

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Krisztina Szabó

Vývoj LC-MS/MS metody ke stanovení abirateronu v krevní plasmě

Development of a LC-MS/MS method for the determination of abiraterone in blood plasma

Bakalářská práce

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

Praha, 2020

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa.....

.....

podpis

Abstrakt

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo vyvinutie analytickej metódy používajúcej vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu s hmotnostnou detekciou s trojitým kvadrupólovým hmotnostným analyzátorom na stanovenie abirateronu v krvnej plazme potkana. Abirateron je hlavným produktom hydrolyzy abirateron-acetátu, liečivej látky komerčne dostupného lieku pod obchodným názvom Zytiga®, ktorý slúži na liečbu rakoviny prostaty.

Separácia prebiehala na kolóne ACQUITY UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm) s použitím gradientovej elúcie acetonitrilu ako zložky A, a deionizovanej vody ako zložky B, (t: 0-1,5-3,0-3,5-6,0 min, A: 30-90-90-30-30 %, v/v). Prietok mobilnej fázy bol $0,35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem nástreku 2 μl , teplota autosamplera 6 $^{\circ}\text{C}$ a teplota kolóny 40 $^{\circ}\text{C}$. Výsledná metóda pomocou hmotnostnej spektrometrie bola vykonávaná v pozitívnom móde, k ionizácii analytov bol používaný elektrosprej, sken prebiehal v móde MRM.

Využitím optimalizovanej metódy bola zostrojená kalibračná závislosť pomeru plôch pík abirateronu k internému štandardu na koncentráciu analytu v matrici krvnej plazmy. Kalibrácia prebiehala v rozmedzí koncentrácií $1,5\text{-}600 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, s regresiou $R^2 = 0,9999$.

Kľúčové slová

abirateron, LC-MS/MS

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to develop an analytical method using high performance liquid chromatography with mass detection with a triple quadrupole mass analyser for the quantification of abiraterone in rat plasma. Abiraterone is the main product of the hydrolysis of abiraterone acetate, a drug commercially available under the trade name Zytiga®, which is used to treat prostate cancer.

Separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH C18 column (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) using a gradient elution of acetonitrile as component A, and deionized water as component B, (t: 0-1,5-3,0-3,5-6,0 min, A: 30-90-90-30-30 %, v/v). The flow rate of the mobile phase was 0,35 ml · min⁻¹, the injection volume 2 µl, the autosampler temperature 6 °C and the column temperature 40 °C. The final method was performed in positive ion mode with electrospray ionization and the scan was performed in MRM mode.

Using the optimized method, a calibration curve was developed, using peak area ratios of abiraterone to the internal standard on the abiraterone concentration in the blood plasma. Calibration was performed at concentrations of 1,5-600 ng · ml⁻¹, with regression $R^2 = 0,9999$.

Key words

abiraterone, LC-MS/MS

Chcela by som poďakovať môjmu školiteľovi, RNDr. Petrovi Kozlíkovi, Ph.D. za odborné vedenie bakalárskeho projektu, za obetovaný čas, odborné rady a trpezlivosť. Chcela by som tiež poďakovať svojej rodine, ktorá celú dobu štúdia ma podporovala. Poďakovanie patrí Stele Kytkovej za mnohonásobné prečítanie a jazykovú kontrolu celej práce a Ing. Gabrielovi Skronkovi za pomoc a rady s grafickými úpravami práce.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická časť	10
2.1. Charakteristika abirateronu.....	10
2.2. Účinok abirateron acetátu	11
2.3. Prehľad vývoja analytických metód pre kvantifikáciu abirateronu	14
2.4. Hmotnostná spektrometria	18
3. Experimentálna časť	20
3.1. Chemikálie	20
3.2. Prístroje a pomôcky	20
3.3. Príprava vzorky na optimalizáciu parametrov detekcie.....	21
3.4. Príprava biologických vzoriek na optimalizáciu HPLC	21
3.5. Príprava biologických vzoriek ku kalibrácii	21
4. Výsledky a diskusia.....	22
4.1. Optimalizácia hmotnostnej detekcie	22
4.2. Optimalizácia vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.....	26
4.3. Výsledná metóda.....	30
5. Záver.....	33
6. Použitá literatúra	34

Zoznam skratiek a symbolov

A	plocha pík
ACN	acetonitril
ADT	hormonálna liečba rakoviny prostaty (z angl. Androgen deprivation therapy)
AU	relatívna jednotka (z angl. Arbitrary unit)
AR	receptor androgénu (z angl. Androgen receptor)
<i>c</i>	koncentrácia
CRPC	kastračne rezistentná rakovina prostaty (z angl. Castration-resistant prostate cancer)
CYP17	enzým v biosyntéze steroidov, 17 α -hydroxyláza/C17, 20-lyáza
C18	oktadecylová stacionárna fáza
C5	pentyllová stacionárna fáza
C8	oktylová stacionárna fáza
ESI	elektrosperjová ionizácia (z angl. Electrospray ionization)
GC-MS	plynová chromatografia s hmotnostnou detekciou
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. High performance liquid chromatography)
IS	interný štandard, izotopicky značený abirateron D4
LC	kvapalinová chromatografia (z angl. Liquid chromatography)
LC-MS	kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou
LH	luteinizačný hormón (z angl. Luteinizing hormone)
LHRH	hormón uvoľňujúci luteinizačný hormón (z angl. Luteinizing hormone-releasing hormone)
LOD	medz detekcie (z angl. Limit of detection)
LOQ	medz kvantifikácie (z angl. Limit of quantification)

MRM	mnohonásobné reakčné monitorovanie (z angl. Multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostná spektrometria (z angl. Mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
R ²	koeficient determinácie
SCAN	mód skenu hmotnostných spektier na získanie celkového hmotnostného spektra
SIM	mód skenu hmotnostných spektier vybranej hodnoty m/z (z angl. Selected ion monitoring)
UV	ultrafialové žiarenie (z angl. Ultraviolet)
UHPLC	ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. Ultra high performance liquid chromatography)
v/v	objemový pomer
QqQ	trojitý kvadrupól

1. Úvod

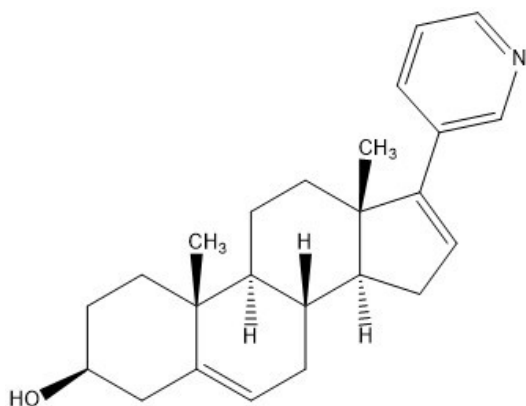
Za biologicky aktívnu látku bol zvolený abirateron, ktorý je inhibítorom enzýmu pri preme testosterónu z cholesterolu. Táto vlastnosť abirateronu sa využíva pri liečbe rakoviny prostaty. V rámci spolupráce s komerčnou farmaceutickou firmou Zentiva, ktorá vyvíja novú liekovú formu obsahujúcu abirateron ako účinnú látku, bolo nutné vyvinúť metodiku na sledovanie koncentrácie abirateronu uvoľňovaného z danej formulácie do krvi.

Cieľom tejto bakalárskej práce bol vývoj HPLC-MS/MS metódy na stanovenie abirateronu v krvnej plazme potkana.

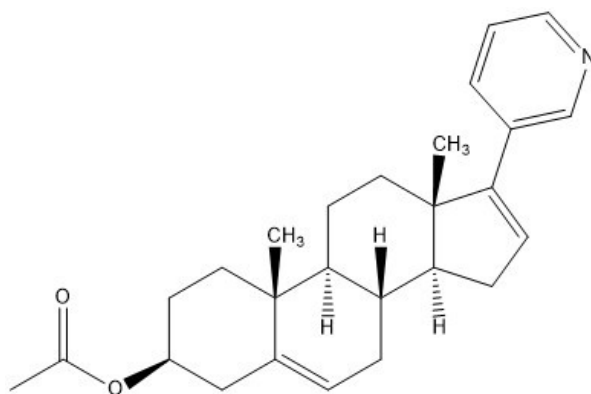
2. Teoretická časť

2.1. Charakteristika abirateronu

Abirateron (obraz 1), IUPAC názvom (3S,8R,9S,10R,13S,14S)-10,13-dimethyl-17-pyridin-3-yl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol je primárnym produktom hydrolyzy abirateron-acetátu (obraz 2), liečivej látky komerčne dostupného lieku pod obchodným názvom Zytiga®, ktorý slúži na liečbu rakoviny prostaty s metastázami u dospelých mužov [1][2][3].



