

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci králové
Katedra analytické chemie

**VÝVOJ A VALIDACE UHPLC-MS/MS METODY PRO STANOVENÍ
MARAVIROKU V PLACENTÁRNÍCH PERFÚZÍCH**
DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Eliška Čapková Maxová

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

V Hradci Králové dne 9.5.2018

.....

Eliška Čapková Maxová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce, doc. PharmDr. Lucie Novákové, Ph.D. za vedení této práce. Další dík patří PharmDr. Veronice Pilařové, Ph.D. za cenné rady a připomínky. Nemalý dík patří i Zdeňce Němcové a mé rodině, která mě během studia podporovala.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Eliška Čapková Maxová

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

Název diplomové práce: Vývoj a validace UHPLC-MS/MS metody pro stanovení maraviroku v placentárních perfúzích

Cílem této práce byl vývoj rychlé a selektivní metody pro stanovení maraviroku v placentárních perfúzích. Pro separaci byla použita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému reverzních fází s kolonou BEH C18 spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Byla zvolena gradientová eluce s mobilní fází se složkou A (0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí) a B (acetonitril) při průtoku 0,35 ml/min a 40 °C v kolonovém prostoru. Parametry hmotnostního spektrometru byly optimalizovány a následně nastaveny: ionizace elektrosprejem v pozitivním módu; napětí na kapiláře 1,0 kV; napětí na vstupním kuželu 35 V; napětí na extraktoru 3,0 V; napětí na RF čočce 0,1 V; průtok desolvatačního plynu 1000 l/h; teplota desolvatace 450 °C; průtok plynu na vstupním kuželu 100 l/h; teplota iontového zdroje 130 °C. Pro kvantifikaci byl použit SRM mód. Jako metoda přípravy vzorků byla zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE). Nejlepší výtěžnost (>90%) byla získána při použití dichlormetanu. Metoda byla validována v kalibračním rozmezí 1-1000 ng/ml na pěti koncentračních hladinách (1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml a 1000 ng/ml). Dolní mez kvantifikace (LLOQ) byla 1 ng/ml, mez detekce (LOD) byla 0,3 ng/ml. Přesnost (RSD %) a správnost (% odchylka) byla stanovena pro každou koncentrační úroveň: 1 ng/ml (RSD = 8,1%, odchylka = +17,5%), 2,5 ng/ml (RSD = 13,0%, odchylka = +13,5%), 50 ng/ml (RSD = 2,6%, odchylka = +3,3%), 500 ng/ml (RSD = 2,7%, odchylka = +0,4%), 1000 ng/ml (RSD = 1,7%, odchylka = -0,6%). Dalším parametrem validace byla linearita ($R^2 = 0,9983$) a matricové efekty (99,1% - 109,2%) stanovené na čtyřech koncentračních úrovních (1 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml). Pro kvantifikaci byl použit isotopicky značený standard d_6 -maravirok. Metoda umožňuje citlivé a selektivní stanovení maraviroku v placentárních perfúzích.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Eliška Čapková Maxová

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Thesis: Development and validation of UHPLC-MS/MS method for the determination of maraviroc in placental perfusions

The goal of this work was to develop fast and selective method for the determination of maraviroc in human placental perfusions. The ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was used. BEH C18 column and gradient elution with the mobile phase A (water with 0.1% formic acid) and B (acetonitrile) at 0.35 mL/min flow-rate and 40 °C temperature were used for the separation. The mass spectrometry conditions were optimized and set up as follows: electrospray ionization in positive mode, capillary voltage 1.0 kV, cone voltage 35 V, extractor 3.0 V, RF lens 0.1 V, desolvation gas flow 1000 L/h, temperature 450 °C, cone gas flow 100 l/h, ion source temperature 130 °C. Selected reaction monitoring (SRM) mode was used for quantitation. Liquid-liquid extraction (LLE) was chosen for sample preparation and was optimized. The best results were obtained when dichloromethane was used as the extraction agent (recovery >90%). The optimized method was fully validated in the range 1-1000 ng/mL at five concentration levels (1 ng/mL, 2.5 ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL and 1000 ng/mL) with the lower limit of quantification (LLOQ) 1 ng/mL and limit of detection (LOD) 0.3 ng/mL. Precision (RSD %) and accuracy (% bias) was determined for each concentration level: 1 ng/mL (RSD = 8.1%, bias = +17.5%), 2.5 ng/mL (RSD = 13.0%, bias = +13.5%), 50 ng/mL (RSD = 2.6%, bias = +3.3%), 500 ng/mL (RSD = 2.7%, bias = +0.4%), 1000 ng/mL (RSD = 1.7%, bias = -0.6%). Further parameters of validation were linearity ($R^2 = 0.9983$) and matrix effects (99.1% - 109.2%) at four concentration levels: 1 ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL and 1000 ng/mL. The stable isotopically labelled internal standard d_6 -maraviroc, was used for quantification in all experiments. The method enabled sensitive and selective determination of maraviroc in placental perfusions.

OBSAH

1. Úvod	10
2. Cíl a zadání práce	11
3. Teoretická část	12
3.1 Maravirok	12
3.1.1 Mechanismus účinku.....	12
3.1.2 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti.....	13
3.1.3 Terapie HIV-1 a maravirok	14
3.1.4 Přehled bioanalytických metod pro stanovení maraviroku	15
3.2 Studium přenosu látek přes placentární bariéru	18
3.2.1 Anatomie a fyziologie placenty	18
3.2.2 Přestup látek přes placentární bariéru	19
3.2.3 Metoda placentární perfúze <i>ex vivo</i>	20
3.3 UHPLC-MS/MS	22
3.3.1 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC).....	22
3.3.2 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	23
3.3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a typy záznamů.....	25
3.4 Validace bioanalytické metody	27
4. Experimentální část.....	32
4.1 Chemikálie a přístroje	32
4.1.1 Standardní látky	32
4.1.2 Rozpouštědla, chemikálie	32
4.1.3 Přístroje	33
4.2 Příprava roztoků.....	33
4.2.1 Příprava zásobních roztoků	33
4.2.2 Příprava pracovních roztoků	33
4.2.3 Příprava mobilní fáze	35
4.3 Optimalizace UHPLC-MS/MS metody	35
4.4 Optimalizace metody pro přípravu vzorku	36
4.5 Validace metody.....	37
5. Výsledky a diskuze.....	39
5.1 Optimalizace UHPLC-MS/MS metody	39
5.2 Optimalizace metody pro přípravu vzorku	43
5.3 Validace metody.....	46

5.3.1 Test vhodnosti systému	46
5.3.2 Validace metody.....	46
5.4 Měření vzorků placentárních perfúzí	49
6. Závěr.....	54
7. Seznam použité literatury	57
8. Přílohy	62
8.1 Chiranal 2018, Univerzita Palackého v Olomouci	62
8.2 Studentská vědecká konference 2018, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy	65

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (<i>atmospheric pressure photoionization</i>)
cART	kombinovaná antiretroviróvá terapie (<i>combination antiretroviral therapy</i>)
CCR5	chemokinový receptor typ 5
D ₆ -MVC	vnitřní standard maraviroku značený 6 deuterii
DCM	dichlormetan
DMSO	dimethylsulfoxid
EMA	Evropská léková agentura (<i>European Medicines Agency</i>)
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>electrospray ionization</i>)
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>Food and Drug Administration</i>)
HAART	vysoce aktivní antiretroviróvá terapie (<i>highly active antiretroviral therapy</i>)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>human immunodeficiency virus</i>)
ICH	mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na léčiva pro humánní použití (<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
IS	vnitřní standard (<i>internal standard</i>)
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LLOQ	spodní mez stanovitelnosti (<i>lower limit of quantification</i>)
LOD	mez detekce (<i>limit of detection</i>)
Log P	logaritmus rozdělovacího koeficientu, koncentrace látky ve dvou nemísitelných fázích (n-oktanol/voda)
LOQ	mez kvantifikace (<i>limit of quantification</i>)

ME	matricové efekty (<i>matrix effects</i>)
MeOH	metanol
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MTCT	přenos HIV z matky na dítě (<i>mother-to-child transmission</i>)
MVC	maravirok
M_w	molekulová hmotnost
m/z	poměr hmotnosti molekuly a jejího náboje
NNRTI	nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (<i>non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>)
NRTI	nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (<i>nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>)
PI	inhibitory proteázy (<i>protease inhibitors</i>)
Q/QqQ	kvadrupól/trojítý kvadrupól
SIL-IS	vnitřní standard značený stabilními izotopy (<i>stable isotopically labelled internal standard</i>)
SRM	záznam vybrané reakce (<i>selected reaction monitoring</i>)
SST	test vhodnosti chromatografického systému (<i>system suitability test</i>)
TBME	terc-butylmetyléter
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>ultra-high performance liquid chromatography</i>)
ULOQ	horní mez kvantifikace (<i>upper limit of quantification</i>)
UNAIDS	společný program Organizace spojených národů pro HIV/AIDS (<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>)

1. ÚVOD

Bioanalytické metody mají nezastupitelné místo v rámci klinického hodnocení a výzkumu léčiv, stejně jako v klinické praxi v rámci individualizované farmakoterapie (terapeutické monitorování léčiv). Díky nim lze stanovit hodnocené látky v biologické matrici. Znalost farmakokinetických a farmakodynamických parametrů léčiv patří mezi základní předpoklady účinné a bezpečné farmakoterapie, zejména u chronicky léčených pacientů.

Mezi taková chronická onemocnění patří získaná nedostatečnost imunitního systému způsobená virem lidské imunitní nedostatečnosti (*human immunodeficiency virus*, HIV), která v pokročilé fázi přechází v syndrom získaného selhání imunity (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS). Cílem léčby je oddálení rozvoje AIDS. Strategií je pak použití kombinace antiretrovirotik, která zamezují replikaci viru HIV v rámci vnitrobuněčných procesů a snižují tak množství kopií virové RNA v krevním oběhu.

Podle odhadů neziskové organizace UNAIDS žije na světě 36,9 milionů lidí infikovaných HIV. Odhaduje se, že více než polovinu tohoto počtu (19,1 milionů) tvoří infikované dívky a ženy [1]. Přenos HIV z matky na plod (*mother-to-child transmission*, MTCT) je nejčastější způsob infekce dětí. Je proto důležité, aby se množství virových RNA kopií v krevním oběhu z matky snížilo na minimum, a tím pokleslo riziko nákazy plodu HIV. Maravirok patří mezi léčiva používaná v rámci terapie HIV typu 1 (HIV-1). Existují však velmi omezené informace o jeho použití u těhotných žen.

Na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK probíhají experimenty, které se soustředí na vstup xenobiotik (převážně léčiv) přes placentární bariéru. Jedním ze zkoumaných léčiv byl maravirok. Vzorok placentárních perfúzí jsou komplexní biologické matrice. Proto je třeba citlivá a selektivní metoda pro stanovení maraviroku. Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní detekcí je vhodná metoda pro analýzu biologických vzorků. Představuje rychlou a citlivou metodu s vysokou separační účinností a rozlišením, která umožňuje odhalení koeluce látek a případných interferencí.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce je vývoj a validace metody pro stanovení maraviroku ve vzorcích placentárních perfúzí. Díky této metodě bude možné vyhodnocení farmakologických experimentů, při kterých je sledován přestup maraviroku přes placentární bariéru. V souladu se současnými trendy v bioanalytických metodách je pro analýzu zvolena ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS).

V prvním kroku je třeba získat maximum informací o maraviroku. V chemické databázi SciFinder budou vyhledány základní fyzikálně-chemické vlastnosti maraviroku. Dále je nutné zjistit informace o vzorcích z perfúzních experimentů (složení matrice vzorku, očekávané koncentrace MVC, a další).

Následujícím krokem je výběr UHPLC podmínek. Současně jsou optimalizovány vybrané parametry nastavení hmotnostního detektoru: napětí na kapiláře, napětí na vstupním kuželu, napětí na extraktoru, napětí na RF čočkách, průtok desolvatačního plynu, teplota desolvatačního plynu, průtok plynu na vstupním kuželu, kolizní energie pro fragmentaci.

Dalším krokem je optimalizace metody pro zpracování vzorku. Metodou je extrakce z kapaliny do kapaliny (*liquid-liquid extraction*, LLE), především díky lipofilitě maraviroku a vysoké koncentraci anorganických solí v matrici vzorku. Optimalizované parametry LLE zahrnují: extrakční rozpouštědlo, poměr vzorku a extrakčního rozpouštědla, doba extrakce, teplota při extrakci a intenzita třepání.

Posledním krokem je validace metody dle směrnice Evropské lékové agentury (*European Medicine Agency*, EMA). Validačními parametry jsou správnost, přesnost, linearita, stanovení LOD, LOQ a matricové efekty. Validovaná metoda bude použita pro stanovení maraviroku ve vzorcích z placentárních perfúzí.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 MARAVIROK

Maravirok (MVC) je látka používaná v kombinované antiretrovirové terapii (*combination antiretroviral therapy, cART*) chronického infekčního onemocnění, které způsobuje virus lidské imunitní nedostatečnosti typu 1 (HIV-1). Díky svému mechanismu účinku má jedinečné postavení v rámci soudobých antiretrovirotik. Spolu s enfuvitridem je řazen mezi tzv. inhibitory vstupu (*entry inhibitors*), které znemožní přilnutí viru na buněčnou membránu buněk imunitního systému [2].

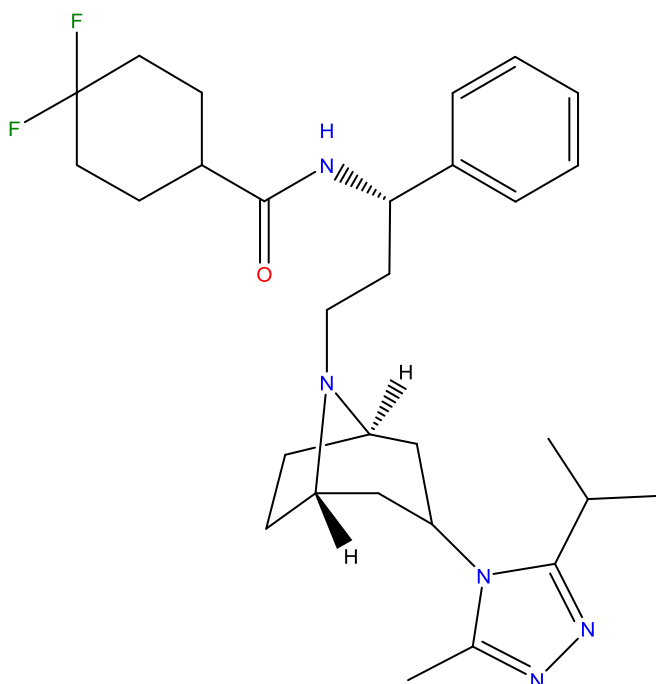
3.1.1 MECHANISMUS ÚČINKU

Mechanismus účinku spočívá v antagonismu C-C chemokinového receptoru typu 5 (CCR5), jednoho z klíčových koreceptorů při vstupu HIV do buněk. Objev tohoto mechanismu je úzce spojen s objevem mutantní alely pro CCR5, která je zodpovědná za částečnou rezistenci vůči HIV-R5 kmenu u kavkazské populace. CCR5 se nachází na buněčné membráně CD4+ buněk (skupina pomocných T_H-lymfocytů a makrofágů). Přilnutí viru na buňku vzniká spojením glykoproteinu 120 virové částice a CD4 receptoru hostitelských buněk. Interakce s CCR5 je specifická pro tzv. HIV-R5 kmeny. Alternativním koreceptorem pro internalizaci viru je chemokinový receptor CXCR4, který je specifický pro tzv. HIV-X4 kmeny. Pokud jsou u infikovaného pacienta přítomny oba kmeny, pak je tento virus klasifikován jako dvojitě tropický [3, 4, 5].

MVC alostericky modifikuje konformaci CCR5, čímž znemožní navázání virového glykoproteinu 120 na CD4 receptor buněčné membrány a následnou internalizaci viru. Vir nepronikne do buňky a nemůže proběhnout replikace a tvorba nového virionu. MVC je indikován pouze ke kombinační léčbě u infikovaných pacientů, u nichž byl v rámci testování varianty viru prokázán výskyt R5-tropního kmene HIV-1 [6].

3.1.2 STRUKTURA A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Vývoj molekuly MVC (UK-427,857) probíhal ve firmě Pfizer. Vedoucí sloučeninou ve screeningových studiích (*lead compound*) byl substituovaný imidazopyridin (UK-107,543), u něhož byla prokázána afinita k CCR5. Cílenou optimalizací farmakodynamických a farmakokinetických parametrů byl z téměř 1000 analogů vybrán MVC (obrázek 1) [7].



Obrázek 1. Struktura maraviroku (UK-427,857).

MVC je bílá krystalická látka. Strukturně se jedná o malou, spíše lipofilní molekulu. Ve své struktuře obsahuje substituovaný cyklohexankarboxamid. Přes propylový můstek je spojen se tropanovým jádrem, na které je navázán substituovaný triazol. Molekula má slabě bazický charakter. Je rozpustná v běžných organických rozpouštědlech. Fyzikálně chemické vlastnosti jsou shrnuty v tabulce 1 [8, 9].

Tabulka 1. Přehled fyzikálně-chemických vlastností MVC [8, 9].

Fyzikálně chemická vlastnost	Hodnota
Sumární vzorec	C ₂₉ H ₄₁ F ₂ N ₅ O
M_w	513,67
Struktura, funkční skupiny	1H-1,2,4 – triazol tropan fenyl fluor (2 atomy) amid
Log P	5,30
pK_a (ac)	14,80
pK_a (bas)	10,24
Rozpustnost	organická rozpouštědla: etanol 25 mg/ml dimetylsulfoxid 3,3 mg/ml dimetylformamid 5 mg/ml

3.1.3 TERAPIE HIV-1 A MARAVIROK

Terapie HIV-1 je v současné době postavena na principu kombinace tří až čtyř antiretrovirových látek (kombinovaná antiretrovirová terapie, cART). Někdy je tato strategie nazývána též vysoce aktivní antiretrovirová terapie (*highly active antiretroviral therapy*, HAART). Obvykle zahrnuje kombinaci dvou nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy (NRTI) s jedním nenukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy (NNRTI), případně s jedním až dvěma inhibitory protézy (PI). Cílem léčby je potlačit HIV replikaci, a tím snížit množství RNA viru v plazmě (tzv. *viral load*) pod 200 kopií/ml. Léčba je celoživotní a je doprovázena častými nežádoucími účinky. MVC je indikován jen ke kombinační terapii a pouze u pacientů s pozitivním kmenem HIV-R5. Není určen pro monoterapii, ani k léčbě HIV-R4 a duálně tropických kmenů [3, 10].

