

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytickej chémie

**Optimalizácia a validácia SPE metódy pre stanovanie  
kvercetinu a jeho 9 metabolitov v biologickej vzorke**

Vedúca diplomovej práce: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedúci katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Lucia Chrenková

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytickej chémie**

**Kandidát:** Lucia Chrenková

**Školiteľka:** doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Optimalizácia a validácia SPE metódy pre stanovenie kvercetinu a jeho 9 metabolitov v biologickej vzorke.

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bol vývoj a validácia novej SPE metódy pre stanovenie kvercetinu a jeho 9 metabolitov: florogluciolu (PG); kyseliny homovanilínovej (HVA); kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctovej (PAA); kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionovej (HFP); kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (HFA); kvercetin-3-glukuronidu (Q3GI); rutinu (RUT); tamarixetinu (TMX) a isorhamnetinu (IRN) v biologickej vzorke.

Ako stacionárna fáza pre SPE bola zvolená viacmodálna kolónka MAX. Ako optimálne elučné činidlo bola určená zmes metanolu a vodného roztoku 0,5% kyseliny trifluóroctovej (95/5). Ako premývacie činidlo v prvom kroku bol vybraný pufer - 0,01M mravenčanom amónnym o pH 5,0 a v druhom kroku roztok 1% metanolu riedeným do tohto pufru.

Na stanovenie kvercetinu a jeho 9 metabolitov bola využívaná ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou detekciou. Na základe najlepšej selektivity pre kritický pár izomérov (tamarixetin a isorhamnetin) bola ako stacionárna fáza využitá kolóna BEH Shield RP18 (2,1 x 100 mm; 1,7  $\mu$ m) a gradientová elúcia za použitia metanolu a 0,1% kyseliny mravčej vo vode. Ionizácia prebiehala za pomoci elektrospreja v kladnom i zápornom móde. Kvantifikácia prebiehala za využitia trojitého kvadrupólu a monitorovania vybranej reakcie (SRM).

Takto zoptimalizovaná metóda bola podrobená validácii v parametroch: linearita, citlivosť (LOD, LOQ), presnosť, správnosť, selektivita a matricové efekty. Metóda vykazuje dobrú linearitu na základe determinačného koeficientu ( $R^2 \geq 0,990$ ). Presnosť bola vyjadrená ako % RSD, ktorá bola nižšia alebo rovná 20 %. Správnosť vyjadrená ako výťažnosť sa pohybovala v rozmedzí 79,6 - 116,6 % vyjmúc 3 analyty (PG, HVA, PAA), pre ktoré sa správnosť pohybovala v rozmedzí 31,1 - 61,4 %. Výhodami novo

vyvinutej SPE metódy na úpravu biologických vzoriek pre analýzu pomocou UHPLC-MS/MS sú paralelná analýza analytov, extrakcia látok s rôznou polaritou a dobrá opakovateľnosť.

**Kľúčové slová:** SPE; UHPLC-MS/MS; Kvercetin; metabolity; validácia metódy.

## **ABSTRACT**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of analytical chemistry**

**Candidate:** Lucia Chrenková

**Supervisor:** doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

**Title of Graduation Thesis:** Optimalization and validation of SPE method for the determination of quercetin and its 9 metabolites in biological material.

The aim of this study was to develop and validate a new extraction method for the preparation of biological samples for the determination of quercetin and its 9 metabolites: phloroglucinol, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanilic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid, rutin, quercetin-3-glucuronide, tamarixetin and isorhamnetin.

Due to the best retention and subsequent elution of all tested analytes the mixed mode (polymeric ion exchanging) cartridge MAX was chosen. The mixture of methanol and 0.5 % trifluoroacetic acid in water (95/5) was chosen as optimal solvent for elution. The combination of 0.01M ammonium formate buffer pH 5.0 and 1% methanol in buffer pH 5.0 were chosen as washing solvent.

The determination of quercetin and its 9 metabolites was performed using UHPLC-MS/MS. The best selectivity between the critical pair of analytes with the same molecular weight (tamarixetin and isorhamnetin) was achieved using BEH Shield RP18 column and gradient elution with methanol and 0.1% formic acid. The ionization was performed in electrospray polarity switching mode. The quantification was performed by triple quadrupole and selected reaction monitoring (SRM) mode. The method was validated in terms of linearity, sensitivity (LOD, LOQ), accuracy, precision, selectivity and matrix effects. Good linearity demonstrated correlation coefficients value  $\geq 0.990$ . Method precision was expressed as  $RSD \leq 20.0\%$ . The results of method accuracy were between 79.6 – 116.6 % except for three metabolites (PG, HVA, PAA) for which the results of accuracy 31.1 – 61.4 %. The advantage of newly developed SPE method for the preparation of biological samples prior to UHPLC-MS/MS analysis is simultaneous analysis and extraction of the compounds with different physicochemical properties.

**Key words:** UHPLC-MS/MS; SPE; quercetin; metabolites; method validation.

**Prehlásenie:**

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

V Žiline dňa 16. 4. 2016

.....  
Lucia Chrenková

**Podakovanie:**

V prvom rade by som sa chcela poďakovať doc. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za cenné rady, venovaný čas, odborné vedenie a ústretovú spoluprácu, ktorými mi pomohla pri vypracovaní mojej diplomovej práce. Ďalej RNDr. Hane Vlčkovej, Ph.D. za jej ochotu a odborné poradenstvo v oblasti extrakčných metód. Následne Mgr. Veronike Pilařovej za jej odborné rady, čas a konzultácie. A v nepodstatnej rade kolegyni Kateřine Plachkej, ktorá mi bola nápomocná v každom smere.

Veľké ďakujem patrí aj mojej rodine, ktorá ma vždy podporovala, a vďaka ktorej som mohla študovať na univerzite.

## Obsah

1. Úvod .....	12
2. Cieľ práce.....	13
3. Teoretická časť .....	14
3.1. Flavonoidy .....	14
3.2. Kvercetin a jeho metabolity .....	14
3.3. Chemická štruktúra analytov .....	15
3.4. Fyzikálno-chemické vlastnosti analytov.....	17
3.5. Farkamokinetika kvercetinu.....	18
3.6. Publikované analytické metódy .....	20
3.7. Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia .....	23
3.7.1. Stacionárne fázy v UHPLC.....	24
3.8. Hmotnostne spektrometrická detekcia .....	24
3.8.1. Inštrumentácia pre hmotnostnú spektrometriu.....	25
3.9. Spojenie kvapalinovej chromatografie s MS detekciou (LC-MS) .....	27
3.10. Proces úpravy vzoriek .....	28
3.10.1. Konvenčné metódy .....	28
3.10.2. Moderné metódy .....	30
3.11. Validácia metódy.....	30
4. Experimentálna časť.....	32
4.1. Použité chemikálie a prístroje.....	32
4.1.1. Štandardné látky .....	32
4.1.2. Chemikálie .....	32
4.1.3. Prístrojové vybavenie .....	33
4.2. Príprava roztokov .....	33
4.3. SPE metóda .....	34
4.3.1. Príprava biologického materiálu .....	34
4.3.2. Finálne podmienky SPE metódy.....	35
4.4. UHPLC – MS/MS metóda .....	35
4.5. Test spôsobilosti systému (SST) .....	36
4.6. Validácia metódy.....	37
4.6.1. Kalibračná závislosť .....	37

4.6.2. Presnosť a správnosť .....	37
5. Výsledky a diskusia.....	39
5.1. UHPLC metóda .....	39
5.2. SPE metóda .....	39
5.2.1. Výber vhodnej extrakčnej kolónky .....	40
5.2.2. Optimalizácia elučného čidla.....	41
5.2.3. Optimalizácia premývacieho čidla .....	47
5.2.4. Aplikácia na vzorky séra .....	51
5.2.5. Overenie matricových efektov .....	52
5.2.6. Optimalizácia precipitačného čidla .....	52
5.3. Validácia metódy.....	58
5.3.1. Test spôsobilosti systému .....	58
5.3.2. Validácia metódy.....	59
6. Záver.....	66
7. Použitá literatúra.....	68
8. Prílohy .....	72
8.1. Studentská vedecká konferencie 2015 .....	72
8.2. Studentská vedecká konferencie 2016 .....	75
8.3. Česká chromatografická škola HPLC 2015 .....	76
8.4. O cenu Karla Štulíka 2016 .....	79



## Zoznam použitých skratiek

**ACN** – Acetonitril

**AmF** – Mravenčan amónny

**APCI** - Chemická ionizácia za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionization)

**APPI** - Fotoionizácia za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure photoionization)

**BEH** - Hybridná častica (Bridge ethyl hybrid)

**DAD** - Detektor diódového poľa

**EČ** - Elučné činidlo

**EMA** – European medicines agency

**ESI** - Ionizácia elektrosprejom (Electrospray ionization)

**FT** - Fourierova transformácia

**FT-ICR** - Iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou

**GC** - Plynová chromatografia (Gas chromatography)

**GSH** - Glutathion

**H** – Výškový ekvivalent teoretickej priehradky

**HFA** - Kyselina 3-hydroxyfenyloctová

**HFP** - Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová

**HILIC** - Hydrofilná interakčná chromatografia (Hydrophilic interaction chromatography)

**HPLC** - Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (High performance liquid chromatography)

**HQC** – Horná hladina kontroly kvality (High quality control)

**HVA** - Kyselina homovanilínová

**IRN** – Isorhamnetin

**Kapilárna SPME** – Kapilárna mikroextrakcia na tuhú fázu (in-tube SPME)

**L** – Hladina (Level)

**LC-MS** - Spojenie kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou

**LC-MS/MS** - Spojenie kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou

**LLE** - Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (liquid-liquid extraction)

**LLOQ** - Dolný limit kvantifikácie (Lower limit of quantification)

**LOD** - Limit detekcie

**LOQ** - Limit kvantifikácie

**LQC** – Dolná hladina kontroly kvality (Low quality control)

**MALDI** – Desorpcia laserom za účasti matrice (Matrix assisted laser desorption ionization)

**MAX** – Viac modálny sorbent (Mixed mode anion-exchange and polymeric cartridge)

**MeOH** – Metanol

**MEPS** – Mikroextrakcia plneným tuhým sorbentom s využitím striekačky (Microextraction by packed sorbent)

**MIP** - Molekulárne vtačené polyméry (Molecularly imprinted polymers)

**MQC** – Stredná hladina kontroly kvality (Middle quality control)

**MS** - Hmotnostný spektrometer / Hmotnostná spektrometria

**MS/MS** - Tandemová hmotnostná spektrometria

**NA** – Nedostupné (Not available)

**PAA** - Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová

**PČ** - Premývacie činidlo

**PTFE** - Polytetrafluóroetylén

**PG** – Floroglucinol

**PP** - Zrážanie proteínov (Protein precipitation)

**PPČ** - Precipitačné činidlo

**Q** – Kvadrupól

**Q3GI** - Kvercetin-3-glukuronid

**QCE** – Kvercetin

**QqQ** - Trojitý kvadrupól

**QTOF** – Kvadrupól a analyzátor doby letu (Quadrupole-time-of-flight analyzer)

**RAM** – Materiály s obmedzeným prístupom (Restricted access materials)

**RSD** – Relatívne smerodajná odchýlka

**RUT** – Rutin

**SDME** – Extrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla (Single-drop microextraction)

**SPE** - Extrakcia na tuhú fázu (Solid phase extraction)

**SPME** – Mikroextrakcia na tuhú fázu (Solid phase microextraction)

**SRM** - Monitorovanie vybranej reakcie (Selected reaction monitoring)

**SST** - Test spôsobilosti systému

**STD** – Štandard

**STD 9** - zásobný roztok pozostávajúci z PG, HVA, PAA, HFA, HFP, QCE, Q3GI, RUT, TMX

**STD IRN** - zásobný roztok isorhamnetinu

**TFA** – Kyselina trifluóroctová (Trifluoroacetic acid)

**TMX** – Tamarixetin

**TOF** - Analyzátor doby letu (Time of flight)

**t<sub>r</sub>** - Retenčný čas

**UHPLC** - Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (Ultra-high performance liquid chromatography)

**ULOQ** - Horný limit stanoviteľnosti (Upper limit of quantification)

**UV-VIS** - Ultrafialová-viditeľná oblasť svetla

## 1. Úvod

Kvercetin je sekundárny metabolit zaradzovaný do skupiny flavonoidov, presnejšie do podskupiny flavonolov. Prírodnými zdrojmi bohatými na kvercetin sú cibuľa, paprika, kel, čučoriedky, paradajky, jablká, čaj, špenát, červené víno, chmeľ a brokolica. Kvercetin je v ľudskom tele rozkladaný na metabolity štruktúrne vychádzajúce z dvoch skupín. Podľa viacerých zdrojov sú pre kvercetin typické rôzne farmakologické účinky, ako je napríklad protizápalový, antioxidantný, antivirový, protinádorový, antitrombotický, vazodilatačný atď. Je považovaný za jeden z najúčinnějších rastlinných antioxidantov. Táto skutočnosť však v niektorých štúdiách nebola potvrdená.

Kvercetin a jeho metabolity boli stanovované pomocou rôznych extrakčných technik a HPLC alebo GC metód s rozdielnymi detekciami. Ako biologický materiál boli analyzované: plazma, stolica, moč, rastlinné materiály atď. Avšak doposiaľ nebola publikovaná metóda využívajúca separačnú techniku UHPLC s hmotnostnou detekciou pre separáciu kvercetinu a jeho širokého spektra metabolitov. Publikované metódy stanovovali vždy len jeden z 2 štruktúrnych typov sledovaných metabolitov alebo len samostatný kvercetin. Stanovenie oboch štruktúrnych skupín je veľmi náročné, keďže sa jedná o látky s rozdielnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami.

Na základe spolupráce s Katedrou farmakológie a toxikológie boli práve tieto skutočnosti hlavným dôvodom vyvinutia a validácie SPE metódy pre UHPLC-MS/MS stanovenie kvercetinu a jeho 9 metabolitov v biologickej vzorke.

Ako už bolo spomenuté, metabolity sa rozdeľujú do 2 štruktúrnych skupín:

- Metabolity vychádzajúce zo štruktúry fenolických kyselín: floroglucinol; kyselina homovanilínová; kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová; kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová; kyselina 3-hydroxyfenyloctová.
- Metabolity vychádzajúce zo štruktúry flavonoidov: kvercetin-3-glukuronid; tamarixetin; isorhamnetin.

Spolu s metabolitmi bola stanovovaná parentná látka rutin.

## 2. Cieľ práce

Hlavným zámerom tejto diplomovej práce bol vývoj a validácia extrakčnej metódy na tuhú fázu pre stanovenie kvercetinu a jeho 9 metabolitov za využitia ultra-vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie s následnou tandemovou hmotnostnou detekciou. Ako analyzátor bol využitý trojitý kvadrupól monitorovaním vybranej reakcie (SRM – selected monitoring reaction).

Vývoj extrakčnej metódy pozostával z voľby vhodného sorbentu a optimalizácie elučného a premývacieho činidla. Takto vyvinutá metóda bola aplikovaná na reálne vzorky séra, kde bolo ďalej optimalizované precipitačné činidlo. Zoptimalizovaná metóda bola validovaná. Hodnotenými parametrami boli: linearita, limit detekcie a kvantifikácie, správnosť, presnosť a matricové efekty.

### **3. Teoretická časť**

#### **3.1. Flavonoidy**

Flavonoidy sú rozsiahlou skupinou sekundárnych metabolitov rastlinného pôvodu známe svojimi antioxidantnými účinkami, ktoré chránia ľudské tkanivá pred atakmi radikálov na lipidy, nukleové kyseliny alebo bielkoviny. Štruktúra flavonoidov je odvodená od difenylpropánu alebo fenylochromanu. Pozostáva z dvoch benzénových kruhov A, B, ktoré môžu byť ďalej substituované, a pyranového kruhu C, ktorý je kondenzovaný s kruhom A. Flavonoidy sú často konjugované s cukrami (glukóza, rhamnóza atď.), ktoré môžu interagovať s organickými kyselinami (benzoová, gallová atď.) za vzniku acylu. Na základe modifikácii v štruktúre dochádza k ovplyvneniu rozpustnosti a celkovo fyzikálno-chemických vlastností [1] [2].

Flavonoidy sa delia na niekoľko podskupín: flavanoly, flavonoly, flavony, flavanony, anthokyanidiny, izoflavony, proanthokyanidiny, dihydroflavonoly, flavan-3,4-dioly, biflavonoidy, neoflavony, chalkony, dihydrochalkony, aurony a ich izoderiváty [1].

#### **3.2. Kvercetin a jeho metabolity**

Flavonoly sú prírodné látky nachádzajúce sa najčastejšie ako O-glykosidy. Typickými predstaviteľmi tejto skupiny sú: kvercetin, myricetin, isorhamnetin a kaempferol [1].

Prírodnými zdrojmi bohatými na kvercetin sú cibuľa, paprika, kel, čučoriedky, paradajky, jablká, čaj, špenát, červené víno, chmeľ a brokolica. Podľa viacerých zdrojov sú kvercetinu typicky pripisované rôzne farmakologické účinky ako sú protizápalový, antioxidantný, antivírusový, protinádorový, antitrombotický, vazodilatačný a ďalšie [1]; [3] - [14].

Kvercetin sa ľahko oxiduje na chinon cez semichinonový radikál. Táto oxidačno-redukčná reakcia je podľa štúdií zodpovedná za cytotoxickú aktivitu, keďže vzniká radikál O<sub>2</sub>. Chinonový alebo semichinonový radikál môže v rámci vysokej koncentrácie kvercetinu interagovať s GSH (Glutathion) za vzniku konjugátu, a tým je vykazovaná antioxidantná účinnosť. Antioxidantná aktivita kvercetinu je taktiež vykazovaná

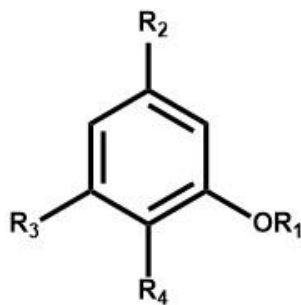
na základe prítomnosti peroxidáz, ktoré podmieňujú majoritne jednoelektrónovú oxidáciu xenobiotík atď. Avšak v niektorých publikovaných štúdiách sa nepreukázala korelácia medzi plazmatickými koncentráciami kvercetínu a jeho antioxidačnou kapacitou a ochranou pred oxidačným stresom u ľudí. Okrem iného kvercetin vykazuje silnú väzobnú kapacitu na ľudské plazmatické bielkoviny napr. albumín [1] [3] [4] [15].

Fyzikálno-chemické vlastnosti kvercetínu poukazujú na nízku biologickú dostupnosť, nevhodnú rozpustnosť a permeabilitu. Kvercetin taktiež vykazuje nízku stabilitu. Samostatný kvercetin sa preto nevyužíva ako účinná látka, ale v liečivých prípravkoch je použitý jeho rutinosid – rutin, ktorý má vhodnejšie fyzikálno-chemické vlastnosti potrebné k vstrebávaniu v ľudskom tele. Rutin vo forme trihydrátu je súčasťou liečivých prípravkov Ascorutin, Pharmaton geriavit, Phlogenzym, Wobenzym. Použitie týchto liečivých prípravkov je rôzne. Pre príklad uvádzam účinky liečivého prípravku Askorutin, pretože ostatné uvedené liečivé prípravky obsahujú niekoľko ďalších účinných látok, preto by uvedené účinky nemuseli súvisieť len s obsahom rutinu. Prípravok Askorutin, obsahujúci účinné látky kyselinu askorbovú a trihydrát rutosidu, je využívaný k symptomatickej liečbe pri zvýšenej lomivosti a permeability kapilár, pri nedostatočnosti žíl dolných končatín, pri liečbe opuchov dolných končatín a pri hemoroidoch [1] [2] [16] - [20].

### **3.3. Chemická štruktúra analytov**

Spoločne s kvercetinom boli separované látky štruktúrne vychádzajúce z dvoch rôznych skupín. Prvou skupinou sú látky vychádzajúce zo štruktúry fenolických kyselín (viď Obrázok 1 a Tabuľka 1). Druhou skupinou sledovaných látok boli metabolity vychádzajúce zo štruktúry flavonoidov (viď Obrázok 2 a Tabuľka 2) [21].

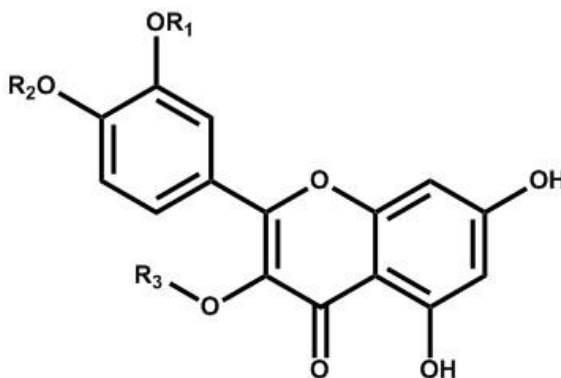
Flavonoidné analyty sú polárne látky s charakterom slabých kyselín. Jednotlivé analyty sa od seba odlišujú rôznymi substitúciami na benzénovom jadre, ktoré svojimi funkčnými skupinami spôsobujú, že analyty majú rozdielne fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré sú viac popísané v stati 3.4.



Obrázok 1: Všeobecná štruktúra metabolitov vychádzajúca z fenolických kyselín.

Názov	Skratka	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Floroglucinol	PG	-H	-OH	-OH	-H
Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová	HFP	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-H	-H
Kyselina 3-hydroxyfenyloctová	HFA	-H	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-H
Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová	PAA	-H	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-OH
Kyselina homovanilínová	HVA	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH	-H	-OH

Tabuľka 1: Detailný popis štruktúry metabolitov vychádzajúcich zo štruktúry fenolických kyselín [21].



Obrázok 2: Všeobecná štruktúra parentnej látky a metabolitov vychádzajúca zo štruktúry flavonoidov.

Názov	Skratka	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Rutin	RUT	-H	-H	- rhamnoglukosid
Kvercetin	QCE	-H	-H	-H
Kvercetin-3-glukuronid	Q3GI	-H	-H	- glukuronid
Tamarixetin	TMX	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
Isorhamnetin	IRN	-CH <sub>3</sub>	-H	-H

Tabuľka 2: Detailný popis štruktúry parentnej látky a metabolitov vychádzajúca zo štruktúry flavonoidov [21].



### 3.4. Fyzikálno-chemické vlastnosti analytov

Ako uvádza Tabuľka 3, stanovované látky sa líšili vo svojich fyzikálno-chemických vlastnostiach. Z hodnôt rozdeľovacieho koeficientu ( $\log P$ ) je evidentné, že analyty PG, HVA, PAA, HFP, RUT sú polárne analyty. Naopak QCE, Q3GI, TMX a IRN sú menej polárne látky. Všetky analyty však boli dobre rozpustné v polárnych organických rozpúšťadlách. Hodnoty  $pK_a$  poukazujú na to, že všetky analyty majú charakter slabých ( $pK_a \sim 4$ ) a veľmi slabých ( $pK_a \sim 6-9$ ) kyselín. Jednalo sa o kryštalické látky bieleho až žltého zafarbenia [21].

Fenolické kyseliny sú štruktúrne zložené z jedného benzénového jadra, ktorý je substituovaný iba krátkym alkylovým reťazcom, hydroxy skupinami alebo krátkymi alifatickými karboxylovými kyselinami. Štruktúrne sa teda jedná o deriváty kyseliny bezoovej, fenylpropiónovej a fenylactovej.