Obraz 1 Štruktúrny vzorec abirateronu



Obraz 2 Štruktúrny vzorec abirateron-acetátu

2.2. Účinok abirateron acetátu

Rakovina prostaty je celosvetovo druhý najčastejšie diagnostikovaný zhubný nádor u mužov vo vyspelých krajinách [4]. Počet nových ochorení každoročne presiahne jeden milión. Metastatická rakovina prostaty je charakterizovaná obdobím, kedy hormonálna liečba (ADT) je účinná v znížení hladiny testosterónu v krvi. Nasleduje však prechod do tzv. kastračne rezistentnej rakoviny prostaty (CRPC) [5].

Prvý záznam rakoviny prostaty vznikol v roku 1853 v Londýne, kedy J. Adams histologickou skúškou objavil tento stav a označil ho ako veľmi zriedkavý typ ochorenia.

Prvá úspešná liečba je spojená s objavom pozitívneho účinku odstránenia androgénu u pacientov. Datuje sa na štyridsiate roky dvadsiateho storočia, keď Huggins a Hodges zistili, že rakovina prostaty je ovplyvnená aktivitou androgénu v tele. Huggins pokračoval svoj výskum v téme a „za objav hormonálnej liečby rakoviny prostaty“ získal v roku 1966 Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu [6].

Ďalším míľnikom výskumu sa stala práca Schallyho, ktorému udelili Nobelovu cenu „za práce týkajúce sa peptidových hormónov tvorených v mozgu“. Objavil štruktúru hormónu uvoľňujúceho luteinizačný hormón (LHRH) a vyvinul jeho syntézu. Jeho význam vychádza z toho, že androgén, po vzniku väzby na androgén receptor (AR) stimuluje produkciu LHRH, čo sa ďalej interaguje s LHRH receptormi. Výsledkom týchto biochemických reakcií sa uvoľňuje luteinizačný hormón (LH) z nadobličiek, čo ďalej vyvolá syntézu testosterónu z cholesterolu. Podanie agonistov LHRH dočasne zvyšuje množstvo testosterónu v krvi, s výrazne negatívnymi účinkami, avšak regulačnými cestami vo výsledku znižuje hladinu LH. Táto hormonálna metóda zníženia testosterónu má rovnaký účinok ako chirurgická kastrácia [6][7][8].

V nasledujúcich rokoch sa výskum zameril na vývoj agonistov LHRH a následne LHRH antagonistov, ktoré priamo inhibovali LHRH receptor. Výhodou LHRH antagonistov bola vyhnutie sa počiatočného zvýšenia hladiny testosterónu a tým silných vedľajších účinkov [6].

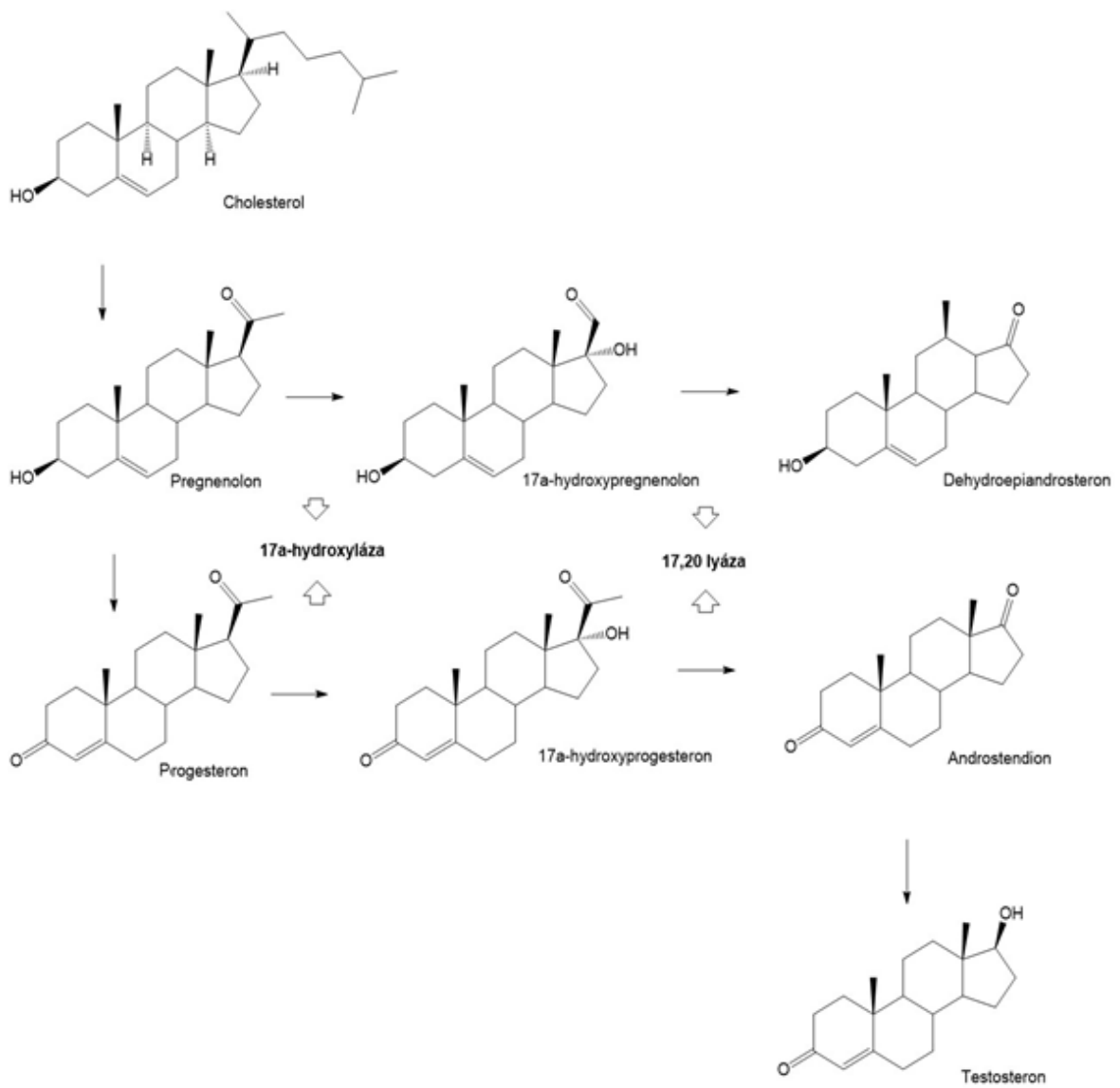
V nasledujúcom období došlo k skúmaniu inhibítorov AR. Medzi prvé látky patrili steroid cyproteron, ktorý inhibuje väzbu testosterónu a dihydrotestosterónu na AR [6].

Ďalšie štúdiá, vzniknuté na začiatku dvadsiateho storočia skúmali ako zdroj testosterónu nadobličky. Zistili, že 10 % pôvodnej hladiny testosterónu zostane

prítomných v krvnom obehu i po chirurgickej alebo chemickej kastrácii, čo je spôsobené premenou steroidov z nadobličiek na testosterón. Na zníženie produkcie steroidov skúmali derivát imidazolu, ketoconazol, ktorý blokuje dva kroky v dráhe premeny cholesterolu na testosterón [6][9].

S účelom zvýšenia efektivity bol hľadaný selektívnejší inhibítor ktorý zabraňuje tvorbe androstendionu z pregnenolonu. V tejto premene kľúčovú rolu hrajú dva enzýmy, 17 α -hydroxyláza a C17, 20-lyláza, práve ktoré sú inhibované abirateronom [9].

Abirateron zabraňuje produkcii testosterónu, čo spôsobuje spomalenie rastu zhubného nádoru prostaty. Abirateron slúži ako selektívny inhibítor 17 α -hydroxylázy/C17, 20-lyázy (CYP17), ktorý je kľúčovým enzýmom v syntéze androgénu v tkanivách semenníkov, nadobličiek a v nádorových tkanivách semenníkov. CYP17 katalyzuje hydroxyláciu v pozícii 17 α pregnenolonu a progesteronu pri vzniku androgénov dehydroepiandrosteron a androstendion, ktoré sú prekurzory testosterónu. Metabolickú dráhu syntézy testosterónu z cholesterolu pomocou enzýmov 17 α -hydroxyláza a C17, 20-lyláza znázorňuje obraz 3 [9][10]. Abirateron-acetát sa podáva perorálne v doporučenej dávke 1000 mg, ktorý konvertuje na abirateron a následne podlieha ďalšiemu metabolizmu v pečeni. Existujú dva hlavné metabolity, abirateron-sulfát a N-oxid abirateron-sulfát [2].



