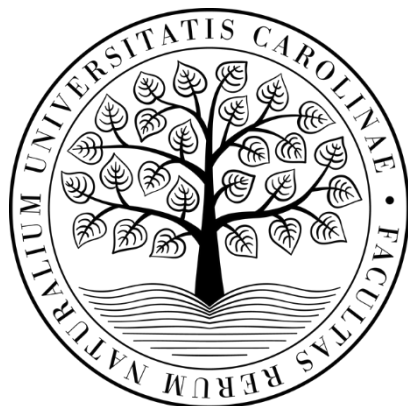


**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Denisa Plášilová**

**VÝVOJ UHPLC-MS/MS METODY KE STANOVENÍ RIVAROXABANU  
V KRYŠÍM SÉRU**

**DEVELOPMENT OF A UHPLC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION  
OF RIVAROXABAN IN RAT SERUM**

**Bakalářská práce**

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

Praha 2021

## **Prohlášení**

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

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

V Praze dne \_\_\_\_\_

Podpis \_\_\_\_\_

## Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout specifickou UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení rivaroxabanu v krysím séru.

Nejprve bylo optimalizováno nastavení hmotnostního spektrometru. Byly nalezeny vhodné MRM přechody pro rivaroxaban a jeho isotopicky značený interní standard. Pro rivaroxaban byl nalezen MRM přechod 436,1 → 145,05 s optimálními hladinami energie Q1 = -12,0 V; CE = -30,0 V; Q2 = -27,0 V. Pro rivaroxaban D4 byl nalezen MRM přechod 440,1 → 145,0 s optimálními hladinami energie Q1 = -22,0 V; CE = -31,0 V; Q2 = -25,0 V. Parametry nastavení iontového zdroje byly následující: průtok nebulizačního plynu 3 l/min; průtok ohřevného plynu 10 l/min; teplota rozhraní 300 °C; desolvatační teplota 526 °C; DL teplota 250 °C; teplota tepelného bloku 400 °C; průtok sušícího plynu 10 l/min. Optimální chromatografická metoda byla následující: Chromatografická kolona Poroshell 120 SB AQ, 100 × 2,1 mm, 2,6 μm (Agilent); mobilní fáze se skládala z acetonitrilu s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (A) a z destilované vody s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (B); průtok mobilní fáze 0,5 ml/min; gradientová eluce (čas: 0-1-2-3,5-4-6,5 min, A: 20-20-80-80-20-20 % v/v); teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C; doba analýzy 6,5 minut; objem nástřiku 2 μl.

Optimalizovaná UHPLC-MS/MS metoda byla lineární (vážená lineární regrese  $1/x^2$ ) v koncentračním rozmezí 0,15-383,33 ng/ml s koeficientem determinace 1,000 znamená výbornou linearitu. Přesnost (relativní směrodatná odchylka) pro koncentrace 12,27 ng/ml a 76,67 ng/ml je v rozmezí 2 až 5 %. Správnost (relativní chyba) je pro tyto koncentrace také v rozmezí 2 až 5 % a tím splňují kritérium pro bio-analytickou aplikaci. Pro koncentrace 0,77 ng/ml byla přesnost 58,7 % a správnost 33,6 %, což poukazuje pravděpodobně na chybu v přípravě roztoku.

**Klíčová slova:** rivaroxaban, krysí sérum, UHPLC-MS/MS

## Abstract

This bachelor thesis is focused on development of a specific UHPLC-MS/MS method for the determination of rivaroxaban in rat serum.

At first, the setting of the mass spectrometer was optimized. Suitable MRM transitions were found for rivaroxaban and its isotopically labeled internal standard. For rivaroxaban was found the MRM transition 436.1 → 145.05 with optimal energy levels Q1 = -12.0 V; CE = -30.0 V; Q2 = -27.0 V. For rivaroxaban D4 was found the MRM transition 440.1 → 145.0 with optimal energy levels Q1 = -22.0 V; CE = -31.0 V; Q2 = -25.0 V. The ion source setting parameters were as follows: nebulizing gas flow 3 l/min; heating gas flow 10 l/min; interface temperature 300 °C; desolvation temperature 526 °C; DL temperature 250 °C; heat block temperature 400 °C; drying gas flow 10 l/min. The optimal chromatographic method was as follows: A Poroshell 120 SB AQ, 100 × 2.1 mm, 2.6 μm (Agilent) chromatographic column; the mobile phase consisted of acetonitrile with the addition of 0.1% formic acid (A) and distilled water with the addition of 0.1% formic acid (B); flow rate of the mobile phase 0.5 ml/min; gradient elution (time: 0-1-2-3.5-4-6.5 min; A: 20-20-80-80-20-20 % v/v); autosampler temperature 15 °C; column temperature 40 °C; time of analysis 6.5 minutes; injection volume 2 μl.

The optimized UHPLC-MS/MS method was linear (weighted linear regression  $1/x^2$ ) in the concentration range of 0.15-383.33 ng/ml with a coefficient of determination of 1.000 means excellent linearity. The accuracy (relative standard deviation) for concentrations of 12.27 ng/ml and 76.67 ng/ml is in the range of 2 to 5 %. The trueness (relative error) for these concentrations is also in the range of 2 to 5 % and thus meet the criteria for bio-analytical application. For the concentration of 0.77 ng/ml was 58.7 % accuracy and 33.6 % trueness, which probably indicates a mistake in the preparation of the solution.

**Key words:** rivaroxaban, rat serum, UHPLC-MS/MS

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, za čas, který mi věnoval a také za trpělivost při zpracování mé bakalářské práce.

Další poděkování patří mým blízkým, kteří mi byli během studia oporou.

## Obsah

Obsah .....	6
Seznam zkratk.....	7
Seznam symbolů.....	10
1. Úvod.....	11
2. Teoretická část .....	12
2.1. Rivaroxaban.....	12
2.1.1. Stanovení.....	12
2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	15
2.2.1. Trendy HPLC .....	15
2.3. Hmotnostní spektrometrie.....	18
2.3.1. Trendy MS .....	18
2.3.2. Tandemová hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem .....	18
3. Experimentální část.....	21
3.1. Použité chemikálie a přístroje .....	21
3.2. Příprava zásobních roztoků.....	22
3.3. Kalibrace .....	22
3.4. Přesnost a správnost metody .....	23
4. Výsledky a diskuse.....	24
4.1. Optimalizace hmotnostního spektrometru .....	24
4.2. Optimalizace gradientové LC metody .....	27
4.3. Kalibrační křivka .....	29
4.4. Přesnost a správnost.....	31
5. Závěr.....	32
6. Seznam použité literatury .....	33

## Seznam zkratek

2D-HPLC	dvourozměrná kapalinová chromatografie (z anglického <i>Two Dimensional High Performance Liquid Chromatography</i> )
ACN	acetonitril
C18	oktadecylová stacionární fáze
CE	kolizní energie
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
ESI-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (z anglického <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> )
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HR-MS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>High-resolution Mass Spectrometry</i> )
IEC	iontově výměnná chromatografie (z anglického <i>Ion Exchange chromatography</i> )
kapilární LC	kapilární kapalinová chromatografie
LC-ESI-MS	spojení kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
LLOQ	dolní mez kvantifikace (z anglického <i>Lower Limit of Quantification</i> )
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (z anglického <i>Microemulsion Electrokinetic Chromatography</i> )

MMC	multimodální chromatografie (z anglického <i>Multimodal Chromatography</i> )
MRM	sledování mnoha reakcí (z anglického <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )
m/z	poměr hmotnosti a náboje
nano LC	nanokolonová kapalinová chromatografie
NP-LC	kapalinová chromatografie na normálních fázích (z anglického <i>Normal Phase Liquid Chromatography</i> )
QqQ	trojitý kvadrupól
Q	kvadrupól
q	kolizní cela
RE	relativní chyba
RP-LC	kapalinová chromatografie na obrácených fázích (z anglického <i>Reverse Phase Liquid Chromatography</i> )
RSD	relativní směrodatná odchylka
SALDI-MS	hmotnostní spektrometrie s pomocí laserové desorpce a ionizace za účasti povrchu matrice (z anglického <i>Surface-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry</i> )
SD	směrodatná odchylka



SIM	měření jednoho iontu (z anglického <i>Single Ion Monitoring</i> )
SRM	sledování vybraných reakcí (z anglického <i>Selected Reaction Monitoring</i> )
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> )
UHPLC-MS/MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
UV	ultrafialová oblast spektra (z anglického <i>Ultraviolet</i> )
UV-VIS	detektor snímající v ultrafialové i ve viditelné oblasti spektra

## Seznam symbolů

c	koncentrace [mg/ml; $\mu\text{g/ml}$ ; ng/ml; mmol/l; ppm]
f	frekvence [Hz]
l	délka [mm; $\mu\text{m}$ ]
m	hmotnost [mg]
M	molekulová hmotnost [Da]
p	tlak [bar]
Q	průtok [l/min; ml/min]
RPM	otáčky za minutu
t	čas [min]
t	teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
U	elektrické napětí [kV; V; mV]
V	objem [ $\mu\text{l}$ ]
$\lambda$	vlnová délka [nm]

## 1. Úvod

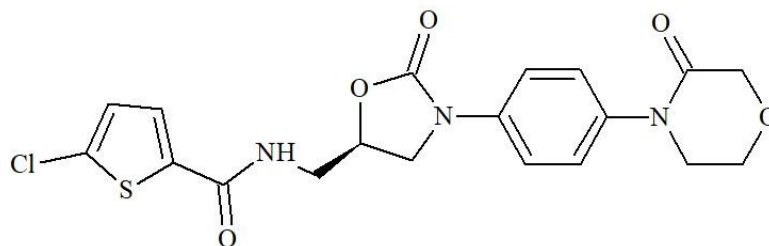
Rivaroxaban je léčivá látka, která patří do skupiny antitrombotik, komerčně prodávána pod názvem Rivaroxaban Aurovitas o síle 15 nebo 20 mg. Byl vyvinut pro prevenci cévní mozkové příhody a systémové embolizace s nevalvulární fibrilací síní. V současnosti je zájem farmaceutického průmyslu nakloněn k inovativním formulacím léčivých přípravků, které umožní podání nižší dávky nebo nahrazení jinou účinnou látkou. Inovativní formulace mohou mít za následek lepší funkci, rychlejší nástup účinku, omezení negativních projevů na léčivou látku a mimo jiné i levnější výrobu s reálným dopadem na nižší pořizovací cenu pro pacienta.