Flavonoidné metabolity a parentná látka (rutin) sú metabolity s vyššou molekulovou hmotnosťou. Rutin je látka obsahujúci cukornú zložku, a preto je veľmi polárny. Kvercetin-3-glukuronid je konjugátom kvercetinu. Medzi separovanými látkami sa nachádza i pár izomérov (isorhamnetin a tamarixetin), ktorý sa vyznačuje rovnakou molekulovou hmotnosťou a je nutné ho separovať i pri hmotnostnej detekcii. Jedná sa o metylderiváty kvercetinu.

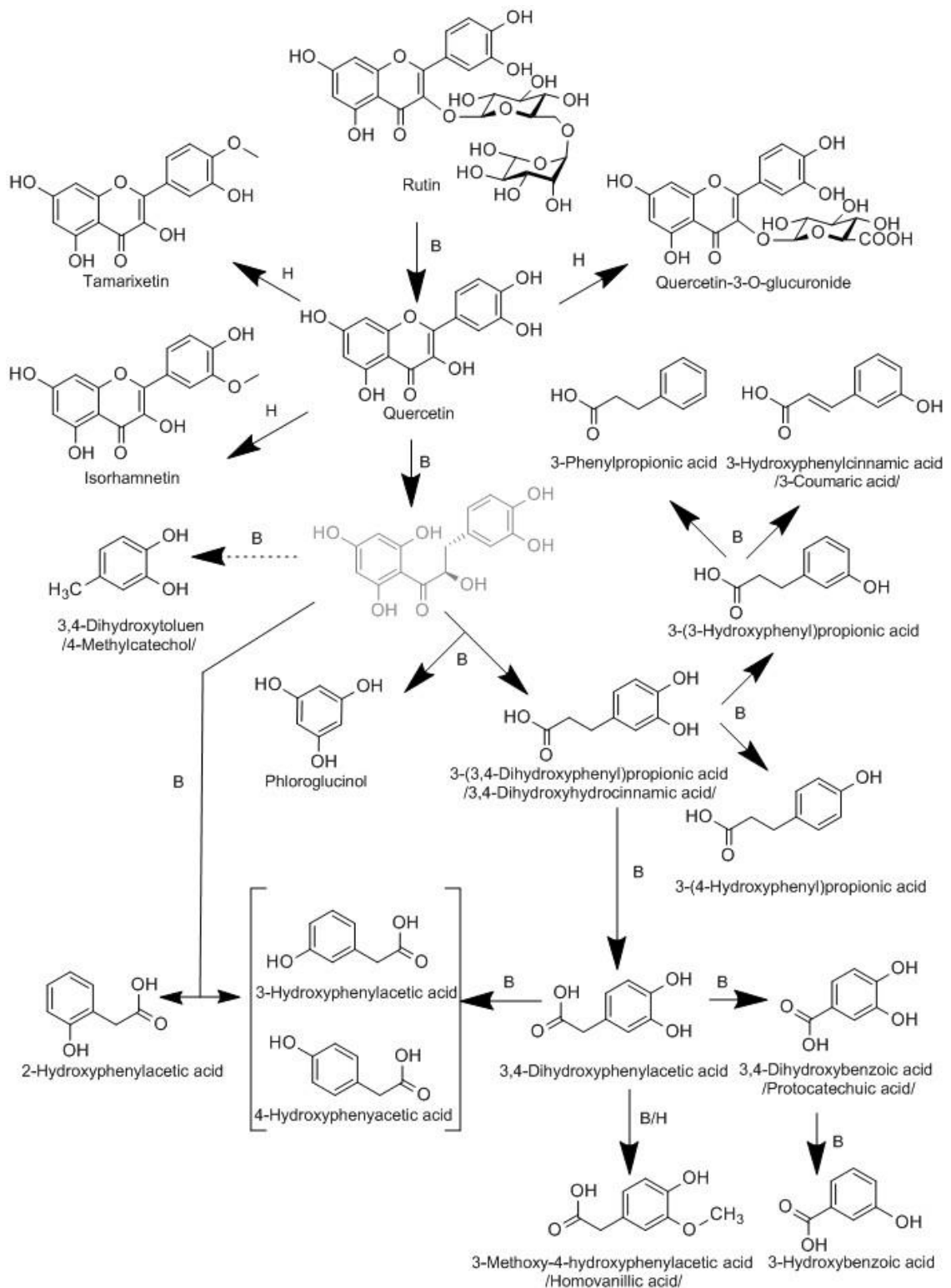
	<b>log P</b>	<b>pKa</b>	<b>Mr</b>	<b>Štruktúrny vzorec</b>
<b>PG</b>	0,01	9,06	126,03	$C_6H_6O_3$
<b>HVA</b>	0,61	4,39	182,06	$C_9H_{10}O_4$
<b>PAA</b>	0,31	4,42	168,04	$C_8H_8O_4$
<b>HFA</b>	1,02	4,21	152,05	$C_8H_8O_3$
<b>HFP</b>	0,43	4,68	166,06	$C_9H_{10}O_3$
<b>RUT</b>	-0,90	6,17	610,15	$C_{27}H_{30}O_{16}$
<b>QCE</b>	1,99	6,31	302,04	$C_{15}H_{10}O_7$
<b>Q3GI</b>	1,94	2,76	478,07	$C_{21}H_{18}O_{13}$
<b>TMX</b>	2,67	6,31	316,06	$C_{16}H_{12}O_7$
<b>IRN</b>	2,68	6,31	316,06	$C_{16}H_{12}O_7$

Tabuľka 3: Fyzikálno-chemické vlastnosti analytov [21].

### 3.5. Farkamokinetika kvercetinu

Po perorálnom podaní rutinu bol v systémovej cirkulácii detegovaný kvercetin, jeho konjugáty (sulfát a glukuronát) a metylované deriváty (isorhamnetin a tamarixetin). Viaceré štúdie ukázali, že črevná mikroflóra dokáže rozštiepiť glykosidické väzby rutinu a modifikovať flavonoly na fenolové kyseliny. Na základe toho, že v črevnej mikroflóre sa nachádzali rôzne druhy baktérii, boli v moči detegované odlišné koncentrácie kvercetinu, isorhamnetinu a v prítomnosti baktérie *Enterococcus* i kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová. Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová je metabolit detegovaný v moči po perorálnom podaní kvercetinu. Po intravenóznom podaní rutinu bol detegovaný v moči hlavne rutin v nezmenenej forme a jeho deriváty (glukuronid a metoxylovaná forma rutinu). Kvercetin a jeho deriváty pri tomto podaní rutinu neboli v moči detegované. Pre schematické zobrazenie metabolizmu kvercetinu vid' Obrázok 3 [1] [22] - [28].

Po suplementácii kvercetinom alebo kvercetinom obsiahnutým v biologických zdrojoch sa v plazme a moči objavujú metabolity: kvercetin ako glukuronid, ktorý môže byť substituovaný na viacerých funkčných skupinách, kvercetin ako sulfát, isorhamnetin a isorhamnetin ako glukuronid. Ako je popísané vyššie je evidentné, že po perorálnom podaní rutinu sa v tkanivách, plazme atď., objavuje kvercetin, ktorý je ďalej metabolizovaný na fenolové kyseliny, ktoré sú štruktúrne deriváty kyseliny bezoovej, fenypropiónovej a fenyloctovej [29].



Obrázok 3: Farmakokinetika kvercetin. Obrázok prevzatý zo zdroja [30].

### 3.6. Publikované analytické metódy

V žiadnej z doposiaľ publikovaných štúdiách nebola vyvinutá analytická a separačná metóda pre všetky sledované látky.

Analýzou kvercetinu a flavonoidných metabolitov sa zaoberajú mnohé štúdie (viď Tabuľka 4). Ako vzorky boli použité rôzne biologické materiály: plazma, tkanivá, stolica, moč, cibuľa, cereálne tyčinky, paradajková šťava a črevná šťava. Pre analýzu flavonoidných metabolitov bola ako extrakčná technika využitá len LLE (Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny) a ako separačná technika bola využitá HPLC (Vysokoučinná kvapalinová chromatografia) s rôznymi typmi detekcie. Jednalo sa o analýzy, ktoré trvali v rozmedzí 22 – 60 minút, čo je pri rutinnom využití danej metódy naozaj dlhý čas analýzy.

Fenolové kyseliny boli stanovované v sére, moči, plazme, ľudskom mozgu a paradajkovej šťave za využitia extrakčných metód SPE (Extrakcia na tuhú fázu) i LLE (viď Tabuľka 5). Je evidentné, že metóda SPE bola použitá pri extrakcii analytov (HFA, PAA, HVA) v moči, nie v sére, čo bolo náplňou mojej diplomovej práce. Analýzy prebiehali za využitia analytických techník HPLC i GC s hmotnostnou detekciou alebo DAD (Detektor diodového poľa) detekciou. Čas analýz bol rozdielny. Najkratšia analýza (4 min.) stanovovala iba HVA a neurotransmitery v ľudskom mozgu.

Štúdia, ktorá stanovovala niektoré fenolické kyseliny (PAA, HFA, HFP a i.) i niektoré flavonoidné metabolity a ich konjugáty (Q3GI, IRN, QCE), trvala 60/65 minút. Avšak táto analýza buď stanovovala fenolické kyseliny, alebo flavonoidné metabolity a analýza prebiehala s odlišným zložením mobilných fáz.

Pre rutinné využitie analytických metód je potrebné, aby analytická metóda nebola časovo náročná a bola čo najuniverzálnejšia. To znamená, dokázala poskytovať presné a správne výsledky pre všetky stanovované analyty, čo žiadna z publikovaných štúdií nespĺňala.

Analyt	Biolog. materiál	Extrakčná metóda	Separáčna metóda	Detekcia	Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Čas analýzy [min]	LOD	Zdroj
QCE, Q3GI, IRN, TMX a ich konjugáty	plazma, tkanivá	LLE	HPLC	DAD (250-700 nm) MS	Synergy RP-Max (250 x 4,6 mm; 4 µm)	gradientová elúcia A: 1% HCOOH v H <sub>2</sub> O; B: ACN	60	NA	[31]
QCE, Q3GI, IRN a ich konjugáty	plazma, moč, cibuľa	LLE	HPLC	DAD (250-700 nm) MS/MS	Synergy Max-RP (250 x 4,6 mm; 4 µm)	gradientová elúcia A: 1% HCOOH v H <sub>2</sub> O; B: ACN	60	NA	[29]
QCE, IRN, TMX	cereálne tyčinky	LLE	HPLC	DAD (365 nm)	Nudeodur Sphinx RP-C18 (125 x 4 mm; 5 µm)	gradientová elúcia A: 0,5% HCOOH v H <sub>2</sub> O; B: ACN	40	5-7 nmol/l	[32]
QCE, IRN, TMX, kaempherol, rhamnetin	plazma	LLE	HPLC	fluorescenčná	C-18 Kromasil 100 (250 x 4 mm; 5 µm)	gradientová elúcia A: pufer 0,025M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,4; B: ACN: MeOH	40	NA	[33]
QCE, IRN, TMX	plazma, tkanivá	LLE	HPLC	coulometrická	Chromolith RP18e (100 x 4,6 mm)	gradientová elúcia A: 5% ACN a 25 mM citrátový pufer o pH 3,7; B: 70% ACN a 25 mM citrátový pufer o pH 3,7	22	NA	[34]
QCE, IRN, kaempherol	plazma	LLE	HPLC	UV/VIS (365 nm)	Discovery C18 rozmery neuvedené	gradientová elúcia A: 1% kys. octová v H <sub>2</sub> O; B: 95% ACN a 1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	NA	NA	[35]
QCE, RUT a ich konjugáty	moč, črevná šťava	LLE	HPLC	fluorescenčná	Inertsil ODS-2 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	gradientová elúcia A: 0,025M citrátový pufer o pH 2,4; B: ACN	NA	5 ng/g	[36]

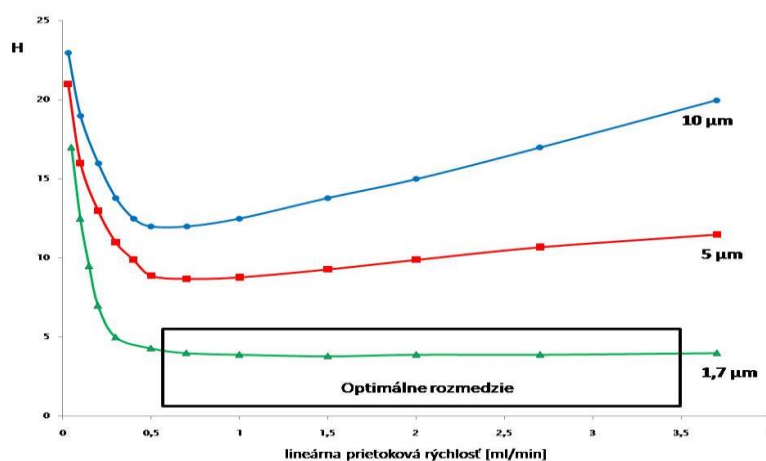
Tabuľka 4: Publikované analytické metódy pre stanovenie QCE, Q3GI, TMX, IRN a ich konjugátov. LLE – Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, DAD - Detektor diodového poľa, HPLC - Vysokoučinná kvapalinová chromatografia, ACN – Acetonitril, MeOH – Metanol, NA – Nedostupné (Not available), LOD – Limit detekcie, MS – Hmotnostný detektor.

Analyt	Biolog. materiál	Extrakčná metóda	Separáčn. metóda	Detekcia	Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Čas analýzy [min]	LOD	Zdroj
HFA, HVA, PAA a iné fenolové kys.	sérum, moč	LLE	GC	MS	Chromosorb W AW - DMCS (1 m x 2 mm)	Hélium	8	2 ng/ml pre HFA, 1 ng/ml pre PAA a HVA	[37]
HFA, PAA, HVA	moč	SPE	GC	MS	Silikagelová kapilárna kolóna CP Sil 5B (25 m x 0,25 mm)	Hélium	35	0,4 mg/l	[38]
1. Q3GI, IRN, QCE a ich konjugáty 2. PAA, HFA, HFP a iné fenolové kys.	paradajková šťava, plazma, črevná šťava, moč	LLE	HPLC	DAD MS/MS	Synergy RP-Max/Hydro-RP (250 x 4,6 mm; 4 µm)	gradientová elúcia 1. A: vodný roztok 1% kys. mravčej; B: ACN 2. A: vodný roztok 0,25% kys. octovej; B: ACN A: 0,05% HCOOH v H <sub>2</sub> O + 1mM kys. heptafluoromaslová; B: MeOH	1. 60 min – flavonoidy 2. 65 min - fenolové kyseliny	NA	[39]
HVA a neurotransmitery	ľudský mozog	LLE	UHPLC	MS	BEH C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 µm)	A: pufer HCOOH o pH 3,0; B: ACN	4	NA	[40]
PG a resorcinol	plazma	LLE	HPLC	MS	C18 XTERRA MS (100 x 2,1 mm; 3,5 µm)	A: pufer HCOOH o pH 3,0; B: ACN	10	2 ng/ml	[41]
HVA a kys.vanilmandľová	sérum	LLE	UHPLC	MS	Acquity HSS T3 (150 x 2,1 mm; 1,8 µm)	A: 0,1% HCOOH v H <sub>2</sub> O; B: 0,1% HCOOH v ACN	8	0,18 ng/ml pre HVA	[42]

Tabuľka 5: Publikované metódy pre stanovenie fenolových kyselín. LLE – Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, SPE – Extrakcia na tuhú fázu, GC - Plynová chromatografia, HPLC - Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, ACN – Acetonitril, NA – Nedostupné (Not available), LOD – Limit detekcie, MS – Hmotnostný detektor.

### 3.7. Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) alebo ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je jedným z trendov v oblasti analýzy za využitia princípov kvapalinovej chromatografie. Prvý komerčný UHPLC systém bol dostupný v roku 2004. Týmto novým prístupom bolo dosiahnutá vyššia separačná účinnosť a skrátenie času analýz. Ako vyplýva z van Deemterovej dynamickej teórie pri zmenšení častíc v stacionárnych fázach je možné dosiahnuť zvýšenie separačnej účinnosti (viď Obrázok 4). Zmenšenie častíc taktiež vyžadovalo uspôsobenie systému na zvýšenie tlaku. Aby bola zvýšená účinnosť zachovaná, bolo nutné uspôsobiť systém tak, aby nedochádzalo k rozširovaniu elučných zón mimokolónovými príspevkami. Zvýšenie prietokovej rýchlosti vedie ku skráteniu času analýz. Výsledný objem prietoku mobilnej fáze je u UHPLC nižší ako u HPLC, čo znamenalo zníženie množstva použitých rozpúšťadiel, na základe používania kolón s menším priemerom ako je tomu u HPLC. Použitie menších častíc viedlo k zvýšenému tlaku v chromatografickom systéme, preto musia byť stacionárne fázy stabilné i pri vysokých tlakoch. Využívajú sa častice o rozmere  $< 2 \mu\text{m}$  a dĺžky kolón 50 alebo 100 mm v priemere 2,1 mm. Inštrumentácia UHPLC sa odlišuje od HPLC čerpacím a dávkovacím systémom, vysokou frekvenciou zberu dát a výrazne redukovanými mimokolónovými objemami [43] - [47].



Obrázok 4: Van Deemterová krivka. Obrázok prevzatý a upravený zo zdroja [47]. H – Výškový ekvivalent teoretickej priehradky.

Všetky novšie technológie vrátane UHPLC majú aj niekoľko nevýhod. Sú to vyššia cena pri nákupe nového systému, náročnejší transfer metód medzi HPLC a UHPLC,

kde sú možné odlišnosti v mimokolonových objemoch, mŕtvych objemoch, vplyve trecieho tepla alebo limitácii prietokovej rýchlosti [43].

### **3.7.1. Stacionárne fázy v UHPLC**

V moderných analytických laboratóriách je najčastejšie využívaná chromatografia na reverzných fázach, ktorá umožnila analýzu látok s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Sorbenty stacionárnych fáz využívaných pri UHPLC analýze môžu byť silikagelové, hybridné, obsahujúce povrchovo porézne častice atď. Každý z uvedených sorbentov má svoje výhody i nevýhody. Silikagelové stacionárne fázy sú typické svojou mechanickou odolnosťou a dobrým rozlíšením. Sorbent je však stabilný len v rozmedzí pH 2 - 7. Hybridné sorbenty pozostávajú z kombinácie anorganického silikagelu a organického organosilanolu. Týmto prístupom bola zaistená vysoká mechanická odolnosť i chemická stabilita v širokom rozsahu pH. Silikagelové a hybridné sorbenty môžu byť ďalej modifikované napr. alkylmi C8, C18, polárnymi skupinami atď. [43] [44] [47].

Ďalším typom stacionárnych fáz sú sorbenty s povrchovo poréznymi časticami, ktoré pozostávajú z pevného silikagelového alebo hybridného jadra a poréznej vrstvy na povrchu (približne 0,5  $\mu\text{m}$  – v závislosti od výrobcu), kde sa odohráva celá separácia. Toto usporiadanie prispelo k zlepšeniu chromatografickej účinnosti, a to na základe vyššej permeability kolóny, z čoho vyplýva nižší tlak na kolóne. Nevýhodou je práve častý silikagelový základ, z čoho vyplýva nižšia chemická a teplotná stabilita. Využívané sú taktiež monolitické kolóny. Pozostávajú z makropórov a mesopórov, ale ich použitie s MS detekciou nie je vhodné, na základe vysokého prietoku, ktorý je nevhodný pre iónový zdroj predovšetkým pre ESI. V UHPLC systémoch môžu byť využité okrem reverzných a normálnych fáz i fáze HILIC, iónovo-výmenné, viac modálne a ďalšie [43] [44] [47].

### **3.8. Hmotnostne spektrometrická detekcia**

Detekčný systém je v kvapalinovej chromatografii vždy umiestnený za kolónou. Hmotnostný spektrometer (MS) využíva fyzikálno-chemické metódy. Princípom účinnej a citlivej detekcie je ionizácia vzorky a separácia iónov na základe pomeru  $m/z$  (hmotnosť/náboj). V ďalšom kroku dochádza k detekcii v detektore. Pre analýzu



je potrebné malé množstvo vzorky. Hmotnostná spektrometria je vysoko citlivá metóda, ktorú je možné využiť pre kvantitatívnu i kvalitatívnu analýzu [48] - [50].

Medzi nevýhody MS patrí fakt, že sa jedná o deštrukčnú analytickú techniku, ktorá má vysoké obstarávacie výdavky [50].

### **3.8.1. Inštrumentácia pre hmotnostnú spektrometriu**

MS je zložený z 3 základných častí: iónového zdroja, analyzátora a detektora [48].

#### **Iónový zdroj**

Iónový zdroj je prvou časťou MS, do ktorej prichádza vzorka. Úlohou iónového zdroja je ionizácia molekúl vzorky. Ionizačné techniky je možné rozdeliť na mäkké a tvrdé. Neexistuje univerzálna ionizačná technika, preto voľba vhodnej ionizačnej techniky závisí od fyzikálno-chemických vlastností stanovovaných látok ako sú napríklad prchavosť, molekulová hmotnosť, stabilita a povaha separovaných látok. Ďalej je podstatné či MS bude použitý pri analýze zmesi látok v biologickej matrici atď. [50] [51].

Predstaviteľom tvrdej ionizačnej techniky je elektrónová ionizácia (EI). Ionizácia je natoľko tvrdá, že môže dochádzať až k úplnej fragmentácii molekuly a vznikajúce ióny dosiahnu nepárny počet elektrónov. Typicky je táto technika využívaná v spojení s plynovou chromatografiou (GC), keďže sú vyžadované prchavé vzorky [51].

Najviac používané sú mäkké ionizačné techniky za atmosférického tlaku (ESI – ionizácia elektrosprejom, APCI - chemická ionizácia za atmosférického tlaku, APPI - fotoionizácia za atmosférického tlaku) v spojení s kvapalinovou chromatografiou. Ďalšou veľmi často používanou mäkkou ionizačnou technikou, ktorá avšak pracuje za zníženého tlaku, je MALDI – desorpcia laserom za účasti matrice. Mäkké ionizačné techniky sa vyznačujú menšou fragmentáciou molekuly a zachovaním molekulového píku. Pri ionizácii mäkkými ionizačnými technikami vznikajú protonované alebo deprotonované molekuly, a to na základe vloženého napätia [47] [51].

Proces ionizácie za využitia ESI je možné rozdeliť do 3 základných krokov. V prvom kroku dochádza k tvorbe malých na povrchu nabitých kvapiek. V druhom nastáva Columbická explózia, kde dochádza k uvoľneniu iónov z nabitých kvapiek, a to buď vyparením iónu, kde je ión analytu vytrhnutý z kvapky, alebo na základe zvyškového

náboja, kde dochádza k odpareniu rozpúšťadla a teda vzniku iónu analytu. Tretím krokom je vstup iónov už do hmotnostného analyzátoru, tým pádom do vákua, kde dochádza ku zmene teploty. Aby sa zabránilo tvorbe klastrov zo vzniknutých iónov je nutné používať sušiaci plyn (dusík) a vyhrievanie iónového zdroja [47] [51].