Obraz 3 Metabolická dráha syntézy testosterónu

2.3. Prehľad vývoja analytických metód pre kvantifikáciu abirateronu

Vzhľadom na farmaceutickú aktivitu abirateronu bol kladený veľký dôraz na vývoj a validáciu najpresnejších a najúčinnějších metód pre zistenie množstva abirateronu v krvnej plazme. Bola dokázaná korelácia medzi koncentráciou abirateronu a účinkom tejto látky pri liečbe. Preto je z hľadiska liečby kľúčové optimálne nastavenie doporučenej dávky a zistenie presnej koncentrácie lieku v krvi [4][2].

Martins a kol. publikovali validovanú metódu využitia kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou detekciou pre kvantifikáciu abirateron-acetátu a abirateronu v ľudskej plazme. Na extrakciu analytu z plazmy najprv skúsili jedнокrokovú extrakciu kvapalina-kvapalina použitím hexanu a butanolu. Pre zlepšenie predchádzajúcej metódy skúsili pri rovnakom type extrakcie rôzne organické rozpúšťadla, ale nakoniec sa rozhodli pre použitie extrakcie na pevnej fáze. Týmto spôsobom dokázali zvýšiť reprodukovateľnosť a presnosť a v neposlednom rade znížili objem vzorov a znížili čas ich prípravy [11].

Validovaná metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie pre kvantifikáciu abirateronu v potkanej krvnej plazme vznikla v roku 2012. V tejto metóde najlepšia rezolútnosť píkov bola dosiahnutá pri laboratórnej teplote použitím isokratickej elúcie mobilných fáz. Na detekciu používali UV detektor nastavený na 255 nm. Kalibračná priamka bola lineárna v rozsahu koncentrácie $93,4\text{-}3251 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$). Značným obmedzením tejto metódy bol nízky detekčný limit, kvôli čomu vznikli ďalšie, presnejšie metódy [12].

Vo výskume sa zamerali na iný typ detekcie, na fluorescenciu, s čím sa zaoberali Belleville a jeho kolektív. Ich cieľom bolo vytvorenie jednoduchej a citlivej metódy ktorá bude vhodná na využitie v rutinnej klinickej praxi. Vlnové dĺžky fluorescenčnej detekcie boli nastavené na 255 a 373 nm. Dosiahli lineárnu kalibráciu v rozmedzí $1,75\text{-}50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Ich výsledky potvrdili prechádzajúcu publikovanú veľkú interindividuálnu variabilitu koncentráciu abirateronu v plazme krvi [13].

Pri použití kvadrupólového hmotnostného detektoru vyvinul Gurav a kol. citlivú ($\text{LOQ} = 0,2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), validovanú metódu pre kvantifikáciu abirateronu. Pre vytvorenie

kalibračnej závislosti používali koncentrácie abirateronu 0,2-201 ng · ml⁻¹, priložením váženej lineárnej regresie, faktorom 1/x² [14].

Článok z roku 2017 popísal ďalšiu metódu kvalifikáciu aktívneho metabolitu abirateronu, $\Delta(4)$ -abirateron (D4A), ktorá vzniká enzymatickou reakciou z abirateronu. Cieľom tejto práce bolo rozšírenie metód aj pre tento metabolit [15].

Ďalšou významnou prácou bola publikácia od Kyu-pyo Kim a kol., zameraná na metódu simultánneho stanovenia abirateronu, enzalutamidu, bicalutamidu a ďalších látok. Tieto látky sa často podávajú súčasne pri liečbe rakoviny prostaty, a ich metóda sa stala prvou validovanou metódou, zaoberajúca sa týmto typom detekcie [16].

V tabuľke 1 sa nachádza zhrnutie najdôležitejších parametrov metód, zaoberajúce sa kvantifikáciou abirateronu, v prípade ich metabolitov v ľudskej krvnej plazme a v plazme potkana.

Tabuľka 1 Prehľad analytických metód pre kvantifikáciu abirateronu

Detekcia	Stacionárna fáza	Mobilná fáza (A/B/C)	Matrica	Gradient	LOD	LOQ
MS/MS [11]	Luna C5 (50 mm × 2,1 mm, 5 µm)	2% (CH ₃) ₂ CHOH v CH ₃ CN/10 mM NH ₄ CH ₃ CO ₂ , 35/65, (v/v)	Ľudská plazma	t:0-4-8-8,5-10,5 min A:35-100-100-35-35 %	-	50 pg·ml ⁻¹
MS/MS [14]	Atlantis dC18 (50 mm × 4,6 mm, 3 µm)	CH ₃ CN/NH ₄ CH ₃ CO ₂ , 10/90, (v/v)	Plazma potkana	-	-	0,2 ng·ml ⁻¹
UV [12]	Thermo Betasil C18 (150 mm × 4,0 mm, 5 µm)	CH ₃ CN/H ₂ O/KH ₄ PO ₄ (pH 3,0), 55/5/40, (v/v/v)	Ľudská plazma	-	-	93,4 ng·ml ⁻¹
Fluorescencia [13]	C8 Xterra (250 mm × 4,6 mm, 5 µm)	glycínový pufor (pH 9,0; 88,4 mM)/CH ₃ CN, 40/60, (v/v)	Ľudská plazma	-	0,6 ng·ml ⁻¹	1,75 ng·ml ⁻¹
MS/MS [5]	Zorbax Eclipse Plus C18 (150 mm × 2,1 mm, 3,5 µm)	H ₂ O+0,1 % CH ₂ O ₂ /[0,1 % CH ₂ O ₂ + CH ₃ OH/CH ₃ CN, 60/40], 35/65, (v/v)	Ľudská plazma	-	-	2,0 ng·ml ⁻¹

Tabuľka 2 Prehľad analytických metód pre kvantifikáciu abirateronu

Detekcia	Stacionárna fáza	Mobilná fáza (A/B/C)	Matrica	Gradient	LOD	LOQ
MS/MS [15]	Kinetex C18 (15 mm × 2,1 mm, 2,6 µm)	[CH ₂ O ₂ /H ₂ O, 0,1/100, (v/v)]/ [(CH ₂ O ₂ /CH ₃ OH), 0,1/100, (v/v)]	Ľudská plazma	t:0–2-10-13 min B:30-30-70-30 %	-	0,182 ng·ml ⁻¹
MS/MS [17]	Synergi Polar-RP (100 mm × 2.0 mm, 4.0 µm)	0,1 % (v/v) CH ₂ O ₂ v CH ₃ OH/ 0,1 % CH ₂ O ₂ v H ₂ O (v/v)	Ľudská plazma	t:0-4-6-8-15 min A:65-75-95-65 %	-	1,0 ng·ml ⁻¹
MS/MS [18]	Poroschell 120 EC-C18 (100 mm × 2,1 mm, 2,7 µm)	[H ₂ O/CH ₃ CN, 80/20 (v/v),+0,8 mM NH ₄ HCO ₂ +0,1 % CH ₂ O ₂]/ [CH ₃ OH/CH ₃ CN, 80/20 (v/v), +0,8 mM NH ₄ HCO ₂ +0,1 % CH ₂ O ₂]	Ľudská plazma	t:0-6-9,5-11,5-17 min B:10-55-55-75-10	-	-
Fluorescencia [19]	Kromasil C8 (150 mm × 4,6 mm)	CH ₃ CN/20 mM NH ₄ CH ₃ CO ₂ , (pH 7), 80/20 (v/v)	Ľudská plazma	-	6,9 ng·ml ⁻¹	21 ng·ml ⁻¹
MS [20]	Accucore Vanquish C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,5 µm)	[CH ₃ OH/CH ₃ CN 60/40, (v/v)]/ [CH ₂ O ₂ /H ₂ O, 0,1/100, (v/v)], 65/35, (v/v)	Ľudská plazma	-	-	0,228 ng·ml ⁻¹

2.4. Hmotnostná spektrometria

Základným princípom hmotnostnej spektrometrie (MS) je generovanie iónov z anorganických alebo organických zlúčenín, oddeľovanie týchto iónov podľa pomeru hmotnosti k nábojom (m/z) a ich následná kvalitatívna alebo kvantitatívna detekcia [21].

Elektrosprejová ionizácia

Účelom iónového zdroja je prevedenie analytu do ionizovaného stavu v plynnej fáze. Elektrosprejová ionizácia (ESI) je najvýznamnejšou technikou v skupine metód ionizácie pri atmosférickom tlaku a patrí medzi najčastejšie používané metódy pri spojení s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou s tandemovou hmotnostnou detekciou (HPLC-MS).