Tato práce vznikla v rámci dlouhodobé spolupráce Přírodovědecké fakulty UK, farmakologického ústavu 1. lékařské fakulty UK, Vysoké školy chemicko-technologické a firmy Zentiva. V rámci této spolupráce jsou vyvíjeny nové formulační postupy a v souvislosti s tím je sledována farmakokinetika daných farmaceuticky aktivních látek na modelových organismech. Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout selektivní a dostatečně citlivou UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení rivaroxabanu v krysím séru.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Rivaroxaban

Rivaroxaban (obrázek č. 1) je účinná látka léčivého přípravku řazeného mezi antitrombotika, konkrétně se jedná o selektivní přímý inhibitor aktivovaného koagulačního faktoru X (FXa). Komerčně je tato účinná látka prodávána pod názvem Rivaroxaban Aurovitas a dostupná je ve formě potahovaných tablech o síle 15 mg nebo 20 mg. Perorálně má okamžitý nástup účinku a své maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 2 až 4 hodinách. Mezi jeho terapeutické indikace patří prevence cévní mozkové příhody a systémové embolizace s nevalvulární fibrilací síní a jedním nebo více rizikovými faktory (např. srdeční selhání, hypertenze a prodělaná cévní mozková příhoda)<sup>1,2</sup>. Využívá se jako alternativa warfarinu při prevenci a léčbě tromboembolické nemoci, protože je méně ovlivňován jídlem a souběžnými medikamenty díky lepšímu antikoagulačnímu efektu<sup>3</sup>. Dále je možné rivaroxabanem nahradit např. heparin nebo fondaparinux<sup>1</sup>.



Obrázek 1: strukturní vzorec rivaroxabanu

#### 2.1.1. Stanovení

Ke stanovení rivaroxabanu se hojně využívá kapalinová chromatografie a detekce pomocí hmotnostního spektrometru, přičemž se stanovení provádí v biologických matricích, jako je krysí nebo lidská plazma či sérum.

První popsaná metoda charakterizující rivaroxaban byla publikována v roce 2013 a jejím autorem je Çelebier Mustafa<sup>4</sup>. Cílem studie bylo vyvinout přesnou, robustní a selektivní metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení rivaroxabanu v tabletách. Separace byla provedena na koloně Phenomenex Luna 5 µm C18 100 A LC (250 × 4,6 mm) s mobilní fází ve složení acetonitril a voda v poměru 55:45 (v/v). Detekce probíhala přes UV spektrometrii při vlnové délce 249 nm<sup>5</sup>.

Další studie se zabývala stanovením rivaroxabanu pomocí elektrochemických metod, konkrétně šlo o square wave a cyklickou voltametrii. Byla použita rtuťová kapková elektroda a argentchloridová jako referenční. Optimální podmínky voltametrické metody čtvercových vln za použití Brittonova-Robinsonova pufru o pH 8,0 byly: frekvence 80 Hz; přírůstek skenování 5 mV a amplituda pulsu 25 mV. Vyvinutá metoda byla validována a použita pro stanovení rivaroxabanu v tabletách. Výsledky z této metody byly statisticky porovnány s výsledky získané pomocí kapalinové chromatografie a bylo zjištěno, že zde není žádný významný rozdíl<sup>6</sup>.

Rivaroxaban lze stanovit i pomocí mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEEKC), což je metoda patřící mezi kapilární elektroforézu umožňující separaci složek na bázi mikroemulze. Mikroemulze se skládá z olejové a vodní fáze, které vytvoří mikroemulzní kapky. Analyty se následně rozdělí mezi vodnou a olejovou fázi a na chromatografickém principu se rozdělí<sup>7</sup>. Z toho důvodu se využívá ve farmaceutickém průmyslu pro stanovení léčivých látek. Studie zaměřená na tuto metodu vytvořila a validovala MEEKC pro analýzu rivaroxabanu ve farmaceutickém preparátu. Kapilára byla tvořena oxidem křemičitým a bylo použito napětí 30 kV. Mikroemulzi tvořil tetraboritan o koncentraci 13 mmol/l o pH 9,75; 1,2% dodecylsulfát sodný; 1,0% ethylacetát a 2,4% butanol<sup>8</sup>.

Ke stanovení rivaroxabanu pomocí spektrometrických metod může být využita hmotnostní spektrometrie s pomocí laserové desorpce a ionizace za účasti povrchu matrice (SALDI-MS). Takto lze stanovit účinnou látku v lidském séru nebo moči. Jako matrice bylo použito koloidní palladium, zlato a stříbro. Byly získány iontové signály při  $m/z$  458,05 a odpovídaly iontu aduktu sodíku rivaroxabanu. Při použití koloidního palladia byla intenzita signálu 1,5krát větší než u ostatních matric. Optimální koncentrace koloidního palladia v rivaroxabanu byla 10 ppm<sup>9</sup>.

Pro rivaroxaban a další přímá perorální antikoagulancia se vývoj nových metod pro jejich kvantifikaci neustále zvyšuje. Vyvinulo se několik metod kapalinové chromatografie, hlavně pro rutinní stanovení v tělesných tekutinách, které se vyznačují přesností a reprodukovatelností. Metody kapalinové chromatografie se používají jak pro terapeutické monitorování rivaroxabanu, tak i během kontroly kvality formulace a neklinického i klinického vývoje. Metody HPLC nebo UHPLC spojené s MS/MS nebo

UV detektorem byly brány jako nejlepší strategie pro stanovení v biologických vzorcích díky své schopnosti vysokého rozlišení, a tím nahradily metody jako např. specifické koagulační testy<sup>4</sup>. V tabulce 1 jsou uvedeny některé typy stanovení rivaroxbanu pomocí kapalinové chromatografie.

*Tabulka 1: Přehled stanovení rivaroxbanu pomocí metod kapalinové chromatografie*

Matrice	Kolona	Detekce	Mobilní fáze	LLOQ ng/ml	Citace
Plazma potkanů	Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 50 mm; 1,7 μm)	ESI-MS/MS	ACN a 0,1% HCOOH	1,0	10
Lidské sérum	Acquity UPLC HSS T3 (2,1 × 100 mm, 1,8 μm)	ESI-MS/MS	ACN a 0,1% HCOOH	—	11
Plazma krys	Agilent Eclipse plus C18 (100 × 2,1 mm; 3,5 μm)	ESI-MS/MS	ACN + 0,1% HCOOH; 0,1% vodný roztok HCOOH	0,5	12
Plazma krys	Inertsil ODS3 C18 150 × 4,6 mm; 5 μm)	ESI-MS/MS	ACN + 0,1% HCOOH; vodný roztok HCOONa	0,5	13
Lidská plazma	Purosphere RP18e (125 × 4 mm; 5 μm)	ESI-MS/MS	ACN a 0,01 mol/l pufr CH <sub>3</sub> COONa upravený na pH 3,0 pomocí HCOOH	0,5	4
Tablety	Phenomenex Luna C18 100 Å LC column (250 × 4,6 mm; 5 μm)	UV 249 nm	ACN: H <sub>2</sub> O (55:45 v/v)	5,0	4
Lidská moč	Zorbax Rapid Resolution High Definition SB-C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,8 μm)	ESI-MS/MS	0,1% HCOOH: ACN (70:30 v/v)	0,005	4
Lidská plazma	Hypersil Gold C18 (50 × 2,1 mm; 1,9 μm)	ESI-MS/MS	(A) ACN; (B) Ultračistá H <sub>2</sub> O obsahující 0,1% HCOOH	1,0	4
Lidská plazma	Acquity UPLC BEH Phenyl (50 × 2,1 mm; 1,7 μm)	ESI-MS/MS	(A): H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH (95:5 v/v); (B) H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> OH (5:95 v/v) Oba roztoky s 0,1% CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	1,0	4
Lidská plazma	Hypersil Gold C8 (50 × 2,1 mm; 1,9 μm)	ESI-MS/MS	(A) ACN; (B) 0,1% HCOOH	0,84 – 2,01	4
Lidská plazma	Poroshell 120, EC-C18 (50 × 3,00 mm; 2,7 mm); UHPLC guard EC-C18 (5 × 3,0 mm; 2,7 mm)	UV-VIS 294;249; 280; 340 nm	(A) H <sub>2</sub> O; (B) CH <sub>3</sub> OH Oba roztoky s 0,1% HCOOH	15,0; 15,0; 16,0; 19,0	4

*LLOQ – dolní mez kvantifikace*

## 2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, jejímž principem je rozdílná rychlost pohybu látek mezi stacionární fází v koloně a kapalnou mobilní fází, která je vháněna na kolonu pod vysokým tlakem. Tato metoda se hojně využívá v kvalitativní i v kvantitativní analýze<sup>14</sup>.