### **Hmotnostný analyzátor**

Ióny z iónového zdroja putujú do analyzátoru, ktorého funkcia je ich rozdelenie na základe  $m/z$  a urýchlenie do detektora. Analyzátory pracujú za vysokého vákua. Rozlišujeme niekoľko základných typov: magnetický sektorový, orbitálna pasca, iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou (FT-ICR), analyzátor doby letu (TOF), kvadrupól a iónová pasca. Kvadrupól (Q) je analyzátor, ktorého princíp separácie je založený na rôznej frekvencii oscilácie iónu pri prechode cez 4 tyče kruhového prierezu, na ktoré je vkladané rôzne napätie tak, aby dve protiľahlé tyče boli nabité kladne a ďalšie dve záporne. Správnym nastavením napätia je možné vyselektovať daný ión alebo je možné napätie upraviť tak, aby všetky ióny boli postupne prepúšťané na detektor [47] [52].

### **Tandemová hmotnostná spektrometria**

Princípom tandemovej hmotnostnej spektrometrie je uskutočnenie  $MS^n$  analýz na základe využitia viacerých hmotnostných analyzátorov. Najčastejším usporiadaním je trojitý kvadrupól (QqQ - triple quadrupole). V prvom analyzátore dochádza k výberu zvolených iónov, ktoré sú rozbité v kolíznej klietke na produktové fragmenty, a ďalej analyzované v nasledujúcom analyzátore. Ďalšími možnými spojeniami pre tandemovú hmotnostnú spektrometriu je spojenie kvadrupólu s analyzátorom doby letu (QTOF), kvadrupólu s orbitálnou pascou atď. [52] - [54].

### **Detektor**

Poslednou časťou MS je detektor, ktorý reaguje buď na zmenu množstva elektrónov z elektródy, na ktorú dopadajú ióny (elektrónový násobič) alebo na zmenu energie fotónov z fosforovej doštičky, na ktorú dopadajú ióny (fotonásobič). Pokles napätia môže byť pomocou rezistora meraný na elektróde, na ktorú dopadajú analyzované ióny (Faradayová klietka) [53].

### 3.9. Spojenie kvapalinovej chromatografie s MS detekciou (LC-MS)

Spojenie kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej detekcie (LC-MS) alebo tandemovej hmotnostnej detekcie (LC-MS/MS) prináša niekoľko výhod pri analýze komplexných vzoriek. LC-MS spojenie je veľmi citlivá analytická technika určená k získaniu molekulovej hmotnosti, identifikácii separovaných látok a kvantifikácii. Ďalšími výhodami sú jednoduchšie odhalenie koelúcie pík, zníženie rizika falošne pozitívnej identifikácie, a vďaka kvapalinovej chromatografii dochádza k odstráneniu nežiadúcich interferencií pochádzajúcich napr. z matrice, a tým dochádza k zlepšeniu signálu. Jedným z hlavných dôvodov častého využitia spojenia LC-MS je možnosť získať komplexné dáta. To znamená, že najprv sú látky rozdelené na základe retenčného času v kvapalinovej chromatografii, následne sú ich ióny rozdelené v pomere  $m/z$  v hmotnostnom analyzátore a v poslednom kroku hmotnostný detektor určí množstvo každého zo sledovaných iónov [55] [56].

Nevýhodou spojenia LC-MS môže byť veľké množstvo parametrov, ktoré môžu byť optimalizované, a napríklad účinnosť ionizácie analytov môže byť veľmi citlivá na malú zmenu systémových parametrov. Ďalšou nevýhodou môže byť vyššia smerodajná odchylka (RSD) opakovateľnosti signálu, a to i v prípade, že je vzorka opakovane analyzovaná v krátkom časovom období. Vzhľadom k deklarovanej vysokej citlivosti je hmotnostný detektor väčšinou využívaný pre stanovenie veľmi malých množstiev analytov. To môže viesť k zvýšenej časovej náročnosti prípravy vzorky, aby došlo k zníženiu interferencie matrice, ktorá by zabránila správnym a presným výsledkom. Pre správne zaobchádzanie s MS je nutné používať všetky rozpúšťadla v LC-MS kvalite, aby sa zabránilo príliš vysokému signálu pozadia a kontaminácii prístroja. To môže byť finančne náročné. V prípade využitia hmotnostného detektora v spojení s kvapalinovou chromatografiou je nutné zdôrazniť potrebu compatibility mobilnej fázy LC s týmto detektorom. Nie je teda možné využiť napr. neprchavé aditíva a pufry, ión-párové činidlá, halogenované rozpúšťadla. Rovnako je nutné kontrolovať koncentrácie využívaných aditív (napr. HCOOH atď.), ktoré nesmú byť príliš vysoké, aby nedochádzalo k súpereniu o náboj pri ionizácii, a tým k nežiadúcemu poklesu signálu. Taktiež je nutné vyvarovať sa použitiu plastového príslušenstva pri príprave

vzorky (parafilm, plastové kvapkadlá atď.). To môže spôsobiť kontamináciu napr. ftalátmi, silikónmi, polymérmí [55] - [57].

### **3.10. Proces úpravy vzoriek**

Pre analýzu komplexných biologických vzoriek (krv, plazma, sliny, sérum atď.) pomocou LC-MS je nevyhnutná úprava vzorky. V opačnom prípade môže dochádzať k ireverzibilným zmenám na stacionárnej fáze, k celkovému zníženiu účinnosti separácie, a následne k upchaniu dávkovacieho systému, kapilár alebo inej časti systému. Biologické vzorky môžu obsahovať soli alebo fosfolipidy, ktoré môžu pozitívne alebo negatívne ovplyvniť signál sledovanej látky pri MS detekcii [55] [58].

Preto na odstránenie balastných látok je nevyhnutné upravenie vzorky. Podstatou úpravy vzorky je jej očistenie a zároveň zakoncentrovanie analytov. Príprava vzoriek je časovo náročná procedúra. Zaberá viac ako 50% času z celkového času analýzy a ovplyvňuje všetky nasledujúce kroky i presnosť a správnosť analýzy [55] [58] [59].

Na základe existencie veľkého množstva extrakčných metód, sú tieto metódy rozdeľované na konvenčné metódy a moderné metódy [55].

#### **3.10.1. Konvenčné metódy**

Konvenčné metódy sú široko využívané v množstve analytických laboratórií. Sú to relatívne jednoduché metódy, dobre optimalizovateľné, ekonomicky dostupné a vyznačujú sa svojou dobrou reprodukovateľnosťou. I tieto metódy majú radu nevýhod. Sú časovo náročné a charakteristické relatívne vysokou spotrebou organických rozpúšťadiel i vzorky pri porovnaní s modernými metódami. Patria sem PP – zrážanie proteínov, LLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny a SPE - extrakcia na tuhú fázu [55].

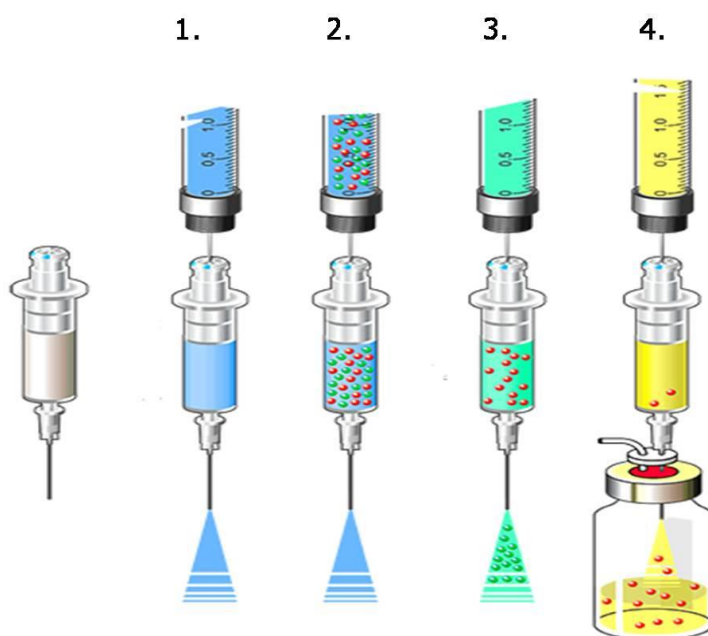
#### **Extrakcia na tuhú fázu (SPE)**

Extrakcia na tuhú fázu (SPE) je jednou z najpoužívanejších metód v analytických zariadeniach. Jedná sa o metódu, ktorá slúži nielen na extrakciu analytov z biologickej vzorky, ale aj na zakoncentrovanie a prečistenie analytov v biologickej vzorke alebo extrakte. Táto metóda poskytuje vhodnú selektivitu, reprodukovateľnosť a výťažnosť. Avšak nevýhodami sú odlišnosti v reprodukovateľnosti medzi rôznymi

šaržami sorbentov a finančná náročnosť pri obstarávaní sorbentov, pretože na jednu extrakciu je potrebná jedna kolónka. SPE pri porovnaní s ostatnými konvenčnými metódami nemá tak vysokú spotrebu organických rozpúšťadiel. Metóda môže byť využitá v online i offline prevedení [55] [59] [60].

Základom optimalizácie SPE metódy je výber vhodného sorbentu, ktorý je podmienený fyzikálno-chemickými vlastnosťami sledovaných látok a biologickej matrice, pretože každý sorbent má inú selektivitu, afinitu a kapacitu. Sorbenty využívané pri SPE majú rovnaký základ ako u stacionárnych fáz využívaných pri kvapalinovej chromatografii (napr. C8, C18 atď.). Využívajú sa i sorbenty, ktoré sú vysoko selektívne (imunoafinitné, MIP - molecularly imprinted polymers), čo je podkladom moderných extrakčných metód [60].

SPE metóda sa skladá zo 4 základných krokov (viď Obrázok 5). Prvým krokom je aktivácia sorbentu, ktorá pozostáva zo zmáčania a zrovnováženia kolónky, aby došlo ku rozprestretiu väzobných miest pre analyty. Druhým krokom je nanosenie biologickej vzorky. Tretím krokom je premytie kolónky z dôvodu odstránenia balastných látok. Posledným krokom je vymytie analytov zo sorbentu pomocou elučného činidla [59].



Obrázok 5: Princíp SPE metódy. Obrázok prebraný a upravený zo zdroja [55]. 1: Aktivácia sorbentu, 2: Nanosenie vzorky, 3: Premytie a vysušenie sorbentu, 4: Vymytie analytov.

### 3.10.2. Moderné metódy

Moderné metódy úpravy vzoriek sú novšími extrakčnými technikami, ktoré sú pri analýzach čoraz častejšie využívané. K výhodám patrí hlavne nižšia spotreba rozpúšťadiel i vzorky a krátky čas extrakcie. Táto skutočnosť prispela ku zníženiu celkovej ceny analýzy a zároveň k jej zrýchleniu. Odlišnosťou oproti konvenčným metódam je hlavne snaha o redukciu krokov potrebných k úprave vzorky. Moderné metódy je možné v niektorých prípadoch i automatizovať. Často sú ale náročné na prístrojové vybavenie a vyžadujú určité zručnosti analytika [55].

Ďalej sa rozdeľujú na online metódy (napr. RAM – materiály s obmedzeným prístupom, kapilárna SPME – kapilárna mikroextrakcia na tuhú fázu atď.), mikroextrakcie (napr. MEPS – mikroextrakcia plneným tuhým sorbentom s využitím striekačky, SDME – mikroextrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla, SPME - mikroextrakcia na tuhú fázu atď.) a extrakcie s vysokou selektivitou (napr. MIP, imunoafinitná SPE) [55].

### 3.11. Validácia metódy

Validácia metódy slúži k overeniu vhodnosti metódy pre stanovenie vybraných analytov a k overeniu zisku relevantných dát za použitia daného systému. V prípade bioanalýzy sú hodnotené parametre: linearita, limit detekcie (LOD) a kvantifikácie (LOQ), presnosť, správnosť, selektivita a matricové efekty [61] [62].

**Linearita** metódy slúži k overeniu priamo úmernosti výsledkov a reálnej koncentrácie analytov vo vzorke. Jedná sa o priamu závislosť signálu na koncentrácii. Všeobecne matematicky sa vyjadruje ako rovnica:  $y = ax + b$ , kde  $a$  - označuje posunutie hodnoty na osi  $y$  a  $b$  – označuje smernicu kalibračnej krivky [61] [62].

**Limit detekcie** (LOD) je parameter, ktorý sa vyjadruje ako pomer signálu k šumu  $\geq 3$ . Tento parameter určuje koncentráciu analytu, ktorá je ešte detegovateľná danou metódou a signál pre analyt je odlišný od šumu. Parameter **LOQ** je vyjadrovaný ako pomer signálu k šumu  $\geq 10$ . LOQ je definovaný ako najnižšia skúšaná koncentrácia, pri ktorej je nadobudnutá vhodná výťažnosť za vhodnej smerodajnej odchýlky. Táto musí byť súčasťou lineárneho rozsahu metódy. Tu je vhodné definovať pojem rozsah metódy. Je to interval hodnôt koncentrácií, pre ktoré bolo validáciou potvrdená

aplikovateľnosť metódy. Tento interval býva často ohraničený horným limitom kvantifikácie (ULOQ – Upper limit of quantification) a dolným limitom kvantifikácie (LLOQ – lower limit of quantification) [61] [62].

Parameter **presnosť** metódy je udávaný v % relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD) a vyjadruje mieru zhody nameraných hodnôt koncentrácií sledovaných látok za predom nastavených podmienok. Parameter **správnosť** vyjadruje mieru zhody nameraných výsledkov a prijatou referenčnou hodnotou. V bioanalýze môže byť klasifikovaná ako výťažnosť metódy pre dané analyty [62].

**Matricové efekty** sú problémom pri využití ionizačnej techniky ESI v spojení LC-MS, pretože na základe prítomnosti matrice môže dochádzať k zosilneniu alebo zoslabeniu signálu pre daný analyt. Keďže matricové efekty sú koncentračne závislé, je nutné pri validácii overiť vplyv matrice pri všetkých koncentráciách [62].

Matricové efekty je možné určiť 3 spôsobmi: post-kolónovou infúziou, metódou post-extrakčného prídavku a metódou porovnania smerníc kalibračných kriviek. V mojej diplomovej práci bola využitá metóda post-kolónovej infúzie, a to následným postupom. Na kolónu je nastrekovaná vzorka (blanková matrica) a rozpúšťadlo bez analyzovaných látok, ktoré sú do mobilnej fázy pridávané za kolónou za využitia tzv. T-kusu. Behom týchto experimentov musia byť všetky parametre systému nastavené rovnako ako pri vlastnej analýze [55].

V prípade, že sa záznamy matrice a slepej vzorky prekrývajú, je evidentné, že nedochádza k matricovým efektom. Naopak, keď je zo záznamu evidentný pozitívny alebo negatívny pík v retenčnom čase sledovanej látky, je zrejmé, že dochádza k potlačeniu alebo zvýšeniu intenzity signálu, a teda prítomnosti matricových efektov [55].

## 4. Experimentálna časť

### 4.1. Použité chemikálie a prístroje

#### 4.1.1. Štandardné látky

- Floroglucinol (PG), Sigma-Aldrich, ČR (HPLC  $\geq$  99 %)
- Kyselina homovanilínová (HVA), Sigma-Aldrich, ČR (HPLC  $\geq$  97 %)
- Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (PAA), Extrasynthese, FR (NA)
- Kyselina 3-hydroxyfenyloctová (HFA), Toronto research chemicals, Kanada (95 %)
- Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová (HFP), Toronto research chemicals, Kanada (98 %)
- Rutin – hydrát (RUT), Sigma-Aldrich, ČR (HPLC  $\geq$  95 %)
- Kvercetin (QCE), Sigma-Aldrich, ČR (HPLC  $\geq$  95 %)
- Kvercetin-3-glukuronid (Q3GI), Extrasynthese, FR (HPLC  $\geq$  95 %)
- Tamarixetin (TMX), Extrasynthese, FR (HPLC  $\geq$  99 %)
- Isorhamnetin (IRN), Extrasynthese, FR (HPLC  $\geq$  99 %)

#### 4.1.2. Chemikálie

- Metanol: Methanol LC-MS grade, Sigma-Aldrich, ČR ( $\geq$  99 %)
- Acetonitril: Acetonitrile LC-MS grade, Sigma-Aldrich, ČR ( $\geq$  99,9 %)
- Amoniak: Ammonium hydroxide solution, Sigma-Aldrich, ČR ( $\geq$  25 %)
- Kyselina octová, Sigma-Aldrich, ČR ( $\geq$  99,7 %)
- Kyselina trifluorooctová, Sigma-Aldrich, ČR (99 %)
- Kyselina trihydrogénfosforečná, Penta, ČR (HPLC 85 %, p.a.)
- Kyselina mravčia puriss. P.a., ACS reagent, reag. Ph., Sigma-Aldrich, ČR ( $\geq$  98 %)
- Ultračistá voda - Destilácia vody prebiehala na Katedre analytickej chémie využitím prístroja Milli-Q RG. Následne bola voda upravená prefiltrovaním pomocou vákuovej pumpy a 0,2  $\mu$ m filtru.
- Technical Buffer pH 4,01, WTW Trace, UK
- Technical Buffer pH 7,00, WTW Trace, UK
- Sérum Lyonorm Hum N, Ebra Lachema s.r.o, ČR



### 4.1.3. Prístrojové vybavenie

- UHPLC systém Acquity™ Ultra Performace LC, Waters, ČR
  - Automatický dávkovač, čerpadlo, kolónový termostat
- Analytická kolóna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (1,7 µm 100 x 2,1 mm), Waters, ČR
- Hmotnostný detektor Quattro Micro – trojitý kvadrupól, Waters, UK
- Software Quanlynx a Masslynx, Waters, ČR
- Analytické váhy a presné analytické váhy, Sartorius, ČR
- Mikropipety (automatické) a špičky, Biohit, ČR
- Magnetická miešačka RCT basic IKAMAG, IKA®Werke GmbH, DE
- pH meter: typu pH 212, HANNA Instruments, DE
- Vákuová pumpa Vacc-space, Chromservis, ČR
- SPE Manifold SUPELCO Visiprep 24™ DL, Supelco Analytical, ČR
- Ultrazvuk BANDELIN SONOREX DIGITEC DT 100, Bandelin electronic, DE
- Centrifúga Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, DE
- Injekčné striekačky, Hamilton-Bonaduz, ČR
- Membránové filtre PTFE (polytetrafluóroetylén) 0,22 µm, AP Servis, ČR
- Vialky s uzávermi, Vitrum, ČR
- Eppendorfky 2,0 ml, Sigma-Aldrich, ČR
- SPE kolónky:
  1. Oasis Max 1cc Cartridge 10 mg 30 µm, Waters, ČR
  2. Discovery DSC-C8 1 ml Tube, 100 mg, Supelco Analytical, ČR
  3. Discovery DSC-18 1 ml Tubes, 100 mg, Supelco Analytical, ČR

## 4.2. Príprava roztokov

### 4.2.1. Príprava zásobného roztoku štandardov

Analytické štandardy (PG, HVA, PAA, HFA, HFP, QCE, Q3GI, RUT, TMX) boli navážené presne do hmotnosti 1 mg. Táto navážka bola následne doplnená príslušným počtom mikrolitrov metanolu tak, aby výsledná koncentrácia bola presne 1 mg/ml.

Roztok isorhamnetinu bol pripravovaný vždy samostatne, keďže pri koncentrácií 1 mg/ml, nebola táto kryštalická látka úplne rozpustná v metanole. Preto bol pripravovaný zásobný roztok o rád nižšej koncentrácie.

#### **4.2.2. Príprava pracovného roztoku štandardov**

Pracovný roztok štandardov bol pripravovaný zo zásobného roztoku analytov riedením do ultračistenej vody. Pred nanesením na SPE sorbent bola vzorka zriedená pufrom 0,01M mravenčanom amónnym o pH 5,0 v pomere 1:1, tak aby bola dosiahnutá výsledná koncentrácia 0,75 µg/ml, ktorá bola využívaná pri optimalizácii.

Porovnávací vzorka štandardov bola pripravená vždy obdobným spôsobom ako vzorka.

#### **4.2.3. Príprava roztokov pre UHPLC analýzu**

Mobilná fáza, využívaná pre analytickú metódu, bola zložená z vodnej a organickej zložky. Ako vodná zložka bola použitá 0,1% kyselina mravčia vo vode pripravená pridaním 0,5 ml kyseliny mravčej do 500 ml ultračistej vody. Ako organická zložka mobilnej fáze bol využívaný metanol.

Oplachové média boli troch typov. Ako silné oplachové činidlo bol využitý metanol. Ako slabé oplachové činidlo bol použitý 10% roztok metanolu vo vode. Ako zadný oplach piestov bol využitý roztok 20% metanolu vo vode.

### **4.3. SPE metóda**

#### **4.3.1. Príprava biologického materiálu**

Na prípravu vzorky biologického materiálu bolo použité komerčne dostupné lyofilizované kontrolné sérum LYONORM HUM N. Fľaštička s lyofilizátom bola otvorená a bolo do nej pridaných presne 5,0 ml ultračistenej vody. Následne bola opätovne uzatvorená a tekutina bola premiešavaná po dobu 30 minút krúživým pohybom tak, aby nevznikla pena. Vzorka biologického materiálu bola pripravená tak, že pripravené sérum bolo obohatené o potrebnú koncentráciu analytických štandardov. Roztok

biologického materiálu bol pripravený podobne ako pracovný roztok štandardov. K 500 µl takto pripravenej vzorky bolo pridaných 500 µl vodného roztoku 1% kyseliny trihydrogénfosforečnej. Následne bola vzorka zriedená pufrom – 0,01M mravenčanom amónnym o pH 5,0 v pomere 1:1 tak, aby bola dosiahnutá výsledná koncentrácia 0,75 µg/ml.

Porovnávací vzorka štandardov bola pripravená podobne ako reálna vzorka.

#### 4.3.2. Finálne podmienky SPE metódy

Na zmáčanie sorbentu bolo využitých 3 x 1 ml metanolu. Na zrovnováženie sorbentu bolo použitých 3 x 1 ml roztoku 1% hydroxidu amónneho. Následne bola nanesená vzorka pripravená podľa stati 4.3.1. Premývanie sorbentu prebehlo v dvoch krokoch. V prvom kroku 1 ml roztoku pufru 0,01M mravenčanu amónneho o pH 5,0 a v druhom kroku 1 ml roztoku 1% metanolu riedeným do tohto pufru. Vymytie vzorky prebiehalo za využitia elučného činidla, ktoré pozostávalo z metanolu a vodného roztoku 0,5% kyseliny trifluóroctovej (95/5). Táto vzorka bola následne prefiltrovaná za využitia membránového filtra PTFE 0,22 µm.

#### 4.4. UHPLC – MS/MS metóda

Pre stanovenie kvercetínu a jeho 9 metabolitov bola vyvinutá UHPLC-MS/MS metóda. Na základe najlepšej selektivity pre všetky separované látky, ale majoritne pre separáciu kritického páru izomérov (isorhamnetín a tamarixetín) bola využívaná stacionárna fáza Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm). Finálne podmienky separácie boli nasledujúce: prietok mobilnej fázy 0,35 ml/min, teplota kolóny 40 °C, teplota automatického dávkovača 4°C, nástrek vzorky 5 µl.

Pri gradientovej elúcii bol využitý metanol a 0,1% kyselina mravčia vo vode, ktorých gradient je podrobne zobrazený vid' Tabuľka 6.