Specifickým problémem v terapii HIV-1 je léčba v těhotenství. Přenos HIV z matky na dítě (MTCT) je hlavním zdrojem HIV infekce u dětské populace. Léčba v těhotenství je důležitá především pro prevenci nákazy plodu. Riziko nákazy plodu je přímo úměrné množství viru v plazmě matky. Dalším důležitým faktorem léčby je prevence zhoršení zdravotního stavu matky, kdy sekundární onemocnění spojená s HIV/AIDS mohou představovat větší riziko než sama terapie. Léčba je založená také na principu HAART,

je nutné však zvážit teratogenitu podávaných antivirotik. Obecně je HAART spojená s rizikem předčasného porodu. MVC není teratogenní u krys a králíků, nejsou však dostatečné důkazy pro odhad teratogenity u lidí [11].

3.1.4 PŘEHLED BIOANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ MARAVIROKU

Souhrn bioanalytických metod pro stanovení MVC je uveden v tabulce 2. Čtyři metody byly vyvinuty přímo pro cílenou kvantifikaci MVC. V ostatních případech byl MVC jedním ze stanovovaných analytů. Stanovení MVC v přítomnosti dalších antiretrovirových látek má význam především díky jeho užití v rámci cART, tedy v kombinaci s dalšími antiretrovirotiky.

Metodou volby je kapalinová chromatografie na reverzních fázích spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Ve dvou případech byla kapalinová chromatografie spojená s UV-detekcí, přičemž MVC byl kvantifikován při vlnové délce 210 nm a 197 nm. Ve čtyřech případech byla zvolena isokratická eluce, s úpravou mobilní fáze přidavkem octanu amonného a kyselinou mravenčí/octové. Čas analýzy se pohyboval v rozmezí 3 – 20 minut. Metodou ionizace byla ve všech případech ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Vnitřním standardem byla ve většině případů deuterovaná molekula maraviroku (d_6 nebo d_5), ve třech případech byl vnitřním standardem substituovaný chinoxalin. Ve všech případech byla do mobilních fází přidávána jako aditivum kyselina mravenčí (0,05 – 0,2%) nebo octová (0,1%), a to buď jen do vodné mobilní fáze A, nebo do obou mobilních fází.

Vzorky byly většinou zpracovávány metodou srážení proteinů, protože dominantní biologickou maticí maraviroku byla plazma. Dalšími biologickými vzorky byl cervikovaginální sekret a tkáň, moč a mozkomíšní moku. Jako rozpouštědlo zásobních roztoků MVC byl většinou použit metanol – buď čistý nebo v poměru s vodou (MeOH:H₂O, 90:10 nebo 50:50). Nejnižší mez kvantifikace nabývala hodnoty 0,1 ng/ml. Nejvyšší horní mez kvantifikace byla 5000 ng/ml.

Tabulka 2. Přehled metod pro stanovení maraviroku v biologických vzorcích (převzato a doplněno dle [1]).

Počet analytů	Vnitřní standard pro MVC	Vzorek		Zásobní roztok (rozpuštědlo)	LC				MS			Koncentrační rozmezí	Odkaz
		Materiál	Příprava		Typ eluce	SF	MF	čas analýzy	ionizace MVC	detekce	SRM přechody		
11	tenofovir	plazma	SPE	DMSO	G	Acquity UPLC BEH (100 x 2,1 mm; 1,7 μm)	A:0,1% FA, B:ACN	16 min	-	PDA (210nm)	-	250 - 2500 ng/ml	[12]
17	6,7-dimetyl-2,3-di(2-pyridyl)chinoxalin	plazma	PP	MeOH:H ₂ O (90:10)	G	Acquity UPLC HSS T3 (150 x 2,1 mm; 1,8 μm)	A:0,05% FA, B: 0,05%FA v ACN	15 min	ESI ⁺	MS/MS	514,33 > 389,27; 514,33 > 117,11	9,8 - 2500 ng/ml	[13]
4	d ₆ -MVC	plazma, tkáňový lyzát (vaginální, kolorektální)	PP (plazma), SPE (lyzát)	MeOH	G	Acquity UPLC BEH C8 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm)	A:0,1% FA, B:0,1%FA v ACN	4 min	ESI ⁺	MS/MS	514,33 > 389,27	0,1 - 850 ng/ml (plazma), 0,05-35 ng/ml (lyzát)	[14]
MVC + ETR + RAL	d ₆ -MVC	plazma, vaginální sekret, vaginální tkáň	PP, SPE	DMSO	G	Chromolith Performance RP-18e 100-3mm (100 x 3 mm; 1,5 μm)	A:10mM FA, B: 10mm FA v ACN:MeOH (50:50)	8,5 min	ESI ⁺	MS/MS	514,48 > 280,22	0,01 - 100 ng/ml	[15]
MVC +DAP	d ₆ -MVC	cervikovaginální tekutina	LLE	ACN	G	Acquity UPLC BEH C8 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm)	A:0,1% FA, B:0,1% FA v ACN	5 min	ESI ⁺	MS/MS	515,5 > 390,2	1 - 1000ng/ml	[16]
MVC	6,7-dimetyl-2,3-di(2-pyridyl)chinoxalin	plazma	PP	MeOH:H ₂ O (90:10)	G	Atlantis T3 C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm)	A:0,05% FA, B: 0,05% FA v ACN	20 min	ESI ⁺	MS/MS	513,3 > 257,5	4,9 - 2500 ng/ml	[17]
MVC	d ₆ -MVC	plazma	PP	ACN	G	Acquity UPLC BEH C8 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm)	A:0,1% FA, B:0,1% FA v ACN	5 min	ESI ⁺	MS/MS	515,5 > 390,2	0,5 - 1000 ng/ml	[18]
16	d ₄ -AMP	plazma	PP	MeOH	G	Acquity UPLC HSS T3 (150 x 2,1 mm; 1,8 μm)	A:0,1% FA, B:0,1% FA v ACN	5,5 min	ESI ⁺	MS/MS	514,4 > 117,2	7,81 - 2000 ng/ml	[19]
10	chinoxalin	plazma	PP	MeOH	I	Ascentis C18 (100 x 2,1 mm; 3 μm)	A:0,05% FA v ACN:H ₂ O (5:95), B:0,05% FA v ACN:H ₂ O (80:20)	5 min	ESI ⁺	MS/MS	514,3 > 279,9; 514,3 > 389,0	13,2 - 691 ng/ml	[20]

Tabulka 2 (pokračování). Přehled metod pro stanovení maraviroku v biologických vzorcích (převzato a doplněno dle [1]).

Počet analytů	Vnitřní standard pro MVC	Vzorek		Zásobní roztok (rozpuštědlo)	LC				MS			Koncentrační rozmezí	Odkaz
		Materiál	Příprava		Typ eluce	SF	MF	čas analýzy	ionizace MVC	detekce	SRM přechody		
MVC	d ₅ -MVC	plazma, moč, mozkomíšní mok	PP	MeOH:H ₂ O (50:50)	I	Fluophase PFP (50 x 4,6 mm; 5 μm)	25mM AmAc v ACN + 0,2% FA v H ₂ O (80:20)	3 min	ESI ⁺	MS/MS	514,1 > 389,1	0,5 - 500 ng/ml (plazma, mozkomíšní mok), 5 - 5000 ng/ml (moč)	[21]
MVC	A86093	plazma	LLE	EtOH:H ₂ O (50:50)	G	SunFire C18 (50 x 2,1 mm; 3,5 μm)	A:0,1mM EDTA v 0,1% AA, B: ACN, C: MeOH	16 min	ESI ⁺	MS	514,7	11 - 2188 ng/ml	[22]
11	A86093	plazma	PP, on-line SPE	MeOH	I	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (50 x 2,0 mm; 5 μm)	MeOH:H ₂ O (97:3) + 10 mM AmAc + 0,1%AA	6 min	ESI ⁺	MS/MS	514,2 > 280,1	10 - 1000 ng/ml	[23]
4	d ₉ -DRV	plazma	LLE	MeOH	G	Atlantis - dC18 (50 x 2,1 mm; 3 μm)	A: 2mM AmAc + 0,1% FA v H ₂ O, B: 0,1% FA v ACN	20 min	ESI ⁺	MS/MS	514,3 > 280,0	2,5 - 1000 ng/ml	[24]
MVC + RAL	-	plazma	SPE	MeOH	I	Atlantis - dC18 (150 x 4,6mm; 5 μm)	A:0,01M KH ₂ PO ₄ , B: ACN	10 min	-	UV (197nm)	-	19,53 - 2500 ng/ml	[25]

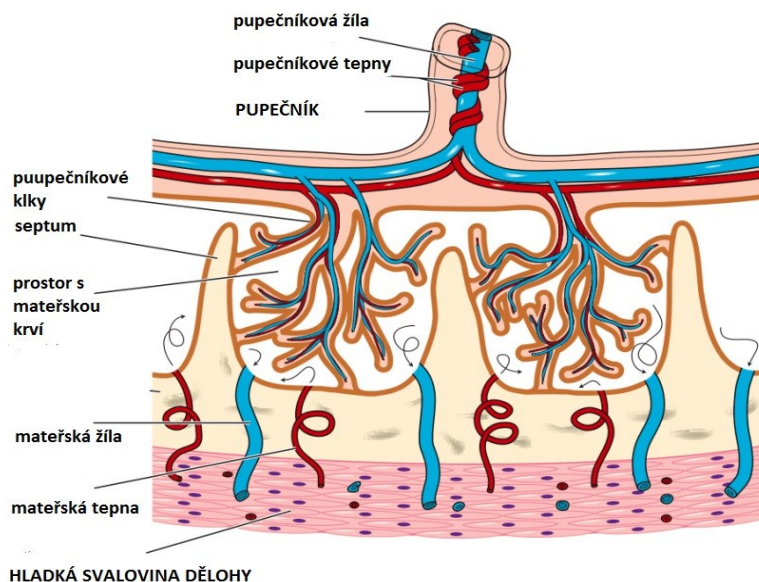
LC – kapalinová chromatografie, MS – hmotnostní detekce, MS/MS – tandemová hmotnostní detekce, SF – stacionární fáze, MF – mobilní fáze, SRM – záznam jedné reakce, MVC - maravirok ETR – etravirin, RAL – raltegravir, DAP – dapivirin, d₆-MVC/d₅-MVC – maravirok značený 6/5 deuterii, d₄-AMP – amprenavir značený 4 deuterii, d₉-DRV – darunavir značený 9 deuterii, PP – srážení proteinů, SPE – extrakce na tuhou fázi, LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny, MeOH – metanol, DMSO – dimetylsulfoxid, ACN – acetonitril, G/I – gradientová/izokratická eluce, FA – kyselina mravenčí, AmAc – octan amonný, AA – kyselina octová, EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina

3.2 STUDIUM PŘENOSU LÁTEK PŘES PLACENTÁRNÍ BARIÉRU

Pozornost věnovaná farmakoterapii těhotných žen v současnosti narůstá, především díky zvyšujícímu se věku rodiček a jejich morbidit. V mnoha případech nelze chronickou léčbu přerušit, protože onemocnění představuje vyšší riziko pro plod než samotná farmakoterapie. Jedním z těchto případů je i léčba onemocnění HIV. Při chronické farmakoterapii v těhotenství je nutné zohlednit také možnost kontaktu plodu s léčivem a jeho případný teratogenní vliv [26].

3.2.1 ANATOMIE A FYZIOLOGIE PLACENTY

Placenta představuje základní fyziologickou, oboustranně propustnou bariéru mezi krevním oběhem matky a plodu. Je jejich společným orgánem. Zabezpečuje výměnu dýchacích plynů (kyslíku a oxid uhličitý), živin a látek, které jsou přítomny v krevním oběhu matky. Další důležitou funkcí placenty je produkce hormonů, které jsou nezbytné pro udržení těhotenství a růst prsních žláz [27]. Anatomická struktura placenty je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2. Anatomická struktura placenty [29].

Placentu tvoří dvě základní složky: část mateřská (*pars materna placentae*) a část plodová (*pars fetalis placentae*). Mateřská část je rozdělena do 15 – 20 lalůčků (kotyledonů), které jsou vzájemně odděleny placentárními septy. Kotyledony jsou

zásobovány krví z kmenů děložní tepny. Plodová část je tvořena klky s pupečnickovými cévami. Jsou obklopeny fetálním mezenchymem, který zajišťuje nepřímý kontakt s krví matky. Krev z klků je odváděna nepárovou pupečnickovou žílou do dolní duté žíly plodu [28].

3.2.2 PŘESTUP LÁTEK PŘES PLACENTÁRNÍ BARIÉRU

Těhotenství je komplexní a dynamický proces. Placentární přenos látek je úzce spojen s fyziologickými změnami, které těhotenství v organismu vyvolá: růst hmotnosti, zvýšení srdečního výdeje a tepové frekvence, růst objemu krve až o 50%, změny respirace, změny funkce ledvin (zvýšení průtoku krve ledvinami a s tím související zvýšená glomerulární filtrace). Významné jsou rovněž změny hormonálních hladin, které mohou ovlivňovat ostatní orgánové systémy [27].

Z výše uvedeného výčtu fyziologických změn je patrné, že žádný model placentárního přestupu nemůže plně simulovat vnitřní prostředí organismu matky a plodu. Pro studium placentárního přestupu látek byly vyvinuty různé metody, v zásadě založené na použití tkání a buněk z lidské placenty. Lze je rozdělit do třech základních skupin: a) metody založené na izolovaných placentárních buňkách a tkáních; b) metody využívající kultivované maligní buněčné tkáně trofoblastu; c) biofyzikální metody. Metody založené na izolovaných tkáních placenty jsou v rámci experimentálních studií často využívány díky relativně snadné dostupnosti placenty [30].

Placentární přenos léčiv je komplexní a dynamický proces, který je ovlivněn mnoha faktory. Látky přestupují placentu čtyřmi základními mechanismy: prostá difúze, facilitovaná difúze, sekundární aktivní transport a pinocytóza [27]. Dalším faktorem je velikost povrchu, na kterém výměna probíhá, a šířka placentární membrány. Během těhotenství placenta roste, a zároveň dochází k zúžení placentární membrány. Placenta je propustnější, což souvisí se zvýšenými metabolickými nároky plodu [30].

Na přestupu látek přes placentární bariéru a koncentraci léčiv v oběhovém systému plodu se mohou významně podílet také efluxní mechanismy. Efluxní přenašeče, které patří do superrodiny ABC přenašečů (*ATP-binding cassette transporters*) mohou hrát důležitou roli. Existují omezené informace, které lze o

přestupu MVC přes placentární bariéru získat z literatury. Bylo provedeno několik experimentů s placentami primátů a s lidskými placentami. Na jejich základě se předpokládá, že MVC prostupuje placentární bariérou v omezené míře díky efluxnímu přenašeči P-glykoproteinu [31, 32].

3.2.3 METODA PLACENTÁRNÍ PERFÚZE EX VIVO

Metoda placentární perfúze *ex vivo* patří k základním metodám, kterými se experimentálně stanovuje míra přestupu látek přes placentární bariéru a funkce přenašečových systémů, dále metabolismus látky placentárními enzymy nebo enzymy jater plodu. Lze také sledovat faktory, které mohou souviset s variabilitou přenašečových systémů. Výhodou této metody je relativně snadná dostupnost placenty. Hlavní omezení je pak v tom, že poskytuje informace o transplacentárním přenosu na konci třetího trimestru, tj. v přenosu v době perinatální. Navíc plně neodráží *in vivo* proměnlivou farmakokinetickou rovnováhu, která souvisí množstvím sérového albuminu v mateřském oběhu a oběhu plodu, a v průběhu těhotenství se mění [33].

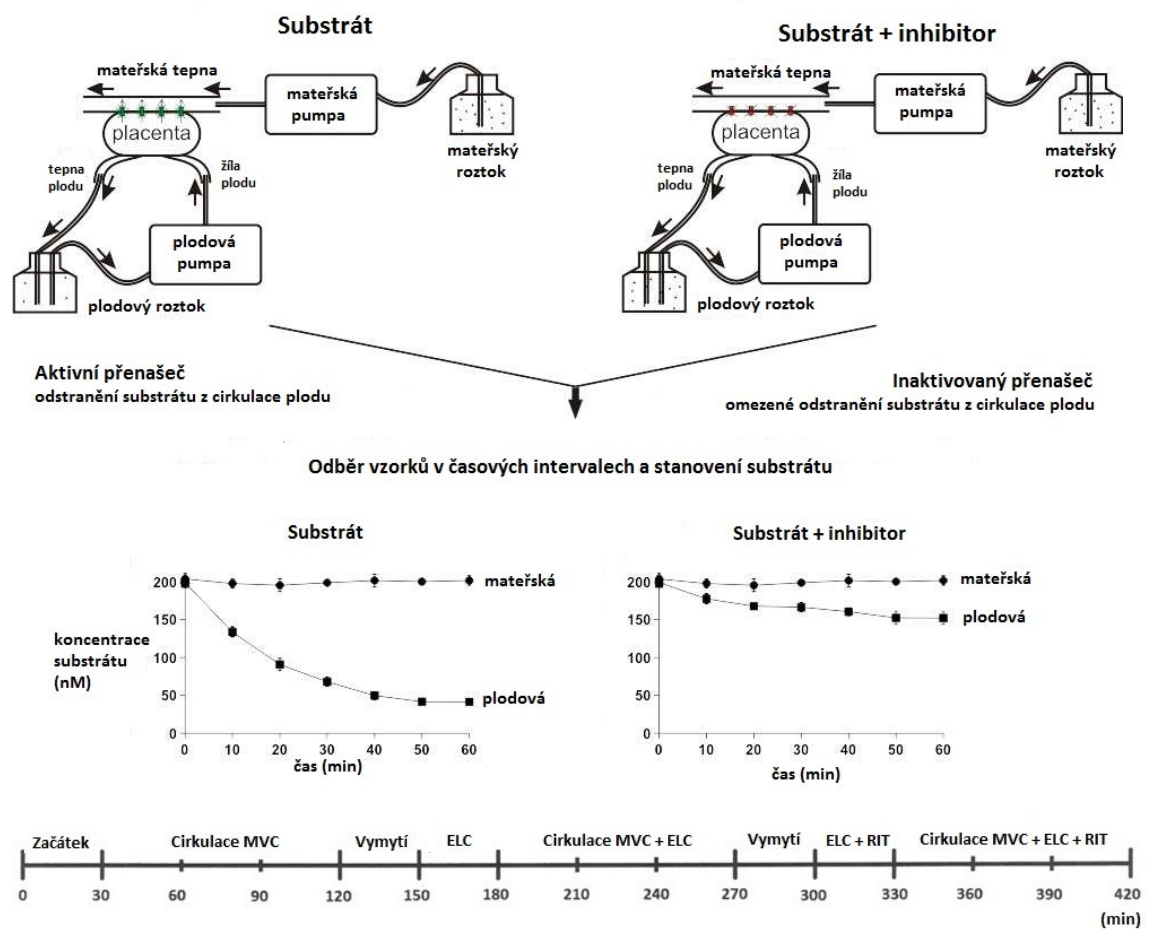
Perfúzní systém může být buď otevřený (jednocestný, perfúzní tok se pohybuje jen jedním směrem), nebo uzavřený (recirkulační). Otevřený systém je vhodný pro odhad clearance látky z mateřského/plodového kompartmentu [30].