### 2.2.1. Trendy HPLC

Mezi přední trendy kapalinové chromatografie patří miniaturizace a automatizace metody. Nanokolonová kapalinová chromatografie (nano LC) a kapilární kapalinová chromatografie (kapilární LC) je výsledkem miniaturizace, jedná se zejména o rozměry kolon. Výhodou zmenšení vnitřního průměru kolony je schopnost pracovat s nepatrnými objemy vzorků při nízkých průtocích a minimální spotřeba rozpouštědla a přísad pro eluci. Miniaturizaci dále podléhá průměr částic sorbentu v koloně. Zmenšování průměru umožní velmi vysokou efektivitu separace. K detekci se používá hlavně elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS), protože se hodí pro většinu aplikací v bioanalytické chemii a má oproti jiným systémům detekce výrazně lepší citlivost. Systém nano LC-ESI-MS se využívá v proteomice, medicíně, farmakologii a analýze potravin<sup>15</sup>.

K dalším trendům se může řadit ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Je to metoda podobná HPLC s tím rozdílem, že se používají menší částice a provozní tlak se u novějších přístrojů může pohybovat až kolem 1400 barů<sup>16</sup>. Klíčovým parametrem pro provedení separace při takto vysokých tlacích je stabilita a provedení stacionární fáze. Bylo zavedeno mnoho stacionárních fází pro zkrácení času a zachování selektivity a rozlišení. Nejzákladnější způsob pro zkrácení doby analýzy je zmenšování částic. Postupně se přešlo od částic s průměrem 100  $\mu\text{m}$  až po částice menší než 2  $\mu\text{m}$ . Dalším vývojem byl přechod z neporézních částic C18 na porézní částice C18. Důvodem byla 15krát vyšší kapacita plnění u porézních částic C18<sup>17</sup>.

Pokud se spojí kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, vznikne velmi užitečný nástroj, který se v posledních desetiletích využívá nejen při vývoji nových léčiv, ale i v širším spektru činností farmaceutického průmyslu. Spojení metod se používá pro charakterizaci léčiva, studium metabolismu a identifikaci nečistot nebo produktů rozkladu<sup>18</sup>.

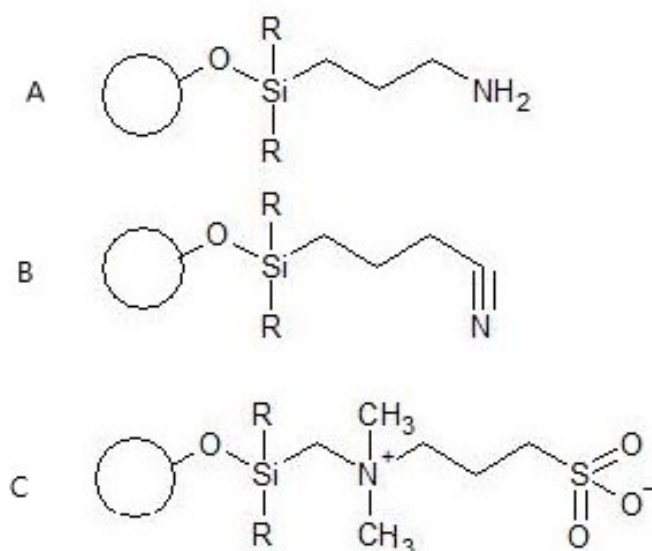
Dvourozměrná, neboli 2D kapalinová chromatografie (2D-HPLC) je metoda, při níž jsou za sebou zapojené alespoň dvě kolony (lišící se v polaritě, popřípadě v retenčním mechanismu) a je zde využito různých typů gradientů. Důvodem je zvýšení počtu separovaných analytů během analýzy. Jsou zde tři možnosti, jak lze separaci na dvou kolonách provést. První z nich je off-line systém, v němž jsou frakce shromážděné z první separace uloženy a často prekoncentrovány před následnou druhou separací. Druhou možností je režim stop-and-go, kde se z první separace vyberou pouze určité frakce, které putují do druhé kolny. Třetí možností je on-line analýza, kdy se všechny frakce převádí na druhou kolonu přes vícecestný ventil<sup>19, 20</sup>.

Další metoda, která se může řadit k moderním trendům kapalinové chromatografie je iontově výměnná chromatografie (IEC), což je metoda umožňující separaci sloučenin iontové povahy. Stacionární fázi tvoří iontoměnič, který vyměňuje ionty sorbentu za ionty jiné. Stacionární fáze může obsahovat buď kladný náboj (jedná se o anex) nebo záporný náboj (jedná se o katex). Výměnnými protiionty mohou být  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $COO^-$ , nebo  $NR_2H^+$ .<sup>21,22</sup>

Pro stanovení malých polárních sloučenin je možné využít alternativní přístup v podobě hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC). Tato metoda využívá hydrofilní stacionární fázi a hydrofobní mobilní fázi. Z historického hlediska lze říct, že tato metoda je považována za formu kapalinové chromatografie na normálních fázích (NP-LC), ale separační mechanismus HILIC je složitější než v NP-LC. HILIC používá tradiční polární stacionární fáze (např. nemodifikovaný silikagel, modifikovaný silikagel polárními skupinami amino-, kyano-), které se používají i u NP-LC. Dále lze použít zwitteriontové stacionární fáze, které mají na povrchu chemicky vázané funkční skupiny nesoucí kladný i záporný náboj, čímž se vyjadřují vysokou polaritou a afinitou k vodě. Struktur kolon pro HILIC je velké množství, zatím však neexistuje žádná univerzální, jakou je např. C18. Na obrázku 2 jsou zachyceny struktury nejběžnějších stacionárních fází používaných u HILIC. Mobilní fáze jsou voleny méně polární a svým složením odpovídají spíše kapalinové chromatografii na obrácených fázích (RP-LC). Mobilní fáze je tvořena směsí vodné složky a méně polárního rozpouštědla (nejčastěji je využíván acetonitril). Mezi výhody HILIC oproti běžné kapalinové chromatografie na normálních fázích nebo na obrácených fázích patří dobrá rozpustnost polárního vzorku ve vodné mobilní fázi a snadné spojení s hmotnostním spektrometrem pro detekci. Aby mohly být



analyzovány i nabité látky, byla vytvořena hydrofilní interakční chromatografie s elektrostatickou repulzí, což je speciální typ HILIC využívající elektrostatické interakce. Stacionární fáze je zde volena tak, aby měla podobný náboj jako analyt. Tím zde dochází k protichůdným interakcím – analyt je odpuzován stacionární fází a zároveň je zadržován na vodné vrstvě kolem stacionární fáze. HILIC se používá pro separaci malých organických kyselin, bazických látek, sacharidů a polárních farmaceutik<sup>23,24</sup>.



Obrázek 2: Schématické znázornění struktury stacionární fáze u hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (převzato a upraveno<sup>23</sup>) A – silikagel modifikovaný amino-skupinou; B – silikagel modifikovaný kyano- skupinou; zwitteriontová stacionární fáze

Metoda kombinující více chromatografických mechanismů se nazývá multimodální chromatografie (MMC). Obvyklá kombinace je iontová výměna a hydrofobní interakce, která zajišťuje dobrou selektivitu a citlivost<sup>25</sup>. Stacionární fáze jsou specifické pro různé kombinace metod a nejčastěji se vyrábí pomocí kovalentní modifikace ligandů navázaných na matici stacionární fáze. Například pro systém HILIC/IEC je stacionární fáze tvořena ligandy obsahující nabitou (amino- nebo karboxy-skupinu) a hydrofilní skupinu. Další kombinací systémů může být RP-LC/HILIC, kde stacionární fázi tvoří kombinace hydrofobní složky (alkylový řetězec) a hydrofilní funkční HILIC skupiny<sup>26</sup>.

## 2.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, kterou lze identifikovat neznámé látky, určit jejich molekulovou hmotnost, složení z prvků a jejich strukturu. Metoda je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Hmotnostní spektrometrii lze rozdělit podle druhu analytu na atomovou MS a molekulovou MS. Atomová MS se používá hlavně pro kvantitativní analýzu téměř všech prvků periodické soustavy. Molekulová MS poskytuje informace o struktuře anorganických komplexů, organických molekul a biomolekul. Využívá se jak pro kvalitativní, tak i pro kvantitativní analýzu<sup>27,28</sup>.

### 2.3.1. Trendy MS

Hmotnostní spektrometrie s přímým vzorkováním vykazuje v posledních letech velký potenciál pro využití v klinických laboratořích pro diagnostiku nemocí nebo rutinní screening. Od klasických metod hmotnostní spektrometrie se liší hlavně v absenci velké přípravy vzorků a chromatografické separace. Cílem skupiny metod MS s přímým vzorkováním je analýza vyžadující malou úpravu biologického vzorku, který je zaváděn přímo do hmotnostního spektrometru. Největšímu vývoji v těchto metodách podléhá iontový zdroj a byly vytvořeny typy ionizace jako např. ionizace výbojem pomocí dielektrické bariéry, ionizace papírovým postřikem nebo extrakční elektrosprejová ionizace<sup>29</sup>.

Mezi další trendy můžeme řadit vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrii (HR-MS), která se využívá pro svou vysokou citlivost, rozlišení a rychlost skenování. Často se spojuje se sektorovým hmotnostním spektrometrem, Fourierovým transformačním orbitrapem nebo analyzátořem doby letu. Využívaná je hojně v toxikologických laboratořích, např. ke stanovení škodlivin v potravinách<sup>30,31</sup>.