čas	[%] 0,1% kyseliny mravčej	[%] metanolu	gradientová krivka
0,00	95	5	
5,00	5	95	6
5,10	95	5	6
7,00	95	5	6

Tabuľka 6: Popis priebehu gradientu u využitej UHPLC metódy.

Ionizácia separovaných látok prebiehala za pomoci elektrospreja (ESI) v kladnom i zápornom móde. Podmienky pre ionizáciu parametrov boli nasledujúce: napätie na kapiláre 3,2 kV a -2,0 kV, napätie na extraktore: 3,0 V, napätie na iónovej šošovke: 0,5 V, teplota zdroja: 130°C, desolvatačná teplota: 450°C, prietok plynu pri desolvatácii: 800 l/hod, prietok plynu na kuželi: 100 l/hod.

Pre každý analyt bola optimalizovaná kolízna energia, napätie na vstupnom kuželi a pozorovací čas. K detekcii stanovovaných látok bol použitý trojitý kvadrupól za využitia monitorovania vybranej reakcie (SRM). Pre podrobnejší prehľad vid' Tabuľka 7.

	Ionizácia	Prekurzor	Fragment	Napätie na vstupnom kuželi [V]	Kolízna energia [eV]	Retenčný čas [min]	Pozorovací čas
PG	ESI <sup>+</sup>	127,1	80,9	35	20	1,39	0,10
HVA	ESI <sup>-</sup>	181,1	137,3	25	10	2,52	0,20
PAA	ESI <sup>-</sup>	166,9	123,1	15	10	2,00	0,10
HFA	ESI <sup>-</sup>	150,8	106,8	15	10	2,54	0,05
HFP	ESI <sup>-</sup>	164,9	120,8	30	10	3,02	0,05
RUT	ESI <sup>+</sup>	610,9	303,3	20	25	3,65	0,20
QCE	ESI <sup>+</sup>	479,2	303,1	25	15	3,88	0,05
Q3GI	ESI <sup>+</sup>	303,0	153,0	40	30	4,61	0,05
TMX	ESI <sup>+</sup>	317,2	302,0	40	25	4,89	0,05
IRN	ESI <sup>+</sup>	317,2	302,1	40	25	4,97	0,05

Tabuľka 7: Popis podmienok SRM pre všetky sledované látky.

#### 4.5. Test spôsobilosti systému (SST)

Pri tomto teste boli využité koncentrácie roztokov: 1 µg/ml, 0,75 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,1 µg/ml a 0,075 µg/ml. Príprava týchto roztokov je podrobne popísaná v stati 4.6.1.

Vhodnosť nastavených parametrov LC-MS systému bola overená testom spôsobilosti systému (SST). SST pozostával z desiatich po sebe idúcich meraniach, ktoré prebiehali za rovnakých podmienok. Predmetom overenia bola opakovateľnosť plochy píku a retenčného času všetkých separovaných látok, a to na štyroch koncentračných hladinách, ktoré záviseli od LOQ každého z analytov. Hodnoty RSD [%]

retenčného času by mali byť < 1% a RSD [%] pre opakovateľnosť plochy píku pre všetky testované látky by mali byť < 5% [62].

## 4.6. Validácia metódy

### 4.6.1. Kalibračná závislosť

Lineárna závislosť bola určená pre vzorky štandardov rovnako ako i pre vzorky biologického materiálu. Meranie bolo uskutočnené na 10 koncentračných hladinách v rozsahu koncentrácií 7,5 ng/ml – 1 µg/ml. Príprava vzoriek biologického materiálu a porovnávajúcich štandardov je podrobne popísaná (viď Tabuľka 8) a podrobný popis prípravy vzoriek viď stať 4.3.2.

koncentrácia		1 µg/ml		0,75 µg/ml		0,5 µg/ml			
	STD	STD	VZORKA	STD	VZORKA	STD	VZORKA		
STD 9	0,1 mg/ml	20 µl	20 µl	15 µl	15 µl	10 µl	10 µl		
STD IRN		20 µl	20 µl	15 µl	15 µl	10 µl	10 µl		
sérum		-	960 µl	-	970 µl	-	980 µl		
ultračistá voda		960 µl	-	970 µl	-	980 µl	-		
		0,25 µg/ml		0,1 µg/ml		75 ng/ml		50 ng/ml	
	STD	VZORKA	STD	VZORKA	STD	VZORKA	STD	VZORKA	
STD 9	10 µg/ml	50 µl	50 µl	20 µl	20 µl	15 µl	15 µl	10 µl	10 µl
STD IRN		50 µl	50 µl	20 µl	20 µl	15 µl	15 µl	10 µl	10 µl
sérum		-	900 µl	-	960 µl	-	970 µl	-	980 µl
ultračistá voda		900 µl	-	960 µl	-	970 µl	-	980 µl	-
		25 ng/ml		10 ng/ml		7,5 ng/ml			
	STD	VZORKA	STD	VZORKA	STD	VZORKA			
STD 9	1 µg/ml	50 µl	50 µl	20 µl	20 µl	15 µl	15 µl		
STD IRN		50 µl	50 µl	20 µl	20 µl	15 µl	15 µl		
sérum		-	900 µl	-	960 µl	-	970 µl		
ultračistá voda		900 µl	-	960 µl	-	970 µl	-		

Tabuľka 8: Popis prípravy vzoriek a štandardov využitých pri kalibračnej závislosti. STD 9 – roztok štandardov obsahujúci všetky analyty okrem isorhamnetinu, STD IRN – štandardný roztok obsahujúci isorhamnetin.

### 4.6.2. Presnosť a správnosť

Overenie presnosti a správnosti prebiehalo na 4 koncentračných hladinách, ktoré vychádzali z rozsahu kalibračnej krivky, a to koncentrácie odpovedajúce hodnotám LLOQ, LQC, MQC a HQC (LLOQ – Dolný limit kvantifikácie, LQC – Dolná hladina kontroly kvality, MQC – Stredná hladina kontroly kvality, HQC – Horná hladina kontroly kvality). Podrobne viď Tabuľka 9. Príprava roztokov MIX-ov, ktoré boli potrebné k príprave vzoriek je popísaná viď Tabuľka 10. Príprava vzoriek na overenie presnosti a správnosti je popísaná viď Tabuľka 11.

	HQC [ng/ml]	MQC [ng/ml]	LQC [ng/ml]	LLOQ [ng/ml]
PG	800	600	400	250
HVA	800	600	400	250
PAA	800	550	250	75
HFA	800	550	250	75
HFP	800	550	250	75
QCE	800	550	250	75
Q3GI	800	500	200	25
RUT	800	500	200	25
TMX	800	500	200	10
IRN	800	500	200	10

Tabuľka 9: Koncentrácie analytov pri overení presnosti a správnosti. LLOQ – Dolný limit kvantifikácie, LQC – Dolná hladina kontroly kvality, MQC – Stredná hladina kontroly kvality, HQC- Horná hladina kontroly kvality.

	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5	MIX 6	MIX 7
PG [1 mg/ml]	50 µl	-	-	-	-	-	100 µl
HVA [1 mg/ml]	50 µl	-	-	-	-	-	100 µl
PAA [1 mg/ml]	-	50 µl	-	10 µl	-	-	100 µl
HFA [1 mg/ml]	-	50 µl	-	10 µl	-	-	100 µl
HFP [1 mg/ml]	-	50 µl	-	10 µl	-	-	100 µl
QCE [1 mg/ml]	-	50 µl	-	10 µl	-	-	100 µl
Q3GI [1 mg/ml]	-	-	50 µl	-	-	10 µl	100 µl
RUT [1 mg/ml]	-	-	50 µl	-	-	10 µl	100 µl
TMX [1 mg/ml]	-	-	50 µl	-	10 µl	-	100 µl
IRN [0,1 mg/ml]	-	-	-	-	100 µl	-	-
MeOH	400 µl	300 µl	350 µl	960 µl	890 µl	480 µl	100 µl

Tabuľka 10: Príprava roztokov analytov na overenie presnosti a správnosti.

MIX	Zásobný roztok LLOQ	Zásobný roztok LQC	Zásobný roztok MQC	Zásobný roztok HQC
1	12,5 µl	20 µl	30 µl	-
2	-	12,5 µl	27,5 µl	-
3	-	10 µl	25 µl	-
4	37,5 µl	-	-	-
5	5 µl	-	-	-
6	12,5 µl	-	-	-
7	-	-	-	40 µl
STD IRN konc. 0,1 mg/ml	-	10 µl	25 µl	40 µl
SÉRUM	2432 µl	2447,5 µl	2392,5 µl	2420 µl
	LLOQ	LQC	MQC	HQC
Zásobný roztok LLOQ	500 µl	-	-	-
Zásobný roztok LQC	-	500 µl	-	-
Zásobný roztok MQC	-	-	500 µl	-
Zásobný roztok HQC	-	-	-	500 µl
1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
mravenčanový pufer o pH 5,0	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

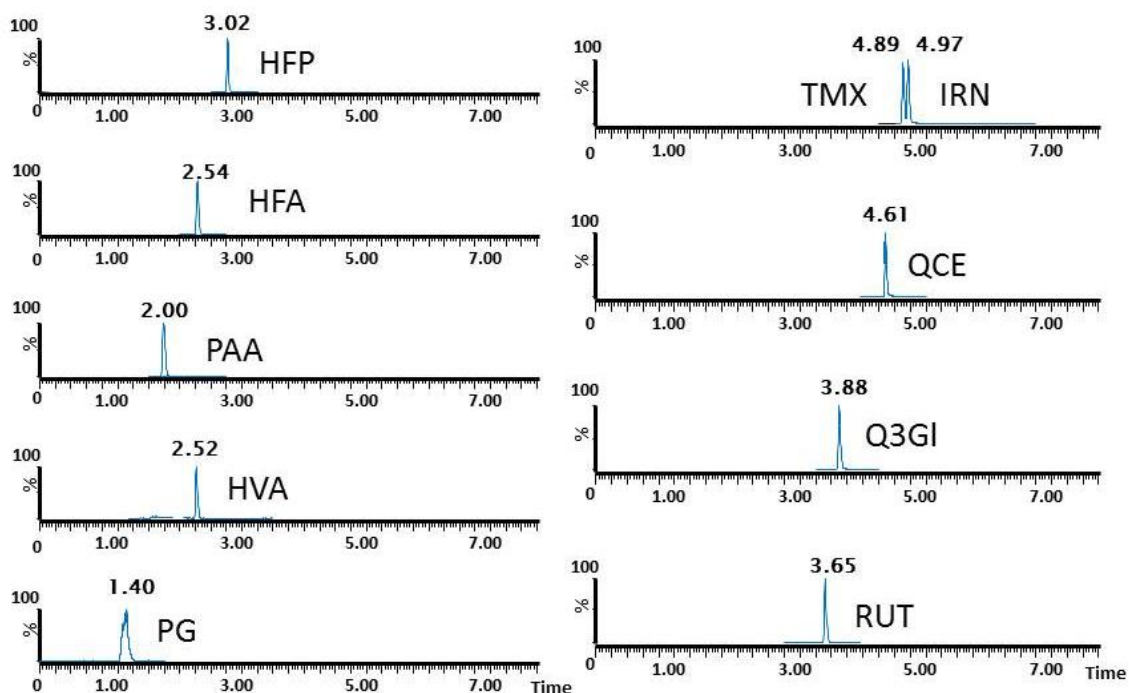
Tabuľka 11: Popis prípravy vzorky, ktorá bola podrobená SPE.

## 5. Výsledky a diskusia

### 5.1. UHPLC metóda

O detailnom vývoji separačnej metódy viac pojednáva Diplomová práca Jakuba Mišíka [63]. Separácia analytov prebiehala za 7,5 min. vrátane ekvilibrácie. Výhodou tejto analytickej metódy je rýchlosť separácie ako je evidentné z chromatogramu vid' Obrázok 6. Pred použitím tejto analytickej metódy bola vhodnosť metódy overená testom SST a zostrojením kalibračnej závislosti.

Dôležitá bola separácia páru izomérov (IRN a TMX), ktorý má rovnakú molekulovú hmotnosť a MS detekciou by nebolo možné ich rozlíšiť.



Obrázok 6: UHPLC-MS/MS chromatogramy s využitím SRM pre jednotlivé analyty (zmes STD o koncentrácii 1 µg/ml).

### 5.2. SPE metóda

Prvým krokom optimalizácie SPE metódy bola voľba vhodného sorbentu. Na základe toho bolo ďalej optimalizované elučné a premývacie činidlo.

### 5.2.1. Výber vhodnej extrakčnej kolónky

Hodnotené boli 3 typy sorbentov, a to: Discovery DSC-C8, Discovery DSC-C18 a Oasis MAX. Sorbenty sa odlišujú svojím zložením. Discovery DSC-C8 a C18 sú reverzné silikagelové kolónky modifikované reťazcom s príslušným počtom uhlíkov. Naopak kolónka MAX je viac modálna stacionárna fáza obsahujúca vo svojej štruktúre kvartérnu amóniovú soľ a nepolárny polymérny reťazec [64].

	Objem [ml]	Použité činidlo/koncentrácia	
		MAX	C8, C18
zmáčanie sorbentu	3 x 1		MeOH
zrovnováženie sorbentu	3 x 1	vodný roztok 1% NH <sub>4</sub> OH	vodný roztok 0,1% HCOOH
nanesenie vzorky	1/2 *		0,75 µg/ ml
1.premytie sorbentu	1		vodný roztok 0,1% HCOOH
2.premytie sorbentu	1	vid' v stati 5.2.3	0,1% HCOOH v MeOH (95:5)
vymytie analytov	1	vid' v stati 5.2.2 pre screening použitý roztok 1% HCOOH v MeOH (10:90)	0,1% HCOOH v MeOH (40:60)

Tabuľka 12: Podrobný popis extrakčných podmienok. \* - 1 ml vzorky bol nanášaný pri optimalizácii metódy, 2 ml vzorky boli nanášané u vzoriek biologického materiálu.

Na základe nezadržania viacerých analytov PG, HFA, RUT, Q3GI, IRN, TMX na reverznej silikagelovej kolónke C8 a nezadržanie analytov PG, PAA, RUT, QCE, Q3GI na stacionárnej fázy Discovery C18 boli tieto stacionárne fázy zvolené za nevhodné. Toto bolo overené UHPLC-MS/MS analýzou frakcií kroku po nanesení vzorky. Keďže kolónky C8 a C18 sú reverzné silikagelové stacionárne fázy, bolo možné očakávať, že polárne analyty charakteru slabých a veľmi slabých kyselín o rôznych molekulových hmotnostiach nebudú zadržované na týchto typoch sorbentov. Hodnoty log P (v rozmedzí: - 0,9 až 2,68) poukazovali na odlišnosti v polarite látok, a preto tieto typy sorbentov neboli vhodné pre extrakciu testovaných analytov.

Na viacmodálnej stacionárnej fázy MAX (ióno-výmennej a polymérnej) došlo k retencii všetkých testovaných analytov, čo bolo overené UHPLC-MS/MS analýzou frakcie kroku po nanesení vzorky. Tento sorbent bol vybraný na základe toho, že všetky separované látky sú charakteru slabých a veľmi slabých kyselín a bol predpokladaný



ich lepší záchyt, a to predovšetkým malých molekúl. Molekuly s nižšou molekulovou hmotnosťou pri retencii na stacionárnu fázu by mali byť v ionizovanom stave (anióny), aby došlo k naviazaniu na kvartérnu amóniovú soľ, obsiahnutú v sorbente. U analytov s vyššou molekulovou hmotnosťou došlo pravdepodobne k naviazaniu svojou lipofilnejšou časťou molekuly na polymérnu časť sorbentu. Preto bola ďalšia optimalizácia uskutočnená práve na tejto kolónke.

## 5.2.2. Optimalizácia elučného činidla

### 1. Voľba organickej zložky v elučnom činidle:

Ako najvhodnejší sorbent využívaný na extrakciu analytov bol zvolený sorbent MAX. Prvým krokom po výbere vhodného sorbentu bola optimalizácia elučného činidla (EČ) z dôvodu nízkej výťažnosti analytov, za použitia elučného činidla 1% kyseliny mravčej v metanole v pomere 10:90. Retencia analytov bola potvrdená analýzou príslušnej frakcie kroku po nanosení vzorky. Pri optimalizácii sa vychádzalo z postupov doporučených výrobcom, ktorý uvádza, že elučné činidlo by sa malo skladať z organickej a kyslej zložky [65]. Organická zložka preto, aby elučné činidlo poskytovalo dostatočnú elučnú silu. Kyslá zložka z dôvodu, aby došlo k rozrušeniu ióno-výmennej interakcie a k následnému vymytiu analytov v neionizovanom stave. Optimalizácia prebiehala v prvej fáze bez účasti premývacieho kroku. Ten bol optimalizovaný až po výbere vhodného elučného činidla, aby bolo zabránené stratám analytov, a taktiež nedochádzalo k skresľovaniu výsledkov.

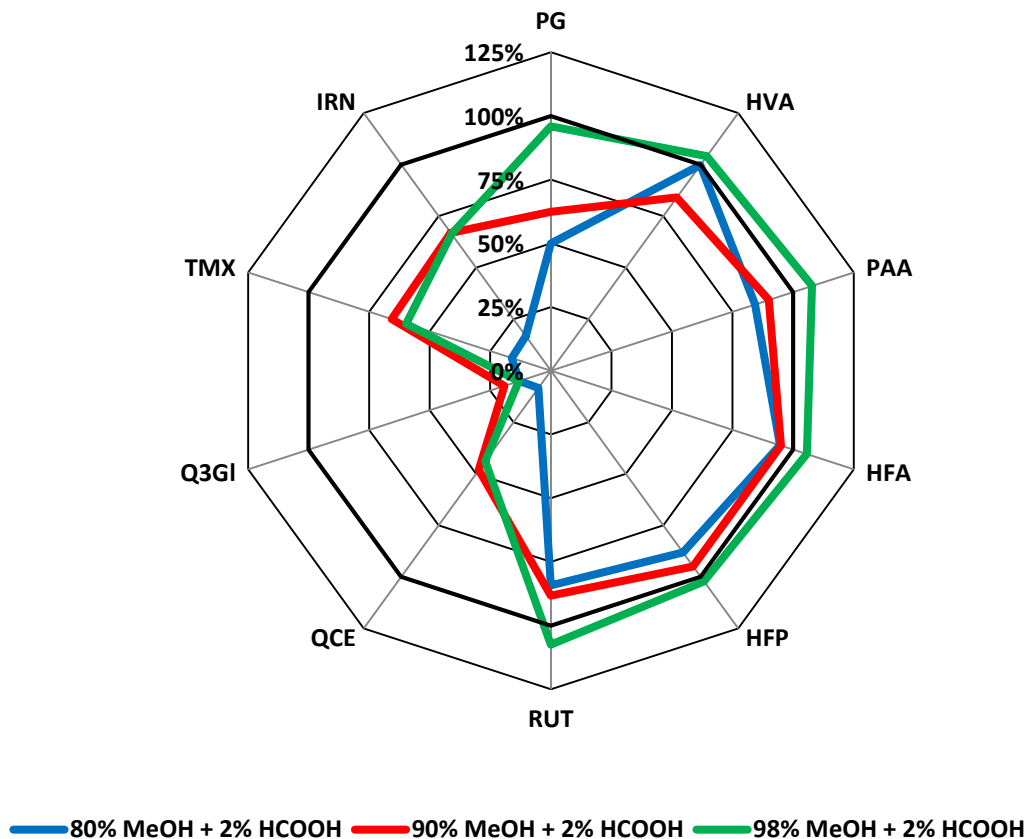
Prvým krokom pri optimalizácii elučného činidla bola voľba vhodnej organickej zložky elučného činidla. Podmienky extrakcie sú zobrazené vid' Tabuľka 12. Ako elučné činidlá boli pri tomto experimente využité roztoky pozostávajúce z 60 – 98% metanolu s prídavkom 2% kyseliny mravčej.

Výsledky výťažnosti sú zobrazené za použitia 80%, 90% a 98% metanolu (vid' Graf 1), pretože nižšie koncentrácie metanolu v elučnom činidle nedosahovali dostatočných výťažností pre analyty PG, HVA, PAA, HFA, HFP. Hodnoty RSD zhŕňa Tabuľka 13.

Zvyšovanie podielu organického rozpúšťadla viedlo k zvýšeniu výťažnosti polárnejších analytov ( $\log P$  0,9 - 1,02). Na základe optimálnej výťažnosti pre analyty

PG, QCE, Q3GI, TMX a IRN bol za vhodný obsah organickej zložky vybraný 90% metanol v roztoku s 2% kyselinou mravčou.

### Optimalizácia organickej zložky elučného činidla



Graf 1: Výťažnosť [%] analytov pri optimalizácii organickej zložky elučného činidla.

	PG RSD [%]	HVA RSD [%]	PAA RSD [%]	HFA RSD [%]	HFP RSD [%]	RUT RSD [%]	QCE RSD [%]	Q3GI RSD [%]	TMX RSD [%]	IRN RSD [%]
<b>80% MeOH</b>	26,5	18,1	1,1	13,6	12,2	12,7	6,6	4,8	3,4	6,5
<b>90% MeOH</b>	13,5	2,6	13,5	4,5	7,9	4,6	24,7	8,6	6,0	12,4
<b>98% MeOH</b>	21,7	19,9	24,0	21,6	33,4	21,8	5,8	5,7	2,5	7,0

Tabuľka 13: Hodnoty RSD [%] pri optimalizácii množstva organickej zložky v elučnom činidle. Ako kyslá zložka elučného činidla bola využitá 2% kyselina mravčia.

## 2. Voľba kyslej zložky v elučnom činidle.

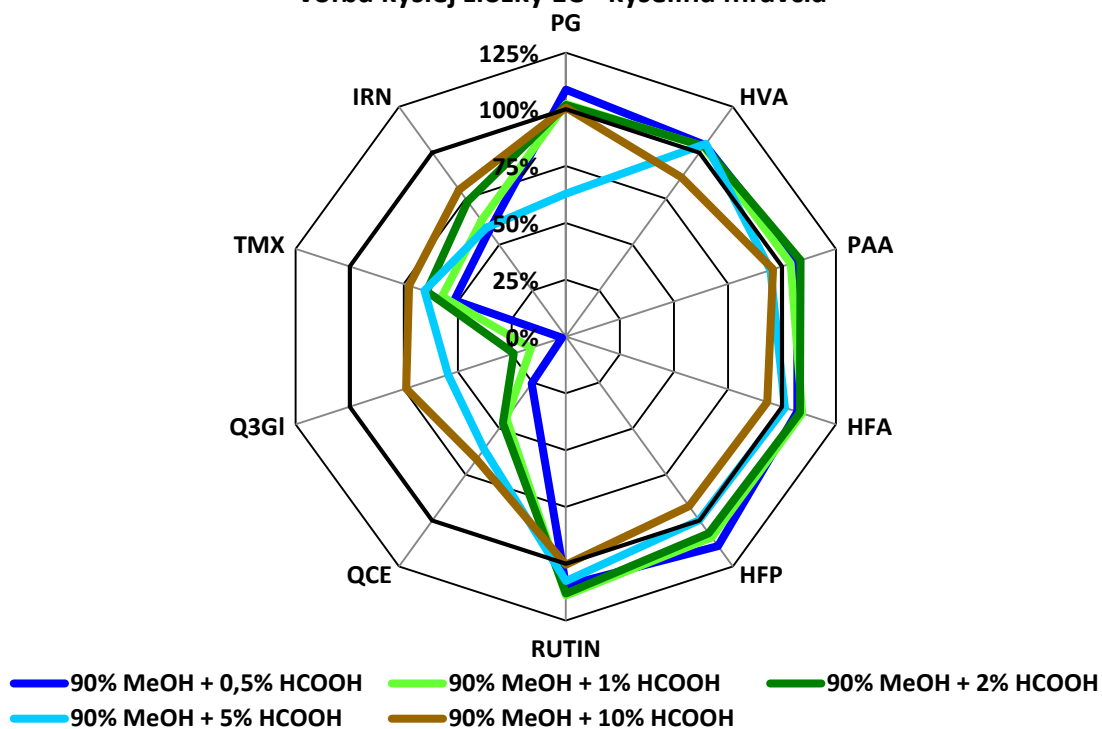
V následnom experimente bola optimalizovaná kyslá zložka elučného činidla. Kyslá zložka je dôležitá súčasť elučného činidla z dôvodu vymývania analytov, ktoré sú vo forme aniónov naviazané na sorbent. K prerušeniu tejto väzby je potrebné analyty previesť do neionizovanej formy.