Vzorky použité v této práci pocházejí z uzavřeného *ex vivo* perfúzního systému. Schéma perfúzního systému a časový průběh odběru vzorků jsou znázorněny na obrázku 3. Cílem farmakologických experimentů bylo zjistit, do jaké míry je koncentrace MVC v plodovém kompartmentu ovlivňována efluxními mechanismy [34].

Do mateřského i plodového zásobníku je vloženo perfúzní médium. Po počátečním ustanovení rovnováhy během prvních 30 minut byl přidán MVC o stejné koncentraci do mateřského i plodového zásobníku. Postupně byly odebírány vzorky. Po 90 minutách cirkulace následoval vymývací interval. Poté byl přidán elakridar (ELC), inhibitor P-glykoproteinu [35]. Po 30 minutách ustavování rovnováhy byl přidán MVC a cirkulace MVC s ELC opět probíhala 90 minut. Na tyto dvě základní fáze u dvou perfúzí navazovala ještě třetí cirkulační fáze. Po 30 minutovém intervalu promývání byl přidán

spolu s elakridarem navíc ritonavir (PI, silný inhibitor cytochromu 3A4), který je používán v rámci cART spolu s MVC [11]. Po 30 minutách ustálení rovnováhy byl přidán MVC a následovala společná cirkulace všech tří látek do ukončení perfúze.

Modelové výsledky prostupu MVC jsou ukázány ve dvou grafech na obrázku 3. Pokud prostup MVC bude ovlivňován P-glykoproteinem, jeho koncentrace při cirkulaci s ELC bude v plodovém kompartmentu vyšší. Pokud není P-glykoprotein inhibován, pomáhá z krevního oběhu plodu odstranit MVC, jeho koncentrace zde v čase klesá.

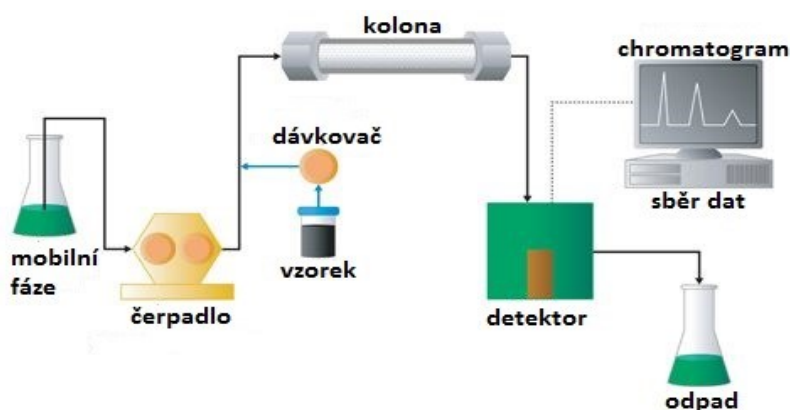


Obrázek 3. Schéma uzavřené *ex vivo* dvojité průtokové placentární perfúze (převzato z [34]) a časové schéma průběhu perfúze. MVC – maravirok, ELC – elakridar, RIT – ritonavir.

3.3 UHPLC-MS/MS

3.3.1 ULTRA-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (UHPLC)

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC) patří k současným trendům v kapalinové chromatografii, jejichž cílem je zrychlení separace při současném zachování nebo zlepšení účinnosti, zvýšení rozlišení a citlivosti metody [36, 37]. Schéma HPLC/UHPLC je na obrázku 4.



Obrázek 4. Schéma HPLC/UHPLC systému [38].

Základní odlišností mezi UHPLC a HPLC je použití částic o velikosti menší než 2 μm . Díky vyšší účinnosti separace menších částic jsou v UHPLC systémech používány kratší kolony s menšími průměry (délka 50 – 150 mm; průměr většinou 2,1 mm). To umožňuje výrazné snížení objemových průtoků mobilní fáze a nástřikového objemu vzorku. Se zmenšením kolonového prostoru úzce souvisí i potřeba výrazného snížení mimokolonových objemů systému. Dochází i k omezení zpoždění gradientu při gradientové eluci. Na druhé straně jsou tyto výhody spojeny s požadavky na dávkovací systém (přesné a rychlé dávkování malých objemů vzorku), a na detektory (rychlejší sběr dat – speciální nízkoobjemové detekční cely) [36, 37].

Menší částice způsobují zvýšení zpětného tlaku v systému. Pracovní tlak dosahuje 100 MPa i více (oproti tlaku okolo 30-40 MPa v HPLC). V systému UHPLC proto musí být tlaku-odolná pevná spojení, robustní čerpadla, a mechanicky i chemicky stabilní stacionární fáze. Základním materiálem pro výrobu sorbentů pro UHPLC kolony je silikagel nebo hybridní sorbenty. Jednou z klíčových stacionárních fází v UHPLC jsou

hybridní sorbenty vyrobené tzv. technologií BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) patentovanou firmou Waters [36, 37, 39].

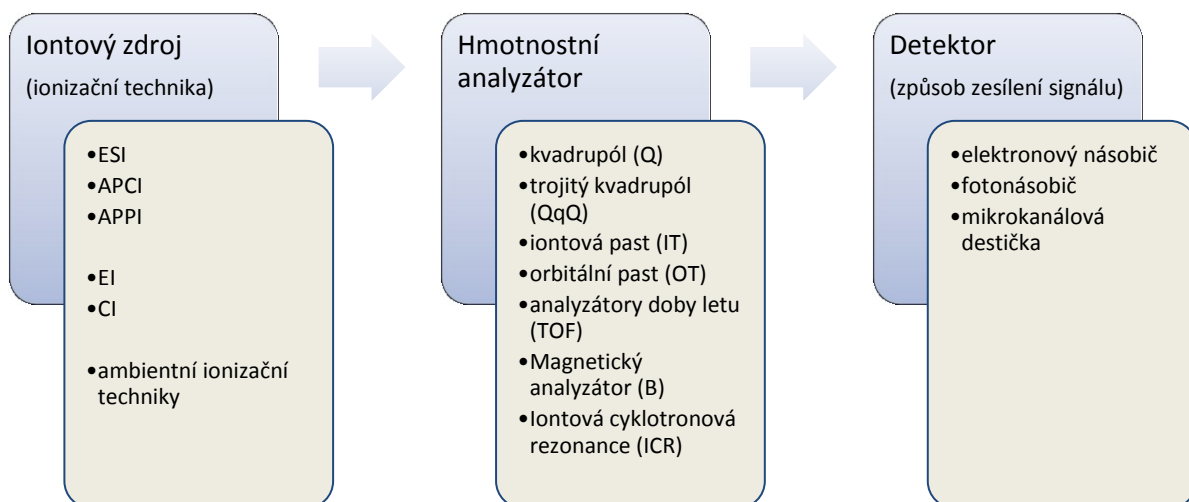
Hlavní přínos UHPLC je vyšší separační účinnost a rozlišení, vyšší citlivost, snížení objemu vzorků a mobilní fáze. Umožňuje rychlejší vývoj metod díky výraznému zkrácení času analýz [36, 37].

3.3.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

Hmotnostní spektrometry patří mezi vysoce citlivé a selektivní detektory. Princip hmotnostní detekce spočívá v převedení neutrálních molekul na nabitě částice v plynném stavu a jejich separaci dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní spektrometr má tři základní části:

1. Iontový zdroj – ionizace molekul analytu a složek matrice, převedení nabitých částic do plynného stavu pomocí zmlžovacího plynu
2. Hmotnostní analyzátor – rozdělení iontů na základě m/z a jejich urychlení
3. Detektor – detekce iontů dle m/z a zesílení signálu iontů [37].

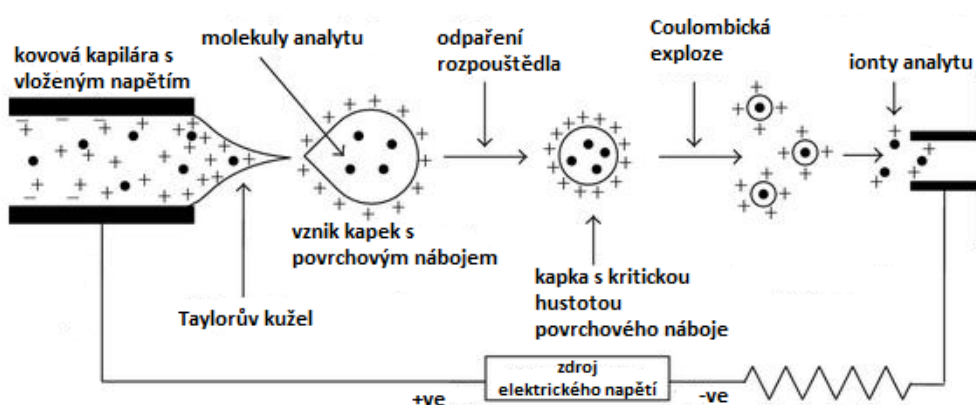
Schéma MS detekce a nejpoužívanější ionizační techniky, analyzátorů a způsoby zesílení signálu iontů jsou uvedeny na obrázku 5.



Obrázek 5. Schéma MS detektoru: ionizační techniky, typ analyzátoru, způsob zesílení detekce). **ESI** – ionizace elektrosprejem, **APCI** – chemická ionizace za atmosférického tlaku, **APPI** – fotoionizace za atmosférického tlaku, **EI** – elektronová ionizace, **CI** - chemická ionizace, **Q** – kvadrupól, **QqQ** – trojitý kvadrupól, **IT** – iontová past, **OT** – orbitální past, **TOF** – analyzátor doby letu, **B** – magnetický analyzátor, **ICR** – iontová cyklotronová rezonance [37].

V hmotnostní spektrometrii existuje mnoho **ionizačních technik**. Z hlediska množství energie potřebné pro ionizaci jsou rozlišovány techniky tvrdé a měkké. Vysokoenergetické tvrdé techniky způsobují rozsáhlou fragmentaci molekulárního iontu, jsou detekovány většinou jen jeho fragmenty. Naproti tomu měkké ionizační techniky pracují s nižšími energiemi na principu acidobazických reakcí (přenos vodíku), kdy vzniká protonovaná/deprotonovaná forma analytu [40].

Mezi nejpoužívanější měkké ionizační techniky patří **ionizace elektrosprejem** (*electrospray ionization*, ESI). Jedná se o velmi šetrnou metodu, která je vhodná pro analýzu širokého spektra látek jak z hlediska polarity (silně polární až středně polární), tak z hlediska rozsahu molekulové hmotnosti analytu (od malých molekul po vysokomolekulární látky typu proteinů). Mechanismus ionizace umožňuje vznik vícenásobně nabitých iontů, což je vhodné zejména při analýze proteinů. ESI probíhá v několika fázích (obrázek 6). Nejprve vznikají kapky s povrchovým nábojem, který získají na konci kovové kapiláry s vloženým napětím. Postupným odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování kapek. Tím na jejich povrchu vznikne hraniční hustota povrchového náboje (tzv. Rayleighův limit). Překročením Rayleighova limitu dojde k rozpadu kapky a rozložení původního povrchového náboje na povrch několika menších kapek. Postupným zmenšováním kapek dojde k vypaření nabitých molekul analytu, které vstupují do hmotnostního analyzátoru [40, 41].



Obrázek 6. Mechanismus ionizace elektrosprejem [41].

Hmotnostní analyzátoary jsou místem rozdělení molekul dle jejich m/z . Existuje několik typů analyzátoary, které pracují na základě různých principů separace iontů.

Obecně lze rozdělit na průletové a pastové. Každý analyzátor má své výhody a omezení. Mezi důležité parametry hmotnostního analyzátoru patří: hmotnostní rozsah, rozlišení, účinnost, správnost hmoty, lineární dynamický rozsah, rychlost a citlivost [37, 40].

Často používaným analyzátozem je **kvadrupól (Q)**. Q je jednoduchý a poměrně levný analyzátor, který má uplatnění i u tzv. hybridních analyzátorů (spojení více typů analyzátorů v prostoru). Jeho konstrukci tvoří čtyři kovové tyče. Vždy na dvě protilehlé tyče je vkládáno stejnosměrné napětí (U) - na jeden pár kladné, na druhý pár záporné. Na všech čtyřech tyčích je zároveň přítomné i vysokofrekvenční střídavé napětí (V). Ionty ve středu kvadrupólu začnou oscilovat, přičemž pro určitý poměr U/V je oscilace stabilní pouze pro iont o určitém m/z , který je propouštěn na detektor. Změnou hodnot U a V jsou postupně propouštěny všechny ionty. Standard pro kvantitativní analýzy v MS představuje **trojitý kvadrupól (QqQ)** – tři tandemově uspořádané kvadrupóly [37, 40].

3.3.3 TANDEMOVÁ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS/MS) A TYPY ZÁZNAMŮ

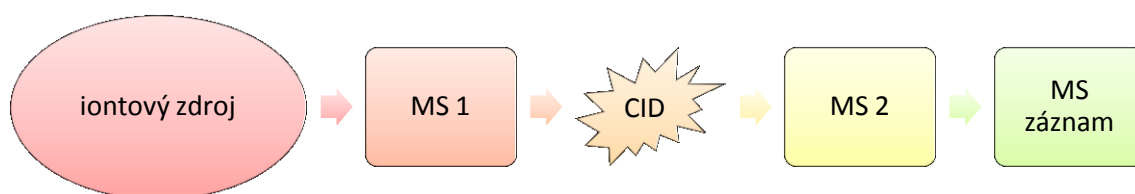
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) patří mezi důležité trendy v oblasti hmotnostních analyzátorů. Jedná se o spojení dvou či více hmotnostních analyzátorů. Důvodem spojení analyzátorů je fakt, že měkké ionizační techniky nejsou schopny poskytnout dostatečné informace o strukturních vlastnostech analytu. Výhoda tohoto spojení je především v získání informací o komplexních vzorcích – identifikace složek, jejich fragmentace, selektivní kvantifikace. Mezi běžně používané a relativně levné tandemové analyzátozem patří **trojitý kvadrupól (QqQ)** [37].

V rámci analýz komplexních vzorků má nezastupitelné místo spojení separační techniky a hmotnostní detekce (specifického detektoru). V bioanalytických studiích je spojení **UHPLC-MS** metodou první volby. Díky separaci látek jsou odstraněny interference látek. Separované látky mohou být identifikovány na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů. Díky MS detekci lze odhalit koeluci látek [37].

Nezastupitelné místo má UHPLC-MS rovněž v kvantitativní analýze. Často jsou používány vnitřní standardy značené stabilními izotopy (*stable isotopically labeled internal standard*, SIL-IS). SIL-IS je strukturně shodný s analytem a má stejné fyzikálně-chemické vlastnosti jako analyt, což se projeví koelucí obou složek. Rozdíl mezi nimi je pouze v hmotnostním posunu. Tento posun by měl být minimálně 3 hmotnostní jednotky, aby nedocházelo k interferencím signálu analytu a IS (tzv. „*cross-talk*“). Jejich nevýhodou je obtížná dostupnost a vysoká cena [37, 42, 43].

V závislosti na nastavení parametrů jednotlivých analyzátorů lze díky spojení LC-MS získat odlišné **MS záznamy**, které mohou sloužit pro získání kvalitativních nebo kvantitativních informací o vzorku. Typy MS záznamů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Přehled typů záznamů v MS a možnosti nastavení trojitého kvadrupólu [37].



Typ záznamu	MS 1	CID	MS 2	Typ skenu
MS sken	Skenuje	-	-	Kvalitativní
SIM	Fixní <i>m/z</i>	-	-	Kvantitativní
Sken produktových iontů	Fixní <i>m/z</i>	+	Skenuje	Kvalitativní
SRM	Fixní <i>m/z</i>	+	Fixní <i>m/z</i>	Kvantitativní
Sken prekurzorových iontů	Skenuje	+	Fixní <i>m/z</i>	Kvalitativní
Sken neutrálních ztrát	Skenuje	+	Skenuje	Kvalitativní (kvantitativní)

MS 1, MS 2 – analyzátoři, **CID** – kolizí indukovaná disociace, **SIM** – záznam jednoho nebo více iontů, **SRM** – záznam vybrané reakce.

MS sken – změření MS spektra, skenuje prekurzorové ionty v zadaném rozsahu *m/z*, neprobíhá fragmentace.

Záznam jednoho nebo více iontů (SIM) – záznam signálu/ů vybraného prekurzorového iontu/iontů v čase, neprobíhá fragmentace.

Sken produktových iontů – skenuje všechny produktové ionty vzniklé fragmentací vybraného prekurzorového iontu v kolizní cele.

Záznam vybrané reakce (SRM) – záznam fragmentační reakce vybraného prekurzorového iontu a jeho produktového iontu.

Sken prekurzorových iontů – záznam všech prekurzorových iontů, ze kterých mohl vzniknout určitý produktový iont (fragment).

Sken neutrálních ztrát – záznam všech prekurzorových iontů, které mohou mít vybranou neutrální ztrátu (např. ztráta hmoty 44 Da odpovídá ztrátě CO₂, je charakteristická pro karboxylové kyseliny) [37].