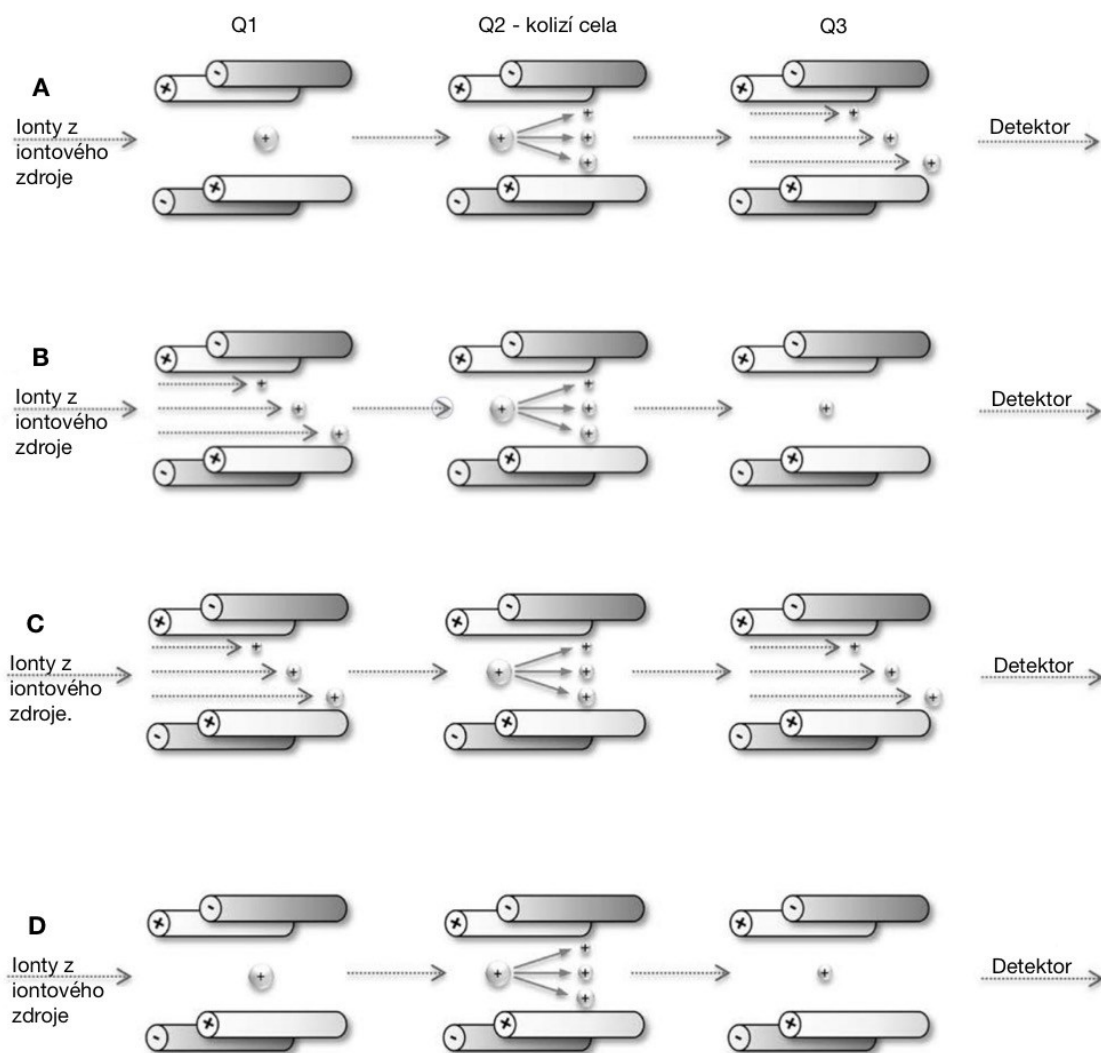
### 2.3.2. Tandemová hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem

Tandemová hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem je metoda, která se v posledních letech velmi hojně využívá např. ve farmaceutickém průmyslu při procesu vývoje léků, v klinických laboratořích při diagnostice metabolických poruch, při sledování kvality životního prostředí nebo při zjišťování kontaminace potravin<sup>32</sup>.

Samotný kvadrupól je hmotnostní analyzátor, jehož principem je selekce iontů na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku. Ionty s hledaným poměrem  $m/z$  se pohybují po stabilní trajektorii dále do detektoru. Trajektorie ostatních iontů je vychýlena a tyto ionty do detektoru neprojdou. Kvadrupól může fungovat v režimu měření jednoho iontu (SIM), kde se kvantitativně s velkou citlivostí měří pouze ionty s příslušným poměrem  $m/z$ . Druhý režim je skenovací a zde se kontinuálně mění elektrické pole a měří se hodnoty  $m/z$  všech iontů vzniklých v iontovém zdroji<sup>28</sup>.

Tandemové uspořádání znamená, že je za sebou umístěno několik hmotnostních analyzátorů. Tuto metodu lze rozdělit na dva typy: MS/MS v prostoru a MS/MS v čase. MS/MS v prostoru je typ metody, kde jsou dva hmotnostní analyzátory zapojeny v sérii. První analyzátor vybírá prekurzorový ion a druhý skenuje produkty vzniklé po aktivaci ve srážkové komoře, která se nachází mezi jednotlivými analyzátory. Kombinace mezi analyzátory může být např. kvadrupól a analyzátor doby letu, dva analyzátory doby letu nebo dva sektorové analyzátory<sup>32</sup>.

Další a nejběžnější kombinací analyzátorů hmotnostní spektrometrie v prostoru je s trojitým kvadrupólem (QqQ). Zde jsou zapojeny 3 kvadrupólové analyzátory, z nichž prostřední (q2) slouží jako kolizní cela, nikoliv jako analyzátor. Takto zapojený systém poskytuje skenovací funkce, které s jednoduchým analyzátozem nelze provést. Jednou z možností je sken produktových iontů, nebo sken dceřiných iontů. Kvadrupól Q1 je zde nastaven na hodnotu  $m/z$  prekurzorového iontu, Q3 skenuje celý rozsah a měří plné spektrum fragmentovaných iontů. Pokud by bylo třeba získat sken prekurzorového iontu, nastavení trojitého kvadrupólu by se obrátilo. Q1 skenuje celý rozsah a měří plné spektrum, zatímco Q3 je nastaven na určitou hodnotu  $m/z$ . Další možností je využití sledování neutrální ztráty. Při tomto měření je získána informace o všech iontech, které se zmenší o stejnou hodnotu hmotnosti (např. snížení hmotnosti o 18 Da odpovídá ztrátě molekuly vody). V tomto případě Q1 i Q3 skenují s konstantním rozdílem  $m/z$  představující neutrální fragment vzniklý v kolizní cele. V módu sledování vybraných reakcí (SRM), nebo sledování mnoha reakcí (MRM) slouží Q1 k výběru iontu prekurzoru, ten je v kolizní cele fragmentován při optimální kolizní energii a produktový iont je vybrán pomocí Q3. Schémata všech popsaných modifikací jsou znázorněna na obrázku č. 3<sup>28,32</sup>.



Obrázek 3: Schéma skenovaných funkcí tandemové hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem (převzato a upraveno)<sup>28</sup>. A – sken produktových iontů; B – sken prekursorových iontů; C – sledování neutrální ztráty; D – sledování vybraných reakcí.

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Použité chemikálie a přístroje

##### Chemikálie

- Rivaroxaban, čistota  $\geq 99,0\%$ , Clearsynth<sup>®</sup> (Bombaj, Indie)
- Rivaroxaban D4, čistota  $\geq 99,0\%$ , Clearsynth<sup>®</sup> (Bombaj, Indie)
- Acetonitril, čistota  $\geq 99,0\%$ , LC-MS Chromasolv<sup>™</sup>, Honeywell Riedel-de Haën<sup>™</sup> (Charlotte, Severní Karolína, Spojené státy)
- Destilovaná voda, LC-MS Grade, LiChrosolv<sup>®</sup>, Supelco (Bellefonte, Pensylvánie, Spojené státy)
- Kyselina mravenčí, čistota LC-MS, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, Missouri, Spojené státy)
- Krysí sérum, Farmakologický ústav 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice (Praha, Česká republika)

##### Přístroje

- Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr, LCMS-8045, Shimadzu (Kjóto, Japonsko)
- Chromatografická kolona, Poroshell 12 SB AQ, 100x2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , Agilent (Santa Clara, Kalifornie, Spojené státy)
- Analytické váhy, Sartorius Entris<sup>®</sup> (Göttingen, Německo)
- Automatické pipety, Socorex (Ecublens, Švýcarsko)
- Homogenizátor CHA Vortex, Chromservis s.r.o. (Praha, Česká republika)
- Ultrazvuk, Elmasonic S 15H, Elma (Singen, Německo)
- Mini centrifuga, Rotilabo<sup>®</sup> Gusto<sup>™</sup>, Carl Roth (Karlsruhe, Německo)

##### Programy

- MS Excel (Redmond, Washington, Spojené státy)
- LabSolutions, Shimadzu (Kjóto, Japonsko)

### 3.2. Příprava zásobních roztoků

Z navážky 4,6 mg rivaroxabanu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 92  $\mu\text{g/ml}$ . Navážené množství bylo pomocí ultrazvuku rozpuštěno v acetonitrilu. Z navážky 1,2 mg byl stejným způsobem připraven zásobní roztok značeného rivaroxabanu D4 o koncentraci 0,24 mg/ml.

### 3.3. Kalibrace

Bylo připraveno devět kalibračních roztoků, jejichž složení je uvedeno v tabulce 2. Příprava dílčích zásobních roztoků probíhala takto: hlavní zásobní roztok rivaroxabanu o koncentraci 92  $\mu\text{g/ml}$  byl zředěn 100x acetonitrilem a vznikl 1. zásobní roztok o koncentraci 920 ng/ml. Tento roztok byl zředěn 10x acetonitrilem na koncentraci 92 ng/ml (2. zásobní roztok) a tento roztok byl dále 10x zředěn na koncentraci 9,2 ng/ml (3. zásobní roztok).

