

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Tomáš Gottvald

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

Název diplomové práce: Vývoj metody pro stanovení entekaviru v biologických materiálech s využitím UHPLC-MS/MS

Entekavir je syntetický analog guanosinového nukleosidu, který hraje významnou roli v léčbě virové infekce chronické hepatitidy B. Tato práce byla zaměřena na vývoj vysoce citlivé metody pro stanovení koncentrace entekaviru v biologickém materiálu (potkaní moči) pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Při analýze byl použit stabilní izotopicky značený vnitřní standard, entekavir $C_2^{13}N^{15}$. Vzhledem ke struktuře analyzované molekuly bylo vhodné k analýze využít hydrofilní interakční chromatografii (HILIC). Jedním z hlavních úkolů bylo potvrdit tento fakt porovnáním s běžně používanou chromatografií na reverzních fázích (RP-UHPLC) na koloně Acquity BEH C18. Mobilní fáze pro reverzní chromatografii byla optimalizována na složení: acetonitril/0,01% kyselina mravenčí v poměru 4 : 96. HILIC separace byla provedena na koloně Acquity BEH Amide za použití izokratické eluce a složení mobilní fáze acetonitril/5 mM octan amonný pH 4,0 (75 : 25). Ve výsledku HILIC poskytovala lepší výsledky, pokud jde o linearitu a opakovatelnost. Příprava vzorku byla provedena pomocí extrakce na tuhé fázi použitím kolonky HLB Oasis, která je vhodná pro analýzu polárních látek. Jako eluční činidlo byl při optimalizaci zvolen 75 % acetonitril. Ve stejné koncentraci byl acetonitril použit v mobilní fázi HILIC, proto mohl být obvykle následující krok odpařování s výhodou vynechán. K minimalizaci matricových efektů přispělo použití UHPLC separace, HILIC chromatografie, SPE pro přípravu vzorku, izotopicky značeného vnitřního standardu a naředění vzorku. Vliv těchto efektů, zkoumaný metodou post-kolonové infuze a post-extrakčního přídavku byl zanedbatelný. Následující validační parametry svědčí o vhodnosti použití této metody ke stanovení entekaviru v potkaní moči – Správnost (< 5% chyba), výtěžnost (87-109 %), přesnost (< 3% RSD), selektivita a citlivost (LOQ = 100 pg/ml).

Klíčová slova: entekavir, hydrofilní interakční chromatografie, UHPLC-MS/MS, extrakce na tuhé fázi, matricové efekty, validace