V prvom experimente bola ako kyslá zložka elučného činidla testovaná kyselina mravčia. Využitie elučné činidlá obsahovali 0,5 – 10% kyseliny mravčej a 90% metanolu. Koncentrácia kyseliny mravčej mala vplyv na obidve skupiny analytov. So zvyšujúcou sa koncentráciou vzrástla výťažnosť menej polárnych analytov s vyššou molekulovou hmotnosťou, ale vzhľadom k tomu, že sa jednalo o zmes štandardov, bola táto výťažnosť nepostačujúca. Naopak polárnejšie analyty poskytovali najlepšiu výťažnosť s obsahom 0,5% kyseliny mravčej. Pri pohľade na výťažnosti všetkých analytov je evidentné, že kyselina mravčia ako kyslá zložka elučného činidla neposkytovala vhodnú výťažnosť pre všetky sledované látky (viď Graf 2). Hodnoty RSD sú zhrnuté (viď Tabuľka 14).

V ďalšom experimente bola ako kyslá zložka testovaná kyselina trifluóroctová v koncentrácii 0,1 – 1% v 90% metanole. Vplyv kyseliny trifluóroctovej bol lepší ako tomu bolo pri použití kyseliny mravčej. Pri použití 1% kyseliny trifluóroctovej v elučnom činidle došlo k poklesu výťažnosti u všetkých sledovaných látok bez ohľadu na ich fyzikálno-chemické vlastnosti. Ako najvhodnejšia koncentrácia bola preto zvolená 0,5% kyselina trifluóroctová, pri ktorej sa zvýšila výťažnosť analytu Q3GI až na 80%. Zároveň síce poklesla výťažnosť analytu PG, avšak ten je na rozdiel od Q3GI sekundárnym metabolitom kvercetinu. Výťažnosti pre všetky analyty sú zhrnuté viď Graf 3 a percentuálne hodnoty RSD zhrňa Tabuľka 14.

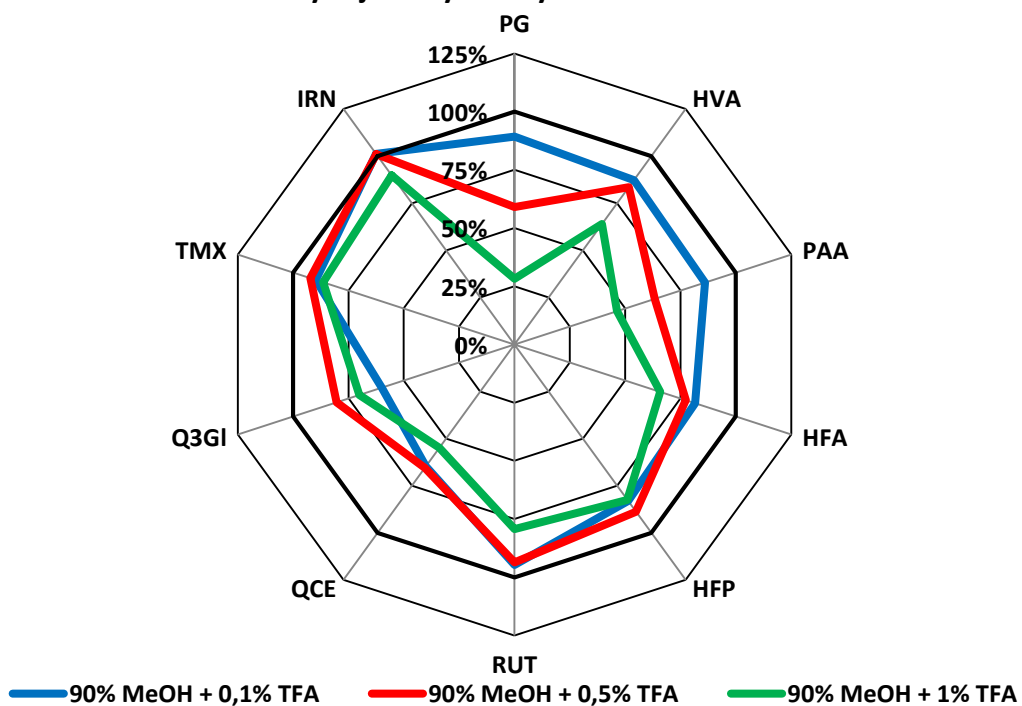
Pri porovnaní výťažností všetkých testovaných látok je badateľná vyššia výťažnosť za použitia kyseliny trifluóroctovej ako za použitia kyseliny mravčej. Avšak stále nie je výťažnosť optimálna, preto bolo pristúpené k detailnému overeniu vplyvu organickej zložky v elučnom činidle.

### Voľba kyslej zložky EČ - kyselina mravčia



Graf 2: Výťažnosť [%] analytov pri optimalizácii kyslej zložky - kyseliny mravčej v elučnom činidle.

### Voľba kyslej zložky EČ - kyselina trifluóroctová



Graf 3: Výťažnosť [%] analytov pri optimalizácii kyslej zložky – kyseliny trifluóroctovej v elučnom činidle. TFA – kyselina trifluóroctová.

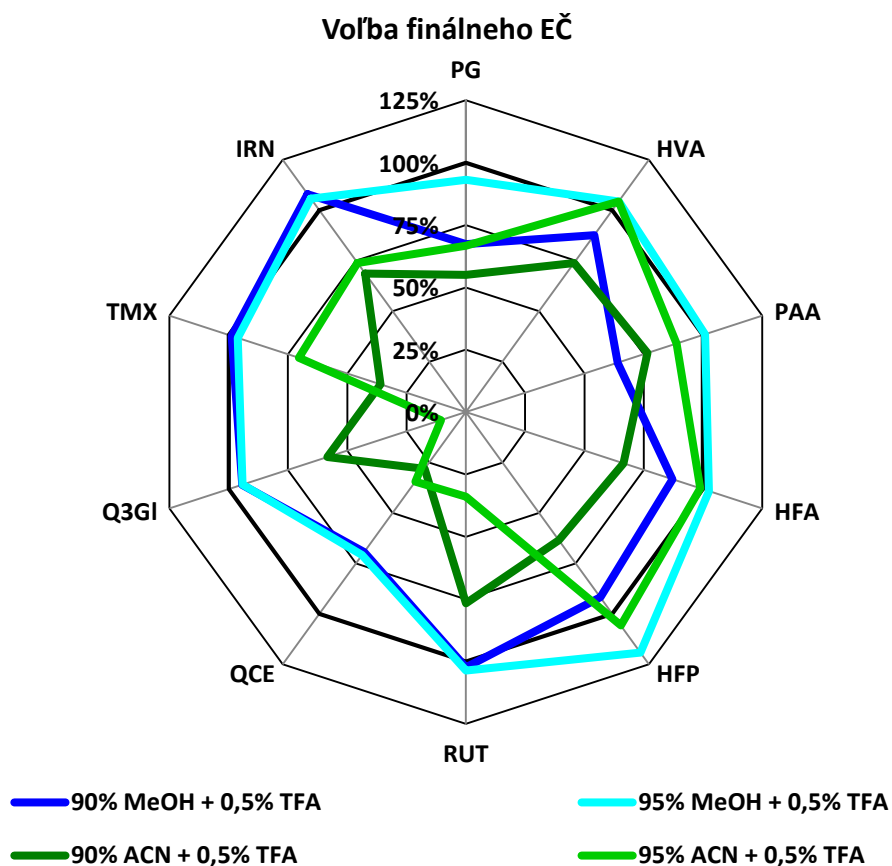
	PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
<b>0,5% HCOOH</b>	0,3	16,4	11,8	16,8	11,5	13,4	9,5	5,0	16,8	17,2
<b>1% HCOOH</b>	0,7	19,6	7,0	25,2	29,4	23,3	11,8	9,8	6,3	5,1
<b>2% HCOOH</b>	51,3	9,1	19,9	13,3	4,1	19,0	8,6	6,6	5,0	6,1
<b>5% HCOOH</b>	9,8	8,0	0,7	3,6	17,4	6,7	25,5	15,4	21,2	42,8
<b>10% HCOOH</b>	16,0	1,8	5,9	2,0	1,7	13,4	6,9	3,6	0,4	2,7
<b>0,1% TFA</b>	4,6	7,6	6,8	4,2	5,7	11,9	7,7	0,9	5,9	5,4
<b>0,5% TFA</b>	13,8	8,6	9,2	6,4	4,2	12,3	21,8	3,4	16,7	19,7
<b>1% TFA</b>	1,5	3,9	5,2	4,4	17,6	13,8	21,2	12,3	19,9	31,2

Tabuľka 14: Hodnoty RSD [%] pri optimalizácii množstva kyslej zložky v elučnom činidle. Ako organická zložka bol použitý 90% metanol. TFA - kyselina trifluóroctová.

### 3. Finálna optimalizácia elučného činidla.

Z predchádzajúcich experimentov vyplynulo, že ako vhodná kyslá zložka bola zvolená kyselina trifluóroctová o koncentrácii 0,5%. Avšak výťažnosť pre všetky testované analyty nebola vhodná. Preto bol uskutočnený experiment, kde bolo vyskúšaných niekoľko organických rozpúšťadiel a ich rozdielne koncentrácie. V experimente boli využité elučné činidlá, ktoré obsahovali acetonitril alebo metanol v koncentrácii 90% alebo 95% a vodný roztok 0,5% kyseliny trifluóroctovej.

Tento experiment slúžil na overenie vhodnosti organickej zložky, kde bol porovnaný vplyv organickej zložky – metanol a acetonitril. Acetonitril markantne znížil výťažnosť analytov, predovšetkým tých menej polárnych s log P nad 1,9 (QCE, Q3GI, TMX, IRN). Za optimálne elučné činidlo preto bola zvolená zmes 95% metanolu a vodného roztoku 0,5% kyseliny trifluóroctovej, kde je možno badať zvýšenie výťažnosti polárnych fenolických kyselín oproti roztoku s obsahom 90% metanolu. Zároveň sa neznížila výťažnosť ostatných analytov. Výťažnosti sú podrobne znázornené vid' Graf 4 a Tabuľka 15. Hodnoty RSD zhŕňa Tabuľka 16.



Graf 4: Výťažnosť [%] analytov pri finálnej optimalizácii zložiek elučného čidla.

	PG [%]	HVA [%]	PAA [%]	HFA [%]	HFP [%]	RUT [%]	QCE [%]	Q3GI [%]	TMX [%]	IRN [%]
<b>90% MeOH + 0,5% TFA</b>	67,7	87,6	64,0	87,1	91,7	102,4	69,4	94,2	98,5	108,0
<b>95% MeOH + 0,5% TFA</b>	93,1	104,4	100,9	102,5	119,2	103,6	70,8	94,1	96,2	105,7
<b>90% ACN + 0,5% TFA</b>	55,0	73,9	76,6	66,5	63,4	76,7	28,1	58,3	35,9	68,7
<b>90% ACN + 0,5% TFA</b>	66,7	104,3	88,9	98,9	105,8	33,9	34,4	10,5	70,3	73,9

Tabuľka 15: Výťažnosť [%] analytov pri finálnej optimalizácii zložiek elučného čidla.

	PG RSD [%]	HVA RSD [%]	PAA RSD [%]	HFA RSD [%]	HFP RSD [%]	RUT RSD [%]	QCE RSD [%]	Q3GI RSD [%]	TMX RSD [%]	IRN RSD [%]
<b>90% MeOH + 0,5% TFA</b>	13,7	4,1	4,6	18,5	16,6	11,0	8,6	10,6	12,1	10,2
<b>95% MeOH + 0,5% TFA</b>	2,4	2,4	2,4	3,9	12,4	0,1	4,4	3,6	10,2	12,3
<b>90% ACN + 0,5% TFA</b>	9,9	0,8	9,2	3,9	0,8	8,3	3,2	6,2	1,2	1,3
<b>90% ACN + 0,5% TFA</b>	12,1	1,4	6,2	1,8	2,3	1,4	1,6	0,1	4,7	4,9

Tabuľka 16: Hodnoty RSD [%] pri finálnej optimalizácii zložiek elučného čidla.

### 5.2.3. Optimalizácia premývacieho činidla

Po voľbe vhodného elučného činidla (roztok 95% metanolu a 0,5% kyseliny trifluóroctovej) nasledovala optimalizácia premývacieho činidla (PČ). Tento experiment vychádzal z doporučených postupov výrobcu, ktorý uvádza, že prvý premývacie krok by mal pozostávať z premytia stacionárnej fázy pomocou roztoku hydroxidu amónneho a druhý krok slabým roztokom organického rozpúšťadla [65].

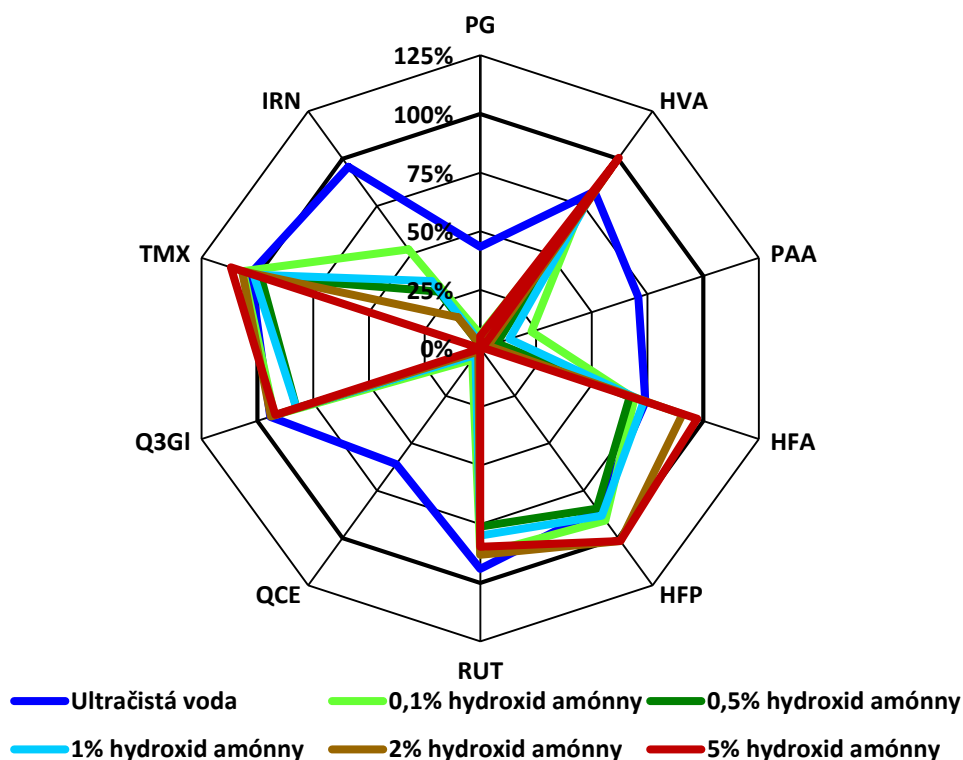
Ako vyplýva z doporučených postupov, v prvom experimente boli využité premývacie činidlá s rôznym obsahom hydroxidu amónneho (0,1 – 5%) alebo ultračistá voda.

Zo znázornenej výťažnosti po elučnom kroku (vid' Graf 5) je evidentné, že premývacie činidla s obsahom  $\text{NH}_4\text{OH}$  nie sú vhodné. Na základe analýzy frakcií pomocou UHPLC-MS/MS premývacieho kroku bolo zistené, že použitím týchto premývacích činidiel dochádzalo k vymývaniu analytov PG a PAA, čo sú najpolárnejšie analyty (na základe hodnôt log P) zo skupiny fenolických kyselín. V tejto analyzovanej frakcii premývacieho kroku nebola zistená prítomnosť QCE, ktorého výťažnosť taktiež poklesla. Mohlo teda dôjsť k nestabilite QCE vplyvom premývacieho činidla. Použitím roztokov  $\text{NH}_4\text{OH}$  bola dosiahnutá vhodná výťažnosť len pre analyty HFA, HFP, RUT, TMX a Q3GI. Avšak najmenej ovplyvňovala výťažnosť po elučnom kroku použitá ultračistá voda. Hodnoty RSD zhŕňa Tabuľka 17.

	PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
<b>Ultračistá H<sub>2</sub>O</b>	23,7	11,4	16,0	7,2	3,2	7,1	13,3	9,2	9,0	8,9
<b>0,1% NH<sub>4</sub>OH</b>	4,7	9,4	14,8	6,0	9,8	11,6	2,0	9,9	10,0	9,1
<b>0,5% NH<sub>4</sub>OH</b>	0,7	6,3	4,5	6,3	5,1	6,4	0,3	6,1	4,8	3,7
<b>1% NH<sub>4</sub>OH</b>	1,0	11,4	8,7	8,9	11,6	15,3	0,9	8,6	9,6	11,7
<b>2% NH<sub>4</sub>OH</b>	0,6	26,0	2,5	24,6	26,8	21,6	1,2	24,3	14,1	16,1
<b>5% NH<sub>4</sub>OH</b>	5,4	14,9	0,2	13,5	12,3	19,5	0,0	10,5	7,8	10,8

Tabuľka 17: Hodnoty RSD [%] pri optimalizácii premývacieho činidla s obsahom rôznych koncentrácií  $\text{NH}_4\text{OH}$  a ultračistej  $\text{H}_2\text{O}$ .

### Optimalizácia PČ - roztok hydroxidu amónneho



Graf 5: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii premývacieho činidla s obsahom rôznych koncentrácií  $\text{NH}_4\text{OH}$  a ultračistenej  $\text{H}_2\text{O}$ .

Následovalo overenie vplyvu na výťažnosť použitím premývacích činidiel s obsahom organickej zložky v rôznych koncentráciách 1 – 10% metanolu. Taktiež bola overená výťažnosť použitím pufru – 0,01M mravenčanu amónneho o pH 5,0.

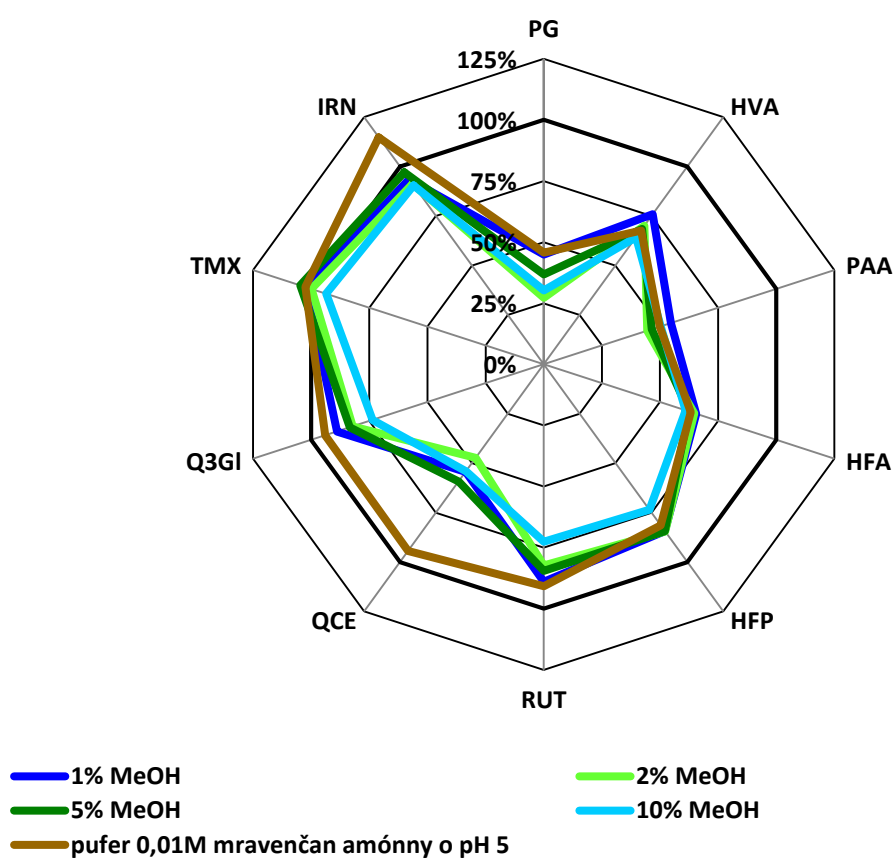
Na základe analýzy frakcií premývacieho kroku pomocou UHPLC-MS/MS bolo zistené, že použitie vodného roztoku metanolu vo všetkých skúšaných koncentráciách ako premývacieho činidla nebolo vhodné, keďže dochádzalo ku sníženiu výťažnosti v porovnaní s výťažnosťou bez premývacieho kroku. So stúpajúcou koncentráciou metanolu dochádza k vymývaniu analytov PG, HVA a PAA, a tým k poklesu ich výťažnosti po elučnom kroku. Zvýšenie podielu organického rozpúšťadla v premývacom činidle nemalo tak silný vplyv na výťažnosť ostatných analytov. Naopak použitie pufru - 0,01M mravenčanu amónneho o pH 5,0 ako premývacieho činidla, malo pozitívny vplyv na následnú výťažnosť po elučnom kroku, pretože u všetkých analytov flavonoidnej štruktúry došlo k zvýšeniu výťažnosti (viď Graf 6). Hodnoty RSD zhŕňa Tabuľka 18.



	PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
1% MeOH	8,4	0,9	6,9	2,4	6,4	1,0	19,2	0,6	3,0	15,4
2% MeOH	10,6	8,4	4,9	5,0	9,3	13,4	12,3	5,6	5,8	8,2
5% MeOH	19,3	9,8	6,0	7,9	14,9	13,9	9,5	11,1	7,9	8,4
10% MeOH	0,3	3,2	3,9	1,5	2,1	5,3	13,1	1,9	3,8	4,1
pufer 0,01M AmF o pH 5	11,8	10,6	12,5	10,3	11,4	16,7	3,8	13,1	10,0	9,7

Tabuľka 18: Hodnoty RSD [%] pri optimalizácii premývacieho činidla s obsahom rôznych koncentrácií MeOH a pufru 0,01M mravenčan amónný (AmF) o pH 5.