Hlavní zásobní roztok rivaroxabanu D4 o koncentraci 0,24 mg/ml byl ředěn 100x acetonitrilem na koncentraci 2,4  $\mu\text{g/ml}$ . Tento roztok byl zředěn 10x na koncentraci 240 ng/ml a ten byl ředěn ještě 10x na výslednou koncentraci 24 ng/ml.

Tabulka 2: Složení kalibračních roztoků

Číslo roztoku	$c$ ng/ml	$c_1$ ng/ml	$V_1$ $\mu\text{l}$	$V_2$ $\mu\text{l}$	$V_3$ $\mu\text{l}$	$V_4$ $\mu\text{l}$	$V$ $\mu\text{l}$
1	383,33	920	50	40	30	0	120
2	191,67	920	25	40	30	25	120
3	76,67	920	10	40	30	40	120
4	38,33	92	50	40	30	0	120
5	12,27	92	16	40	30	34	120
6	3,07	92	4	40	30	46	120
7	1,53	9,2	20	40	30	30	120
8	0,77	9,2	10	40	30	40	120
9	0,15	9,2	2	40	30	48	120

$c$  – celková koncentrace rivaroxabanu v roztoku;  $c_1$  – koncentrace zásobního roztoku rivaroxabanu;  $V_1$  – objem zásobního roztoku rivaroxabanu;  $V_2$  – objem zásobního roztoku rivaroxabanu D4;  $V_3$  – objem séra/destilované vody;  $V_4$  – objem acetonitrilu;  $V$  – celkový objem roztoku

Byly připraveny dvě řady kalibračních roztoků. Jedna kalibrační řada byla připravena bez krysího séra. To bylo nahrazeno destilovanou vodou. Kalibrační roztoky byly zamíchány pomocí vortexu a převedeny do kónických vialek. Druhá kalibrace byla připravena s krysím sérem. Roztoky byly zamíchány na vortexu, stočeny na centrifuze (8 min, 12500 RPM) a supernatanty byly převedeny do kónických vialek. Poprvé byl každý vytvořený kalibrační roztok změřen 3x a mezi jednotlivými koncentracemi byl měřen slepý vzorek (čistý acetonitril). Poté byly stejné kalibrační roztoky připraveny znovu a následné měření proběhlo stejně jako v prvním případě, ovšem každý roztok byl změřen pouze 2x.

### 3.4. Přesnost a správnost metody

Pro stanovení přesnosti a správnosti metody byly připraveny tři roztoky obsahující sérum o koncentracích rivaroxabanu 76,67; 12,67 a 0,77 ng/ml dle tabulky 2. Roztoky byly zamíchány na vortexu, stočeny na centrifuze (8 min, 12500 RPM), supernatanty byly převedeny do kónických vialek a změřeny. Každý roztok byl takto připraven 3x a poté byl každý 3x změřen a mezi jednotlivé koncentrace byl vložen slepý vzorek (čistý acetonitril).

Pro vypočtení přesnosti byla nejprve spočítána směrodatná odchylka (SD) ze vztahu:

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

kde  $x_i$  jsou jednotlivá měření,  $\bar{x}$  je aritmetický průměr všech hodnot,  $n$  je počet jednotlivých měření.

Přesnost byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) ze vzorce:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

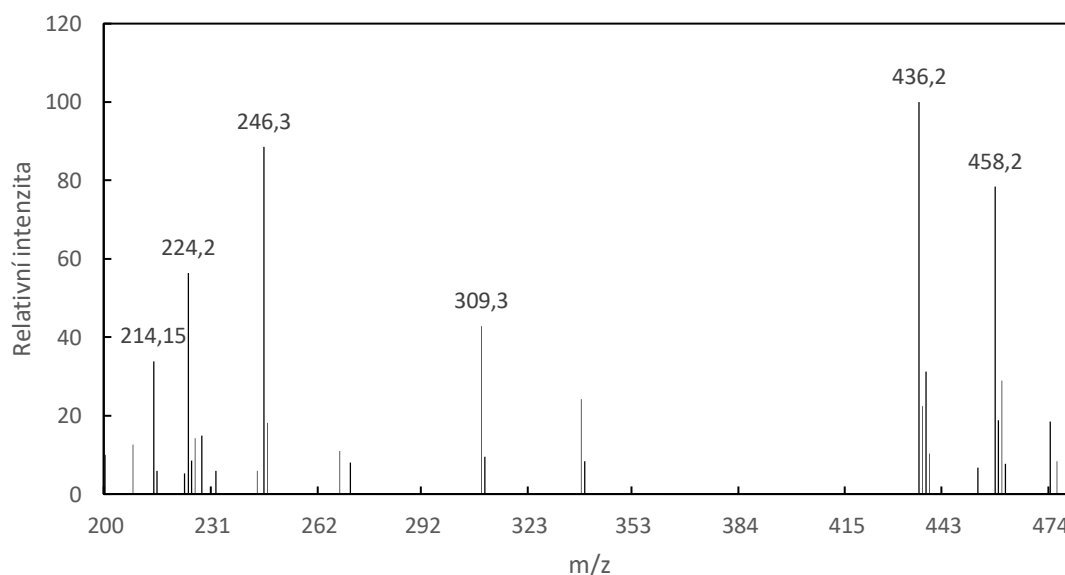
Správnost byla vypočtena jako relativní chyba (RE) ze vzorce:

$$RE = \frac{c_{naměřená} - c_{očekávaná}}{c_{očekávaná}} \cdot 100$$

## 4. Výsledky a diskuse

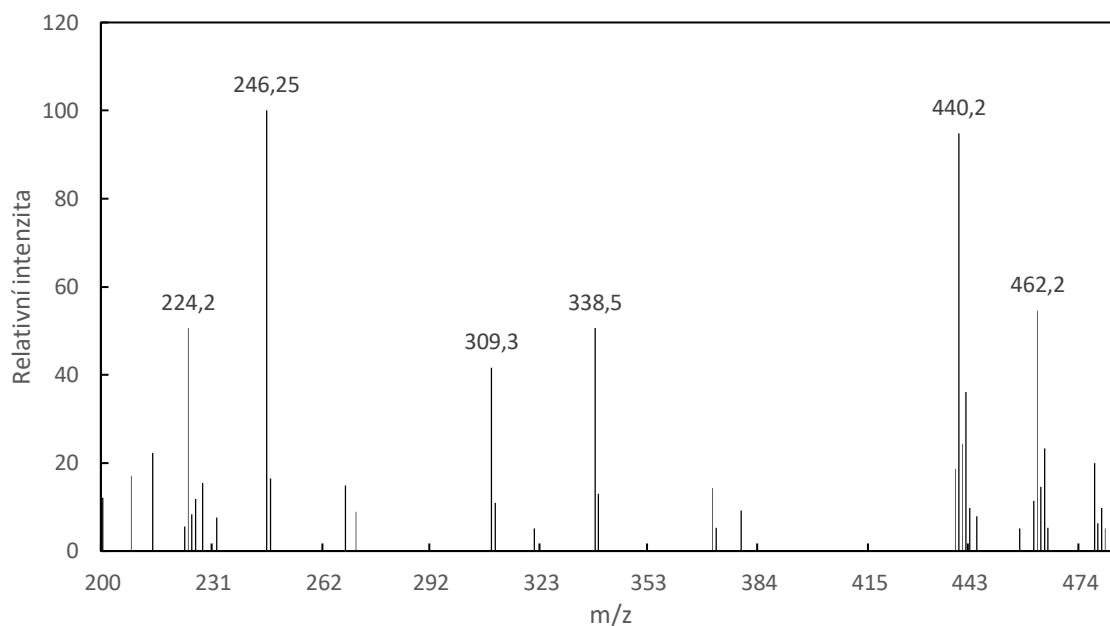
### 4.1. Optimalizace hmotnostního spektrometru

Měření bylo provedeno na hmotnostním spektrometru Shimadzu, LCMS-8045 v pozitivním režimu a za použití elektrosprejové ionizace. Pro nalezení vhodných MRM přechodů byla použita mobilní fáze složená z 80 % z acetonitrilu (s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí) a z 20 % destilovanou vodou (s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí). Byly nastaveny následující podmínky: průtok mobilní fáze 0,2 ml/min; teplota na dávkovači 15 °C; doba analýzy 2 min; objem nástřiku 2 µl. Nejprve bylo změřeno celé hmotnostní spektrum rivaroxabanu (graf 1) o koncentraci 0,92 µg/ml a poté rivaroxabanu D4 (graf 2) o koncentraci 1,2 µg/ml. Z grafu 1 a 2 byly vybrány prekurzorové ionty, které odpovídají iontům rivaroxabanu ( $m/z$  436,2) a rivaroxabanu D4 ( $m/z$  440,2) ve tvaru  $[M+H]^+$ .