ESI je technika mäkkej ionizácie, ktorá je mimoriadne užitočná na analýzu veľkých, neprchavých, nabíjateľných molekúl, ako sú proteíny a polyméry nukleových kyselín. Pri tejto ionizácii môžu vzniknúť i viacnásobne nabité ióny, a preto je metóda vhodná i pre sledovanie vysokomolekulárnych látok. ESI slúži rovnako dobre tak pre malé polárne molekuly, ako aj pre komplexy iónových kovov a pre ďalšie rozpustné anorganické analyty [21][22].

Kvadrupólový detektor

Kvadrupólový detektor je skonštruovaný zo štyroch kovových tyčí, ktoré sú zapojené diagonálne v pároch. Protiahlé tyče sú elektricky navzájom spojené jednosmerným vysokofrekvenčným napätím. Na ostávajúce dve tyče je vložené záporné jednosmerné napätie a na všetky tyče je superponované vysokofrekvenčné striedavé napätie. Nastavením frekvencie môže byť určené, ióny akým pomerom m/z prejdú kvadrupólom. Ióny s vyššími alebo nižšími m/z hodnotami sú zachytené na tyčiach kvadrupólu.

Trojité kvadrupólové hmotnostné spektrometre, tiež známe ako QqQ, je tandemová metóda MS, štandardný analytický nástroj pre aplikáciu GC-MS a LC-MS, najmä v prípadoch, keď sa vyžaduje presná kvantifikácia analytov. Prvý a tretí kvadrupól fungujú ako hmotnostné filtre a druhý spôsobuje fragmentáciu analytu prostredníctvom interakcie s kolíznym plynom. Pri tejto metóde môže v dôsledku opakovaných zrážok iónov

a kolízneho plynu dochádzať k opakovaným kolíznym excitáciám, ktoré sa prejavujú vo zvýšení fragmentových iónov [21][22].

Druhy skenov

SCAN mód sa používa na získanie celých hmotnostných spektier látok. Výhodou tejto metódy je jej všeobecnosť, nevýhoda spočíva v nízkej citlivosti, spôsobená využitím jedného kvadrupólu na filtráciu.

Mód prekurzorového iónu (SIM) sa používa na detekciu iónov určitého pomeru m/z . Podobne ako u metódy SCAN, aj tu sa používa režim jednoduchého kvadrupólu.

V móde produktového iónu na prvom kvadrupóle sa prebieha vybrané prekurzorové iónu, o danej hodnote m/z . Tento ión sa na druhom kvadrupóle rozštepí na fragmenty. Deteguje sa celkový súbor fragmentov.

V móde MRM sú aktívne všetky tri kvadrupóly. Prvým kvadrupólom prejde prekurzorový ión, v druhom kvadrupóle prebieha fragmentácia pôsobením kolízneho plynu a tretím kvadrupólom je prepustený len produktový ión, určitého pomeru m/z , ktorý je v poslednom kroku detegovaný. Výhodou tejto metódy je vysoká citlivosť, ktorá je vhodná pre kvantifikačné účely. K vytvoreniu metódy kvantifikácie v tomto móde je potrebné definovanie hodnoty m/z prekurzorového, aj produktového iónu a následná optimalizácia ionizačných, fragmentačných, a ďalších parametrov [21][22][23].

3. Experimentálna časť

3.1. Chemikálie

Abirateron (čistota $\geq 99\%$, Clearsynth)

Abirateron D4, (čistota $\geq 99\%$, Clearsynth)

Acetonitril (čistota LC-MS, Sigma-Aldrich, Nemecko)

Metanol (čistota LC-MS, Sigma-Aldrich, Nemecko)

Kyselina mravčia (čistota LC-MS, Sigma-Aldrich, Nemecko)

Deionizovaná voda

3.2. Prístroje a pomôcky

Prístroj - Systém UHPLC 1290 Infinity Agilent s kvartérnou pumpou spojený s QqQ 6460

Kolóna ACQUITY UPLC BEH C18, 100 x 2,1mm; 1,7 μm (Waters)

Kolóna Kinetex C18, 50 x 2,1mm; 1,3 μm (Phenomenex)

Ultrazvuk LC30 (Elma)

Vortex (Chromservis)

Mass Hunter workstation software

3.3. Príprava vzorky na optimalizáciu parametrov detekcie

Vzorka abirateronu bola pripravená rozpustením 10 mg abirateronu v 5 ml metanolu. K úplnému rozpúšťaniu bola vložená do ultrazvuku na dobu 10 min. Po vychladnutí na laboratórnu teplotu bola vzorka zriedená 2000-krát, pridaním 3998 μl metanolu ku 2 μl ($c = 2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) abirateronu. Výsledná koncentrácia bola $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Vzorka interného štandardu bola pripravená rozpustením 3,45 mg IS v 25 ml metanolu ($c = 138 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Následne bola ultrazvukovaná po dobu 10 min. Po vychladnutí na laboratórnu teplotu bola zriedená 100-krát, v dvoch krokoch, v každom kroku 10-krát zriedená metanolom, na výslednú koncentráciu $1,38 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

3.4. Príprava biologických vzoriek na optimalizáciu HPLC

Na optimalizáciu podmienok HPLC bola používaná vzorka abirateronu v krvnej plazme potkana o koncentrácii $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po homologizácii abirateronu a acetonitrilu na vortexe bola pridaná krvná plazma a bola centrifugovaná po dobu 10 min pri otáčkach 12 500 rpm. Vzorka bola nameraná po vychladnutí na laboratórnu teplotu.

3.5. Príprava biologických vzoriek ku kalibrácii

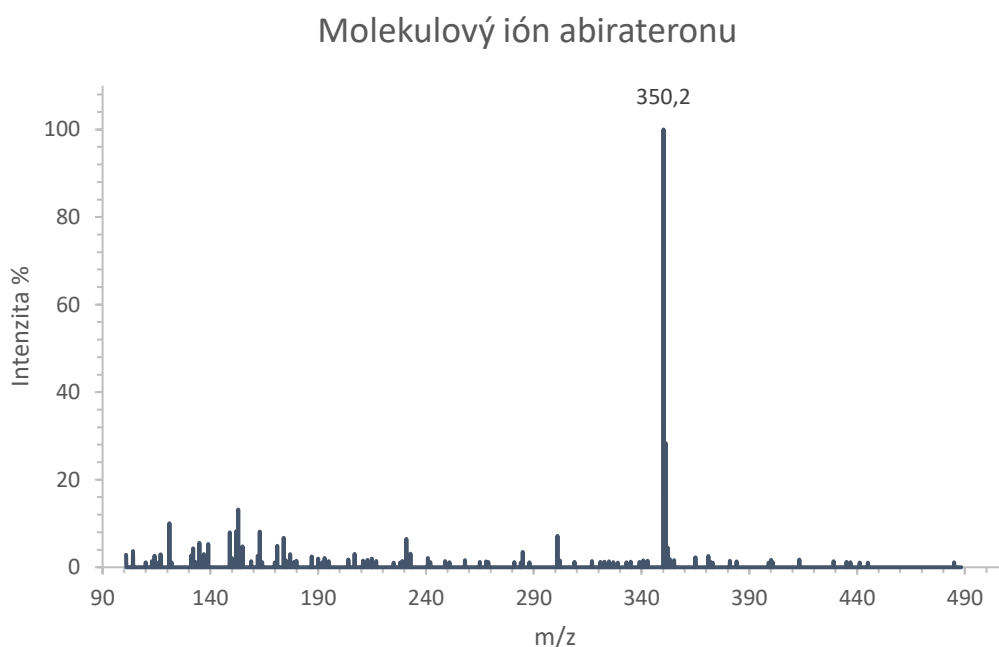
Automatickou pipetou boli odmerané objemy interného štandardu ($c = 32 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), abirateronu a acetonitrilu tak, že koncentrácia interného štandardu zostávala stále konštantná a menila sa len koncentrácia abirateronu. Celkový objem tejto zmesi bol vždy 100 μl . Po homologizácii na vortexe bola pridaná 25 μl krvnej plazmy, ktorou sa v prvom kroku vzorka zrazila. Následne boli vzorky opäť homologované na vortexe a centrifugované po dobu 10 min pri otáčkach 12 500 rpm, a pred meraním nechali ochladnúť sa na laboratórnu teplotu. Po vložení 65 μl supernatantu do LC vialky bola vzorka vložená do autosampleru. Konečné koncentrácie kalibračných roztokov boli 0,3; 0,6; 2,5; 9,4; 62,5; 97,6 a 120,0 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, čo zodpovedalo koncentráciám 1,5; 3,0; 12,5; 47,0; 312,5; 488,0 a 600,0 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ v pôvodnej vzorke plazmy.