3.4 VALIDACE BIOANALYTICKÉ METODY

Kvantifikace léčiv v komplexních biologických matricích je zásadní aspekt ve výzkumu léčiv a během jejich klinického hodnocení, kdy jsou stanovovány mj. farmakokinetické parametry. Výsledky těchto výzkumů jsou jedny ze základních východisek pro rozhodování o bezpečnosti a účinnosti léčiv. Je proto žádoucí, aby použité metody pro kvantifikaci byly přesně charakterizovány a zdokumentovány. Validací bioanalytické metody je rozuměn soubor postupů a důkazů, kterými je možno prokázat spolehlivost metody pro stanovení analytu v biologické matrici. Validace následuje po fázi optimalizace metody [44, 45].

Pro správně provedenou validaci jsou zásadní předem vhodně vybrané validační parametry, stejně tak jako akceptační kritéria, která jasně definují hodnoty/rozmezí hodnot validačních parametrů. Mezi základní dokumenty pro validaci bioanalytických metod jsou směrnice EMA [44], směrnice FDA [45], a směrnice ICH [46]. Tyto směrnice doporučují validační parametry, jejich hodnoty a akceptační kritéria.

Dle směrnice EMA lze hlediska rozsahu provést plnou nebo částečnou validaci. Plná validace by měla být provedena při vývoji nové metody nebo u metody převzaté z literatury. Částečná validace může mít různý rozsah, který odráží provedené změny v metodě. Provádí se např. při přenosu metody do jiné laboratoře, při změně koncentračního rozmezí nebo při změně objemu vzorků [44].

Základními validačními parametry obecně jsou: selektivita, kalibrační rozsah se stanovenými limity kvantifikace (LOQ), správnost, přesnost, výtěžnost, matricové efekty a stabilita [47]. **Selektivita** metody (*selectivity*) vyjadřuje schopnost metody poskytnout kvalitativní i kvantitativní informace o analytu nebo analytech v přítomnosti interferujících složek matrice. **Kalibrační rozsahem** (*calibration range*) je míněn takový koncentrační rozsah, pro nějž byla prokázána správnost a přesnost dané metody. Toto koncentrační rozmezí je zpravidla ohraničeno **dolní mezí kvantifikace** (*lower limit of quantification, LLOQ*) a **horní mezí kvantifikace** (*upper limit of quantification, ULOQ*). **Správnost** metody (*accuracy*) vyjadřuje blízkost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou (případně známou skutečnou hodnotou) za předem daných podmínek. Je vyjádřena jako chyba výsledku (*error of result*, rozdíl mezi přijatou referenční a naměřenou hodnotou) nebo jako odchylka (*bias*, rozdíl mezi přijatou referenční hodnotou a průměrem naměřených hodnot). **Výtěžnost** (*recovery*) je vyjádřena jako poměr mezi přijatou referenční hodnotou a množstvím analytu, které bylo ve vzorku zachováno během jednotlivých kroků analýzy, především při přípravě vzorků. **Přesnost** metody (*precision*) definuje míru shody mezi vzájemně nezávisle naměřenými hodnotami za předem daných podmínek. Je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka naměřených hodnot [44, 46, 48].

Dalšími parametry, které lze v rámci validace hodnotit jsou: stabilita, vliv zředění vzorku na jeho integritu, a přenos analytu. Hodnocení stability je nutné pro posouzení, zda budou v biologické matrici zachovány kvalitativní a kvantitativní vlastnosti analytu během skladování. Vyhodnocení vlivu zředění vzorku (*dilution integrity*) na jeho integritu má zajistit, zda bude při různém zředění vzorku zachována přesnost a správnost metody. Přenos analytu (*carry-over*) je definován jako změna koncentrace vzorku díky zbytkovému množství analytu, který zůstal v nástřikovém systému po předchozím nástřiku vzorku s vyšší koncentrací analytu [44, 46]. Validační parametry a doporučená akceptační kritéria jednotlivých směrníc jsou shrnuta v tabulce 4. Je patrné, že se jednotlivé validační parametry a jejich akceptační kritéria u jednotlivých směrníc sjednotily. Tím se předejde zmatkům, které mohou vznikat při nejednotnosti validačních parametrů bioanalytických metod.

Tabulka 4. Přehled validačních parametrů jednotlivých směrnic (převzato a upraveno dle[49]).

Parametr	EMA	FDA	ICH M10
Selektivita	+	+	+
Přenos analytu	+	+	+
LOQ (limit of quantification)	LLOQ, ULOQ	LLOQ, ULOQ	LLOQ, ULOQ
Kalibrační rozsah	6 ± 15%, LLOQ ±20%	6 ± 15%, LLOQ ±20%	6 ± 15%, LLOQ ±20%
Správnost [%]	4 x 5 *	4 x 5 *	4 x 5 *
Přesnost [% RSD]	4 x 5 *	4 x 5 *	4 x 5 *
Výtěžnost [%]	-	+	-
Matricové efekty	6 (≤ 15 %)	6 (≤ 15 %, LOQ≤20%)	6 (≤ 15 %)
Stabilita	+	+	+
Integrita zředění	+	-	+

+ požadovaný parametr, - parametr, který není požadován

* 4 koncentrační hladiny x 5 vzorků

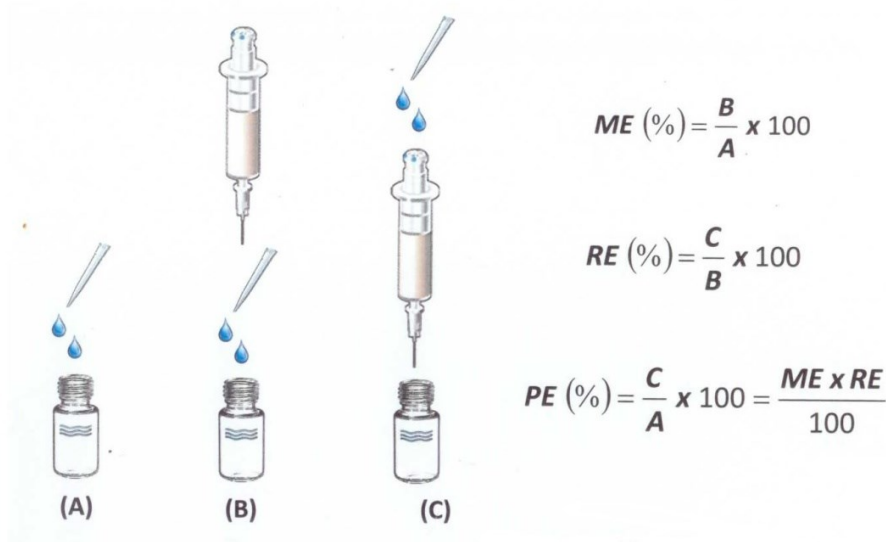
Kvantitativní hodnocení analytu probíhá na základě určení plochy píku eluované látky. Nejčastěji je používána metoda vnitřního standardu (*internal standard, IS*).

Do iontového zdroje vstupují i ostatní složky matrice, které jsou ionizovány a mohou přispívat k zesílení nebo potlačení signálu analytu, který je získán u standardního roztoku analytu. **Matricové efekty** (*matrix effects, ME*) jsou vlivy všech složek vzorku (vyjímaje analyt) na proces stanovení analytu [42, 48, 50].

ME mají vliv na identifikaci i kvantifikaci analytu. Mohou ovlivnit citlivost, selektivitu, správnost, přesnost i linearitu metody. Mohou vznikat díky přítomnosti endogenních složek vzorku, které nejsou odstraněny během přípravy vzorku (soli, polární látky, nemonitorované či neznámé metabolity, strukturně podobné látky, lipidy, a další), nebo díky zbytkovým chemikáliím, které byly použity při extrakci (pufry, organická rozpouštědla), nebo díky sekundárním látkám, které se do vzorku dostaly během extrakčním postupu (zbytky polymerů, ftaláty) [42, 51].

ME lze hodnotit jako absolutní (ME pro konkrétní analyt a vzorek) nebo relativní (porovnání hodnot ME mezi jednotlivými vzorky). Pro hodnocení ME existují

tři základní přístupy. Metoda postextrakčního přidavku (obrázek 7) je založená na kvantitativním hodnocení variability mezi standardním roztokem analytu s IS v mobilní fázi (vzorek A), a blankovou maticí obohacenou analytem a IS poté, co byla upravena dle metody přípravy vzorku (vzorek B). ME jsou vyjádřeny jako poměr mezi vzorky B a A [42, 52].



Obrázek 7. Postup pro vyhodnocení matricových efektů. ME – matricové efekty, RE – výtěžnost metody, PE – účinnost procesu zpracování vzorku [42].

Druhou metodou hodnocení ME je porovnávání směrníc kalibračních křivek. Využívá se především pro hodnocení relativních ME v biologických vzorcích. ME jsou vypočítány na základě odchylky směrníc matricových kalibračních přímků jedné biologické matrice (např. plazma, moč), přičemž tato matrice pochází z více zdrojů. Při zesílení signálu dochází k růstu hodnoty směrnice, při zeslabení signálu dochází ke snížení hodnoty směrnice [42, 53].

Třetí metoda byla původně vyvinuta pro hodnocení potlačení signálu ionizací elektrosprejem v tandemové MS (ESI-MS/MS), ke kterému dochází díky endogenním látkám plazmy. Jedná se o metodu post-kolonové infúze, která umožňuje přímo pozorovat časový profil a rozsah změn v signálu analytu při přítomnosti interferujících látek. Infúze roztoku analytu/analytů je přiváděna do postkolonového prostoru, konstantní průtok zajistí stabilní odezvu detektoru. Na koloně jsou separovány složky matrice vzorku, které svým vstupem do detektoru mohou vyvolat změnu stabilního signálu analytu [42, 54].

Existují různé přístupy, jak eliminovat nebo snížit vliv matrice v LC-MS v jednotlivých krocích analýzy. Jejich přehled je shrnut v tabulce 5 [42].

Tabulka 5. Možnosti eliminace/snížení vlivu matrice v LC-MS [42].

Fáze analýzy	Redukce ME	Příklady realizace
Příprava vzorku	Důkladné přečištění Vyšší selektivita Zředění vzorku	SPE, RAM, LLE SPE, MIP, imunoafinní SPE
Chromatografie	Vyšší separační účinnost Nano-LC, Micro-LC Změna selektivity Gradientová eluce	UHPLC 2D-LC SF, MF, HILIC
Hmotnostní spektrometrie	Typ a geometrie iontového zdroje Vyšší selektivita Ionizační techniky méně náchylné k ME	Záznam negativních iontů APPI, APCI, EI-MS

SPE - extrakce na tuhou fázi, **RAM** – materiály s omezeným přístupem, **LLE** – extrakce z kapaliny do kapaliny, **MIP** – molekulárně vtištěný polymer, **2D-LC** – dvoudimenzionální kapalinová chromatografie, **Nano-LC** – miniaturizovaná kapalinová chromatografie, **Micro-LC** – mikrochromatografický systém v kapalinové chromatografii, **SF** – stacionární fáze, **MF** – mobilní fáze, **HILIC** – hydrofilní interakční chromatografie, **APPI** – fotoionizace za atmosférického tlaku, **APCI** – chemická ionizace za atmosférického tlaku, **EI** – elektronová ionizace.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

4.1.1 STANDARDNÍ LÁTKY

- maravirok (MedChemExpress, Monmouth Junction, USA)
- d₆-maravirok (Toronto Research Chemicals, North York, Kanada)

4.1.2 ROZPOUŠTĚDLA, CHEMIKÁLIE

- acetonitril (ACN), LC-MS Chromasolv[®], (Honeywell, Praha, ČR)
- dichlormetan (DCM), (Sigma Aldrich, Praha, ČR)
- etylacetát Chromasolv[™] (Honeywell, Praha, ČR)
- kyselina mravenčí ≥ 99%, (Honeywell, Praha, ČR)
- hexan Chromasolv[®] (Honeywell, Praha, ČR)
- heptan Chromasolv[®] (Honeywell, Praha, ČR)
- metanol, LC MS Barker analysed[®], (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice, ČR)
- dusík (Linde, Praha, ČR)
- terc-butylmetyléter (TBME), (VWR Chemicals, Stříbrná Skalice, ČR)
- ultračistá voda, vyrobená na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Mili-Q, Millipore
- Earlovův pufr (složení tabulka 6), připraven na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK
- perfúzní médium (tabulka 7), připraveno na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK

Tabulka 6. Složení Earlova pufru.

Látka	Množství [g/l]
NaCl	6,80
KCl	0,40
NaH ₂ PO ₄	0,14
MgSO ₄	0,20
NaHCO ₃	2,20
CaCl ₂	0,20

Tabulka 7. Složení perfúzního média.

Látka	Množství na 1 l perfúzního média
D-glukóza	1,33 g/l
Amoxicilin	0,25 g/l
Dextran	10 g/l
DMEM médium	666 ml
Earlův pufr	333 ml

4.1.3 PŘÍSTROJE

- Acquity UPLC™ systém (Waters, Milford, USA)
- Hmotnostní analyzátor typu QqQ Quattro Micro (Waters, Manchester, UK)
- Software MassLynx (Waters, Milford, USA)
- chromatografická kolona Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) (Waters, Milford, USA)
- manuální pipety Reference® 2 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- analytické váhy Sartorius ME5-OC (Sartorius, Goettingen, Německo)
- minitřepačka IKA® MS3 basic (IKA, Staufen, Německo)
- termotřepačka s chlazením Thermo-Shaker TS100c (Biosan, Riga, Litva)
- centrifuga Hettic® Mikro 220R (DJB Labcare, Newport Pagnell, UK)
- systém pro odpařování dusíkem

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

4.2.1 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ

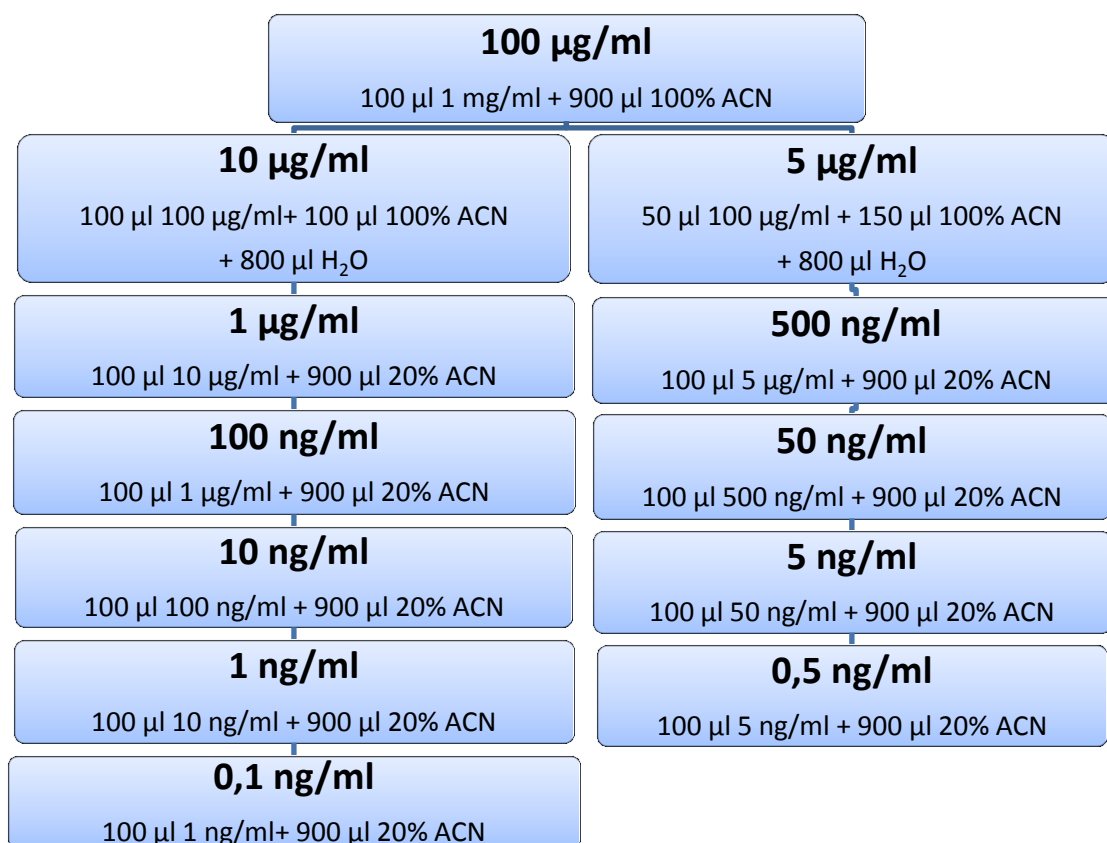
Zásobní roztoky MVC a šesti deuterii značeného MVC (d₆-MVC) byly připraveny navážením 1 mg a rozpuštěním v 1 mililitru ACN. Výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Roztoky byly skladovány v lednici.

4.2.2 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

Pracovní roztoky byly připravovány ředěním zásobních roztoků. Z obou zásobních roztoků (roztok MVC a d₆-MVC) byly připraveny pracovní roztoky o

koncentraci 100 µg/ml (100 µl roztoku o koncentraci 1 mg/ml bylo smíseno s 900 µl 100% ACN).

Standardní roztoky MVC pro měření kalibrační křivky byly připravovány postupným ředěním ve dvou řadách: desítkové a pětkové. V obou řadách ředění probíhalo od nejvyšší po nejnižší koncentrace. Desítková řada začínala ředěním standardního roztoku 10 µl/ml (100 µl roztoku o koncentraci 100 µg/ml se smísilo se 100 µl 100% ACN a 800 µl vody). Postupné ředění standardních roztoků o nižších koncentracích probíhalo mísením 100 µl roztoku s o řádem vyšší koncentrací, s 900 µl roztoku 20% ACN. Pětková řada začínala ředěním standardního roztoku 5 µg/ml (50 µl roztoku o koncentraci 100 µg/ml se smísilo se 150 µl 100% ACN a 800 µl vody). Schéma ředění je zobrazeno na obrázku 8.



Obrázek 8. Schéma ředění standardních roztoků pro přípravu kalibrační křivky.

Rozpouštědlem pro pracovní roztoky byl vodný roztok 20% ACN (poměr H₂O:ACN, 8:2). Tento poměr se ukázal jako nejvýhodnější při posuzování vlivu organického rozpouštědla na odezvu detektoru a tvar píku.

Příprava standardních roztoků pro matricové kalibrační křivky, které byly připravovány metodou LLE, probíhala obdobně. Místo 20% ACN však byl použit Earlov pufr nebo perfúzní médium. Roztok s nejvyšší koncentrací 10 µg/ml byl připraven smísením 10 µl roztoku o koncentraci 1 mg/ml a 990 µl pufru. Obdobně roztok o koncentraci 5 µg/ml byl připraven smísením 50 µl roztoku o koncentraci 100 µg/ml s 950 µl pufru. Cílem bylo omezit přítomnost ACN v roztocích a zachovat stávající složení pufru.