Graf 1: Hmotnostní spektrum rivaroxabanu

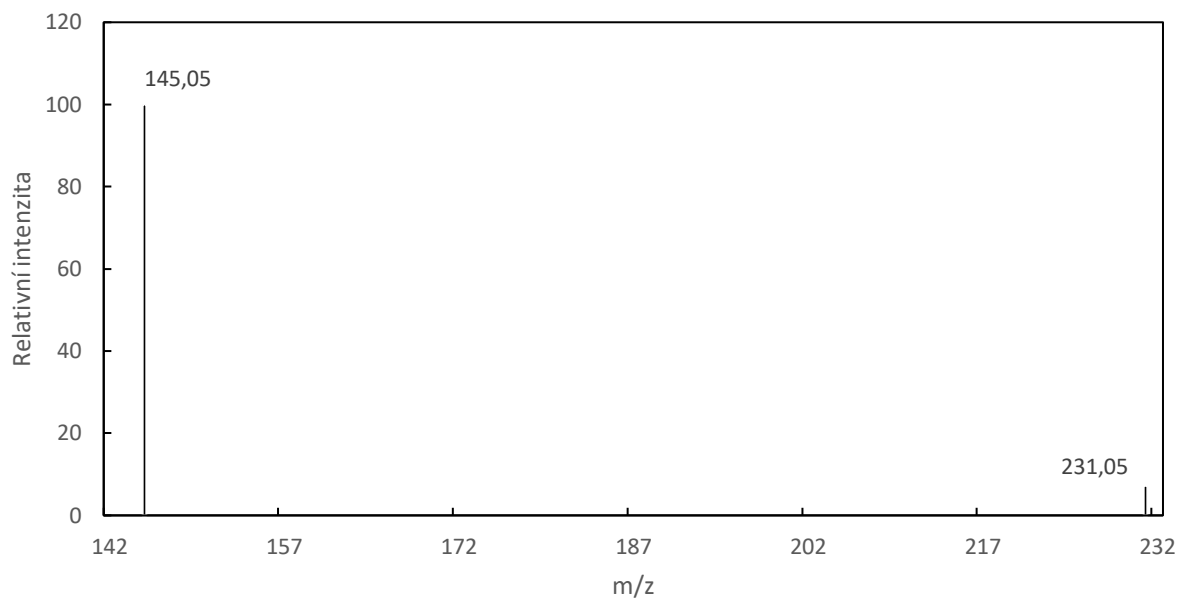




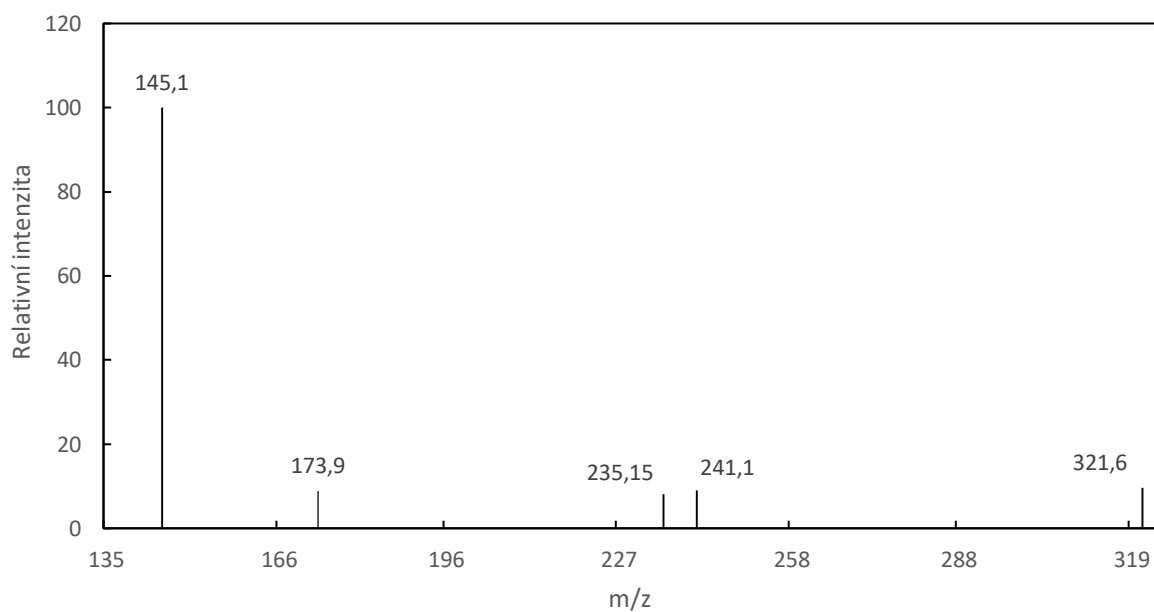
Graf 2: Hmotnostní spektrum rivaroxabanu D4

Tyto ionty byly automaticky optimalizovány hmotnostním spektrometrem tak, aby bylo nalezeno optimální nastavení iontové optiky a aby byly nalezeny vhodné produktové ionty. Hodnoty prekurzorových iontů a rozpětí kolizní energie (-80 až -5 V) byly nastaveny manuálně. Z automatické optimalizace byly získány 2 MRM přechody pro rivaroxaban – jeden kvantifikační přechod a druhý konfirmační. A 1 MRM přechod pro rivaroxaban D4 spolu s jejich optimálním nastavením iontové optiky. Tabulka 3 obsahuje výsledky automatické optimalizace MRM přechodů pro rivaroxaban a tabulka 4 obsahuje tytéž výsledky, ale pro rivaroxaban D4.

Dále graf 3 znázorňuje hmotnostní spektrum produktových iontů rivaroxabanu vzniklých fragmentací m/z 436,2 při hodnotě kolizní energie -30 V. Graf 4 znázorňuje hmotnostní spektrum produktových iontů rivaroxabanu D4 vzniklých fragmentací rovněž při hodnotě kolizní energie -30 V.



Graf 3: Hmotnostní spektrum produktových iontů rivaroxabanu se zadáním prekurzorového iontu  $m/z$  436,1 se zadanou kolizní energií -30 V.



Graf 4: Hmotnostní spektrum produktových iontů rivaroxabanu D4 se zadáním prekurzorového iontu  $m/z$  440,1 se zadanou kolizní energií -30 V.

Tabulka 3: *Optimální hladiny energie pro přechod rivaroxabanu*

Prekurzorový iont m/z	Produktový ion m/z	Q1 (V)	CE (V)	Q2 (V)
436,1	144,95	-12,00	-30,00	-27,00
436,1	231,15	-12,00	-23,00	-24,00

Tabulka 4: *Optimální hladiny energie pro přechod rivaroxabanu D4*

Prekurzorový iont m/z	Produktový ion m/z	Q1 (V)	CE (V)	Q2 (V)
440,1	145,0	-22,00	-31,00	-25,00

Pro další měření byl pro rivaroxaban používán přechod 436,1 → 145,05 kvůli jeho nejvyšší intenzitě (a nejvhodnějšímu poměru signál/šum). Parametry pro nastavení iontového zdroje pro další měření byly následující: průtok nebulizačního plynu 3 l/min; průtok ohřevného plynu 10 l/min; teplota rozhraní 300 °C; desolvatační teplota 526 °C; DL teplota 250 °C teplota tepelného bloku 400 °C a průtok sušícího plynu 10 l/min.

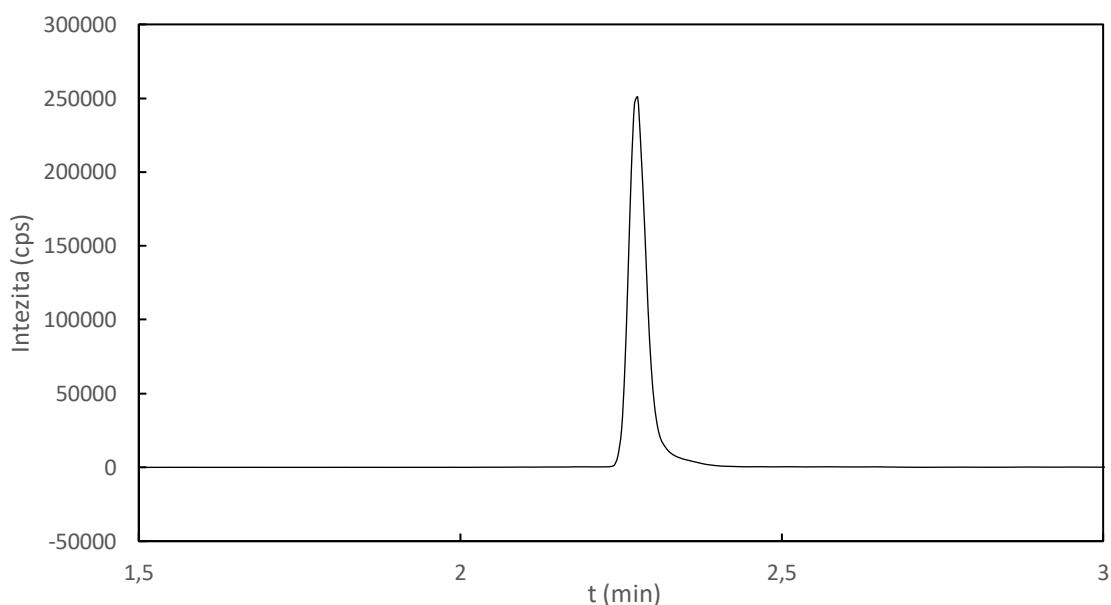
## 4.2. Optimalizace gradientové LC metody

Pro další měření byla použita kolona Poroshell 120 SB AQ, 100x2,1 mm, 2,6 μm (Agilent). Složení mobilní fáze bylo stejné jako u předchozího měření (směs acetonitrilu a destilované vody s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí). Podmínky měření byly následující: průtok mobilní fáze 0,5 ml/min; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C; doba analýzy 6,5 minut; objem nástřiku 2 μl.

