther, U.; Albert, K.: In vivo ¹⁹F nuclear magnetic resonance of a monofluorinated neuroleptic in the rat. *NMR in Biomedicine* **6**:1, 27–31 (1993).
- [2] Meltzer, H. Y.; Sumiyoshi, T.; Jayathilake, K.: Melperone in the treatment of neuroleptic-resistant schizophrenia. *Psychiatry Research* **105**:3, 201–209 (2001).
- [3] Roth, B. L.; Meltzer, H. Y.; Khan, N.: Binding of Typical and Atypical Antipsychotic Drugs to Multiple Neurotransmitter Receptors. *Advances in Pharmacology* **42**:C, 482–485 (1997).
- [4] Sumiyoshi, T.; Jayathilake, K.; Meltzer, H. Y.: The effect of melperone, an atypical antipsychotic drug, on cognitive function in schizophrenia. *Schizophrenia Research* **59**:1, 7–16 (2003).
- [5] Dalaya, P.; Chou, K. L.: Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms and their management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **9**:9, 1451–1462 (2008).
- [6] Ichikawa, J.; Li, Z.; Dai, J.; Meltzer, H. Y.: Atypical antipsychotic drugs, quetiapine, iloperidone, and melperone, preferentially increase dopamine and acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex: Role of 5-HT_{1A} receptor agonism. *Brain Research* **956**:2, 349–357 (2002).
- [7] Modica-Napolitano, J. S.; Lagace, C. J.; Brennan, W. A.; Aprille, J. R.: Differential effects of typical and atypical neuroleptics on mitochondrial function in vitro. *Archives of Pharmacal Research* **26**:11, 951–959 (2003).
- [8] Venkatesh, G. M.; Stevens, P. J.; Lai, J. W.: Development of orally disintegrating tablets comprising controlled-release multiparticulate beads. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **38**:12, 1428–1440 (2012).
- [9] Wobrock, T.; Schwaab, B.; Böhm, M.; Schäfers, H. J.; Wanke, K.; Supprian, T.: Pharmakotherapeutische behandlungsstrategien der insomnie bei patienten mit kardialen erkrankungen und nach herztransplantation. *Zeitschrift für Kardiologie* **90**:10, 717–728 (2001).
- [10] Proença, P.; Monteiro, C.; Mustra, C.; Claro, A.; Franco, J.; Corte-Real, F.: Identification and quantification of antipsychotics in blood samples by LC–MS–MS: Case reports and data from three years of routine analysis. *Journal of Analytical Toxicology* **44**:8, 915–922 (2020).

- [11] Josefsson, M.; Kronstrand, R.; Andersson, J.; Roman, M.: Evaluation of electrospray ionisation liquid chromatography–tandem mass spectrometry for rational determination of a number of neuroleptics and their major metabolites in human body fluids and tissues. *Journal of Chromatography B* **789**:1, 151–167 (2003).
- [12] Bjerkenstedt, L.; Gullberg, B.; Härnryd, C.; Sedvall, G.: Monoamine metabolite levels in cerebrospinal fluid of psychotic women treated with melperone or thiothixene. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* **224**:2, 107–118 (1977).
- [13] Ichikawa, J.; Li, Z.; Dai, J.; Meltzer, H. Y.: Atypical antipsychotic drugs, quetiapine, iloperidone, and melperone, preferentially increase dopamine and acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex: role of 5-HT_{1A} receptor agonism. *Brain Research* **956**:2, 349–357 (2002).
- [14] Dziadosz, M.; Bolte, K.; Rosenberger, W.; Klintschar, M.; Teske, J.: Interpretation of melperone intoxication: post-mortem concentration distribution and interpretation of intoxication data. *Drug Metabolism and Personalized Therapy* **36**:3, 233–237 (2021).
- [15] Saar, E.; Beyer, J.; Gerostamoulos, D.; Drummer, O. H.: The analysis of antipsychotic drugs in human matrices using LC-MS(/MS). *Drug Testing and Analysis* **4**:6, 376–394 (2012).
- [16] Sistik, P.; Urinovska, R.; Brozmanova, H.; Kacirova, I.; Silhan, P.; Lemr, K.: Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication. *Biomedical Chromatography* **30**:2, 217–224 (2016).
- [17] Saar, E.; Gerostamoulos, D.; Drummer, O. H.; Beyer, J.: Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* **45**:8, 915–925 (2010).
- [18] Bock, N.; Moll, G. H.; Wicker, M.; Pilz, J.; Rütther, E.; Banaschewski, T.; Huether, G.; Rothenberger, A.: Early administration of tiapride to young rats without long-lasting changes in the development of the dopaminergic system. *Pharmacopsychiatry* **37**:4, 163–167 (2004).
- [19] Li, J.; Zhao, F.; Ju, H.: Simultaneous electrochemiluminescence determination of sulpiride and tiapride by capillary electrophoresis with cyclodextrin additives. *Journal of Chromatography B* **835**:1–2, 84–89 (2006).