4.2.3 PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE

Jako mobilní fáze A pro gradientovou eluci byl použit 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (0,5 ml kyseliny mravenčí a ultračistá voda doplněna po rysku odměrné baňky o objemu 500 ml). Byl připravován vždy v den analýzy.

4.3 OPTIMALIZACE UHPLC-MS/MS METODY

UHPLC separace probíhala na analytické koloně Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) pro reverzní chromatografii, gradientová eluce s mobilními fázemi A (0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí) a B (100% ACN) o průtoku 0,35 ml/min, a objem nástřiku vzorku 5 µl. Jako silná oplachová kapalina byl použit 100% ACN, jako slabá oplachová kapalina byl použit 10% vodný roztok ACN.

Pro ionizaci látek byla použita metoda ESI. Byla ověřena intenzita signálu v pozitivním módu (ESI⁺) i v negativním (ESI⁻). Teplota zdroje byla nastavena na 130 °C. Pro hodnocení vybraných parametrů byly použity standardní roztoky o koncentraci 1 µg/ml. U každého vzorku byly provedeny dva nástřiky. Přehled optimalizovaných parametrů iontového zdroje, rozsah a výběr hodnot jsou shrnuty v tabulce 8.

Po optimalizaci parametrů iontového zdroje byly vybrány produktové ionty pro kvantifikační analýzu (výběr SRM přechodů). Pro každý fragment byla optimalizována kolizní energie v rozsahu 5 – 40 eV. Kolizním plynem byl argon.

Tabulka 8. Přehled optimalizovaných parametrů iontového zdroje, rozsah a výběr hodnot.

Optimalizovaný parametr	Rozsah hodnot	Vybrané hodnoty
Napětí na kapiláře [kV]	1,0 – 4,0	1,0
Napětí na vstupním kuželu [V]	5 – 50	35
Napětí na extraktoru [V]	0 – 15	3
Napětí na RF čočce [V]	0,0 – 5,0	0,1
Průtok desolvatačního plynu [l/h]	200 – 1000	1000
Teplota desolvatace [°C]	150 – 450	450
Průtok plynu na vstupním kuželu [l/h]	0 – 200	100

4.4 OPTIMALIZACE METODY PRO PŘÍPRAVU VZORKU

Jako metoda volby pro přípravu vzorků byla zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny (*liquid liquid extraction*, LLE). Pro optimalizaci LLE byly použity vzorky MVC o koncentraci 100 ng/ml. Rozpouštědlem byl Earlov pufr, který tvořil základ perfúzního média. Pro každou analýzu byly připraveny dva vzorky a z každého vzorku provedeny tři nástříky.

Nejprve byl optimalizován typ extrakčního rozpouštědla. Byla zkoušena následující rozpouštědla: etylacetát, TBME, DCM, heptan, hexan, heptan:DCM (v poměrech 9:1 a 8:2), hexan:DCM (v poměrech 9:1 a 8:2). Roztok MVC v Earlově pufru/perfúzním médiu o koncentraci 100 ng/ml a objemu 0,5 ml byl přidán k extrakčnímu rozpouštědlu. Směs byla 5 minut protřepávána, poté vložena do centrifugy. Doba centrifugace byla 5 min, rychlost byla 14 000 RPM. Poté bylo odebráno 0,5 ml extrakčního rozpouštědla a odpařeno pod proudem dusíku. Následně byl zbytek po odpaření rekonstituován ve 20% ACN.

Další optimalizace probíhala pouze se dvěma rozpouštědly, která měla největší výtěžnost MVC, tj. nejvyšší poměr obsahu MVC ve vzorku, který prošel extrakcí ku standardnímu roztoku o stejné koncentraci. Optimalizované parametry LLE a finální podmínky LLE jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9. Rozsah optimalizovaných hodnot a finální podmínky LLE.

Parametr	Rozsah optimalizovaných hodnot	Finální podmínky LLE
Extrakční rozpouštědlo	TBME, etylacetát, hexan, heptan, DCM, poměr hexan:DCM (9:1, 8:2), poměr heptan:DCM (9:1, 8:2)	DCM
Poměr vzorek:extrakční rozpouštědlo	1:1; 1:2; 1:3	1:2
Doba extrakce [min]	5 - 30	10 minut
Intenzita třepání [RPM]	250 - 1400	1400 RPM
Teplota při extrakci [°C]	10 - 50	30°C
Odebraný objem rozpouštědla s extrahovaným MVC	-	0,5 ml
Rekonstituční rozpouštědlo	-	H ₂ O:ACN (8:2)
Objem rekonstitučního rozpouštědla	-	0,5 ml

4.5 VALIDACE METODY

Po optimalizaci byla metoda validována podle směrnice EMA [44]. V rámci validace byla hodnocena správnost, přesnost, linearita, limit detekce a kvantifikace, kalibrační rozmezí, a matricové efekty. Správnost a přesnost byla vyhodnocena na pěti koncentračních hladinách (1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml a 1000 ng/ml). Přesnost byla dále vyhodnocena na základě opakovatelnosti směrnic tří standardních a čtyř matricových kalibračních křivek. Linearita byla hodnocena na základě tří matricových kalibračních křivek v koncentračním rozmezí 1 – 1000 ng/ml. Dále byly stanoveny LLOQ a LOD. Matricové efekty byly hodnoceny na čtyřech koncentračních úrovních (1 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml a 1000 ng/ml).

Vzorky pro validaci byly připravovány s využitím optimalizované metody LLE. Pro kvantitativní analýzu byl do všech roztoků přidáván isotopicky značený vnitřní standard d₆-MVC v množství 100 ng/ml.

V rámci validace byl proveden i test vhodnosti chromatografického systému, který je požadován Českým lékopisem 2017. Parametry pro test vhodnosti chromatografického systému (*system suitability test*, SST) byla opakovatelnost retenčního času MVC a ploch píků. Opakovatelnost byla vyhodnocena na třech

koncentračních úrovních (1000 ng/ml, 100 ng/ml a 10 ng/ml) ve dvanácti po sobě jdoucích měření. Byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka [55].

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

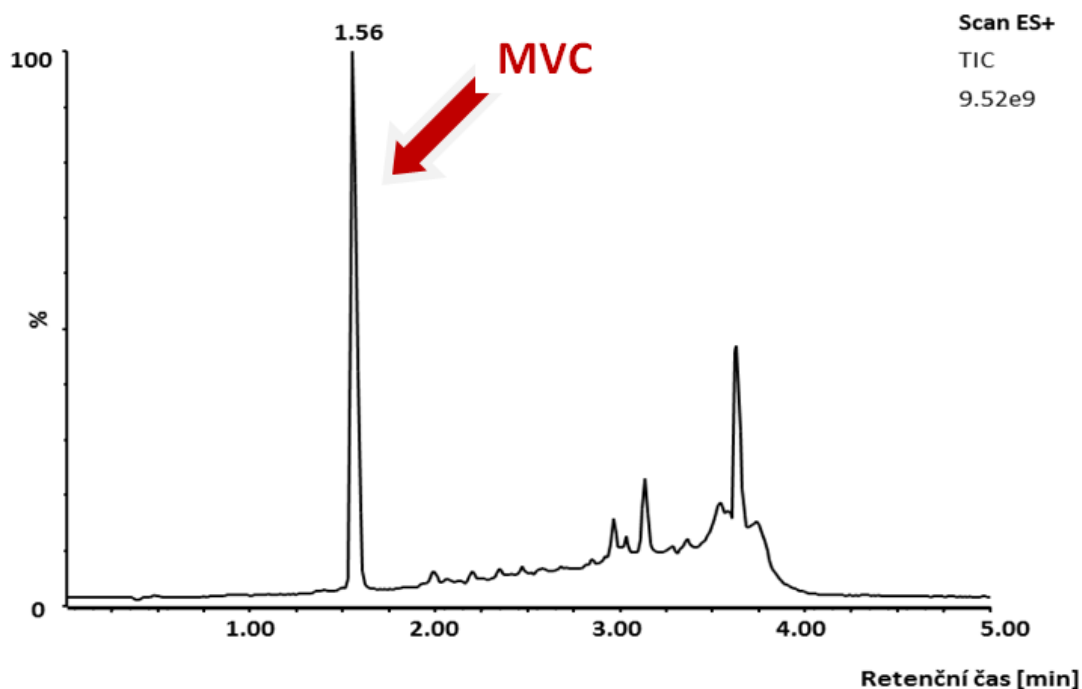
5.1 OPTIMALIZACE UHPLC-MS/MS METODY

Pro UHPLC metodu byl zvolen systém reverzních fází. Byla použita kolona Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm). Gradientová eluce byla zvolena, aby zabránila kontaminaci kolony a zlepšila účinnost separace. Dalším důvodem byla separace interferujících látek, které nebyly odstraněny během LLE. Jako vodná složka mobilní fáze byl použit 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí, která snížila pH vodné fáze a jako těkavé aditivum v nízké koncentraci usnadňovala ionizaci analytu v iontovém zdroji. Organickou složkou mobilní fáze byl 100% ACN, který jako těkavé rozpouštědlo byl kompatibilní s hmotnostním detektorem. Souhrn parametrů UHPLC shrnuje tabulka 10.

Tabulka 10. Podmínky pro UHPLC analýzu.

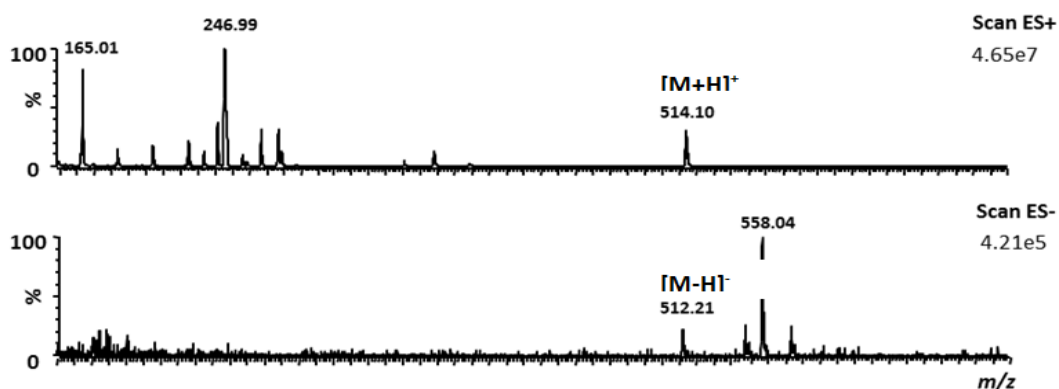
Parametr	Hodnota		
Mobilní fáze	A: 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí B: ACN		
Gradientová eluce	Čas	MF A	MF B
	0 min	95	5
	3 min	5	95
	3,1 min	95	5
	5 min	95	5
Průtok mobilní fáze	0,35 ml/min		
Dávkovaný objem	5 µl		
Teplota kolonového termostatu	40 °C		
Teplota autosampleru	10°C		

Retenční čas MVC byl 1,56 minut. Nastříkovan byl vzorek o koncentraci 1 µg/ml, rozpouštědlem byl 20% ACN. Chromatogram celkového iontového proudu je uveden na obrázku 9.



Obrázek 9. Chromatogram celkového iontového proudu standardního roztoku MVC o koncentraci 1 µg/ml.

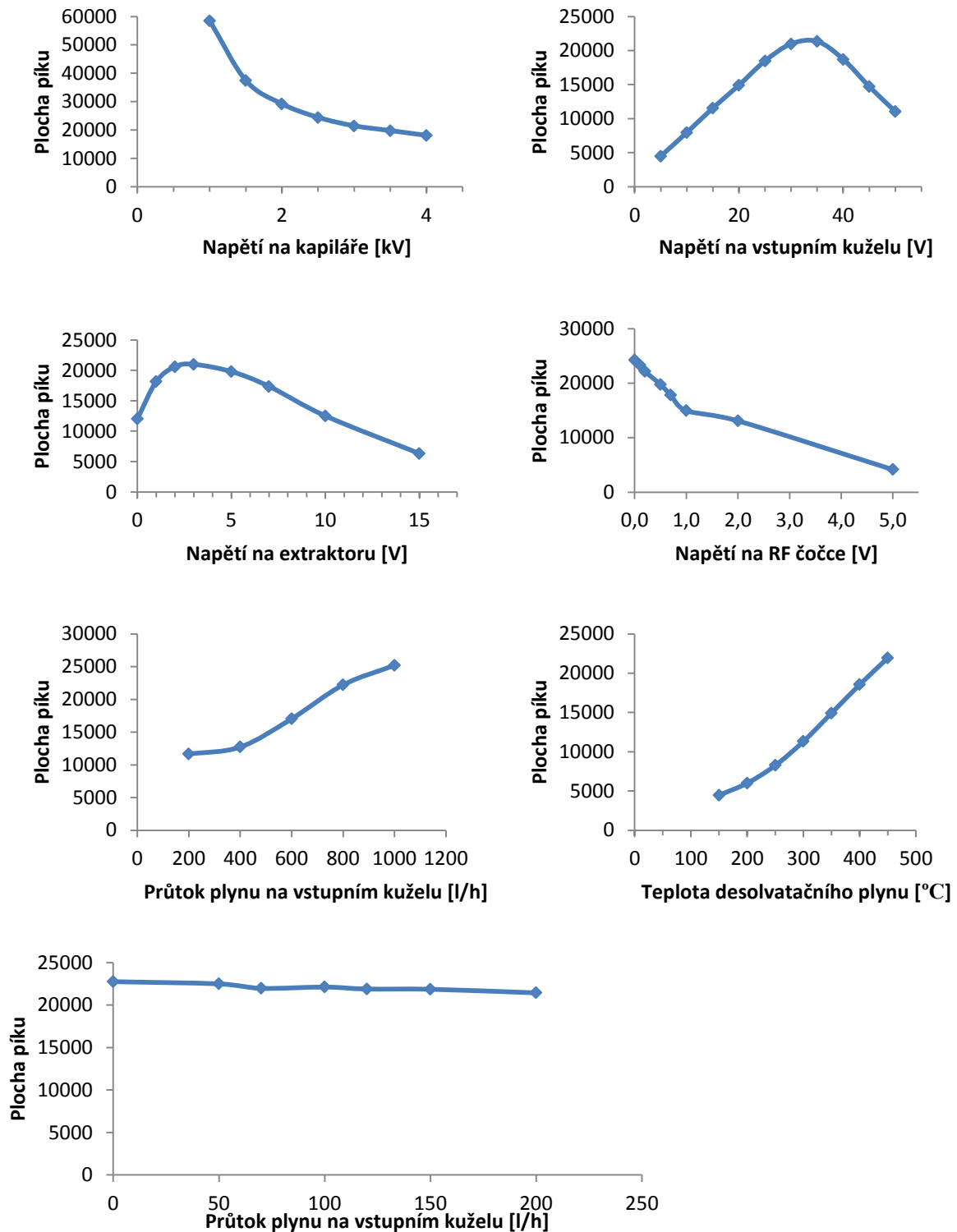
Pro ionizaci v iontovém zdroji byla použita metoda ESI. MVC je slabě bazická látka, proto bylo předpokládáno, že větší intenzita signálu bude získána v pozitivním módu ESI (obrázek 10). Předpoklad byl potvrzen. V pozitivním módu bylo dosaženo o dva řády vyšší intenzity signálu. Pro další analýzu byl zvolen ESI⁺ mód.



Obrázek 10. MS spektrum v pozitivním a negativním módu ESI.

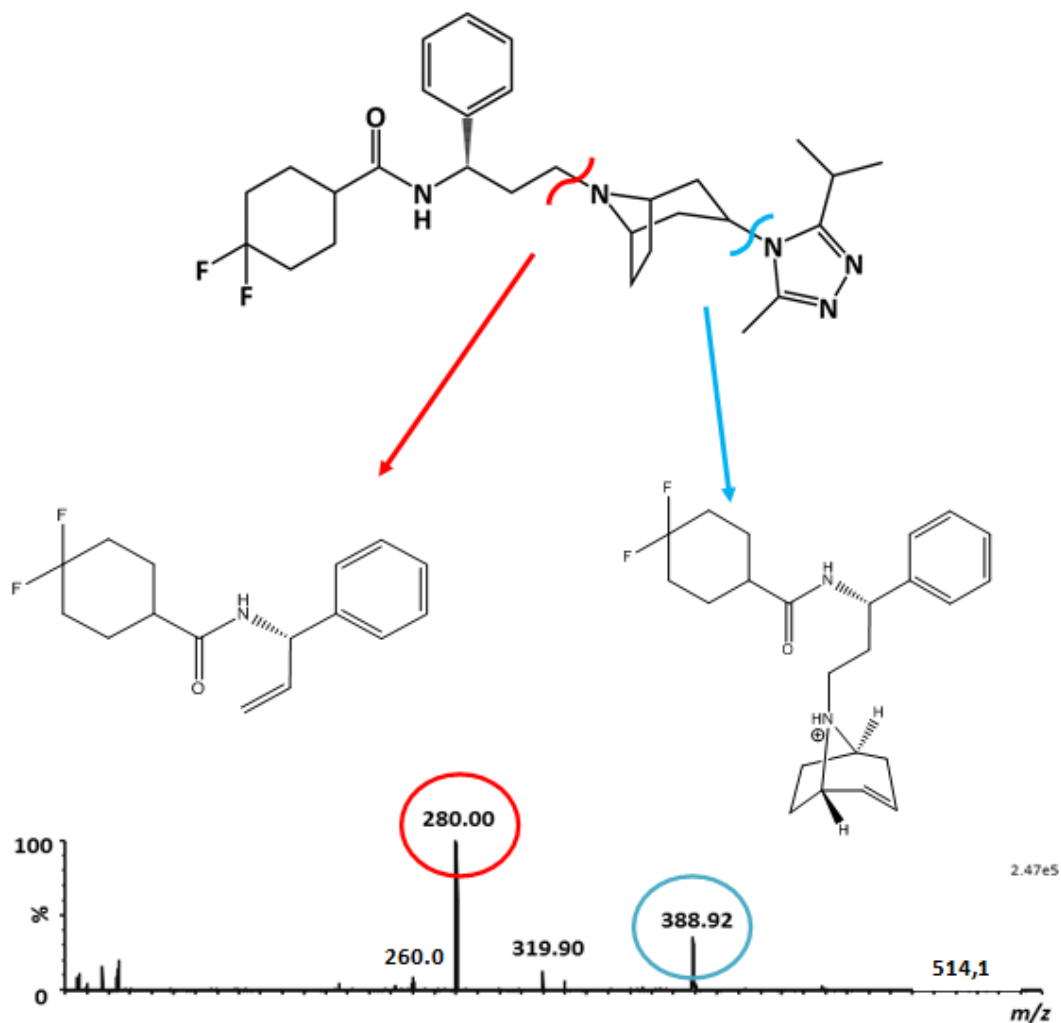
Dalším krokem byla optimalizace vybraných parametrů iontového zdroje s cílem dosažení co nejúčinnější ionizace analytu a nejvyšší možné intenzity signálu. U každého

vzorku byly provedeny dva nástřiky. Výsledky optimalizace parametrů iontového zdroje jsou shrnuty na obrázku 11. Nastavení finálních parametrů iontového zdroje pro analýzu je uvedeno v tabulce 8 (viz kapitola 4.3).