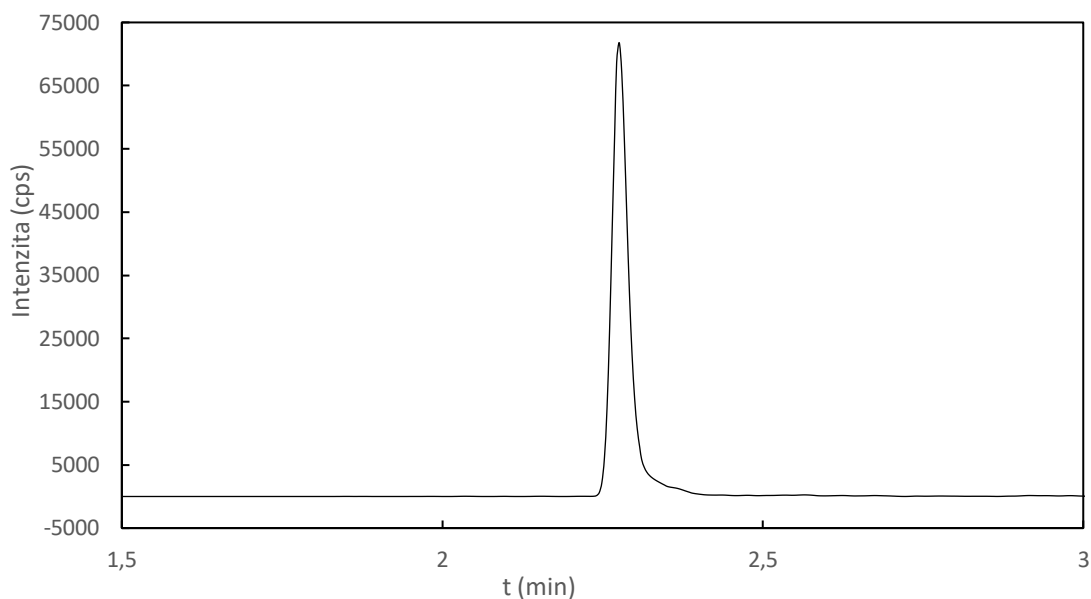
Koncentrace roztoku, která byla použita v této fázi pro rivaroxaban, byla 46 ng/ml a pro rivaroxaban D4 byla koncentrace roztoku 24 ng/ml. Oba použité roztoky obsahovaly krysí sérum. Tabulka 5 znázorňuje zvolený gradientový program, při kterém byl eluát vpouštěn do hmotnostního spektrometru v rozmezí 1,8 až 3 minuty. Získaný chromatogram pro rivaroxaban je uveden v grafu 5 a chromatogram pro rivaroxaban D4 je uveden na grafu 6. Tyto podmínky byly nastaveny u všech dalších měření.

Tabulka 5: Použití gradientového programu

t (min)	Acetonitril + 0,1% HCOOH (obj. %)	H <sub>2</sub> O + 0,1% HCOOH (obj. %)
0,0	20	80
1,0	20	80
2,0	80	20
3,5	80	20
4,0	20	80
6,5	20	80



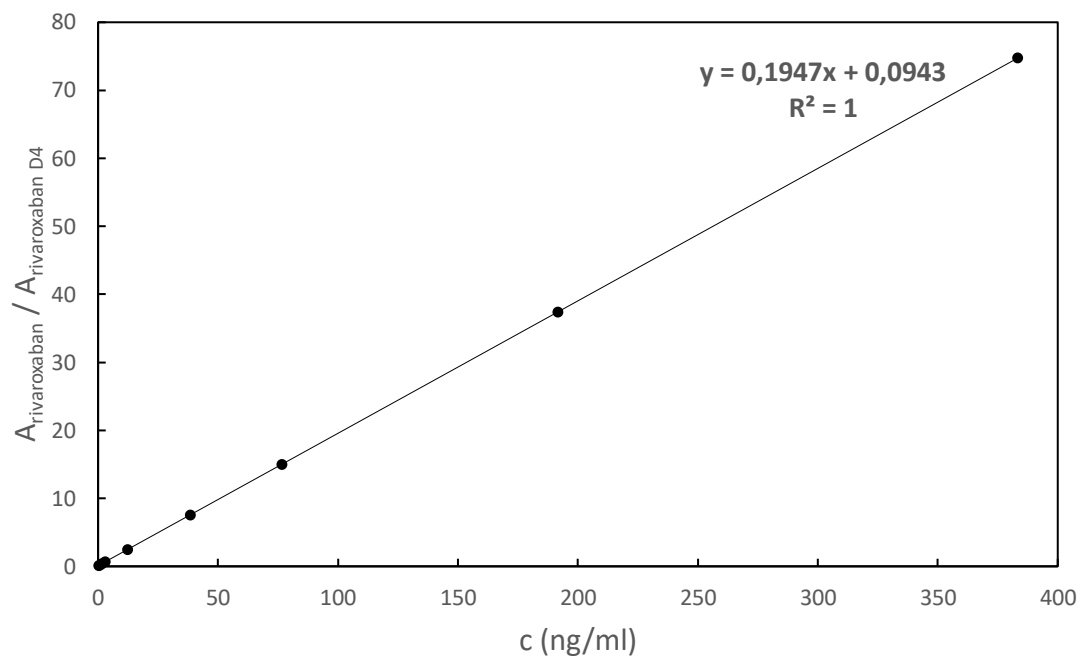
Graf 5: Chromatogram rivaroxabanu (použitá kolona Poroshell 12 SB AQ, 100x2,1 mm, 2,6  $\mu$ m od firmy Agilent; mobilní fáze byla složena z acetonitrilu s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí (A) a destilované vody s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí (B); průtok mobilní fáze 0,5 ml/min; gradientová eluce (čas: 0-1-2-3,5-4-6,5 min, A: 20-20-80-80-20-20 % v/v); teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C; doba analýzy 6,5 min; objem nástřiku 2  $\mu$ l; použitý kalibrační roztok rivaroxabanu o koncentraci 46 ng/ml s krysím sérem)



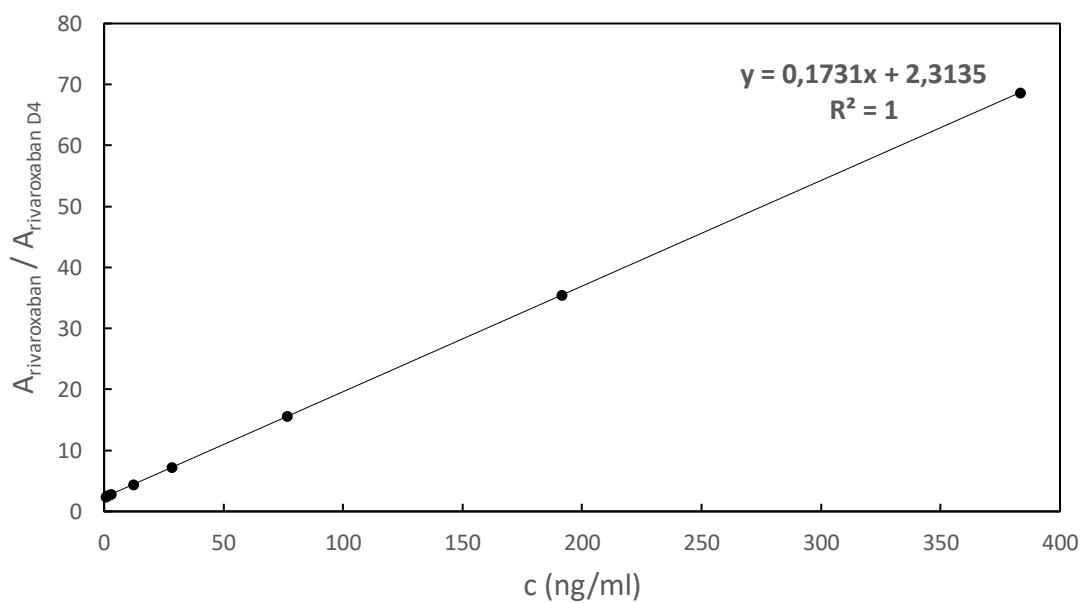
*Graf 6: Chromatogram rivaroxabanu D4 (použitá kolona Poroshell 12 SB AQ, 100x2,1 mm, 2,6  $\mu$ m od firmy Agilent; mobilní fáze byla složena z acetonitrilu s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (A) a destilované vody s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (B); průtok mobilní fáze 0,5 ml/min; gradientová eluce (čas: 0-1-2-3,5-4-6,5 min, A: 20-20-80-80-20-20 % v/v); teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C; doba analýzy 6,5 min; objem nástřiku 2  $\mu$ l; použitý kalibrační roztok rivaroxabanu o koncentraci 24 ng/ml s krysím sérem)*

### 4.3. Kalibrační křivka

Byla sestrojena kalibrační křivka závislosti poměru ploch píků rivaroxabanu (přechod 436,1  $\rightarrow$  145,05) a rivaroxabanu D4 na koncentraci rivaroxabanu v roztoku jako vážená lineární regrese podle faktoru  $1/x^2$ . Jako první byla naměřena kalibrační křivka bez séra (místo něj byla použita destilovaná voda), jejíž průběh je znázorněn na grafu 7. Poté byla naměřena druhá kalibrační křivka, tentokrát s použitím krysího séra. Tento průběh je znázorněn na grafu 8.



Graf 7: Kalibrační křivka roztoku rivaroxabanu za použití destilované vody místo krysího séra



Graf 8: Kalibrační křivka roztoku rivaroxabanu s použitím krysího séra

Při porovnání obou kalibračních křivek je na první pohled zřetelné, že jejich koeficient determinace 1,000 znamená výbornou linearitu. Dále při porovnání směrnic obou rovnic zjistíme, že jejich rozdíl je 11 %. Tato hodnota vypovídá, jak velké je ovlivnění stanovení rivaroxabanu maticí krysího séra. Isotopicky značený standard eluuje ve stejném retenčním čase jako standard neznačený, to znamená, že ionizaci obou standardů ovlivňují stejné maticí efekty. Z toho vyplývá, že matrice neovlivňuje stanovení a příčinou rozdílu ve směrnicích je chyba v měření, respektive v přípravě vzorků.

#### 4.4. Přesnost a správnost

Pro vyhodnocení přesnosti a správnosti bylo využito složení 3 kalibračních roztoků (roztok 3, 5 a 8 viz tabulka 1), z nichž byl každý znovu 3x připraven a změřen. Tabulka 6 znázorňuje výsledky měření přesnosti a správnosti.