### Optimalizácia PČ - metanol a AmF pufer



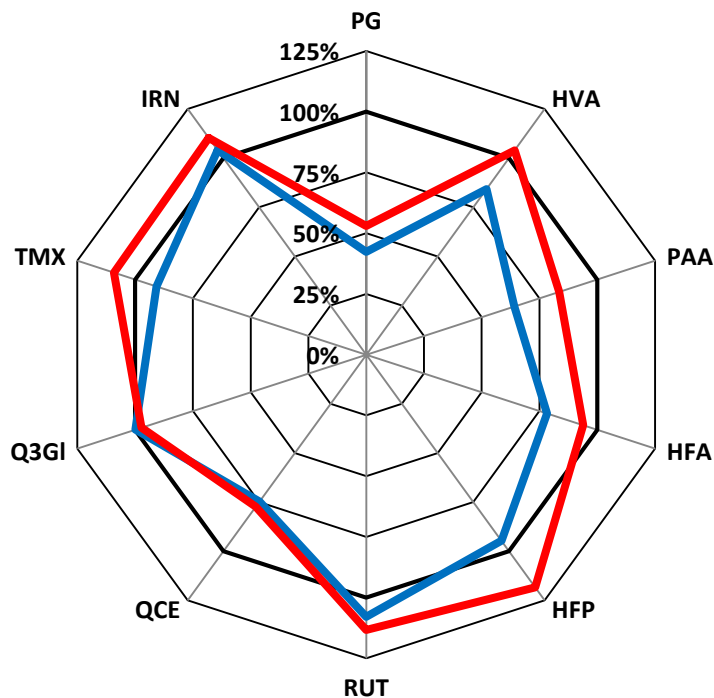
Graf 6: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii premývacieho činidla s obsahom rôznych koncentrácií MeOH a pufru 0,01M mravenčan amónný o pH 5.

Overenie predchádzajúcich výsledkov prebehlo v ďalšom experimente, kde boli skombinované 2 premývacie kroky, a to premytie v prvom kroku pufrom – 0,01M mravenčanom amónnym o pH 5,0 a v druhom kroku roztokom 1% metanolu vo vode alebo riedeným do mravenčanového pufru o pH 5,0.

Pri analýze frakcií premývacieho činidla oboch krokov dochádzalo k vymývaniu analytov PG, HVA a PAA. Avšak najviac to bolo evidentné u analytu PG. Ako je

evidentné zo zobrazených výsledkov výťažností po elučnom kroku (viď Graf 7), najmenej ovplyvňovala výťažnosť analytov kombinácia premytia v prvom kroku pufrum – 0,01M mravenčanom amónnym o pH 5,0 a v druhom kroku roztokom 1% metanolom riedeným do mravenčanového pufru. Hodnoty RSD zhŕňa Tabuľka 19.

### Voľba finálnej kombinácie premývacích činidiel



— 1. krok -pufer 0,01M mravenčan amónny o pH 5,0; 2.krok - 1% MeOH vo vode

— 1. krok - pufer 0,01M mravenčan amónny o pH 5,0; 2.krok - 1% MeOH riedený do mravenčanového pufru o pH 5,0

Graf 7: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri finálnej optimalizácii premývacieho činidla.

	PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
<b>1. krok: pufer AmF</b>										
<b>2. krok: 1%MeOH</b>	1,3	21,7	4,7	19,3	34,9	26	45,5	38,4	31,4	40,1
<b>1. krok: pufer AmF;</b>										
<b>2. krok: 1% MeOH</b>	5,6	9,0	9,0	6,8	8,1	6,3	20,5	0,5	5,5	8,4
<b>v AmF puFRE</b>										

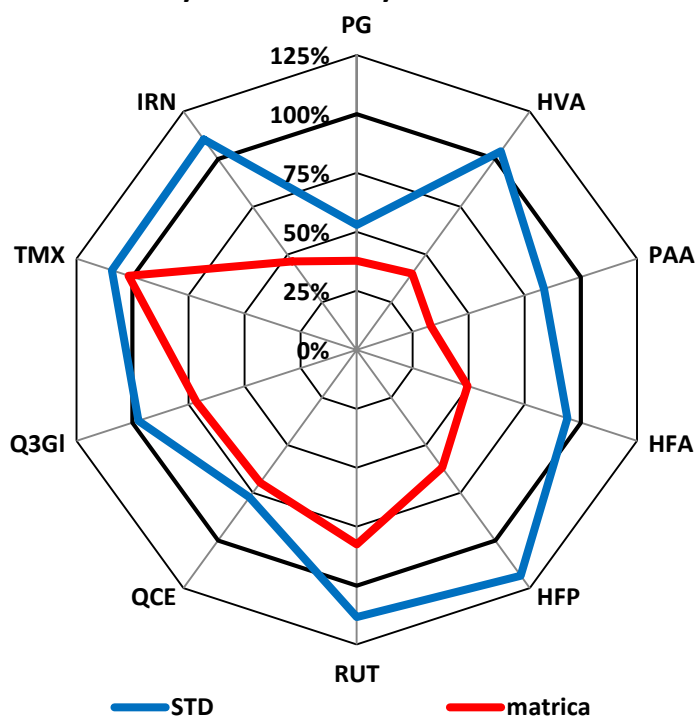
Tabuľka 19: Hodnoty RSD [%] pri finálnej optimalizácii premývacieho činidla. Pufer – 0,01M mravenčan amónny o pH 5,0. AmF – mravenčan amónny.

#### 5.2.4. Aplikácia na vzorky séra

Zoptimalizovaná SPE metóda bola aplikovaná na vzorky séra. Vzorky na tento experiment boli pripravené obohatením pripraveného séra o potrebnú koncentráciu analytov a následne po pridaní pufru o pH 5,0 bola táto vzorka podrobená procesom extrakčnej metódy. Podrobný popis priebehu extrakčnej metódy vid' Tabuľka 12.

Nízka výťažnosť skoro pre všetky analyty (vid' Graf 8 a Tabuľka 20) bola podnecujúca k ďalšiemu experimentu, ktorý bol zameraný na vplyv matricových efektov a následne odstránenie bielkovín obsiahnutých v sére. Výťažnosť výrazne poklesla (až o polovicu vid' napr. IRN, HFP) u všetkých analytov okrem QCE a TMX. Hodnoty RSD sa pohybovali v rozmedzí 2,9 – 11,5 %.

Porovnanie výťažností vzorky matrice a štandardov



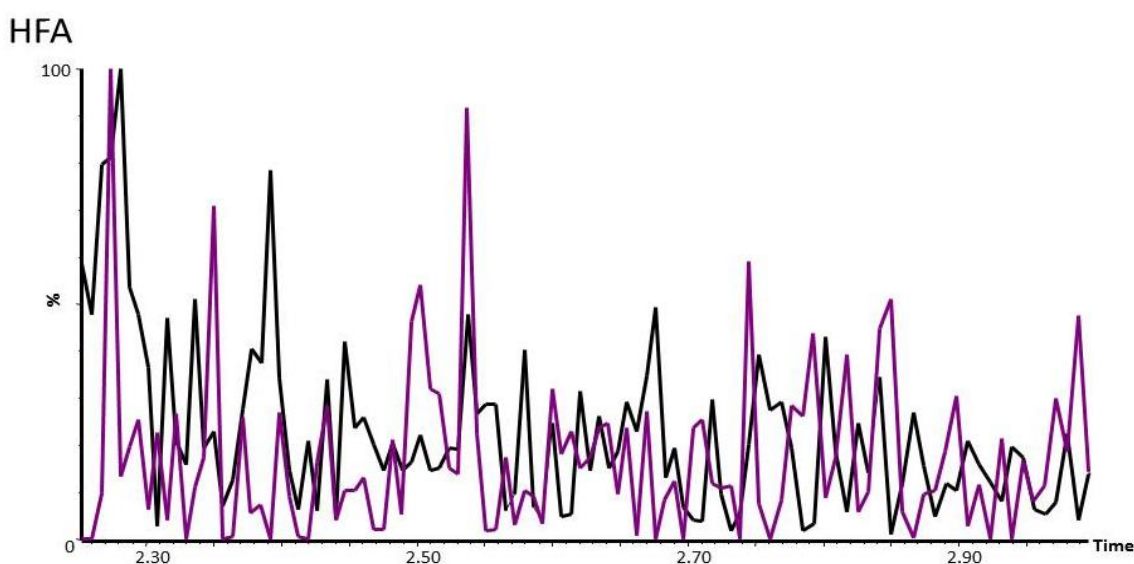
Graf 8: Porovnanie výťažností [%] analytov vo vzorkách štandardov a matrice.

	PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
matrica	37,7	40,0	33,1	49,4	61,8	82,5	69,6	71,5	101,7	46,4
štandard	53,0	104	83,6	94	118,4	113,4	77,4	97,3	109,2	110,3

Tabuľka 20: Výťažnosť [%] analytov vo vzorke biologického materiálu a STD po elučnom kroku.

### 5.2.5. Overenie matricových efektov

Overenie matricových efektov prebehlo za využitia postkolonového prídavku analytov. Na toto overenie boli použité 2 typy vzoriek - elučné činidlo a blankové sérum. Keďže matricové efekty môžu byť koncentračne závislé, bolo ich meranie uskutočnené na rovnakej koncentračnej hladine ako pri optimalizácií. Keďže dochádza k prekrytiu oboch záznamov bez vzniku pozitívneho alebo negatívneho píku v retenčnom čase analytu, je evidentné, že matricové efekty nie sú prítomné. Na základe týchto meraní bolo evidentné, že matricové efekty neovplyvňujú výťažnosť analytov. Pre príklad uvádzam záznam pre analyt HFA (viď Obrázok 7).



Obrázok 7: Overenie matricových efektov pre analyt HFA pri koncentrácii 0,75 µg/ml. Fialová – znázorňuje záznam prázdneho séra. Čierna – znázorňuje elučné činidlo, oboje s postkolónovým prídavkom analytov.

### 5.2.6. Optimalizácia precipitačného činidla

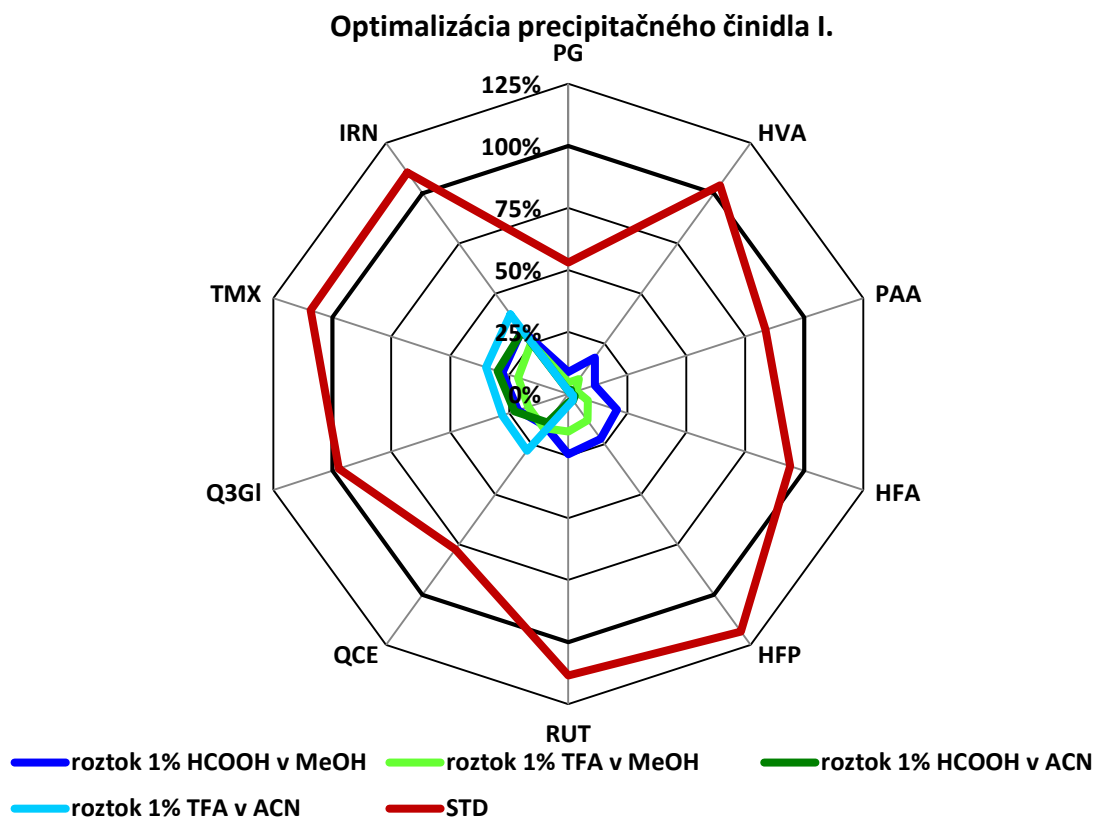
Výťažnosť sledovaných látok nebola ovplyvnená matricovými efektmi, preto sa predpokladalo, že pred samotnou extrakčnou metódou je potreba precipitácie, keďže pravdepodobne dochádza k interakcií analytov s bielkovinami nachádzajúcimi sa v sére.

Prvým prístupom bola precipitácia, pri ktorej vzorky boli pripravované následným postupom. Do ependorfky bola vpravená vzorka biologického materiálu a precipitačné činidlo v pomere 1:1. Takto vzniknutá vzorka bola inkubovaná v laboratóriu pri teplote 20 °C počas 10 minút a potom vložená do centrifúgy, kde bol obsah odstreďovaný

počas 10 minút pri 12 000 otáčkach za minútu. Po centrifugácii bol odobratý supernatant, ku ktorému bol následne pridaný pufer - 0,01M mravenčan amónny o pH 5 vždy v pomere 1:1. Takto pripravená vzorka bola podrobená procesom SPE metódy a následne prefiltrovaná za využitia PTFE membránového filtra 0,22 µm.

Ako je evidentné (vid' Graf 9) výťažnosť sledovaných látok bola markantne nižšia (< 40 %) ako bez použitia precipitačných činidiel. Použité boli precipitačné činidlá obsahujúce roztok 1% kyseliny mravečej alebo kyseliny trifluóroctovej v metanole alebo acetonitrile. U všetkých použitých činidlách vznikol precipitát.

Bolo možné pozorovať pokles výťažnosti fenolických kyselín a polárneho rutinu, kedy tento pokles bol zvýraznený pri použití kyseliny trifluóroctovej oproti použitiu kyseliny mravečej v acetonitrile a v metanole. U flavonoidných metabolitov bol tento trend opačný. S použitím acetonitrilu výťažnosť vzrástla. Pri použití kyseliny trifluóroctovej bol odlišný vplyv organickej zložky precipitačného činidla. S obsahom metanolu sa výťažnosť znižovala, naopak s použitím acetonitrilu sa zvyšovala.



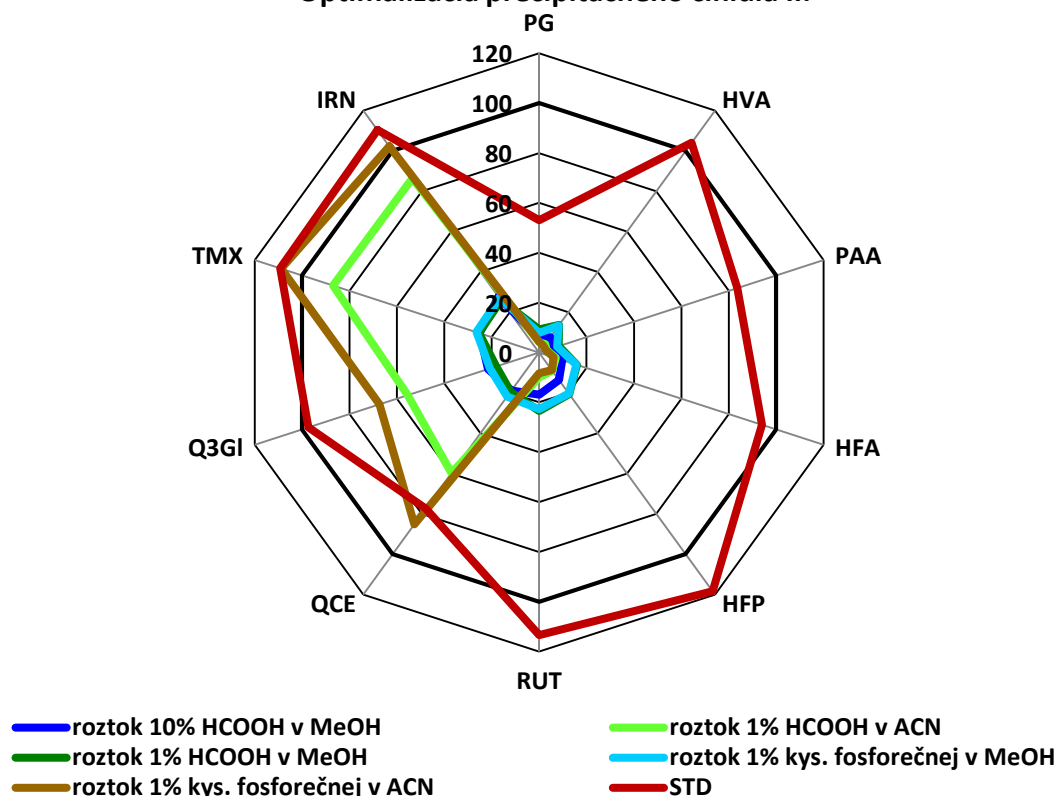
Graf 9: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii precipitačného činidla za použitia roztokov s obsahom 1% HCOOH alebo TFA v ACN alebo MeOH. STD – znázorňuje výťažnosť roztoku štandardov.

Na základe vyššie zobrazených výsledkov bolo pristúpené kinému typu precipitácie. Vzorky na tento proces boli pripravované tak, že do ependorfky bola vpravená vzorka biologického materiálu, ku ktorej bolo pridané precipitačné činidlo v pomere 1:1. Pri tomto experimente boli použité precipitačné činidlá: 10% HCOOH v metanole, 1% HCOOH v acetonitrile, 1% HCOOH v metanole, 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v metanole a 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v acetonitrile. Vzorka bola následne uložená do mrazničky s teplotou -15 °C. Po 20 minútach bola vytiahnutá a následne vložená do centrifúgy, kde bol obsah odstreďovaný počas 10 minút pri 12 000 otáčkach za minútu. Po centrifugácii so všetkými činidlami vznikol precipitát a supernatant, ktorý bol odobratý. K nemu bolo následne pridané dané množstvo pufru 0,01M mravenčanu amónneho o pH 5,0 tak, aby bol dodržaný pomer 1:1. Takto pripravená vzorka bola podrobená extrakcii na tuhú fázu a následne prefiltrovaná za využitia PTFE membránového filtra 0,22 μm.

Na základe výsledkov tohto experimentu bolo jednoznačné, že precipitačné činidlá s obsahom organickej zložky (metanol alebo acetonitril) sú nevhodné, pretože negatívne ovplyvňovali výťažnosť sledovaných látok. Keďže sa jednalo o precipitačné činidlá s rôznym obsahom a typom organických kyselín musela znížená výťažnosť tkvieť práve v tom, že precipitačné činidlá obsahovali organickú zložku. Podrobný prehľad výťažností vid' Graf 10.

Bolo možné pozorovať opačné trendy v správaní skupín analytov. Výťažnosť fenolických kyselín a rutinu bola vyššia za použitia precipitačných činidiel obsahujúce: 10% HCOOH v metanole, 1% HCOOH v metanole a 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v metanole. Výťažnosť sa však pohybovala okolo 10-20%. Pre flavonoidné metabolity sa ako vhodnejšie javilo naopak použitie precipitačných činidiel obsahujúce: 1% HCOOH v acetonitrile a 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v acetonitrile.

## Optimalizácia precipitačného činidla II.



Graf 10: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii precipitačného činidla za použitia roztokov s obsahom 1 a 10% HCOOH v MeOH, 1% HCOOH v ACN a 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v ACN alebo MeOH. STD – znázorňuje výťažnosť roztoku štandardov.

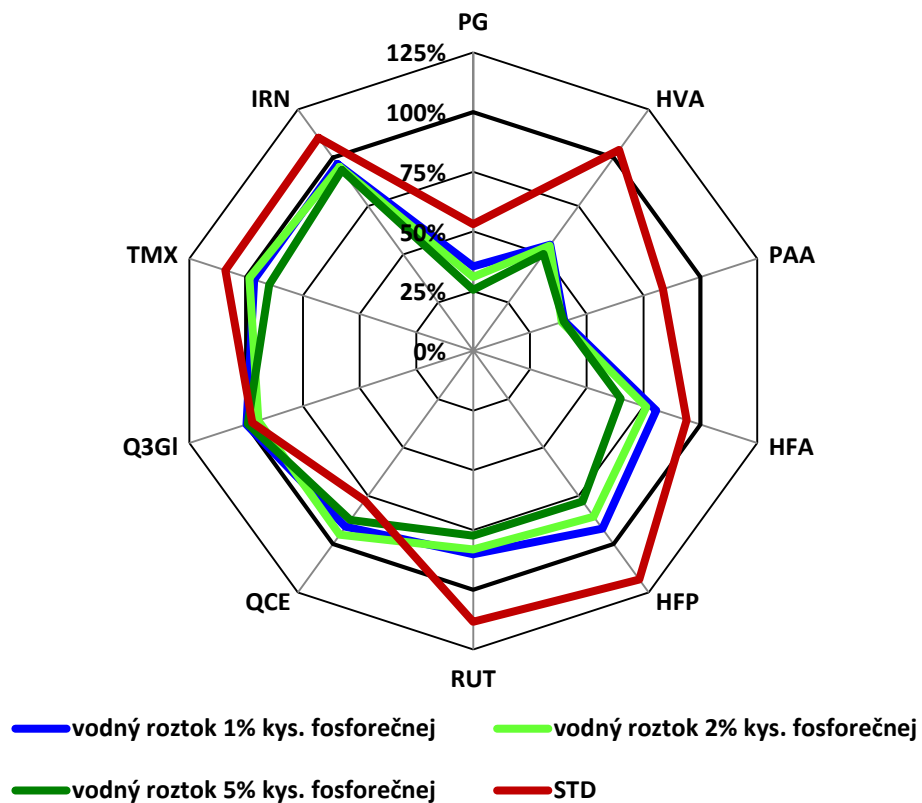
Následný experiment bol taktiež uskutočnený za vymrzenia vzorky s tým rozdielom, že ako precipitačné činidla boli využité vodné roztoky kyselín (trifluoroctová, octová, trihydrogénfosforečná, mravčia) o rôznych koncentráciách. Výber práve týchto kyselín súvisel s ich hodnotami pKa.

Ako je evidentné z výsledkov zobrazených vid' Graf 11 - Graf 14, výťažnosť látok bola vyššia pomocou činidiel upravujúcich vzorku, ktoré obsahovali vodný roztok kyselín. Avšak tieto činidlá upravujúce vzorku nevykazovali precipitačný účinok, keďže nevznikal sediment. Týmto experimentom bolo vyvrátená hypotéza, že dochádza k naviazaniu analytov na bielkoviny.

U kyseliny trifluóroctovej a octovej bolo možno pozorovať podobný trend. Fenolové kyseliny a rutin, polárnejšie analyty, poskytovali vyššiu výťažnosť pri úprave vzorky pomocou roztoku s nižšou koncentráciou kyseliny. Naopak flavonoidné metabolity vykazovali lepšiu výťažnosť s vyššou koncentráciou danej kyseliny.