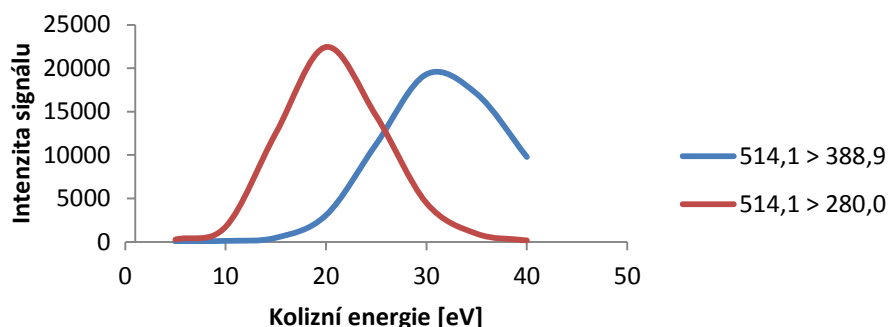
Obrázek 11. Naměřené hodnoty vybraných parametrů během optimalizace parametrů iontového zdroje.

Poslední fází optimalizace nastavení MS detektoru byl výběr fragmentů pro SRM. Na základě skenu produktových iontů byly identifikovány čtyři fragmenty molekuly MVC ($m/z = 388,9$; $m/z = 280,0$; $m/z = 319,9$; $m/z = 260,0$). Dva fragmenty s nejintenzivnějším signálem byly použity jako SRM přechody v rámci kvantitativní analýzy: SRM1 = 388,9; SRM2 = 280,0. Vznikají odštěpením substituovaného triazolu ($m/z = 388,9$) nebo celého tropanového jádra i s triazolem ($m/z = 280,0$). Sken produktových iontů s naznačením fragmentace je uveden na obrázku 12.



Obrázek 12. Sken produktových iontů se dvěma nejintenzivnějšími fragmenty molekuly MVC a schéma předpokládané fragmentace (struktura fragmentů dle [56]).

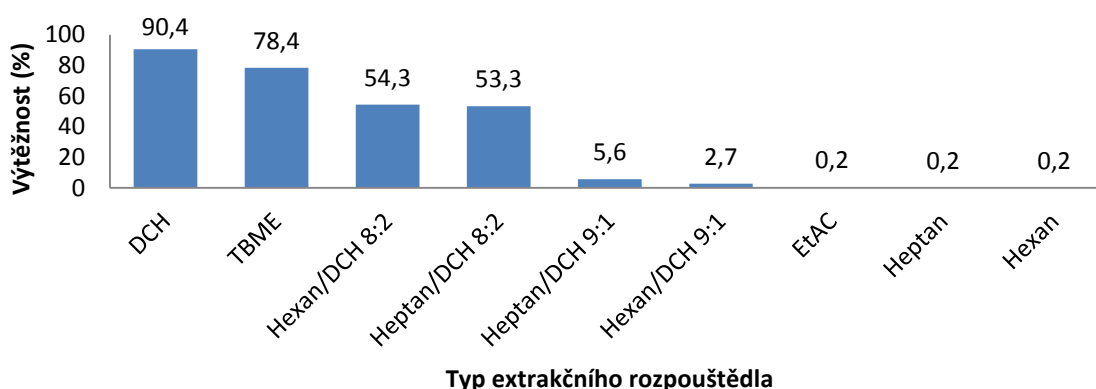
Pro tyto dva fragmenty byly hledány optimální energie kolize, při kterých jsou získány nejintenzivnější signály. Pro SRM 1 (fragment $m/z = 388,9$) byl nejintenzivnější signál při energii 20 eV, pro SRM 2 (fragment $m/z = 280,0$) byla zvolená optimální energie 30 eV (obrázek 13).



Obrázek 13. Optimalizace kolizní energie pro přechody SRM1 ($m/z = 388,9$) a SRM2 ($m/z = 280,0$).

5.2. OPTIMALIZACE METODY PRO PŘÍPRAVU VZORKU

Vzhledem k vysoké koncentraci anorganických solí v perfúzním médiu byla jako metoda pro přípravu vzorku zvolena LLE. Extrakce probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 4.4. Prvním krokem optimalizace byla volba vhodného extrakčního rozpouštědla pro MVC. Byla zvolena rozpouštědla nemísitelná s vodou s různými stupni polaritity – od silně nepolárních (hexan, heptan) po středně polární (DCM, TBME, etylacetát). Vyhodnocení probíhalo na základě výtěžnosti [%], tj. poměru mezi stanoveným množstvím v rekonstituovaném vzorku a blankové matrici, která prošla zpracováním a byla následně obohacena MVC a IS (výpočet viz kapitola 3.4.1, obrázek 7). Výsledky jsou shrnuty na obrázku 14.

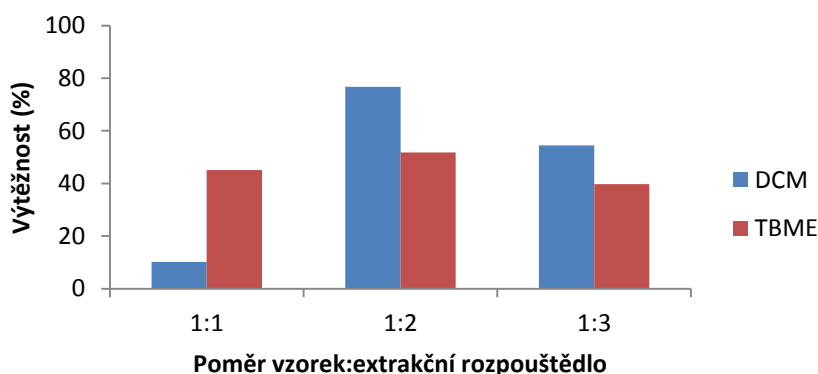


Obrázek 14. Vliv extrakčního rozpouštědla na výtěžnost MVC při LLE z Earlova pufru. DCH - dichlormetan, TBME – terc-butylmetyléter, EtAC – etylacetát.

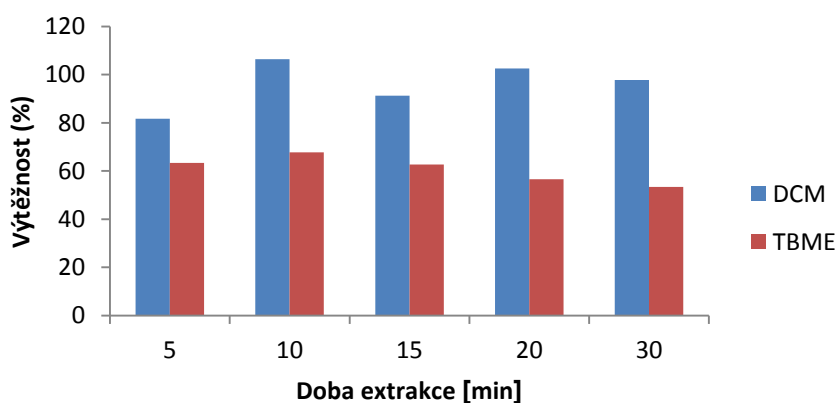
Z výsledků je patrné, že nejvyšší výtěžnost byla získána při použití DCM a TBME. Při použití silně nepolárních rozpouštědel k extrakci téměř nedochází. V kombinaci

s polárnější složkou, např. DCM, výtěžnost mírně stoupá. Na druhé straně polárnější rozpouštědlo etylacetát také není vhodný. Jako extrakční rozpouštědlo pro optimalizaci dalších parametrů byl použit DCM a TBME.

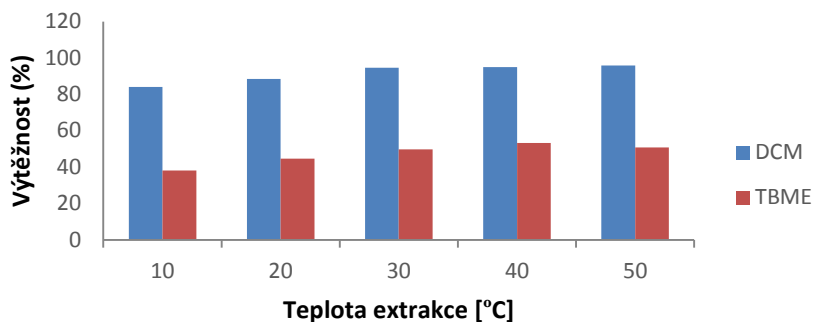
Dalšími optimalizovanými parametry byl poměr vzorku a extrakčního rozpouštědla, teplota během extrakce, intenzita třepání a doba extrakce. Extrakce byla neúčinnější při použití dvou dílů rozpouštědla ku jednomu dílu vzorku (obrázek 15). Nárůst výtěžnosti byl patrný u doby extrakce 10 minut, poté výtěžnost klesala (obrázek 16). Teplota (obrázek 17) a intenzita třepání (obrázek 18) byly parametry, které neměly výrazný vliv na výtěžnost. Souhrn parametrů optimalizované metody LLE je uveden v tabulce 11.



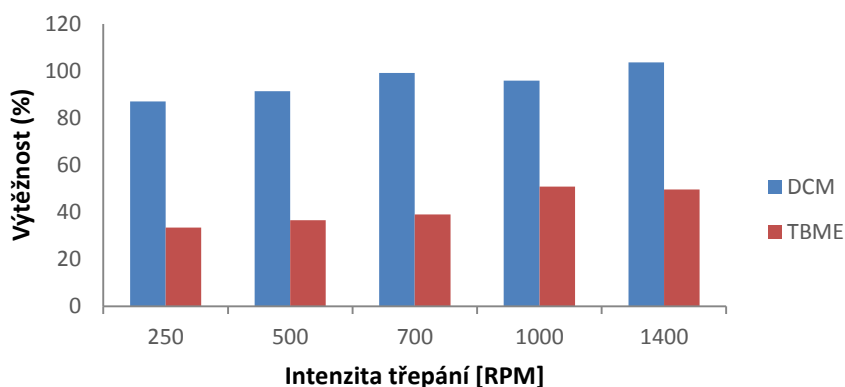
Obrázek 15. Vliv poměru objemu vzorku a rozpouštědla na výtěžnost MVC při LLE z perfúzního média.



Obrázek 16. Vliv doby extrakce na výtěžnost MVC při LLE z perfúzního média.



Obrázek 17. Vliv teploty extrakce na výtěžnost MVC při LLE z perfúzního média.



Obrázek 18. Vliv intenzity třepání na výtěžnost MVC při LLE z perfúzního média.

V rámci optimalizace metody pro přípravu vzorku byly připraveny dvě matricové kalibrační řady. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit DCM pro jednu, TBME pro druhou kalibrační řadu. Vzorky nebyly obohaceny vnitřním standardem. Cílem bylo ověření linearity. Lepší linearity bylo dosaženo u kalibrační řady extrahované do DCM (tabulka 11). Díky výrazně vyšší výtěžnosti a lepší linearitě kalibrační přímky byl pro validaci metody zvolen DCM jako extrakční rozpouštědlo.

Tabulka 11. Porovnání parametrů matricových kalibračních křivek.

Extrakční činidlo	Přechod	Rovnice	Korelační koeficient (r^2)
DCM	SRM1	$y=0,955124x+3,52882$	0,9980
	SRM2	$y=0,958293x+3,67276$	0,9948
TBME	SRM1	$y=0,907409x+3,04883$	0,9905
	SRM2	$y=0,917046x+3,25197$	0,9915

5.3 VALIDACE METODY

5.3.1 TEST VHODNOSTI SYSTÉMU

Test vhodnosti systému byl hodnocen na základě opakovatelnosti ploch píků a retenčního času MVC. Opakovatelnost metody byla vyhodnocena na třech koncentračních hladinách. Na každé koncentrační hladině byl připraven jeden vzorek a provedeno dvanáct nástřiků. RSD ploch píků se u jednotlivých koncentrací pohybuje $\leq 5,0$ %, RSD retenčních časů byla 0,00 % (tabulka 12).

Tabulka 12. Opakovatelnost nástřiků hodnocená na základě ploch píků a retenčních časů.

Koncentrační úroveň	Plocha píků			Retenční čas		
	průměr	SD	RSD [%]	průměr	SD	RSD [%]
1000 ng/ml	47374,62	590,51	1,25	1,56	0,00	0,00
100 ng/ml	5239,43	136,83	2,61	1,56	0,00	0,00
10 ng/ml	529,56	26,22	4,95	1,56	0,00	0,00

5.3.2 VALIDACE METODY

Validační parametry byly ověřovány s využitím matricových vzorků. Byla použita metoda vnitřního standardu.

Přesnost a správnost

Validační parametry správnost a přesnost byly hodnoceny na pěti koncentračních úrovních. Pro každou koncentrační hladinu bylo připraveno šest vzorků, z nichž byly provedeny dva nástřiky. Tři koncentrační úrovně spadaly do intervalu spodních hodnot, jedna do středních hodnot, a jedna do horních hodnot kalibračního rozmezí. Limitní hodnoty dle směrnice EMA nebyly překročeny. Přesnost (vyjádřená jako RSD %) u žádné z pěti koncentračních hladin nepřekročila 15%. Správnost (vyjádřená jako odchylka %) byla u čtyř hladin $\leq 15\%$, v případě LLOQ (1 ng/ml) byla $\leq 20\%$. Souhrn výsledků je uveden v tabulce 13.

Tabulka 13. Správnost a přesnost metody.

Validační parametr	Koncentrační hladina [ng/ml]				
	1000	500	50	2,5	1
Přesnost [RSD %]	1,7	2,7	2,6	13,0	8,1
Správnost [%]	-0,6	+0,4	+3,3	+13,5	+17,5

Přesnost metody (vyjádřená jako RSD %) byla dále vyhodnocena jako opakovatelnost směrníc kalibračních přímek. Pro hodnocení byly připraveny dva typy kalibračních přímek: tři standardní kalibrační přímky (MVC ve 20% ACN) a čtyři matricové kalibrační přímky (DCM jako extrakční rozpouštědlo). Dle očekávání bylo lepší opakovatelnosti dosaženo u standardních kalibračních přímek (RSD = 1,22%) než u matricových (RSD = 5,02%). Souhrn výsledků opakovatelnosti směrníc kalibračních přímek je uveden v tabulce 14.

Tabulka 14. Opakovatelnost standardních a matricových kalibračních přímek.

Kalibrační přímky			
Standardní	Hodnota směrnice	Matricové	Hodnota směrnice
1.	0,966852	1.	0,955124
2.	0,971419	2.	0,931487
3.	0,949233	3.	0,997645
		4.	1,043320
průměr hodnot směrníc	0,962501	průměr hodnot směrníc	0,981894
SD	0,01	SD	0,05
RSD [%]	1,22	RSD [%]	5,02

Linearita, stanovení LLOQ a LOD, kalibrační rozmezí

Pro hodnocení linearity byly použity stejné kalibrační přímky jako u parametru opakovatelnosti kalibračních přímek. LLOQ byl stanoven na 1 ng/ml, LOD byl 0,3 ng/ml. Kalibrační rozmezí bylo stanoveno v rozsahu 1-1000 ng/ml. Linearita byla posuzována na základě korelačního koeficientu (r^2). U všech standardních kalibračních přímek se korelační koeficient pohyboval $\geq 0,999$. U matricových kalibračních přímek se korelační koeficient pohyboval v rozmezí 0,9917-0,9983, tj. ve všech případech byl $> 0,99$. Souhrn parametrů kalibrace je v tabulce 15.

Tabulka 15. Souhrn kalibračních parametrů – rovnice přímek, korelační koeficienty, stanovený LLOQ, LOD a kalibračního rozmezí.

Kalibrační řady	Rovnice kalibrační přímky	Korelační koeficient (r^2)
Standardní	1. $y = 0,966852x + 4,12537$	0,9992
	2. $y = 0,971419x + 3,87556$	0,9992
	3. $y = 0,949233x + 4,58926$	0,9990
Matricové	1. $y = 0,955124x + 3,52882$	0,9980
	2. $y = 0,931487x + 3,40169$	0,9917
	3. $y = 0,997645x + 3,06316$	0,9983
	4. $y = 1,04332x + 2,87273$	0,9978
LLOQ	1 ng/ml	
LOD	0,3 ng/ml	
Kalibrační rozmezí	1 - 1000 ng/ml	

Matricové efekty

Matricové efekty byly hodnoceny metodou postextrakčního přidavku. Vyhodnocení probíhalo na čtyřech koncentračních úrovních (1 ng/ml, 50 ng/ml, 500 ng/ml a 1000 ng/ml). Byly připraveny dvě sady vzorků. První sada byla připravená jako standardní roztoky MVC ve 20% ACN. Vzorky druhé sady byly zpracovány metodou LLE jako blankové matrice, po rekonstituci byly obohaceny standardním roztokem MVC o dané koncentraci a IS o koncentraci 100 ng/ml. Matricové efekty se na hodnocených koncentračních hladinách pohybovaly v rozmezí 99,1 – 109,2%. Výskyt matricových efektů se pohybuje v rozmezí $\leq 15\%$. Souhrn výsledků je uveden v tabulce 16.