4. Výsledky a diskusia

4.1. Optimalizácia hmotnostnej detekcie

V hmotnostnom detektore bol nastavený pozitívny ionizačný mód, a nastavený mód MS2 SCAN. Elučný roztok tvoril acetonitril a deionizovaná voda v pomere 1:1. Prietok mobilnej fázy bol $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota autosamplera $5,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, nástrek $1 \text{ } \mu\text{l}$ a fragmentačné napätie 135 V . Vzorky boli pripravené podľa kapitoly 3.3.

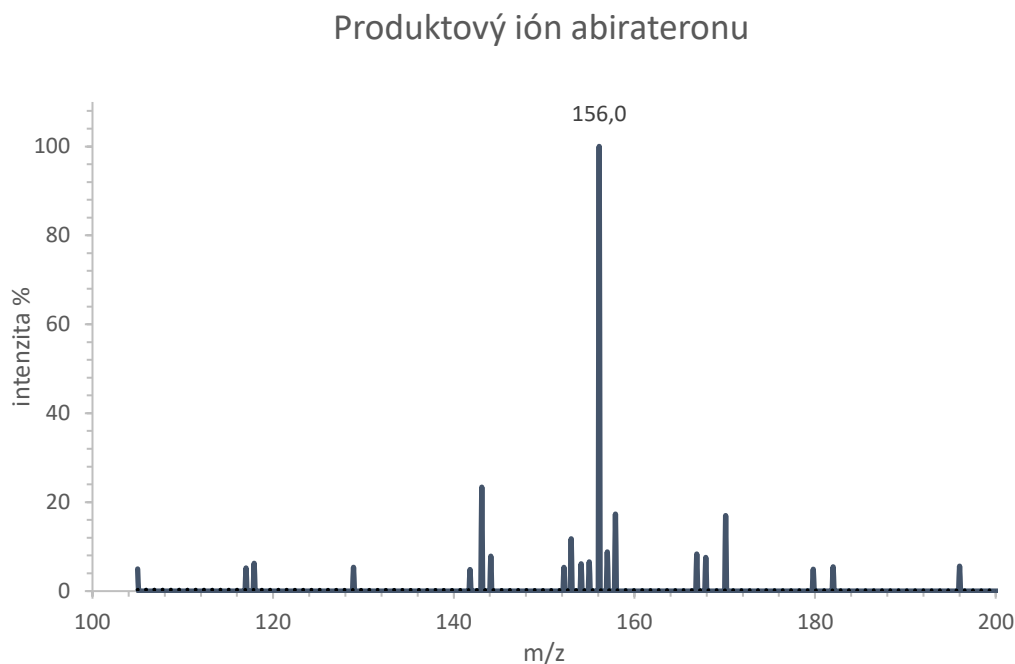
Abirateron v rozsahu $90\text{-}490 \text{ m/z}$ vykazoval najvyššiu intenzitu pri $350,2 \text{ m/z}$ (obraz 4) a táto hodnota bola vybraná ako prekurzorový ión.



Obraz 4 Hmotnostné spektrum abirateronu v móde MS2 SCAN, koncentrácia abirateronu $1,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, nástrek $1,0 \text{ } \mu\text{l}$, elučné činidlo ACN:H₂O, v pomere 1:1, (v/v), prietok mobilnej fázy $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota autosamplera $5,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fragmentačné napätie 135 V

V móde MS2 SIM bol sledovaný ión nastavený na $350,2 \text{ m/z}$, a nástrek nastavený na $0,2 \text{ } \mu\text{l}$. V tomto móde bolo hľadané optimálne nastavenie fragmentoru, ktorý bol pôvodne nastavený na 135 V . Pri meraniach boli vyskúšané hodnoty $100\text{-}190 \text{ V}$. Najvyššia odozva bola nameraná pri fragmentačnom napätí 165 V . V režime produktového iónu

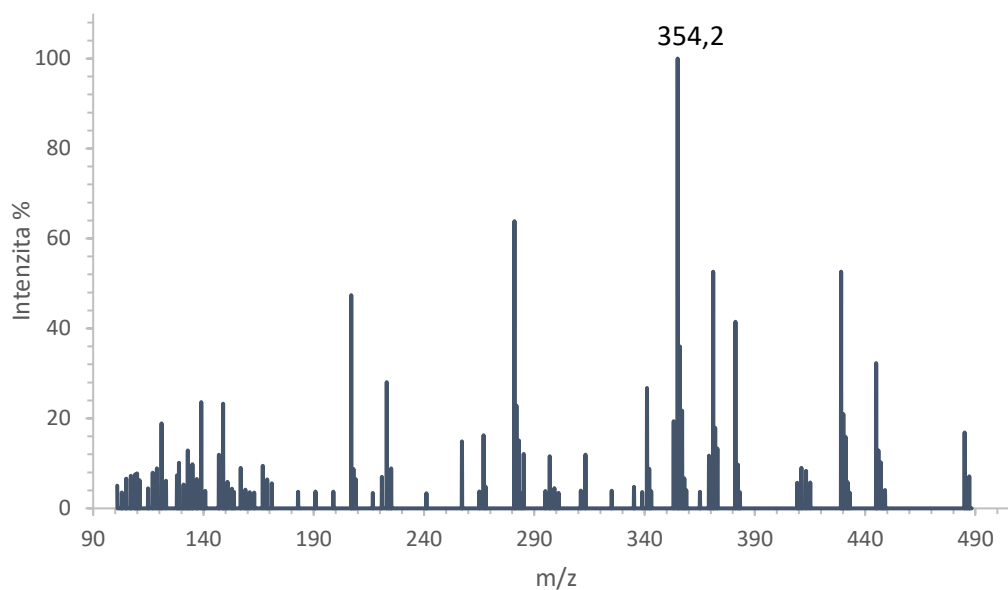
dochádzalo k fragmentácii prekursorového iónu m/z 350,2. Menila sa hodnota kolíznej energie v rozsahu 15-70 V tak, aby boli dosiahnuté najvyššie intenzity fragmentačných iónov. Na obrázku 5 môžeme vidieť fragmentačné spektrum m/z 350,2 za optimálnej kolíznej energie 65 V. Vidíme, že najintenzívnejší m/z je 156,0, ktorý bol vybraný ako hlavný m/z do nasledujúcich MRM meraní.



Obraz 5 Fragmentačné spektrum m/z 350,2, koncentrácia abirateronu $1,0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, nástrek $0,2 \mu\text{l}$, elučné činidlo ACN:H₂O, v pomere 1:1, (v/v), prietok mobilnej fázy $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota autosampleru $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$, nástrek $0,2 \mu\text{l}$, fragmentačné napätie 165 V, kolízna energia 65 V

Pre izotopicky značený štandard bolo postupované analogicky. Pri hľadani optimálnych podmienok u interného štandardu bol najprv určený molekulový ión v móde MS2 SCAN na $354,2 \text{ m/z}$ (obraz 6).

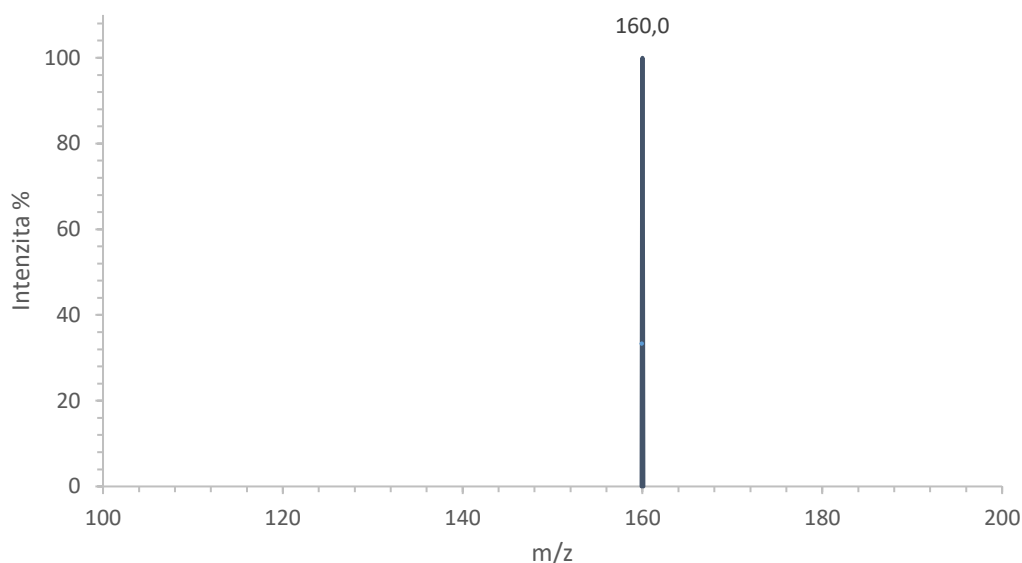
Molekulový ión interného štandardu



Obraz 6 Hmotnostné spektrum interného štandardu v móde MS2 SCAN, koncentrácia IS $1,38 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, nástrek $1,0 \mu\text{l}$, elučné činidlo ACN:H₂O, 1:1, (v/v), prietok mobilnej fázy $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota autosampleru $6,0 \text{ }^\circ\text{C}$, fragmentačné napätie 135 V

V režime MS2 SIM sa hľadalo optimálne nastavenie fragmentačného napätia. Zistená optimálna hodnota bola 170 V. Pri nastavení produktového iónu boli vykonané merania s rôznymi kolíznymi energiami 50-80 V. Najintenzívnejšia odozva bola získaná pri 65 V. Získané fragmentačné spektrum je uvedené na obraze 7.