Tento trend bol v menšej miere rozoznaný za použitia kyseliny mravčej a úplne vymizol pri úprave vzorky za použitia kyseliny trihydrogénfosforečnej. Najlepšia výťažnosť bola zaznamenaná za použitia činidla na úpravu vzorky obsahujúceho vodný roztok 1% kyseliny trihydrogénfosforečnej, a to z dôvodu ovplyvnenia pH vzorky, vďaka čomu dochádzalo k zvýšeniu stability analytov. S prihliadnutím na výťažnosť kvercetinu a jeho primárnych metabolitov v ľudskom tele bola táto metóda podrobená validácii i na základe nižšej výťažnosti látok zo skupiny sekundárnych metabolitov PG, HVA, PAA.

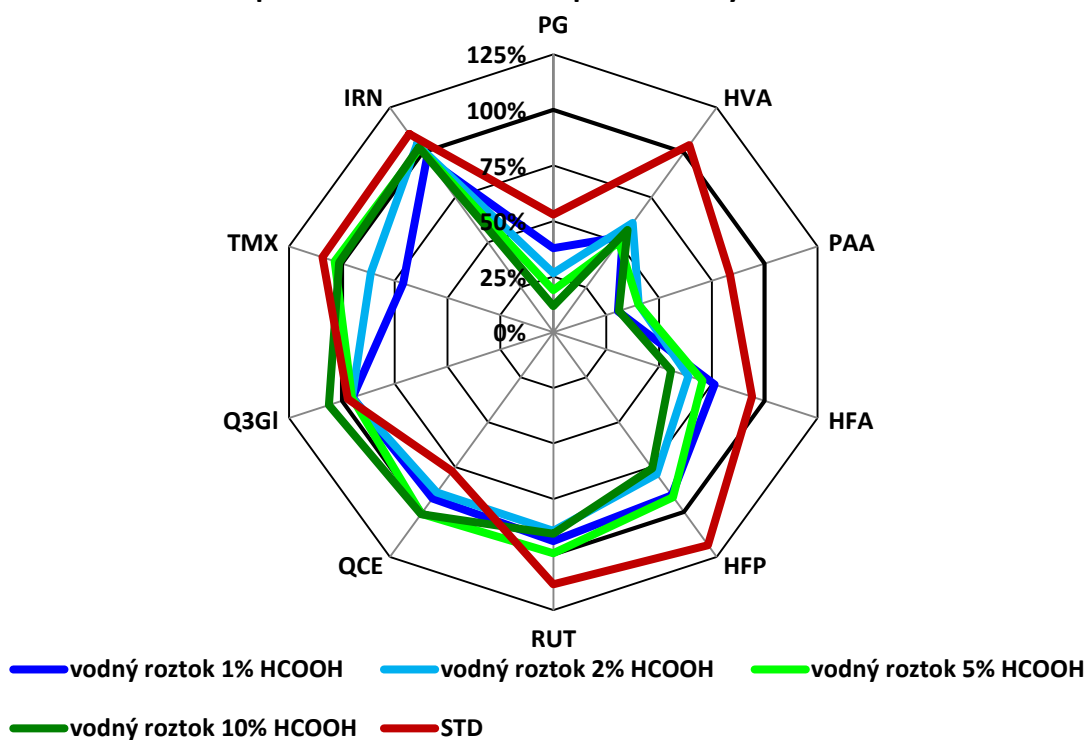
### Optimalizácia činidla na úpravu vzorky - $H_3PO_4$



Graf 11: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii činidla na úpravu vzorky -  $H_3PO_4$ . STD – znázorňuje výťažnosť roztoku štandardov.

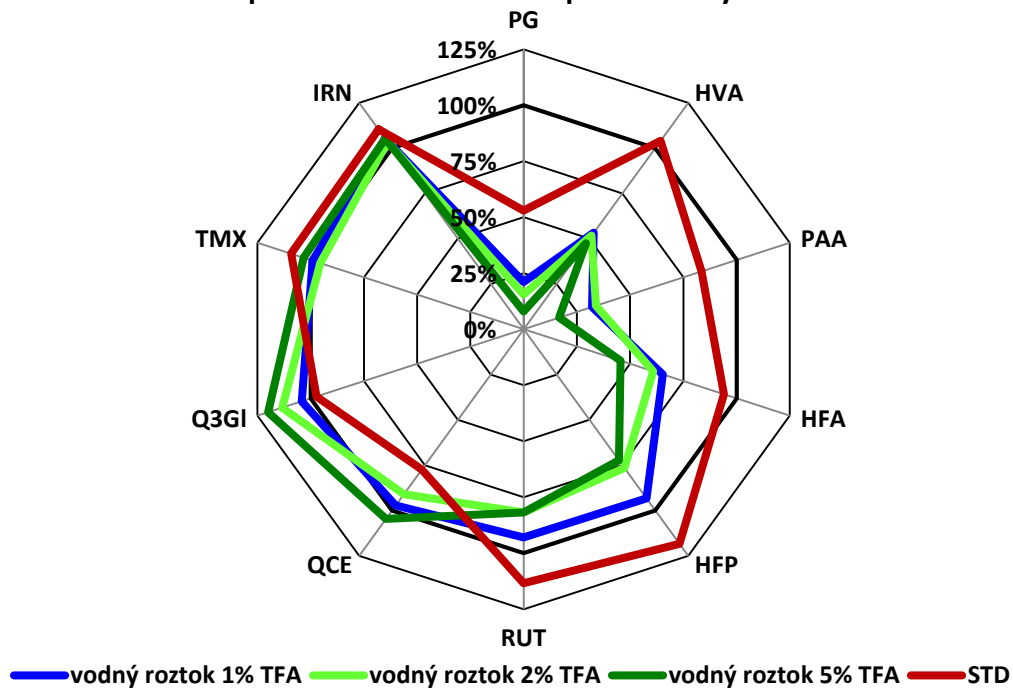


### Optimalizácia činidla na úpravu vzorky - HCOOH



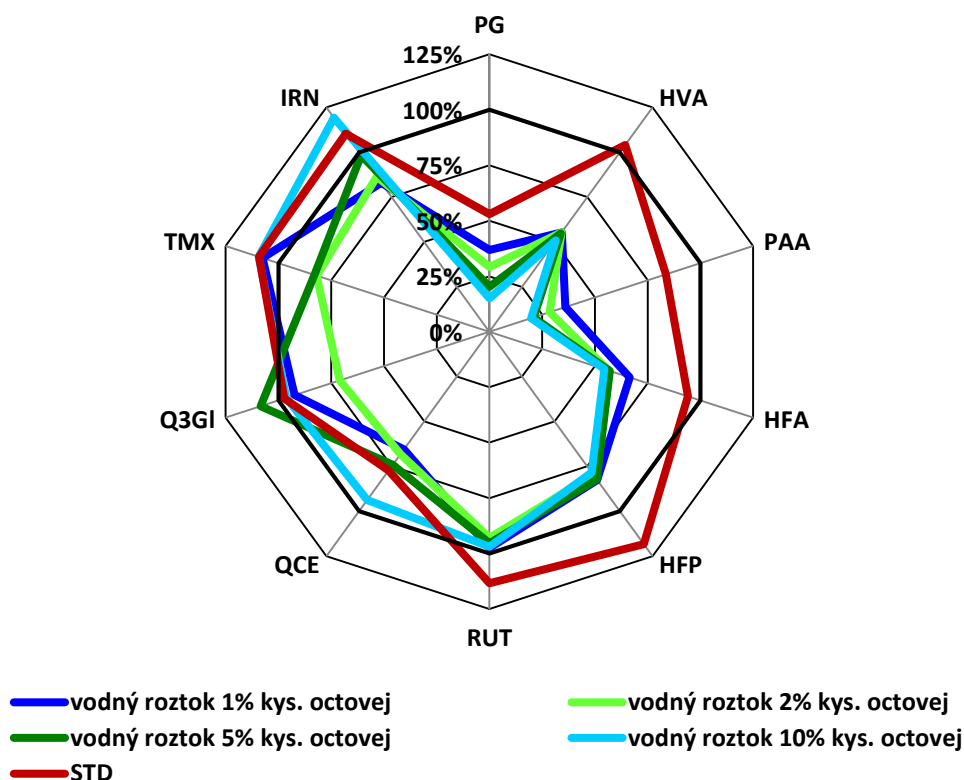
Graf 12: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii činidla na úpravu vzorky – HCOOH. STD – znázorňuje výťažnosť roztoku štandardov.

### Optimalizácia činidla na úpravu vzorky - TFA



Graf 13: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii činidla na úpravu vzorky – TFA. STD – znázorňuje výťažnosť roztoku štandardov.

## Optimalizácia činidla na úpravu vzorky - kyselina octová



Graf 14: Výťažnosť [%] analytov po elučnom kroku pri optimalizácii činidla na úpravu vzorky – kyselina octová.

### 5.3. Validácia metódy

#### 5.3.1. Test spôsobilosti systému

Po optimalizácii metódy nasledovalo overenie vhodnosti zvolených podmienok. To prebiehalo na základe desiatich po sebe idúcich meraniach za rovnakých podmienok. Predmetom overenia bola plocha píku a retenčný čas všetkých separovaných látok, a to na štyroch koncentračných hladinách, ktoré záviseli od LOQ každého z analytov. Podrobný prehľad vid' Tabuľka 21.

Opakovateľnosť retenčného času je popísaná ako % RSD retenčného času, ktorého hodnoty boli pre všetky analyty menšie ako 1% a RSD pre opakovateľnosť plochy píku bola menšia ako 5%. Výsledky sú znázornené vid' Tabuľka 21.

konc.	PG [µg/ml]	HVA [µg/ml]	PAA [µg/ml]	HFA [µg/ml]	HFP [µg/ml]	RUT [µg/ml]	QCE [µg/ml]	Q3GI [µg/ml]	TMX [µg/ml]	IRN [µg/ml]
L1	0,25	0,25	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
L2	0,50	0,50	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
L3	0,75	0,75	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
L4	1,00	1,00	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
[%] RSD t <sub>r</sub>	PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
L1	0,37	0,13	0,16	0,19	0,31	0,17	0,09	0,12	0,11	0,09
L2	0,30	0,38	0,21	0,12	0,21	0,09	0,11	0,13	0,07	0,11
L3	0,23	0,38	0,31	0,25	0,31	0,17	0,11	0,13	0,20	0,06
L4	0,46	0,12	0,16	0,17	0,16	0,12	0,16	0,18	0,21	0,11
[%] RSD plocha píku	PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
L1	3,35	4,13	1,76	3,14	3,38	1,67	1,39	1,52	3,51	1,97
L2	2,33	3,18	1,46	1,15	1,21	3,79	1,24	2,36	3,01	3,81
L3	1,23	3,35	1,22	2,29	1,33	1,87	2,74	1,31	3,90	2,09
L4	3,46	4,72	0,96	1,17	1,77	1,62	2,37	3,81	3,10	1,61

Tabuľka 21: RSD [%] retenčného času a plôch pík pri SST (Test spôsobilosti systému). t<sub>r</sub> – retenčný čas.

### 5.3.2. Validácia metódy

Optimalizovaná SPE UHPLC-MS/MS metóda bola následne validovaná. Hodnotené boli parametre: linearita, limit detekcie a kvantifikácie, správnosť, presnosť a matricové efekty.

#### Linearita

Linearita metódy bola overená pomocou dvoch kalibračných kriviek. Prvá bola zostrojená na overenie kalibračnej závislosti pre štandardy v rozmedzí 7,5 ng/ml – 1 µg/ml pre všetky sledované analyty. Následne bola linearita overená pre matricovú kalibračnú závislosť v rovnakom rozsahu koncentrácií. Matricu predstavovalo sérum. Podrobný popis prípravy vzoriek vid' stať 4.6.1.

Metóda bola vyhodnotená pomocou koeficientu determinácie ( $R^2$ ), ktorý dosahoval pri oboch kalibračných závislostiach vyššie hodnoty ako 0,990 (vid' Tabuľka 22). Rovnice priamok oboch kalibračných kriviek sú zobrazené vid' Tabuľka 22.

	štandardná kalibračná krivka		matricová kalibračná krivka	
	R <sup>2</sup>	rovnice priamok	R <sup>2</sup>	rovnice priamok
PG	0,994	y = 0,861x - 79,68	0,995	y = 0,204x + 17,20
HVA	0,992	y = 0,814x - 97,70	0,996	y = 0,524x - 11,28
PAA	0,992	y = 3,106x - 57,54	0,997	y = 1,612x - 5,253
HFA	0,994	y = 2,09x - 45,12	0,998	y = 1,480x - 4,432
HFP	0,996	y = 2,347x - 131,10	0,993	y = 2,048x - 5,230
RUT	0,994	y = 10,03x - 205,30	0,994	y = 8,616x + 62,40
QCE	0,990	y = 1,715x - 75,89	0,996	y = 1,798x + 26,44
Q3GI	0,991	y = 7,235x - 128,60	0,990	y = 8,889x + 117,1
TMX	0,997	y = 4,487x - 29,91	0,990	y = 6,235x + 87,08
IRN	0,997	y = 6,081x - 75,36	0,996	y = 7,802x + 31,58

Tabuľka 22: Hodnoty determinačného koeficientu a rovníc priamok v kalibračnej závislosti pre všetky analyty.

### Limit detekcie a kvantifikácie

Z lineárnej závislosti boli taktiež určené limity detekcie (LOD) a kvantifikácie (LOQ). Hodnota LOQ bola určená ako najnižšia koncentrácia lineárneho rozmedzia, ktorá splňovala podmienky presnosti a správnosti, a u ktorej bol pomer signálu k šumu väčší ako 10. Hodnota LOD bola určená ako koncentrácia, u ktorej pomer signálu k šumu bol väčší než 3. Presné hodnoty vid' Tabuľka 23.

U niektorých testovaných látok (TMX, IRN, Q3GI, RUT) boli hodnoty LOQ stanovené dostatočne nízko, aby metódu bolo možné použiť pre analýzu biologického materiálu. Vysoká hodnota LOQ u analytov PG a HVA bola daná ich nízkou výťažnosťou (30 % resp. 48 %), a to môže byť problematické pri aplikácii tejto extrakčnej metódy na biologické vzorky. Hodnoty LOQ pre ostatné testované látky (PAA, HFA, HFP, QCE) by taktiež neboli dostatočné pri aplikácii tejto metódy na vzorku biologického materiálu. Tieto hodnoty by bolo možné zvýšiť použitím citlivejšieho hmotnostného detektoru alebo zakoncentrovaním pri SPE extrakcii.

	STD		Matrica	
	LOQ [ng/ml]	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	LOD [ng/ml]
PG	250	75,8	250	75,6
HVA	250	75,8	250	75,6
PAA	50	15,2	75	22,7
HFA	50	15,2	75	22,7
HFP	75	22,7	75	22,7
RUT	25	7,6	25	7,5
QCE	75	22,7	75	22,7
Q3GI	25	7,6	25	7,5
TMX	10	3,0	10	3,0
IRN	10	3,0	10	3,0

Tabuľka 23: Hodnoty LOQ a LOD pre všetky sledované látky.

### Presnosť a správnosť

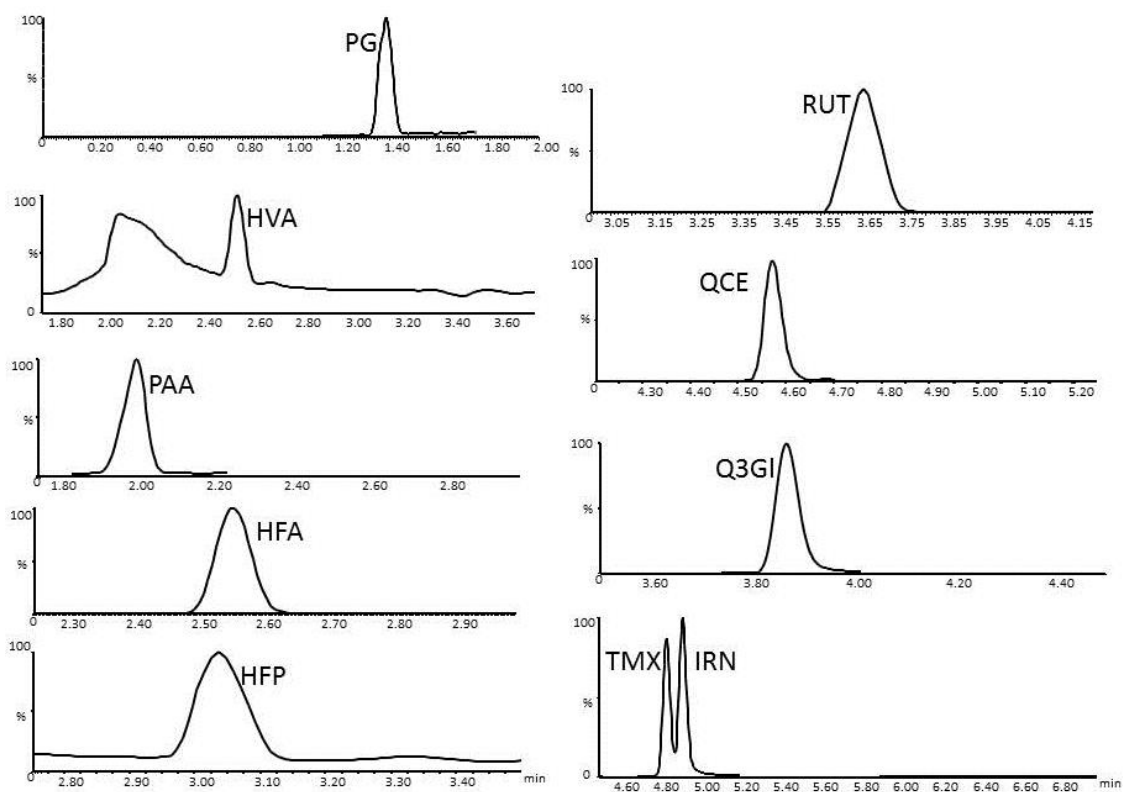
Správnosť a presnosť metódy boli overené na 4 koncentračných hladinách (viď Tabuľka 24). Parameter presnosť splnili všetky testované látky, pretože RSD sa pohybovalo pod 20 %. Správnosť bola určená ako výťažnosť jednotlivých látok. Tento parameter splnili látky (HFA, HFP, RUT, QCE, Q3GI, TMX a IRN), u ktorých bola výťažnosť vyššia ako 79,6 %. Látky zo skupiny fenolických kyselín (PG, HVA, PAA) poskytovali výťažnosť nižšiu, čo bolo spôsobené stratami pri premývacom kroku, ktorý bol pre tieto analyty kritický. S prihliadnutím k výťažnosti kvercetínu a jeho primárnych metabolitov v ľudskom tele bola táto metóda zvalidovaná i na základe nižšej výťažnosti látok zo skupiny sekundárnych metabolitov PG, HVA, PAA. Hodnoty koncentrácií pre všetky testované látky využité pri tomto overení sú zobrazené viď Tabuľka 9.

konc. hladina		PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
LLOQ	[%]	34,1	48,2	38,9	84,0	106,2	89,1	101,5	113,0	111,2	90,9
	RSD	8,0	10,9	10,5	19,5	5,4	10,2	15,2	3,4	6,2	13,7
LQC	[%]	34,3	50,1	34,7	82,1	108,9	85,8	108,5	107,3	97,9	96,7
	RSD	13,9	13,7	11,4	12,9	12,4	12,0	11,0	17,7	10,7	11,0
MQC	[%]	31,1	55,2	41,8	82,3	103,7	86,1	106,7	113,2	95,3	99,9
	RSD	2,2	9,3	19,7	7,5	15,7	12,8	20,0	12,4	14,8	15,5
HQC	[%]	35,6	61,4	44,1	79,6	109,9	102,2	116,6	94,9	116,4	113,5
	RSD	15,9	1,4	9,8	13,1	18,8	13,4	16,5	11,8	12,1	14,2

Tabuľka 24: Presnosť a správnosť pre všetky analyty. LLOQ – Dolný limit kvantifikácie, LQC – Dolná hladina kontroly kvality, MQC – Stredná hladina kontroly kvality, HQC – Horná hladina kontroly kvality.

### Selektivita

Selektivita bola potvrdená na základe analýzy čistej matrice a neboli zistené žiadne interferencie v retenčných časoch testovaných analytov. Selektivita je podľa doporučených postupov EMA (European medicines agency) charakterizovaná tak, že analytická metóda by mala byť schopná odlíšiť stanovované metabolity od endogénnej matrice. Na základe zobrazených chromatogramov (viď Obrázok 8) je evidentné, že nedochádzalo k elúcii interferujúcich látok v retenčných časoch sledovaných analytov, a teda nedochádzalo k ovplyvneniu ich signálu stanovovaných látok.

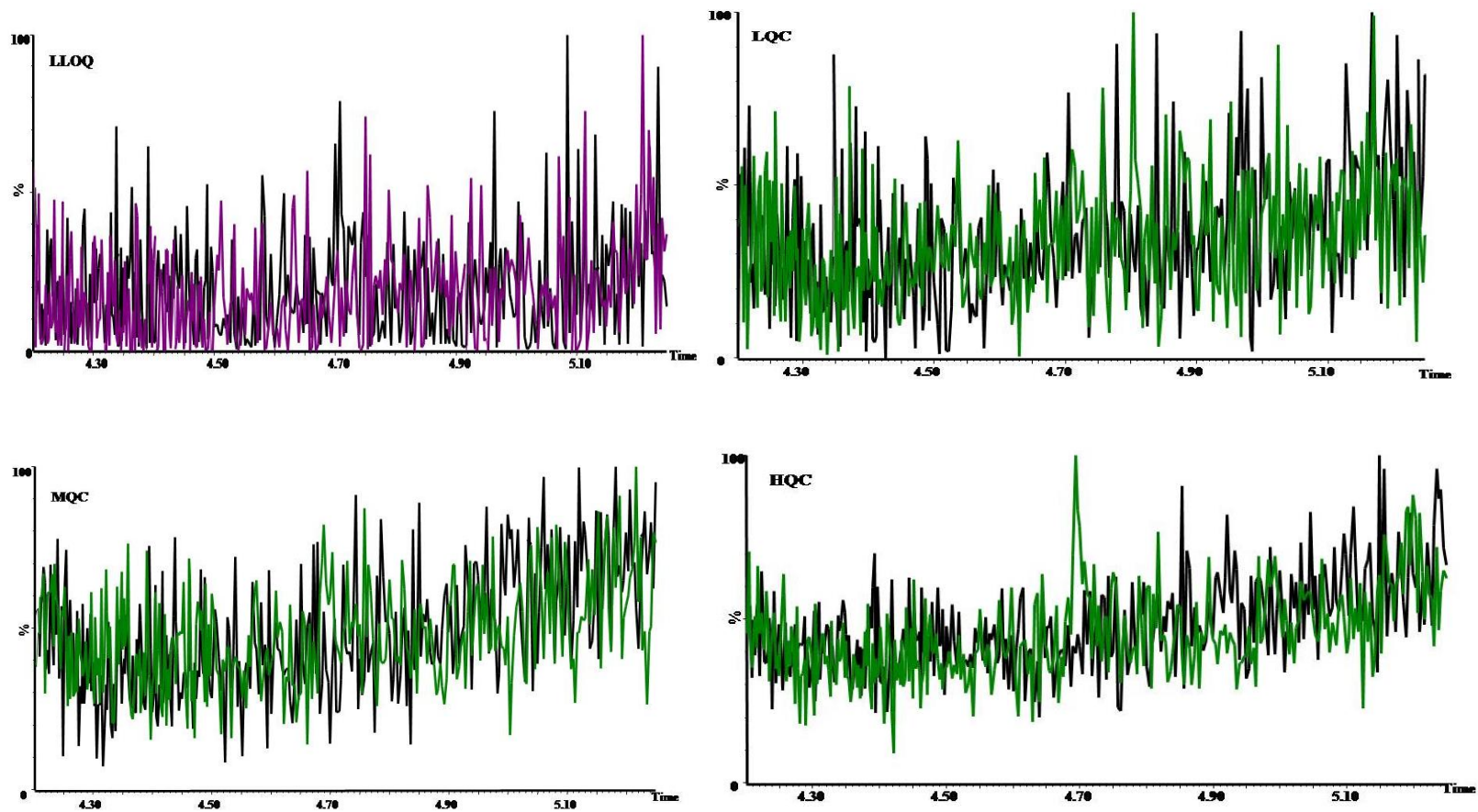


Obrázok 8: Chromatogramy všetkých sledovaných látok pri koncentračnej hladine MQC.