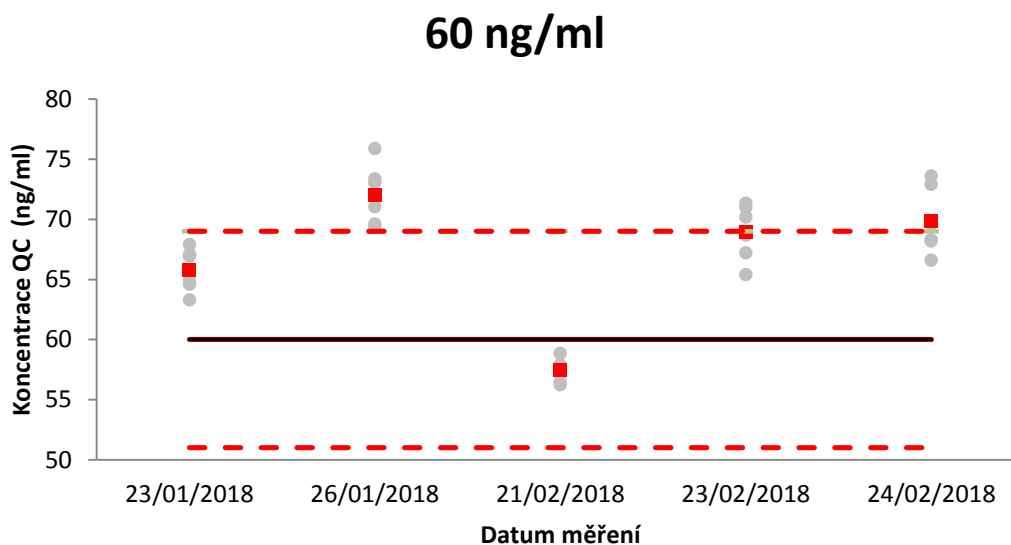
Tabulka 16. Vyhodnocení matricových efektů.

	Koncentrační hladina [ng/ml]			
	1000	500	50	1
ME [%]	99,1	101,7	95,1	109,2

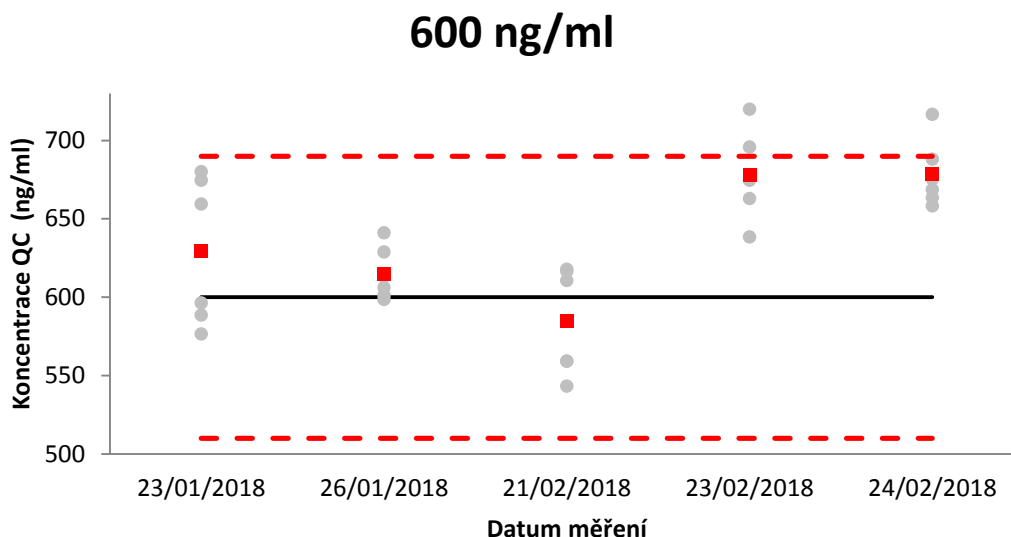
5.4 MĚŘENÍ VZORKŮ PLACENTÁRNÍCH PERFÚZÍ

Po optimalizaci a validaci byla metoda aplikována na vzorky z placentárních perfúzí. Vzorky pocházely z celkem pěti perfúzních experimentů. V rámci každé perfúze bylo odebráno 45 – 85 vzorků. Objem každého vzorku byl 1,5 ml. Očekávané koncentrace MVC ve vzorcích byly 600 ng/ml. Pro vzorky z promývací fáze byly očekávané koncentrace v dolním rozmezí kalibračního rozsahu.

Součástí každého měření byla příprava matricové kalibrační přímky, která byla připravována stejně jako matricové kalibrační přímky v rámci validace. Dále bylo pro každé měření připravováno šest kontrolních vzorků kvality (QC vzorky) na koncentrační úrovni 60 a 600 ng/ml, kterými byla kontrolována správnost metody. Souhrn naměřených hodnot je uveden na obrázku 19 pro koncentrační hladinu 60 ng/ml, a na obrázku 20 pro koncentrační hladinu 600 ng/ml.



Obrázek 19. Hodnoty QC vzorků na koncentrační hladině 60 ng/ml v rámci jednotlivých měření s vyznačeným intervalem $\pm 15\%$ 60 ng/ml (● = naměřené hodnoty QC vzorků, ■ = průměr naměřených hodnot, - - - hranice intervalu $\pm 15\%$).



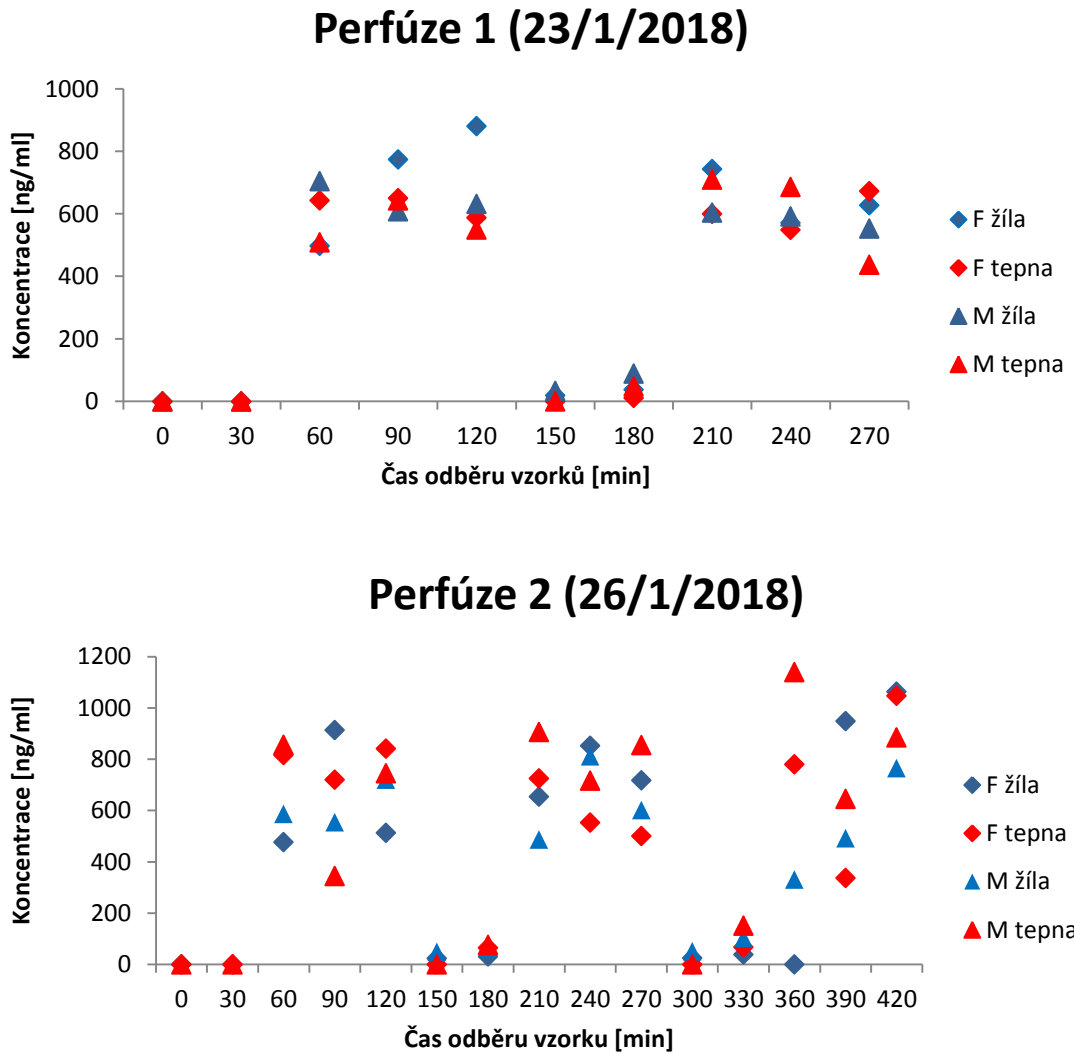
Obrázek 20. Hodnoty QC vzorků na koncentrační hladině 600 ng/ml v rámci jednotlivých měření s vyznačeným intervalem $\pm 15\%$ 600 ng/ml (● = naměřené hodnoty QC vzorků, ■ = průměr naměřených hodnot, - - - hranice intervalu $\pm 15\%$).

Z výsledků je patrné, že vyšší přesnost měření byla na koncentrační hladině 600 ng/ml, tedy v očekávaných koncentracích MVC během cirkulačních fází. Průměrné hodnoty koncentrací spadají ve všech případech do intervalu $\pm 15\%$ hodnoty 600 ng/ml. U koncentrace 60 ng/ml je patrná vyšší chyba měření. Vzhledem k tomu, že nízké koncentrace jsou očekávány jen v promývacích fázích, interpretaci výsledků prostupu MVC přes placentární bariéru tato chyba nezatíží.

Hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků byly stanoveny na základě průměrných hodnot ploch píků MVC a IS ze dvou nástřiků. Výsledky stanovení MVC u jednotlivých perfúzí jsou na obrázku 21 a 22. V každém časovém úseku byly odebírány vzorky z plodové i mateřské žíly a tepny (časové schéma odběru viz obrázek 3, kapitola 3.2.3).

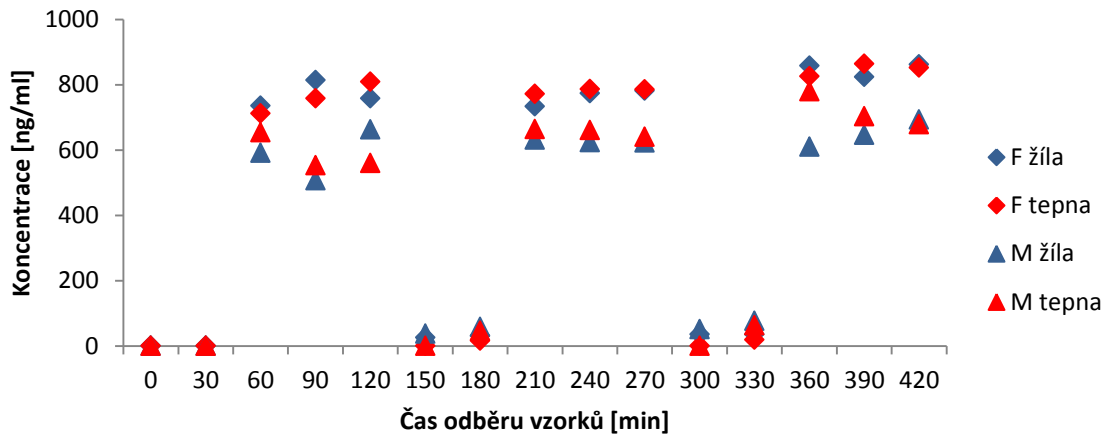
U perfúze 1, 4 a 5 jsou patrné dvě cirkulační fáze, které odpovídají časovému průběhu cirkulace MVC samotného a cirkulaci MVC v kombinaci s elakridarem (inhibitorem P-glykoproteinu). U perfúze 2 a 3 jsou tři cirkulační fáze, přičemž třetí fáze odpovídá cirkulaci MVC spolu s elakridarem a ritonavirem. U každé perfúze jsou patrné

zbytkové hodnoty MVC během vymývací fází. Metoda byla natolik citlivá, že bylo možné detekovat i nízké koncentrace MVC v systému perfúze.

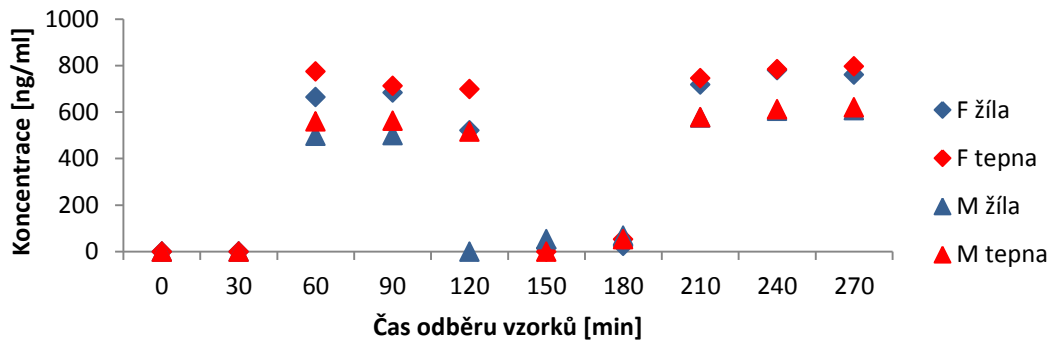


Obrázek 21. Výsledky naměřených hodnot vzorků z perfúze 1 a 2 (v závorce datum měření). F žíla/tepna – žíla/tepna plodového kompartmentu, M žíla/tepna – žíla/tepna mateřského kompartmentu.

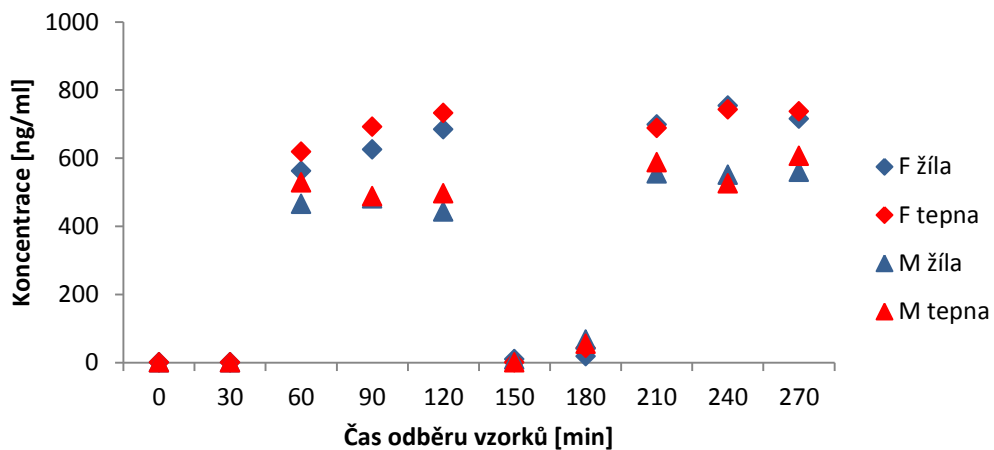
Perfúze 3 (21/2/2018)



Perfúze 4 (23/2/2018)



Perfúze 5 (24/2/2018)



Obrázek 22. Výsledky naměřených hodnot vzorků z perfúze 3, 4 a 5 (v závorce datum měření). F žíla/tepna – žíla/tepna plodového kompartmentu, M žíla/tepna – žíla/tepna mateřského kompartmentu.

V rámci jednotlivých perfúzí jsou patrné rozdíly a změny v koncentracích MVC v obou kompartmentech i jednotlivých cévách (obrázek 21 a 22). Trendy v koncentracích zobrazené na obrázku 3 (kapitola 3.2.3) však nejsou v jednotlivých grafech jednoznačně patrné. Cílem této práce bylo přesné a správné stanovení MVC v jednotlivých vzorcích. Získané výstupy budou základem pro farmakokinetická hodnocení a interpretaci výsledků, kterými se dále budou zabývat pracovníci Katedry farmakologie a toxikologie FaF UK, kteří experimenty provedli.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce byl vývoj citlivé a selektivní metody pro stanovení maraviroku ve vzorcích pocházejících z experimentů placentárních perfúzí.

V první fázi bylo získáno maximum informací o maraviroku a vzorcích z placentárních perfúzí. Jedná se o slabě bazickou a spíše lipofilní molekulu ($M_w = 513,67$; $\log P = 5,3$, která je rozpustná v organických rozpouštědlech. Matrice vzorků (perfúzní médium) obsahovala převážně anorganické soli, cukry a aminokyseliny. Tyto látky mají netěkavou povahu, představují potenciální problém v kompatibilitě s LC-MS (krystalizace v iontovém zdroji, problémy při ionizaci analytu). Navíc mohou být zdrojem matricových efektů, které způsobují potlačení/zesílení signálu analytu.

Následně byly optimalizovány parametry separace a detekce maraviroku v systému UHPLC-MS/MS. Byla zvolena separace v módu reverzních fází s použitím analytické kolony Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μm), s gradientovou elucí a průtokem 0,35 ml/min. Optimalizované parametry iontového zdroje byly následující: ionizace elektrosprejem v pozitivním módu; napětí na kapiláře 1,0 kV; napětí na vstupním kuželu 35 V; napětí na extraktoru 3,0 V; napětí na RF čočkách 0,1 V; průtok desolvatačního plynu 1000 l/h, teplota desolvatace 450 °C, průtok plynu na vstupním kuželu 100 l/h; a teplota iontového zdroje 130 °C. Pro kvantifikaci byl zvolen mód záznamu vybrané reakce (SRM mód) s kolizní energií 30 eV pro SRM 1 ($m/z = 388,9$) a 20 eV pro SRM 2 ($m/z = 280,0$).

Dále byla optimalizována metoda extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), která byla zvolená jako metoda volby vzhledem k lipofilitě maraviroku a složení perfúzního média. Jako extrakční rozpouštědlo s nejvyšší výtěžností byl zvolen dichlormetan. Optimalizovány byly tyto parametry LLE: poměr vzorek:rozpouštědlo (1:2), čas extrakce (10 minut), teplota extrakce (30 °C) a intenzita třepání (1400 RPM). Vzorky byly rekonstituovány směsí rozpouštědel voda:acetonitril v poměru 80:20.

Po fázi optimalizace následovala validace metody. Souhrn validačních parametrů je uveden v tabulce 17. Metoda je přesná a správná. Spodní mez stanovitelnosti je 1 ng/ml, limit detekce je 0,3 ng/ml. Kalibrační rozmezí je 1 – 1000 ng/ml. Korelační koeficient standardních kalibračních křivek je $\geq 0,999$. U matricových kalibračních křivek je korelační koeficient $\geq 0,99$.