Produktový ión značeného abirateronu



Obraz 7 Fragmentačné spektrum m/z 354,2, koncentrácia IS 1,38 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, ná-strek 1,0 μl , elučné činidlo ACN:H₂O, 1:1, (v/v), prietok mobilnej fázy 0,3 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota autosamplera 6,0 °C, fragmentačné napätie 135 V, kolízna energia 65 V

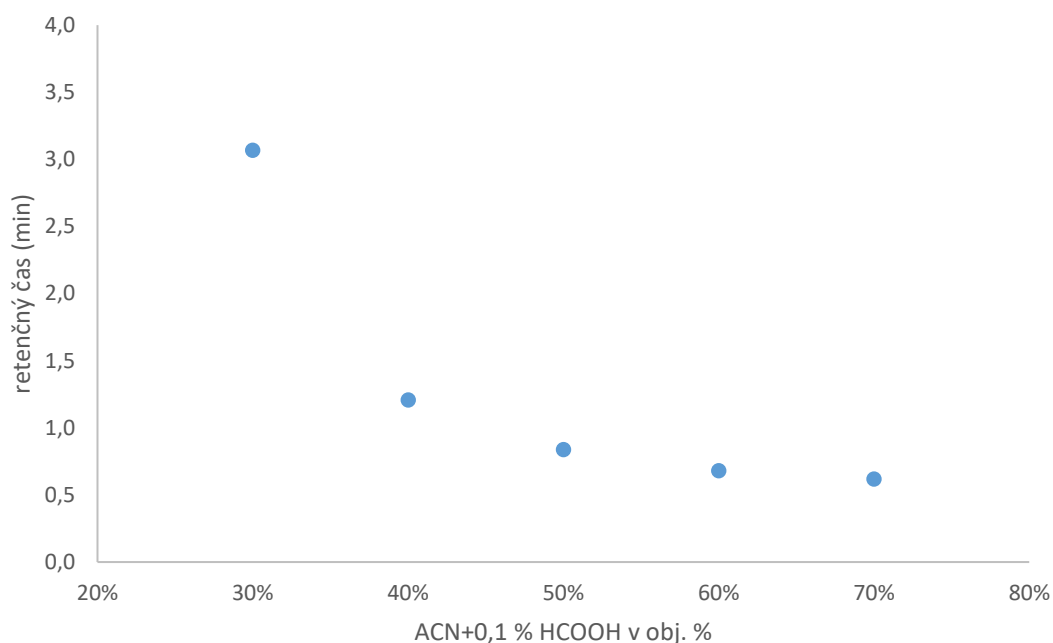
V poslednom kroku bol optimalizovaný prietok plynu, teplota plynu a nebulizér. Optimum prietoku plynu bol hľadaný pri hodnotách 7-12 $\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. Ako optimálny sa ukázal 8 $\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. Počas nastavenia teploty plynu, pri 400 °C bola dosiahnutá najvyššia odozva prístroja, avšak kvôli výraznému zvýšeniu šumu bola zvolená nižšia teplota, 350 °C. Nebulizér bol vyskúšaný okrem pôvodne nastavenej 35 psi aj pri 45 psi, ale lepší výsledok bol dosiahnutý pri pôvodnej hodnote.

4.2. Optimalizácia vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie

Pre optimalizáciu zloženia mobilnej fázy bola používaná kolóna Kinetex C18 (50 x 2,1 mm, 1,3 μm). Vzorka bola pripravená podľa kapitoly 3.4., o koncentrácii 10,0 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ v plazme potkana. Prietoková rýchlosť bola 0,2 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a nástrek 1,0 μl .

V prvom kroku boli vyskúšané rôzne pomery elučného činidla pri isokratickej elúcii. Cieľom bolo zistenie vplyvu zloženia mobilnej fázy na chromatografické chovanie abirateronu. Pri každej sade meraní sa najprv meral čistý acetonitril, následne dvakrát vzorka abirateronu a v poslednom kroku opäť čistý acetonitril. Meranie acetonitrilu bolo potrebné, aby sa zabránilo prenosu abirateronu medzi jednotlivými meraniami a aby sa zistilo, či k prenosu naozaj nedošlo. Kyselina mravčia bola pridaná aj do vodnej, aj do organickej fázy pre úpravu hodnoty pH, k zlepšeniu tvaru chromatografických pík a pre poskytnutie zdroja protónov pri meraniach kolónou s reverznými fázami. Závislosti zloženia mobilnej fázy na obj. % zložky A elučného činidla (A: $\text{CH}_3\text{CN}+0,1\% \text{HCOOH}$, B: $\text{H}_2\text{O}+0,1\% \text{HCOOH}$) je znázornené na obraze 8. Z grafu vidíme, že so znížením obsahu acetonitrilu v mobilnej fáze dochádza k nárastu retencie abirateronu, čo je typické správanie v chromatografii na reverzných fázach.

Závislosť zloženia mobilnej fázy na retenčný čas



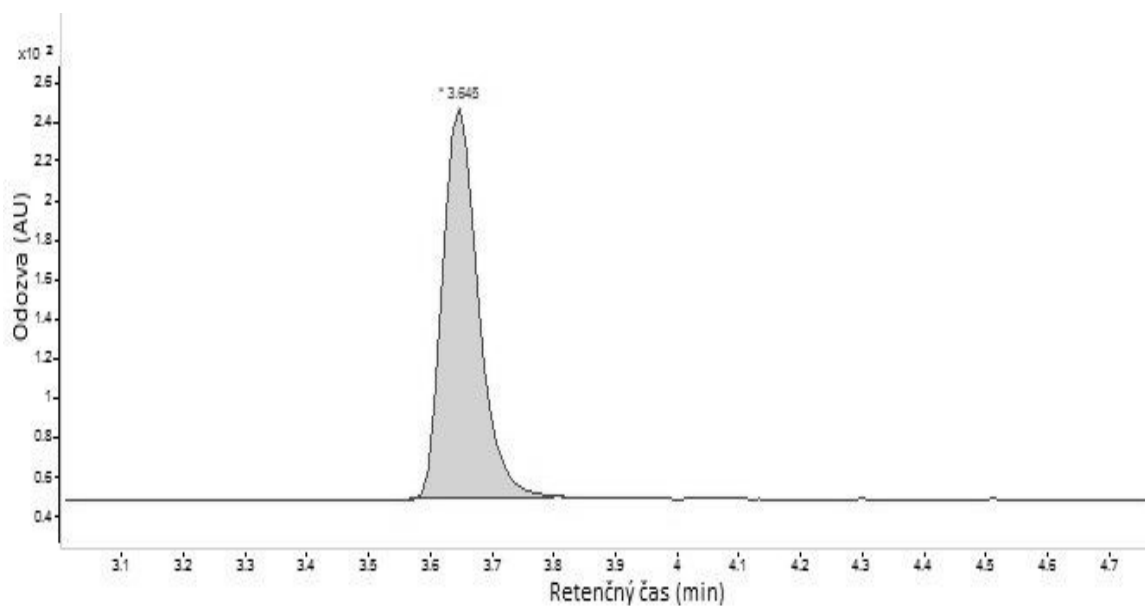
Obraz 8 Závislosti zloženia mobilnej fázy na obj % zložky A elučného činidla (A: CH₃CN+0,1 % HCOOH, B: H₂O+0,1 % HCOOH), koncentrácia abirateronu 10,0 ng · ml⁻¹ v plazme potkana, nástrek 1,0 μl, kolóna Kinetex C18 (50 x 2,1mm, 1,3 μm) prietoková rýchlosť 0,2 ml · min⁻¹

Pri vyhodnotení presnosti sady dvoch meraní boli vypočítané smerodajné odchýlky. Maximálna hodnota bola $\sigma = 0,002$ min, ktorá bola zanedbateľná. Gradientová elúcia bola používaná k zníženiu vplyvu matrice krvnej plazmy na ionizáciu, a tým pádom k zvýšeniu intenzity odozvy prístroja a zlepšeniu tvaru píku. Výsledný gradient je uvedený v tabuľke 3, samotné meranie sa vykonávalo od 3,0 do 4,8 minút retenčného času.