Tabulka 6: Přesnost a správnost měření.

c (teoretická) ng/ml	c (naměřená) ± SD ng/ml	RSD %	RE %
0,77	1,03 ± 0,60	58,7	33,6
12,27	12,87 ± 0,61	4,7	4,9
76,67	78,70 ± 1,83	2,3	2,7

*SD – směrodatná odchylka; RSD – relativní směrodatná odchylka; RE – relativní chyba*

Relativní směrodatná odchylka vyjadřuje přesnost, která se u koncentrovanějších roztoků pohybuje od 2,3 do 4,7 %. Správnost je vyjádřena jako relativní chyba a její hodnoty se u koncentrovanějších roztoků pohybuje od 2,7 do 4,9 %. Tyto roztoky splňují kritérium pro bio-analytickou aplikaci. Měření roztoku o koncentraci 0,77 ng/ml má přesnost 58,7 % a správnost 33,6 %. Takto vysoké hodnoty poukazují pravděpodobně na chybu při přípravě roztoku.

## 5. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo vyvinout specifickou UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení rivaroxabanu v krysím séru. Metoda bude následně použita pro sledování farmakokinetiky rivaroxabanu v rámci spolupráce Přírodovědecké fakulty UK, farmakologického ústavu 1. lékařské fakulty UK, Vysoké školy chemicko-technologické a firmy Zentiva.

Nejprve byla optimalizována separace pomocí UHPLC a nastavení MS/MS pro měření v režimu MRM. Byla použita mobilní fáze složená ze směsi acetonitrilu (A) a destilované vody (B) s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí. Pro rivaroxaban byl nalezen MRM přechod 436,1 → 145,05 s optimálními hladinami energie Q1 = -12,0 V; CE = -30,0 V; Q2 = -27,0 V. Pro rivaroxaban D4 byl nalezen MRM přechod 440,1 → 145,0 s optimálními hladinami energie Q1 = -22,0 V; CE = -31,0 V; Q2 = -25,0 V. Parametry nastavení iontového zdroje byly následující: průtok nebulizačního plynu 3 l/min; průtok ohřevného plynu 10 l/min; teplota rozhraní 300 °C; desolvatační teplota 526 °C; DL teplota 250 °C; teplota tepelného bloku 400 °C; průtok sušícího plynu 10 l/min. Byla použita chromatografická kolona Poroshell 120 SB AQ, 100 × 2,1 mm, 2,6 μm (Agilent). Podmínky nastavení LC metody byly následující: průtok mobilní fáze 0,5 ml/min; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C; gradientová eluce (čas: 0-1-2-3,5-4-6,5 min, A: 20-20-80-80-20-20 % v/v); doba analýzy 6,5 minut; objem nástřiku 2 μl.

Dále byla provedena kalibrace ve vodných roztocích a krysím séru, byla určena přesnost a správnost pro 3 vybrané kalibrační roztoky. Koeficient determinace 1,000 byl určen pro obě kalibrace a znamená výbornou linearitu. Přesnost (relativní směrodatná odchylka) pro koncentrace 12,27 ng/ml a 76,67 ng/ml je v rozmezí 2 až 5 %. Správnost (relativní chyba) je pro tyto koncentrace také v rozmezí 2 až 5 % a tím splňují kritérium pro bio-analytickou aplikaci. Pro koncentraci 0,77 ng/ml byla přesnost 58,7 % a správnost 33,6 %, což poukazuje pravděpodobně na chybu v přípravě roztoku.



## 6. Seznam použité literatury

1. Kvasnicka, T., Malikova, I., Zenahlikova, Z., Kettnerova, K., Brzezкова, R., et al.: Rivaroxaban – Metabolism, Pharmacologic Properties and Drug Interactions. *Current drug metabolism*, Volume 18, Issue 7, p. 636-642 (2017)
2. Rivaroxaban Aurovitas, Státní ústav pro kontrolu léčiv  
<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0244105&tab=info>  
(accessed January 9, 2021)
3. Guimaraes, H. P., de Barros e Silva, P. G. M., Liporace, I. L.Sampaio, R. O., Tarasoutchi, F., et al.: Randomized clinical trial to evaluate the efficacy and safety of rivaroxaban in patients with bioprosthetic mitralvalve and atrial fibrillation or flutter: Rationale and design od the RIVER trial, *American Heart Journal*, Volume 231, p. 128-136 (2021)
4. Gouveia, F., Bicker, J., Gonçalves, J., Alves, G., Falcão, A., & Fortuna, A.: Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review. *Analytica chimica acta*, Volume 1076, p. 13-31 (2019)
5. Çelebier, M., Reçber, T., Koçak, E., Altinoz, S.: RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 49, Issue 2, p. 359-366 (2013)
6. Süslü, I., Çelebier, M, Altinoz, S.: Electrochemical Behaviour Investigation and Square-Wave Voltammetric Determination of Rivaroxaban in Pharmaceutical Dosage Forms. *Analytical Methods*, Volume 6, p. 9397-9403 (2014)
7. Altria, K D.: Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography*, Volume 892, Issue 1-2, p. 171-86 (2000)
8. Wingert, N. R., Dos Santos, N. O., Campanharo, S. C., Jablonski, A., Steppe, M.: Quantitative Assessment of Poorly Soluble Anticoagulant Rivaroxaban by Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* Volume 56, p. 650-655 (2018)
9. Cheng, Y. H., Chen, W. C., Chang, S. Y.: Rapid Determination of Rivaroxaban in Human Urine and Serum Using Colloidal Palladium Surface-Assisted Laser

- Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, Volume 29, p. 1977-1983 (2015)
10. Zheng, S., Luo, S. B., Mei, Y. B., Guo, J., Tong, L. J., Zhang, Q., & Ye, X. Y.: Simultaneous Determination of Rivaroxaban and Enalapril in Rat Plasma by UPLC-MS/MS and Its Application to A Pharmacokinetic Interaction Study. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, Volume 44, Issue 2, p. 229-236 (2019)
  11. Lindahl, S., Dyrkorn, R., Spigset, O., & Hegstad, S.: Quantification of Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Serum by UHPLC-MS/MS-Method Development, Validation, and Application. *Therapeutic drug monitoring*, Volume 40, Issue 3, p. 369-376 (2018)
  12. Wang, L., Gai, S., Zhang, X., Xu, X., Gou, N., Wang, X., Zhou, N., & Feng, T.: Simultaneous determination of Rivaroxaban and TAK-438 in rat plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetic interaction study. *Bioanalysis*, Volume 12, Issue 1, p. 11-22 (2020)
  13. Gai, S., Huang, A., Feng, T., Gou, N., Wang, X., Lu, C., Tang, H., Xu, D., Zhang, B., & Wang, L.: LC-MS/MS method for simultaneous determination of rivaroxaban and metformin in rat plasma: application to pharmacokinetic interaction study. *Bioanalysis*, Volume 11, Issue 24 p. 2269-2281 (2019)
  14. Rathore, A. S., Joshi, S.: High Performance Liquid Chromatography. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2018
  15. Šesták, J., Moravcová, D., & Kahle, V.: Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of chromatography*, Volume 1421, p. 2-17 (2015)
  16. Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J.-L., Guillarme, D.: Current and Future Trends in UHPLC. *TrAC Trends Anal. Chem.*, Volume 63, p. 2-13 (2014)
  17. Nováková, L., Vlckova, H.: A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica chimica acta*, Voume 656, Issue 1-2, p. 8-35 (2009)
  18. Beccaria, M., Deirdre, C.: Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *The Analyst*, Volume 145, Issue 4, p. 1129-1157 (2020)

19. Jandera, P.: Programmed elution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of chromatography*, Volume 1255, p. 112-29 (2012)
20. Jandera, P.: Multidimensional Liquid Chromatography. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2018
21. Cummins, P. M., Rochfort, K. D., & O'Connor, B. F.: Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods in molecular biology*, Volume 1485, p. 209-223 (2017)
22. Iontová chromatografie, Hplc.cz; <http://hplc.cz/> (accessed July 12, 2021)
23. Boersema, P. J., Mohammed, S., & Heck, A. J.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Volume 391, Issue 1, p. 151-9 (2008)
24. Guiochon, G.: Preparative liquid chromatography. *Journal of chromatography*, Volume 965, Issue 1-2, p. 129-61 (2002)
25. Halan, V., Maity, S., Bhambure, R., & Rathore, A. S.: Multimodal Chromatography for Purification of Biotherapeutics – A Review. *Current protein & peptide science*, Volume 20, Issue 1. p. 4-13 (2019)
26. Wang, L., Wei, W., Xia, Z., Jie, X., Xia, Z. Z.: Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.*, Volume 80, p. 495-506 (2016)
27. Skoog, D. A., West, D. M., James Holler, F., Crouch, S. R.: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Ninth Edition, Belmont, Brooks/Cole, Cengage Learning 2014
28. Fridecký, B., Lemr, K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus, Časopis Čes. Spol. Klin. Biochem.*, Volume 20, Issue 3, p. 152 157 (2012)
29. Pu, F., Chiang, S., Zhang, W., & Ouyang, Z.: Direct sampling mass spektrometry for clinical analysis. *The Analyst*, Volume 144, Issue 4, p. 1034-1051 (2019)
30. Lin, L., Lin, H., Zhang, M., Dong, X., Yin, X., Qu, C., Ni, J.: Types, Principle, and Characteristics of Tandem High-Resolution Mass Spectrometry and Its Applications. *RSC Adv.*, Volume 130, Issue 5, p. 107623-107636 (2015)
31. Roberto, R.-G.; Garrido Frenich, A.: *Applications in High Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis*; Applications in High

Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis;  
2017

32. Sadílek, M.: Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. Chemické listy,  
Volume 114, p. 133-144 (2020)