- [20] Lucht, M.; Kuehn, K. U.; Armbruster, J.; Abraham, G.; Gaensicke, M.; Barnow, S.; Tretzel, H.; Freyberger, H. J.: Alcohol Withdrawal Treatment in Intoxicated Vs Non-intoxicated Patients: A Controlled Open-label Study With Tiapride/Carbamazepine, Clomethiazole And Diazepam. *Alcohol and Alcoholism* **38**:2, 168–175 (2003).
- [21] Zangani, C.; Giordano, B.; Stein, H. C.; Bonora, S.; Ostinelli, E. G.; D'Agostino, A.: Efficacy of tiapride in the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* **37**:5, e2842 (2022).
- [22] Sempio, C.; Morini, L.; Vignali, C.; Groppi, A.: Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC–MS/MS: Application on postmortem samples. *Journal of Chromatography B* **970**, 1–7 (2014).
- [23] Chiba, R.; Ogasawara, A.; Kubo, T.; Yamazaki, H.; Umino, M.; Ishizuka, Y.: Direct determination of benzamides in serum by column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences* **19**:5, 785–789 (2003).
- [24] Nobilis, M.; Vybíralová, Z.; Szotáková, B.; Sládková, K.; Kuneš, M.; Svoboda, Z.: High-performance liquid chromatographic determination of tiapride and its phase I metabolite in blood plasma using tandem UV photodiode-array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **879**:32, 3845–3852 (2011).
- [25] Moon, Y.; In, B. P.; Kim, H. H.; Hye, Y. J.; Hye, W. L.; Park, H. G.; Hye, S. L.: Determination of tiapride in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Archives of Pharmacal Research* **27**:9, 901–905 (2004).
- [26] Wang, Y.; Zhou, L.; Hui, Y.; Chen, X.: A simple and rapid CZE determination of tiapride hydrochloride and related impurities in pharmaceutical formulations. *Chromatographia* **70**:1–2, 293–297 (2009).
- [27] Aly, F. A.; Alarfaj, N. A.; Alwarthan, A. A.: Flow-injection chemiluminometric analysis of some benzamides by their sensitizing effect on the cerium-sulphite reaction. *Talanta* **54**:4, 715–725 (2001).
- [28] Ortuño, J. A.; Ródenas, V.; Garcia, M. S.; Albero, M. I.; Sánchez-Pedreño, C.: A New Tiapride Selective Electrode and Its Clinical Application. *Sensors* **7**:3, 400–409 (2007).

- [29] Chawla, G.; Chaudhary, K. K.: A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis* **6**:2, 27-39 (2019).
- [30] Abdu Hussen, A.: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry* **6**:1, 010–020 (2022).
- [31] Sahu, P. K.; Ramiseti, N. R.; Cecchi, T.; Swain, S.; Patro, C. S.; Panda, J.: An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **147**, 590–611 (2018).
- [32] Bansal V. et al.: High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology* **2**:5, 22-26 (2010).
- [33] Zotou, A.: An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry* **10**:3, 554–569 (2012).
- [34] Erkmen, C.; Gebrehiwot, W. H.; Uslu, B.: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC): Latest Applications in the Pharmaceutical Researches. *Current Pharmaceutical Analysis* **17**:3, 316–345 (2020).
- [35] Rodriguez, E. L.; Poddar, S.; Iftexhar, S.; Suh, K.; Woolfork, A. G.; Ovbude, S.; Pekarek, A.; Walters, M.; Lott, S.; Hage, D. S.: Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *Journal of Chromatography B* **1157**, 122332 (2020).
- [36] Fekete, S.; Schappler, J.; Veuthey, J. L.; Guilleme, D.: Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **63**, 2–13 (2014).
- [37] Roge, A. B.; Firke, S. N.; Dhane, R. M.; Gunjkar, V. J.; Vadvalkar, S. M.: Novel Achievement of HPLC: UPLC. *International Journal of PharmTech Research CODEN* **3**:3, 1423–1429 (2011).
- [38] Klimczak, I.; Gliszczynska-Świgło, A.: Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chemistry* **175**, 100–105 (2015).
- [39] Svec, F.; Lv, Y.: Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography. *Analytical Chemistry* **87**:1, 250–273 (2015).
- [40] Lynch, K. B.; Chen, A.; Liu, S.: Miniaturized high-performance liquid chromatography instrumentation. *Talanta* **177**, 94–103 (2018).

- [41] Urban, P. L.: Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **374**:2079, (2016).
- [42] Friedecký D; Lemr K: Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**:41, 152–157 (2012).
- [43] Awad, H.; Khamis, M. M.; El-Aneed, A.: Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews* **50**:2, 158–175 (2015).
- [44] Himmelsbach, M.: 10 years of MS instrumental developments – Impact on LC–MS/MS in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B* **883–884**, 3–17 (2012).
- [45] Faktor J., Dvorakova M., Maryas J., Struharova I., Bouchal P.: Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies. *Klinická onkologie* **25**:2, 2570-2577 (2012).
- [46] Lucci, P.; Saurina, J.; Núñez, O.: Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **88**, 1–24 (2017).
- [47] Picó, Y.: Chromatography–mass spectrometry: Recent evolution and current trends in environmental science. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **18**, 47–53 (2020).
- [48] Xian, F.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G.: High resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **84**:2, 708–719 (2012).
- [49] Ashcroft, A. E.; Sobott, F.; Gabelica, V.: Ion Mobility–Mass Spectrometry: an Overview. 1–25 (2021).
- [50] Glish, G. L.; Burinsky, D. J.: Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**:2, 161–172 (2008).
- [51] J. Vessman et al.: Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry* **73**:8, 1381–1386 (2001).