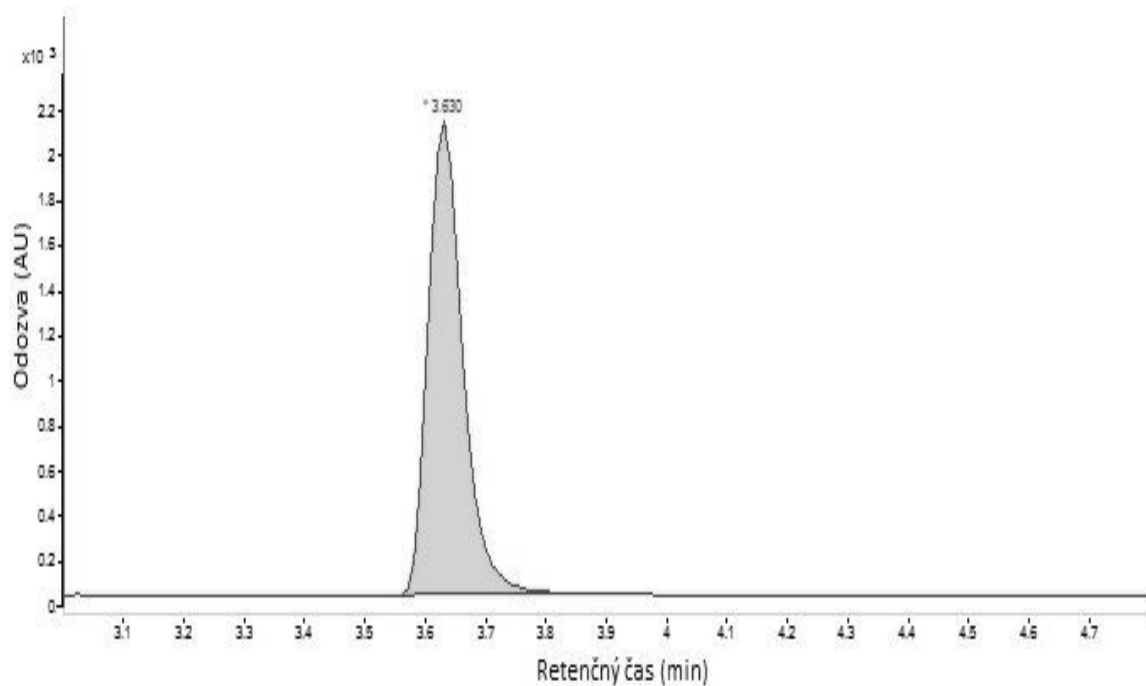
Tabuľka 3 Používaný gradient (A: CH₃CN+0,1 % HCOOH, B: H₂O+0,1 % HCOOH)

Retenčný čas [min]	A (%)	B (%)
0	30	70
1,5	90	10
3,0	90	10
3,5	30	70
6,0	30	70

Retenčné časy pri použití gradientovej elúcie boli namerané aj pre abirateron (obraz 9), aj pre interný štandard (obraz 10). Pri týchto meraniach bola vymenená kolóna na ACQUITY UPLC BEH C18, 100 x 2,1mm; 1,7 µm, a bola zmenená prietoková rýchlosť na 0,35 ml · min⁻¹.



Obraz 9 Retenčný čas 1,0 µl nástreku abirateronu koncentrácie 10,0 ng · ml⁻¹, v móde MRM, kolóna ACQUITY UPLC BEH C18, 100 x 2,1mm; 1,7 µm, gradientová elúcia, prietoková rýchlosť 0,35 ml · min⁻¹



Obraz 10 Retenčný čas 1,0 μl nástreku značeného abirateronu koncentrácie $10,0 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, v móde MRM, kolóna ACQUITY UPLC BEH C18, 100 x 2,1mm; 1,7 μm , gradientová elúcia, prietoková rýchlosť $0,35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

4.3. Výsledná metóda

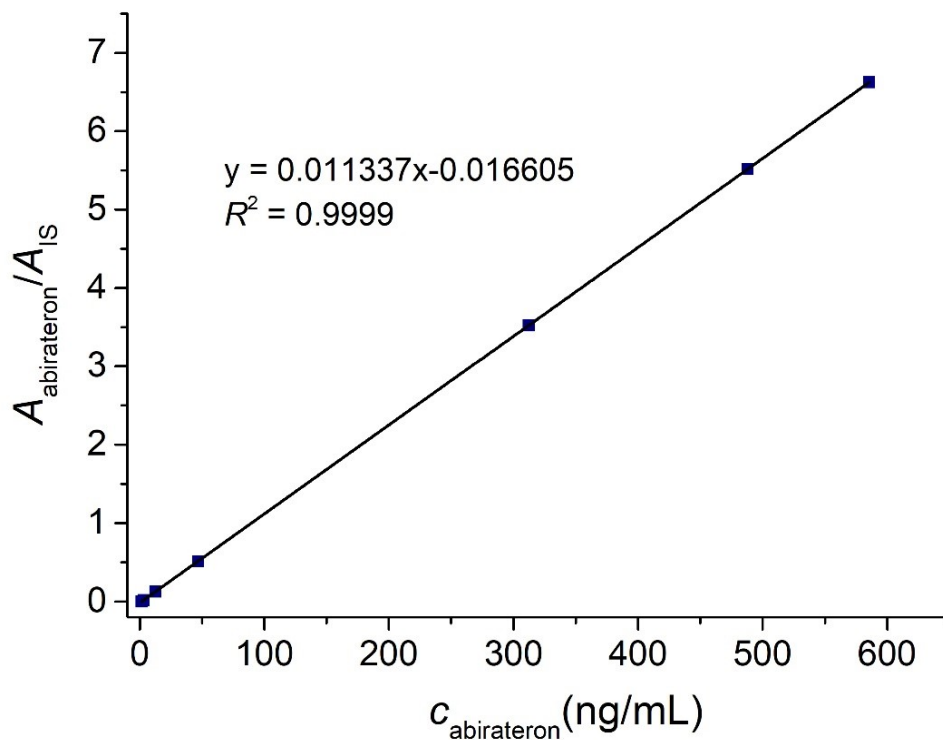
Kalibrácia prebiehala použitím abirateronu a interného štandardu, podľa postupu uvedeného v kapitole 3.5. K nastaveniu prístroja boli používané optimalizované podmienky detekcie a optimalizované podmienky separácie. Zhrnutie týchto parametrov sa nachádza v tabuľke 4.

Tabuľka 4 Zhrnutie parametrov optimalizovanej metódy

Kolóna:	ACQUITY UPLC BEH C18, 100 x 2,1mm; 1,7 μm (Waters)
Komponent A:	Acetonitril
Komponent B:	H ₂ O
Prietoková rýchlosť:	0,35 ml \cdot min ⁻¹
Dávkovaný objem:	2,0 μl ;
Teplota autosampleru:	6 °C
Teplota kolóny:	40 °C
	QqQ s ESI v pozitívnom iónovom móde
	Mód MRM
	MRM prechod abirateronu: 350.2 > 156
	MRM prechod interného štandardu 354.2 > 160
	Fragmentor 170 V,
Detekcia:	Kolízna energia 65 V
	Teplota plynu: 350 °C
	Prietok plynu: 8 l \cdot min ⁻¹
	Nebulizér: 35 psi
	Od 0 do 3,0 minúty do odpadu, od 3,0 do 4,8 minút merané, od 4,8 do 6,0 minút do odpadu.

K vytvoreniu kalibračnej závislosti bolo nameraných sedem vzoriek v móde MRM. Na osi nezávislej premennej boli vynesené výsledné koncentrácie abirateronu z pripravených vzoriek, a na osi závislej premennej pomery plôch pík abirateronu k internému štandardu.