Tabulka 17. Souhrn výsledků validace.

Validační parametr	Koncentrační hladiny [ng/ml]					Typ kalibrační přímky	Rovnice přímky	Korelační koeficient (r^2)
	1000	500	50	2,5	1			
Přesnost [RSD %]	1,7	2,7	2,6	13	8,1	standardní kalibrační přímky	$y = 0,966852x + 4,12537$	0,9992
Správnost [%]	-0,6	0,4	3,3	13,3	17,5		$y = 0,971419x + 3,87556$	0,9992
ME [%]	99,1	101,7	95,1	-	109,2		$y = 0,949233x + 4,58926$	0,9990
						RSD [%] směrnice přímky	1,22	
						matricové kalibrační přímky	$y = 0,955124x + 3,52882$	0,9980
LLOQ	1 ng/ml						$y = 0,931487x + 3,40169$	0,9917
LOD	0,3 ng/ml						$y = 0,997645x + 3,06316$	0,9983
Kalibrační rozmezí	1 - 1000 ng/ml					RSD [%] směrnice přímky	5,02	

LLOQ – spodní mez stanovitelnosti, LOD – limit detekce

Posledním krokem byla aplikace metody na proměření vzorků perfúzí. Vzorky pocházely z pěti perfúzních experimentů. Součástí každé analýzy bylo sestavení matricových kalibračních křivek a příprava QC vzorků na koncentrační hladině 60 ng/ml a 600 ng/ml. Metoda se ukázala jako dostatečně citlivá pro stanovení zbytkového množství maraviroku během vymývacích fází.

Jedním z cílů práce bylo stanovení maraviroku ve vzorcích z placentárních perfúzí. Na základě získaných dat mohou proběhnout farmakologická vyhodnocení experimentů. Informace o farmakokinetice maraviroku a možnosti jejího ovlivnění mohou významně přispět ke klinickému užívání maraviroku v rámci terapie HIV-R5 pozitivních těhotných žen, tím snížit riziko přenosu infekce z matky na plod.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2019_women-and-hiv_en.pdf online 18.3.2019.
- [2] L. Nováková, J. Pavlík, L. Chrenková, O. Martinec, L. Červený, Current antiviral drugs and their analysis in biological materials – Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 378-399.
- [3] H.P. Rang, J.M. Ritter, R.J. Flower, G. Henderson. Rang & Dale's Pharmacology, 7th edition, Elsevier, 2012.
- [4] Z.L. Brumme, J. Goodrich, H.B. Mayer, C.J. Brumme, B.M. Henrick, B. Wynhoven, J.J. Asselin, P.K. Cheung, R.S. Hogg, J.S.G. Montaner, P.R. Harrigan, Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals, *J. Infect. Dis.* 192 (2005) 466-474.
- [5] M. Samson, F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumèroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, M. Parmentier, Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene, *Nature* 382 (1996) 722-725.
- [6] P. Dorr, M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, M. Perros, Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity, *Antimicrob. Agents Chemoter.* 49 (2005) 4721-4732.
- [7] S.M. Woollard, G.D. Kanmogne, Maraviroc: a review of its use in HIV infection and blond, *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 5447-5468.
- [8] <https://scifinder.cas.org> online 18.3.2019.
- [9] https://www.caymanchem.com/Product_information_of_maraviroc online 18.3.2019.
- [10] <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf> online 18.3.2019.
- [11] <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/PerinatalGL.pdf> online 18.3.2019.
- [12] R. Boonprasert, R. Klintip, S. Phakdeenukoolkijja, W. Ratanasuwan, T. Kolladarungkri, Development of a novel method for determination of 11 antiretroviral drugs concentrations in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-photodiode array detection method, *Siriraj. Med. J.* 70 (2018) 238-236.

- [13] M. Simiele, A. Ariaudo, A. De Nicoló, F. Favata, M. Ferrante, C. Carcieri, S. Bonora, G. Di Perri, A. D'Avolio, UPHLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of three new antiretroviral drugs, dolutegravir, elvitegravir and rilpivirine, and other thirteen antiretroviral agents plus cobicistat and ritonavir boosters in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 223-230.
- [14] T.L. Parsons, M.A. Marzinke, Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the multiplexed quantification of etravirine, maraviroc, raltegravir, and rilpivirine in human plasma and tissue, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131 (2016) 333-344.
- [15] A.K. Blakney, Y. Jiang, D. Whittington, K.A. Woodrow, Simultaneous measurement of etravirine, maraviroc and raltegravir in pigtail masque plasma, vaginal secretions and vaginal tissue using LC-MS/MS assay, *J. Chromatogr. B* 1025 (2016) 110-118.
- [16] T.L. Parsons, J.F. Emory, L.A. Seserko, W.S. Aung, M.A. Marzinke, Dual quantification of dapivirine and maraviroc in cervicovaginal secretions from ophthalmic tear strips and polyester-based swabs via liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 407-416.
- [17] M. Simiele, L. Baietto, A. Audino, M. Sciandra, S. Bonora, G. Di Perri, A. D'Avolio, A validated HPLC-MS method for quantification of the CCR5 inhibitor maraviroc in HIV+ human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 94 (2014) 65-70.
- [18] J.F. Emory, L.A. Seserko, M.A. Marzinke, Development and bioanalytical validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for the quantification of the CCR5 antagonist maraviroc in human plasma, *Clin. Chim. Acta* 431 (2014) 198-205.
- [19] Z. Djerada, C. Feliu, C. Tournois, D. Vautier, L. Binet, A. Robinet, H. Marty, C. Gozalo, D. Lamiable, H. Millart, Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 86 (2013) 100-111.
- [20] L. Else, V. Watson, J. Tjia, A. Hughes, M. Siccardi, S. Khoo, D. Back, Validation of a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) assay for the simultaneous determination of existing and new antiretroviral compounds, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1455-1465.
- [21] E. Brewer, T. Felix, P. Clarke, A. Edgington, D. Muirhead, An LC-MS-MS method for quantitative determination of maraviroc (UK-427,857) in human plasma, urine and cerebrospinal fluid, *Biomed. Chromatogr.* 24 (2010) 1316-1323.
- [22] M. Takahashi, A. Hirano, N. Okubo, E. Kinoshita, T. Nomura, T. Kaneda, Development and application of a simple LC-MS method for the determination of plasma maraviroc concentrations, *J. Med. Invest.* 57 (2010) 245-250.

- [23] J. Martin, G. Deslandes, E. Dailly, C. Renaud, V. Reliquet, F. Raffi, P. Jolliet, A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3072-3082.
- [24] A. Fayet, A. Béguin, B. Zanolari, S. Cruchon, N. Guignard, A. Telenti, M. Cavassini, H.F. Günthard, T. Buclin, J. Biollaz, B. Rochat, L.A. Decosterd, A LC-tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir and etravirine, *J. Chromatogr.* 877 (2009) 1057-1069.
- [25] S. Notari, C. Tommasi, E. Nicastri, R. Bellagamba, M. Tempestilli, L.P. Pucillo, P. Narciso, P. Ascenzi, Simultaneous determination of maraviroc and raltegravir in human plasma by HPLC-UV, *IUBMB Life* 61 (2009) 470-475.
- [26] J. Vachek, V. Tesař, O. Zakiyanov, K. Maxová, *Farmakoterapie v těhotenství a při kojení*, 2. Vydání, Maxdorf, 2016.
- [27] O. Kittnar, K. Jandová, E. Kuriščák, M. Langmeier, D. Marešová, M. Mlček, J. Mysliveček, J. Pokorný, V. Riljak, S. Trojan, *Lékařská fyziologie*, 1. Vydání, Grada Publishing, a.s., 2011.
- [28] R. Hudák, D. Kachlík, *Memorix anatomie*, 3. Vydání, Stanislav Juhaňák – TRITON, 2015.
- [29] <https://www.shutterstock.com/cs/image-vector/placenta-chorionic-villi-labeled-24963919> online 13.4.2019.
- [30] B.V.R. Sastry, Techniques to study human placental transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38 (1999) 17-39.
- [31] M.A. Winters, K.K.A. Van Rompay, A.D.M. Kashuba, N.S. Shulman, M. Holodniy, Maternal-fetal pharmacokinetics and dynamics of a single intrapartum dose of maraviroc in Rhesus Macaques, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 4059-4063.
- [32] C. Vinot, L. Gavard, J.M. Tréluyer, S. Manceau, E. Courbon, J.M. Scherrmann, X. Declèves, D. Duro, G. Peytavin, L. Mandelbrot, C. Giraud, Placental transfer of maraviroc in an *ex vivo* human cotyledon perfusion model and influence of ABC transporter expression, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 1415-1420.
- [33] P. Myllynen, K. Vähäkanagas, Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue, *Toxicol. in Vitro.* 27 (2013) 507-512.
- [34] <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/Experimental-Pharmacology-and-Drug-Interactions/Equipment-and-methods> online 26.3.2019.
- [35] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04881> online 19.3.2019.

- [36] L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8-35.
- [37] L. Nováková, M. Douša, P. Blatný, P. Jandera, J. Planeta, V. Maier, J. Znaležiona, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 1. Vydání, Europrint a.s., 2013.
- [38] http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US online 14.4.2019.
- [39] http://www.waters.com/waters/de_CH/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=de_CH online 14.4.2019.
- [40] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*, 3th edition, John Wiley & Sons, 2007.
- [41] S. Banerjee, S. Mazumdar, Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte, *Int. J. Anal. Chem.* 2012 (2012) 1-40.
- [42] L. Nováková, *Matricové efekty v LC-MS analýze*, 19. Škola hmotnostní spektrometrie, Špindlerův Mlýn, 13. září 2018.
- [43] E. Stokvis, H. Rosing, J.H. Beijnen, Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 401-407.
- [44] Committee for medicinal products for human use, *Guideline on validation of bioanalytical methods*, EMEA, London, UK, 2015.
- [45] U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Bioanalytical method validation: Guidance for industry*, 2018.
- [46] International Conference on Harmonization (ICH), *M10: Bioanalytical Method validation*, 2019.
- [47] M.M. Moein, A. El Beqqali, M. Abdel-Rehim, Bioanalytical method development and validation: critical concepts and strategies, *J. Chromatogr. B* 1043 (2017) 3-11.
- [48] L. Nováková, M. Douša, P. Blatný, P. Jandera, J. Planeta, V. Maier, J. Znaležiona, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, 1. Vydání, Europrint a.s., 2013.
- [49] L. Nováková, Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 25-37.
- [50] <https://goldbook.iupac.org/html/M/M03759.html> online 20.3.2019.

- [51] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929-3937.
- [52] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019-3030.
- [53] B.K. Matuszewski, Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLV-MS bioanalysis, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 293-300.
- [54] R. Bonfiglio, R. King, T. Olah, K. Merkle, The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175-1185.
- [55] Český lékopis 2017, Grada, 2017.
- [56] P. Wright, A. Alex, T. Nyaruwata, T. Parsons, F. Pullen, Using density functional theory to rationalise the mass spectral fragmentation of maraviroc and its metabolites, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1025-1031.

8. PŘÍLOHY

8.1 CHIRANAL 2018, UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

UHPLC-MS/MS method for the determination of maraviroc in placental perfusions

Veronika Pilařová¹, Eliška Čapková Maxová¹, Zdeňka Němcová¹, Martina Čečková²,
Lenka Ťupová², Lucie Nováková¹

¹*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

²*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University in
Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

e-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

Introduction

Maraviroc is an antiviral drug against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). It blocks HIV-1 from entering human cells. This blocking is caused by a binding of maraviroc to transmembrane pocket of human C-C chemokine receptor CCR5, which is present on the membrane of CD4⁺ cells (T-cells) and macrophages. The CCR5 receptor interacts with HIV-1 glycoprotein 120 that enables the entry of HIV-1 into human cells. Maraviroc was approved for usage in adults and for children older than 2 years as a part of combination antiretroviral therapy (cART) in 2016. Up to date, there is sparse data about its administration during pregnancy. Some case reports indicate its limited passage across placenta barrier as umbilical-cord/maternal blood ratio measured after the administration. Thus, the aim of this work was to develop fast, selective, and sensitive method for the determination of maraviroc in human placental perfusions to extend current knowledge about maraviroc transplacental pharmacokinetics and its safety when it is used during pregnancy.

Experimental

UHPLC-MS/MS method using rapid high-throughput liquid-liquid extraction (LLE) as a sample preparation step was developed and used. Placental perfusion (500 µL) was extracted by dichloromethane (DCM). UHPLC using Acquity Ultra Performance LC™ (UPLC) system (Waters, Milford, MA, USA) coupled with Micromass Quattro Micro™ API benchtop triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) was used for the separation and detection. 2 µL of sample were injected in Acquity BEH C18 analytical column (50 x 2.1 mm i.d.; particle size 1.7 µm). The analytes were

separated using gradient elution with 0.1% aqueous formic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B) at a flow rate of 0.35 mL/min. The gradient started with 5 % of eluent B in A, and increased to 95 % B in 3 min. The percentage of eluent B was at the time 3.1 min reduced to the original value of 5 %. The total time of chromatographic separation including column equilibration was 5 min. Quantification of analyte was achieved via selected reaction monitoring (SRM) using the precursor ion $[M+H]^+$ and two selected fragment ions to increase method selectivity. Following MS parameters were used: capillary voltage 1.0 kV, extractor: 3.0 V, RF lens: 0.1 V, ion source temperature 130 °C, cone voltage: 35 V. The desolvation gas (nitrogen) flow was 1000 L/h and temperature 450 °C, Nitrogen was also used as a cone gas with a flow rate of 100 L/h. Collision energy was set individually for each SRM transitions.

Results

The LLE method for the selective isolation of maraviroc from human placental perfusion buffer was developed first. LLE was chosen due to the high lipophilicity of maraviroc, and to achieve the efficient removal of polar compounds from the sample. Various extraction agents including dichloromethane (DCM), terc-butylmethylether (TBME), ethylacetate, hexane, heptane, and their mixtures (DCM: hexane; DCM: heptane in ratio 10:90 and 20:80, v/v) were tested. The highest recoveries 90% and 78% were obtained using DCM and TBME, respectively. Further optimization was then carried out with these solvents. The effect of sample:solvent ratio (500, 1000 and 1500 μ L of extraction agent), extraction temperature (10 – 50 °C), and extraction intensity (250 – 1400 rpm) was determined.

The key factor in UHPLC-MS/MS method development was the separation of maraviroc and two known transporter inhibitors that are present in real-life samples, namely ritonavir and elacridar. The separation was successful when C18 was used. The mass spectrometer parameters including ionization mode, capillary voltage, RF lens, extractor voltage, ion source temperature, desolvation gas flow rate and temperature, cone gas flow rate, and collision energy for each SRM were optimized to obtain sufficient sensitivity.

Finally, optimized method was validated in the terms of precision, accuracy, calibration range, linearity, limit of detection and quantification, and matrix effects. The developed method provided sensitivity in ng/mL amounts with a high selectivity, accuracy, and precision.

Conclusion

Selective and sensitive method for the high-throughput determination of maraviroc in human placental perfusion samples using LLE-UHPLC-MS/MS was developed and fully validated. The method is suitable for the fast analysis of samples containing maraviroc and it will be used for the quantification of this antiviral drug to explain its transport across human placenta in materno-fetal and feto-maternal direction.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Charles University Grant Agency for Grant GAUK no. 616216/C/2016, the financial support of the Project

of Specific research, SVV 260 412 (2017), and the project STARSS reg. no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465 funded by EFRR.

UHPLC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF
MARAVIROC IN PLACENTAL PERFUSATE

ČAPKOVÁ MAXOVÁ, E.¹, PILAŘOVÁ, V.¹, NĚMCOVÁ, Z.¹, ŤUPOVÁ, L.²,
ČEČKOVÁ, M.², NOVÁKOVÁ, L.¹

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

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

e-mail: maxovae@faf.cuni.cz

Maraviroc is an antiretroviral drug acting as an entry inhibitor blocking the chemokine co-receptor 5 (CCR5). It is used as the second choice therapy in HIV-1- positive patients; the lack of knowledge on its safety in pregnancy and transplacental transfer, however, limit its administration to pregnant women so far. The goal of this work was to develop fast and selective method for the analysis of maraviroc in perfusates of human placental cotyledon performed in order to clarify its transfer from mother to fetus. The ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was the method of choice. BEH C18 column and gradient elution with the mobile phase A (water with 0.1% formic acid) and B (acetonitrile) at 0.35 mL/min flow-rate and 40 °C temperature were used for the separation. The mass spectrometry conditions were set up as follows: electrospray ionization in positive mode, capillary voltage 1.0 kV, RF lens 0.1 V, extractor 3.0 V, ion source temperature 130 °C, cone voltage 35 V, desolvation gas flow 1000 L/h, and temperature 450 °C. Selected reaction monitoring (SRM) mode was used for quantitation with collision energy 20 eV (SRM 1, quantifier transition) and 30 eV (SRM 2, qualifier transition). Liquid-liquid extraction (LLE) was chosen for sample preparation due to the high lipophilicity of maraviroc. The LLE optimization included optimization of solvent type, solvent to sample ratio, extraction temperature, shaking intensity, and extraction time. The best results were obtained when dichloromethane was used as the extraction agent (recovery > 90%). The optimized method was fully

validated in the calibration range 1-1000 ng/mL at five concentration levels (1 ng/mL, 2.5 ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL and 1000 ng/mL) with the lower limit of quantification (LLOQ) 1 ng/mL and limit of detection (LOD) 0.33 ng/mL. Precision (RSD %) and accuracy (% bias) was determined for each concentration level: 1 ng/mL (RSD = 8.1%, bias = +17.5%), 2.5 ng/mL (RSD = 13.0%, bias = +13.5%), 50 ng/mL (RSD = 2.6%, bias = +3.3%), 500 ng/mL (RSD = 2.7%, bias = +0.4%), 1000 ng/mL (RSD = 1.7%, bias = -0.6%). Further parameters of validation were linearity ($R^2 = 0.9994$) and matrix effects (99.1% - 109.2%) for four concentration levels: 1 ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL and 1000 ng/mL. The internal standard of maraviroc, maraviroc-d₆, was used for quantification in all experiments. The method finally enabled sensitive and selective determination of maraviroc in placental perfusion samples. We believe these data could help gain better knowledge on transplacental transport of maraviroc and its safety in pharmacotherapy of HIV-1 positive pregnant women.

The study was supported by Grant GAUK no. 616216/C/2016, SVV 260 412, and the project STARSS reg. no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465 funded by EFRR.