Pri používaní váženej lineárnej regresie $1/x^2$, pri priložení regresnej priamky bolo rozhodnuté, pretože poskytovala najmenší koeficient determinácie. Správnosť metódy potvrdí i publikácia, podľa ktorej chyby odozvy prístroja pri rôznych koncentráciách ukazujú koreláciu s koncentráciou analytu a majú väčší rozptyl (σ^2) a smerodajnú odchýlku (σ) pri vyšších koncentráciách. Používanie váženej lineárnej regresie $1/x^2$ sa všeobecne odporúča pri metódach LC-MS/MS na odstránenie týchto chýb a získanie nezávislosti kalibračných medzier na výslednú kalibračnú priamku. Vážená lineárna regresia je založená za predpokladu, že váhy sú ideálne a presne známe, čo ale v prípade LC-MS/MS meraniach väčšinou neplatí. Tento nedostatok metódy však výsledok regresie skoro vôbec neovplyvňuje [24].



Obraz 11 Kalibračná závislosť koncentrácie abirateronu v krvnej plazme na pomere plôch pík abirateronu k internému štandardu, použitím váženej lineárnej regrese, váhou $1/x^2$, merané pri podmienkach, zhrnuté v tabuľke 4

Kalibračná závislosť bola vytvorená pri koncentráciách $1,5\text{-}600 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, výsledkom regresnej analýzy bola získaná závislosť $y = 0,011337x - 0,016605$, kde závislá premenná y značí pomer plôch pík abirateronu k internému štandardu a nezávislá premenná x koncentráciu abirateronu v $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Ukázala sa lineárna závislosť s koeficientom determinácie $R^2 = 0,9999$, čo potvrdí presnosť metódy a účinnosť nastavených parametrov pri HPLC-MS/MS analýze.

5. Záver

V tejto bakalárskej práci sa podarilo vyvinutie metódy na stanovenie abirateronu v matrici krvnej plazmy.

Pri optimalizovaných separačných podmienkach separácia prebiehala na kolóne ACQUITY UPLC BEH C18 (100 x 2,1mm, 1,7 μm) s použitím gradientovej elúcie acetonitrilu ako zložky A, a deionizovanej vody ako zložky B, (t: 0–1,5-3,0-3,5-6,0 min, A: 30-90-90-30-30 %, v/v). Prietok mobilnej fázy bol $0,35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objem nástreku $2 \mu\text{l}$, teplota autosampleru $6 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota kolóny $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Výsledná metóda pomocou hmotnostnej spektrometrie bola vykonávaná v pozitívnom móde, k ionizácii analytov bol používaný elektrosprej, sken prebiehal v móde MRM.

Využitím optimalizovanej metódy bola zostrojená kalibračná závislosť pomeru plôch pík abirateronu k internému štandardu na koncentráciu analytu v matrici krvnej plazmy. Kalibrácia prebiehala v koncentráciách $1,5\text{-}600 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, s regresiou $R^2 = 0,9999$. Novo vyvinutá HPLC-MS/MS metóda je vhodná na stanovenie abirateronu v krvnej plazme a bude následne využitá na meranie farmakokinetického štúdie.

6. Použitá literatura

- [1] Abiraterone, CAS Registry number 154229-19-3, [online], dostupné na <https://scifinder-n.cas.org/>
- [2] Souhrn údajů o přípravku SÚKL:0168443, Státní ústav pro kontrolu léčiv, [online], dostupné na <http://www.sukl.cz/>
- [3] A. Papangelou, A. J. Olszanski, C. A. Stein, B. Bosch, and P. Nemeth, “The Effect of Food on the Absorption of Abiraterone Acetate from a Fine Particle Dosage Form: A Randomized Crossover Trial in Healthy Volunteers,” *Oncol. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 161–170, 2017.
- [4] T. Belleville *et al.*, “A HPLC-fluorescence method for the quantification of abiraterone in plasma from patients with metastatic castration-resistant prostate cancer,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 989, pp. 86–90, 2015.
- [5] M. Alyamani, Z. Li, S. K. Upadhyay, D. J. Anderson, R. J. Auchus, and N. Sharifi, “Development and validation of a novel LC–MS/MS method for simultaneous determination of abiraterone and its seven steroidal metabolites in human serum: Innovation in separation of diastereoisomers without use of a chiral column,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 172, pp. 231–239, Sep. 2017.
- [6] S. R. Denmeade and J. T. Isaacs, “A history of prostate cancer treatment,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 5, pp. 389–396, 2002.
- [7] A. V. Schally, A. J. Kastin, and A. Arimura, “Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies.,” *Fertil. Steril.*, vol. 22, no. 11, pp. 703–721, 1971.
- [8] I. Masic, “Nobel Prize Winners in Medicine and Physiology and their Contribution to Development of Modern Medicine,” *Mater. Socio Medica*, vol. 20, no. 4, p. 242, 2008.
- [9] A. O’Donnell *et al.*, “Hormonal impact of the 17 α -hydroxylase/C17,20-lyase

- inhibitor abiraterone acetate (CB7630) in patients with prostate cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 90, no. 12, pp. 2317–2325, 2004.
- [10] Z. Li *et al.*, “Redirecting abiraterone metabolism to fine-tune prostate cancer anti-androgen therapy,” *Nature*, vol. 533, no. 7604, pp. 547–551, 2016.
- [11] V. Martins, Y. Asad, N. Wilsher, and F. Raynaud, “A validated liquid chromatographic–tandem mass spectroscopy method for the quantification of abiraterone acetate and abiraterone in human plasma,” *J. Chromatogr. B*, vol. 843, no. 2, pp. 262–267, 2006.
- [12] S. V. Kumar *et al.*, “Validated RP-HPLC/UV method for the quantitation of abiraterone in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study in rats,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 27, no. 2, pp. 203–207, 2013.
- [13] T. Belleville *et al.*, “A HPLC-fluorescence method for the quantification of abiraterone in plasma from patients with metastatic castration-resistant prostate cancer,” *J. Chromatogr. B*, vol. 989, pp. 86–90, May 2015.
- [14] S. Gurav, R. Punde, J. Farooqui, M. Zainuddin, S. Rajagopal, and R. Mullangi, “Development and validation of a highly sensitive method for the determination of abiraterone in rat and human plasma by LC-MS / MS-ESI : application to a pharmacokinetic study,” vol. 2011, no. September 2011, pp. 761–768, 2012.
- [15] M. van Nuland, H. Rosing, J. de Vries, H. Ovaa, J. H. M. Schellens, and J. H. Beijnen, “An LC–MS/MS method for quantification of the active abiraterone metabolite $\Delta(4)$ -abiraterone (D4A) in human plasma,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1068–1069, pp. 119–124, Nov. 2017.
- [16] K. Kim *et al.*, “Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Simultaneous quantitation of abiraterone , enzalutamide , N -desmethyl enzalutamide , and bicalutamide in human plasma by LC – MS / MS,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 138, pp. 197–205, 2017.
- [17] K. Kim *et al.*, “Simultaneous quantitation of abiraterone, enzalutamide, N -desmethyl enzalutamide, and bicalutamide in human plasma by LC–MS/MS,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 138, pp. 197–205, May 2017.

- [18] P. Caron, V. Turcotte, E. Lévesque, and C. Guillemette, “An LC-MS / MS method for quantification of abiraterone, its active metabolites D (4) - abiraterone (D4A) and 5 α -abiraterone, and their inactive glucuronide derivatives,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1104, no. December 2018, pp. 249–255, 2019.
- [19] J. Rodriguez, “A Rapid, Direct and Validated HPLC- Fluorescence Method for the Quan- tification of Abiraterone and Abiraterone Acetate in Urine and Serum Samples from Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer,” *Curr. Pharm. Anal.*, no. April, pp. 233–238, 2018.
- [20] A. Bhatnagar *et al.*, “Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Quantitation of the anticancer drug abiraterone and its metabolite (4)-abiraterone in human plasma using high-resolution mass spectrometry,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 154, pp. 66–74, 2018.
- [21] J. H. Gross, *Mass Spectrometry*. 2011.
- [22] W. B. Dunn, “Mass Spectrometry in Systems Biology: An Introduction,” in *Methods in Systems Biology*, vol. 500, D. Jameson, M. Verma, and H. V. B. T.-M. in E. Westerhoff, Eds. Academic Press, 2011, pp. 15–35.
- [23] K. pyo Kim *et al.*, “Simultaneous quantitation of abiraterone, enzalutamide, N-desmethyl enzalutamide, and bicalutamide in human plasma by LC–MS/MS,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 138, pp. 197–205, 2017.
- [24] H. Gu, G. Liu, J. Wang, A. F. Aubry, and M. E. Arnold, “Selecting the correct weighting factors for linear and quadratic calibration curves with least-squares regression algorithm in bioanalytical LC-MS/MS assays and impacts of using incorrect weighting factors on curve stability, data quality, and assay perfo,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 18, pp. 8959–8966, 2014.