### Matricové efekty

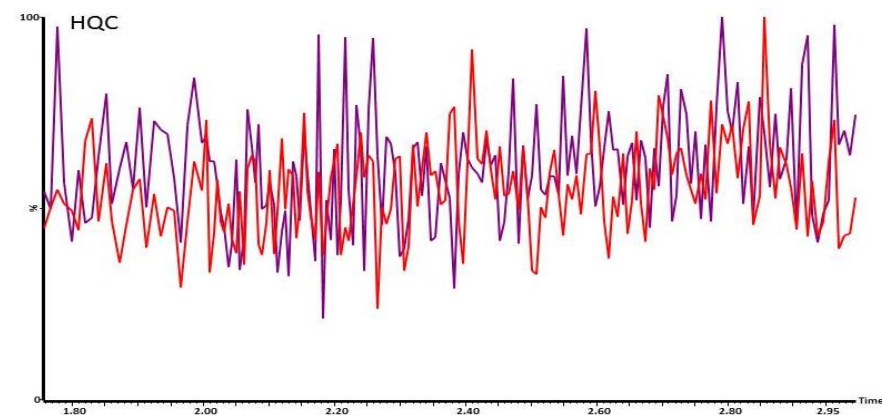
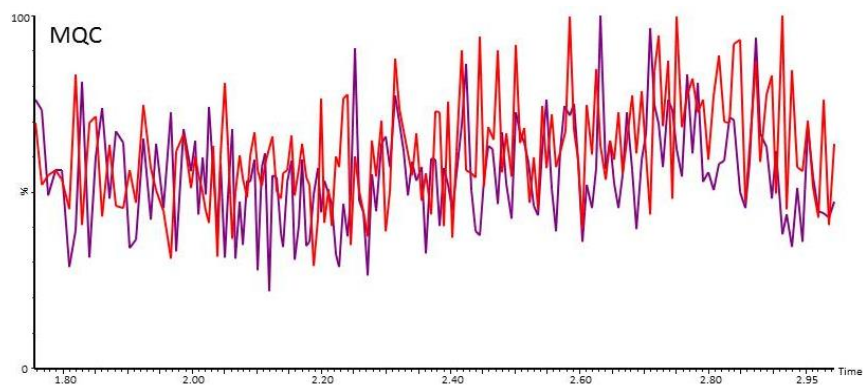
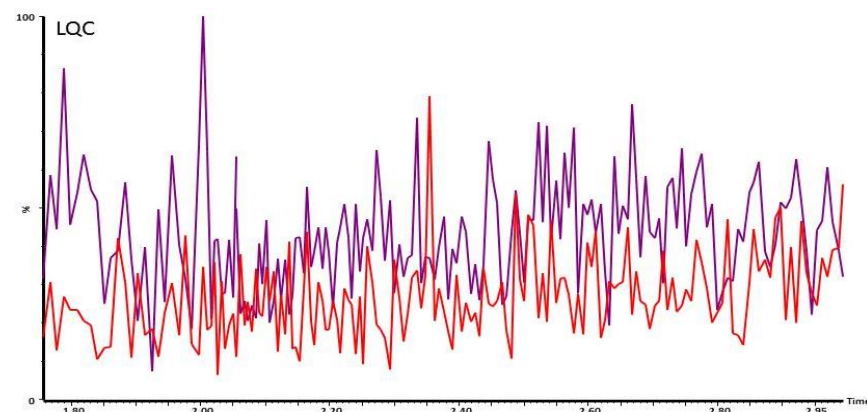
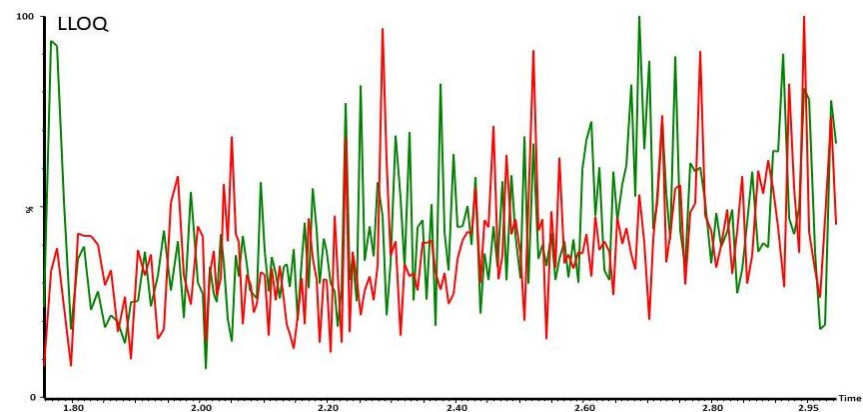
Matricové efekty boli overené na základe postkolonového prídavku. Tento experiment prebehol rovnako ako v stati 5.2.5. Sérum bolo obohatené analytmi o rovnakých koncentráciách ako pri overení presnosti a správnosti. Pre príklad uvádzam záznamy pre analyty Q3GI, PAA a PG. Podrobne vid' Obrázok 9 - Obrázok 11.

Na základe zobrazených výsledkov je evidentné, že nedochádzalo ku potlačeniu alebo zvýšeniu signálu sledovaných látok, keďže sa v záznamoch nepreukázal žiaden pozitívny alebo negatívny pík v retenčných časoch daných analytov.



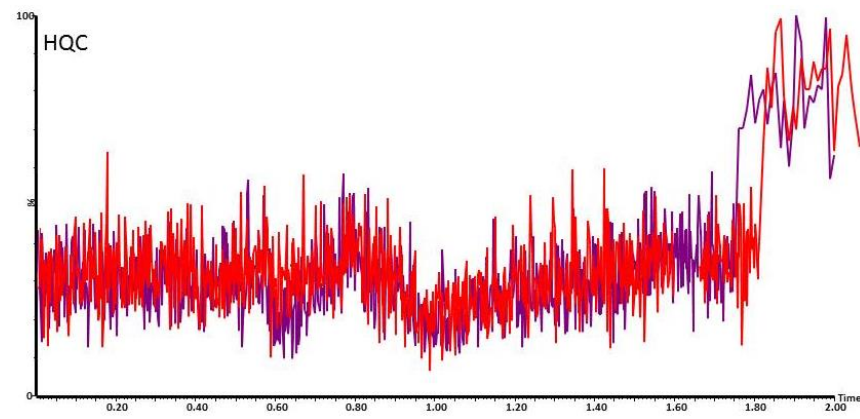
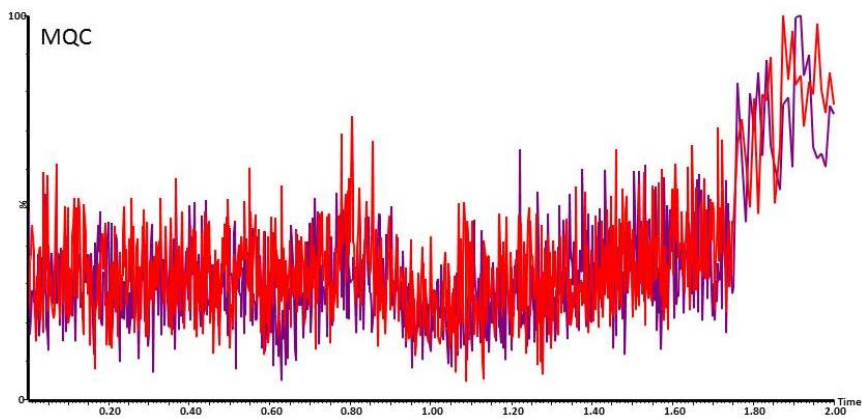
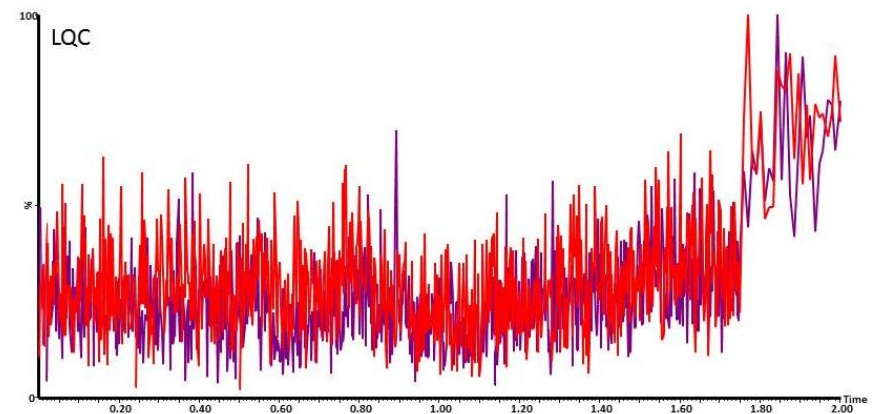
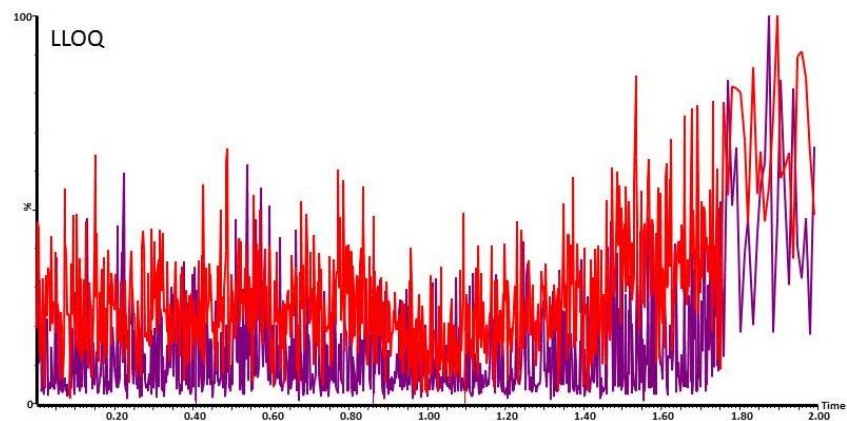
Obrázok 9: Matricové efekty pre Q3GI pri koncentráciach LLOQ, LQC, MQC, HQC. Čierna – znázorňuje blankové sérum s postkolónovým prídavkom analytov. Zelená/fialová – znázorňuje elučné činidlo s postkolónovým prídavkom analytov.





Obrázok 10: Matricové efekty pre PAA pri koncentráciach LLOQ, LQC, MQC, HQC. Červená – znázorňuje blankové sérum s postkolónovým prídavkom analytov. Zelená/Fialová – znázorňuje elučné činidlo s postkolónovým prídavkom analytov.





Obrázok 11: Matricové efekty pre PAA pri koncentráciach LLOQ, LQC, MQC, HQC. Červená – znázorňuje blankové sérum s postkolónovým prídavkom analytov. Fialová – znázorňuje elučné činidlo s postkolónovým prídavkom analytov.

## 6. Záver

Bola vyvinutá, optimalizovaná a zvalidovaná extračná metóda na tuhú fázu pre stanovenie kvercetínu a jeho 9 metabolitov v ľudskom sére.

Optimalizácia extrakčnej metódy bola uskutočnená na štandardnej vzorke a najzložitejšími krokmi bola voľba vhodného elučného a premývacieho činidla, pretože sledované látky sa významne odlišovali vo svojich fyzikálno-chemických vlastnostiach (log P, pKa). Metóda musela byť optimalizovaná na základe výberu optimálneho sorbentu, elučného i premývacieho činidla. Zvolený pracovný postup na sorbente MAX vid' Tabuľka 25.

<b>zmáčanie kolónky</b>	3 x 1 ml	metanol
<b>zrovnováženie kolónky</b>	3 x 1 ml	1% vodný roztok NH <sub>4</sub> OH
<b>nanesenie vzorky</b>	1/2* ml	
<b>1. premývaci krok</b>	1 ml	puffer 0,01M AmF o pH 5
<b>2. premývaci krok</b>	1 ml	1% MeOH v pufre 0,01M AmF o pH 5,0
<b>vymytie analytov</b>	1 ml	MeOH a 0,5% TFA (95/5)

Tabuľka 25: Výsledný pracovný postup použitý pri SPE metóde. \* - 1 ml vzorky bol nanášaný pri optimalizácii metódy, 2 ml vzorky boli nanášané u vzoriek biologického materiálu.

Táto metóda bola následne využitá na vzorky ľudského séra. Tu však bola badateľná znížená výťažnosť všetkých sledovaných látok. Preto bolo pristúpené k overeniu matricových efektov. Matricové efekty nemali kvantitatívny vplyv na výťažnosť sledovaných látok, preto bolo pristúpené k voľbe precipitačného činidla. Tento experiment však ukázal, že činidlo na úpravu vzorky – vodný roztok 1% kyseliny trihydrogénfosforečnej nemá precipitačný účinok. Jeho použitie však bolo podstatné na úpravu pH v biologickej vzorke, a tým následné zvýšenie výťažnosti pre všetky analyty.

Zoptimalizovaná metóda bola následne zvalidovaná. Hodnotené boli parametre: linearita, limit detekcie a kvantifikácie, správnosť, presnosť a matricové efekty (vid' Tabuľka 26). Z výsledkov je evidentné, že metóda je lineárna. Avšak jej citlivosť nie je dostatočná pre analýzu metabolitov PG, HVA, PAA, HFA, HFP a QCE v biologickej

vzorke. Tieto hodnoty by bolo možné zvýšiť použitím citlivejšieho hmotnostného detektoru alebo prekoncentráciou vzorky.

		PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
<b>LINEARITA (R<sup>2</sup>)</b>											
<b>štandardná kalibračná závislosť</b>		0,994	0,992	0,992	0,994	0,996	0,994	0,990	0,991	0,997	0,997
<b>LINEARITA (R<sup>2</sup>)</b>											
<b>matricová kalibračná závislosť</b>		0,995	0,996	0,997	0,998	0,993	0,994	0,996	0,990	0,990	0,996
<b>Správnosť metódy [%]</b>	<b>LLOQ</b>	34,1	48,2	38,9	84,0	106,2	89,1	101,5	113,0	111,2	90,9
	<b>LQC</b>	34,3	50,1	34,7	82,1	108,9	85,8	108,5	107,3	97,9	96,7
	<b>MQC</b>	31,1	55,2	41,8	82,3	103,7	86,1	106,7	113,2	95,3	99,9
	<b>HQC</b>	35,6	61,4	44,1	69,6	109,9	102,2	116,6	94,9	116,4	113,5
	<b>LLOQ</b>	8,0	10,9	10,5	19,5	5,4	10,2	15,2	3,4	6,2	13,7
<b>Presnosť metódy RSD [%]</b>	<b>LQC</b>	13,9	13,7	11,4	12,9	12,4	12,0	11,0	17,7	10,7	11,0
	<b>MQC</b>	2,2	9,3	19,7	7,5	15,7	12,8	20,0	12,4	14,8	15,5
	<b>HQC</b>	15,9	1,4	9,8	3,1	18,8	13,4	16,5	11,8	12,1	14,2
<b>LOQ [ng/ml]</b>		250	250	75	75	75	25	75	25	10	10
<b>LOD [ng/ml]</b>		75,6	75,6	22,7	22,7	22,7	7,5	22,7	7,5	3	3

Tabuľka 26: Celkové výsledky validácie metódy. LLOQ – Dolný limit kvantifikácie , LQC – Dolná hladina kontroly kvality, MQC – Stredná hladina kontroly kvality, HQC- Hornkontroly kvality.

Výhodou novo vyvinutej SPE metódy pre prípravu biologických vzoriek s následnou analýzou pomocou UHPLC-MS/MS je paralelná analýza všetkých sledovaných látok, extrakcia látok s rôznou polaritou a zároveň dobrá opakovateľnosť. S prihliadnutím k výťažnosti kvercetinu a jeho primárnych metabolitov v ľudskom tele bola táto metóda zvalidovaná i na základe nižšej výťažnosti látok zo skupiny sekundárnych metabolitov PG, HVA, PAA. Pre tieto látky bol kritický premývací krok, ktorý spôsobil ich nižšiu výťažnosť.

## 7. Použitá literatura

- [1] <http://www.iuwital.cz/Upload/Documents/FLAVONOIDY.pdf>, 12.02.2016.
- [2] J. Hartl et al., Farmaceutická chemie I. (2001) 90-96.
- [3] R.A. Shanely et al. , Free Radical Res. 44 (2010) 224-231.
- [4] S. Egert et al., J. Nutr. 138 (2008) 1615-1621.
- [5] M.Cíz et al., Physiol Res. 57 (2008) 393-402.
- [6] A.S. Dias et al., J Nutr. 135 (2005) 2299-22304.
- [7] M. Comalada et al., Eur J Immunol. 35 (2005) 584-592.
- [8] M.P. Nair et al., Clin Vaccine Immunol. 13 (2006) 319-328.
- [9] M. Comalada et al., Biochem Pharmacol. 72 (2006) 1010-1021.
- [10] L.C. Chiang et al., J Antimicrob Chemother. 52 (2003) 194-198.
- [11] R. Vrijzen et al., J Gen Virol. 69 (1988) 1749-1751.
- [12] T.P. Cushnie et al., Int J Antimicrob Agents. 26 (2005) 343-356.
- [13] M.L. Neuhouser, Nutr Cancer. 50 (2004) 1-7.
- [14] S. Dimova et al., Int J Pharm. 263 (2003) 95-103.
- [15] J.W. Erdman Jr. et al., J Nutr. 137 (2007) 718S-737S.
- [16] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0096303>, 12.02.2016.
- [17] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0199682>, 12.02.2016.
- [18] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0067167>, 12.02.2016.
- [19] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0096406>, 12.02.2016.
- [20] [www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC63960.pdf&type=spc&as=ascorutin-spc](http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC63960.pdf&type=spc&as=ascorutin-spc), 12.02.2016.

- [21] <https://scifinder-cas-org.ezproxy.is.cuni.cz/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>, 12.02.2016.
- [22] W.G. Clark et al., J Am Med Assoc. 143 (1950) 1411-1415.
- [23] I. Erlund et al., Eur J Clin Pharmacol. 56 (2000) 545-553.
- [24] R. Choudhury et al., Free Radic Biol Med. 27 (1999) 278-286.
- [25] C. Manach et al., J Nutr. 125 (1995) 1911-1922.
- [26] C. Morand et al., Biofactors. 12 (2000) 169-174.
- [27] C.W. Murray et al., J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc. 43 (1954) 361-364.
- [28] H. Schneider et al., J Appl Microbiol. 89 (2000) 1027-1037.
- [29] W. Mullen et al., Br J Nutr. 96 (2006) 107-116.
- [30] I. Najmanová et al., Mol Nutr Food Res. 2016, v tlači.
- [31] W. Mullen et al., J Agric Food Chem. 50 (2002) 6902-6909.
- [32] S. Egert et al., Br J Nutr. 107 (2012) 539-546.
- [33] P. Ader et al., Free Radic Biol Med. 28 (2000) 1056-1067.
- [34] V.C. de Boer et al., J Nutr. 135 (2005) 1718-1725.
- [35] R.L. Edwards et al., J Nutr. 137(2007) 2405-2411.
- [36] P.C. Hollman et al., Am J Clin Nutr. 62 (1995) 1276-1282.
- [37] Y. Sawai et al., Arzneimittelforschung. 37 (1987) 729-732.
- [38] M.R. Olthof et al., J Nutr. 133 (2003) 1806-1814.
- [39] I.B. Jaganath et al., Free Radic Res. 40 (2006) 1035-1046.
- [40] M.A. Kashem et al., Neurochem Res. 41 (2016) 385-397.
- [41] H. Kim et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 792(2003) 307-312.

- [42] K. Sadilkova et al., Clin Chim Acta. 424 (2013) 253-257.
- [43] L. Nováková et al., Úvodní kurz: Moderní trendy v HPLC (Fast-LC, SFC, HILIC), Rožnov pod Radhoštěm, 2015.
- [44] L. Nováková, POKROKY V HPLC a další vybrané kapitoly....., Hradec Králové, 2014.
- [45] L. Nováková et al., Talanta. 68 (2006) 908-918.
- [46] [http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#\\_1\\_Polar\\_sorbent](http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#_1_Polar_sorbent), 12.02.2016.
- [47] L. Nováková et al., Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. (2013) 11-267.
- [48] L. Nováková, HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE, Hradec Králové, 2012.
- [49] Ch. Dass, Fundamentals of contemporary mass spectrometry (2007) 12-607.
- [50] [http://holcapek.upce.cz/teaching/01\\_Uvod.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf), 13.02.2016.
- [51] [http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni\\_techiky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf), 13.02.2016.
- [52] [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf), 13.02.2016.
- [53] L. Nováková, ANALYTICKÉ A BIOANALYTICKÉ VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE, Hradec Králové, 2012.
- [54] <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>, 13.02.2016.
- [55] L. Nováková et al., Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. (2013) 11- 161.
- [56] A. Krueve et al., Anal Chim Acta. 870 (2015) 29-44.
- [57] [http://holcapek.upce.cz/teaching/06\\_Spojeni\\_MS\\_separace.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/06_Spojeni_MS_separace.pdf), 05.04.2016.
- [58] R.M. Smith, J Chromatogr A. 1000 (2003) 3-27.
- [59] L. Nováková, MODERNÍ TRENDY V PŘÍPRAVĚ VZORKU K ANALÝZE S VYUŽITÍM INSTRUMENTÁLNÍCH TECHNIK, Hradec Králové, 2015.
- [60] M.C. Hennion, J Chromatogr A. 856 (1999) 3-54.

[61][http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf), 24.04.2016.

[62][http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf), 24.04.2016.

[63] J. Mišík, Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro stanovení vybraných flavonoidů v biologických materiálech, 2016.

[64][http://www.waters.com/waters/en\\_CZ/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=en\\_CZ](http://www.waters.com/waters/en_CZ/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=en_CZ), 13.02.2016.

[65]<http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/716001391.pdf>, 13.02.2016.

## 8. Prílohy

### 8.1. Studentská vědecká konference 2015

Táto konferencia sa konala 22 - 23.4. 2015 na pôde Farmaceutickej fakulty, Univerzity Karlovej v Hradci Králové.

#### DEVELOPMENT OF SPE AND UHPLC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF QUERCETIN AND ITS 9 METABOLITES

Chrenková L<sup>1</sup>, Plachká K<sup>1</sup>, Pilařová V<sup>1</sup>, Mišík J<sup>1</sup>, Vlčková H<sup>1</sup>, Nováková L<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

e-mail: chrenku@faf.cuni.cz

Quercetin (Fig. 1) is one of the major flavonoids belonging to subgroup of flavonols. It is one of the most potent plant antioxidants which is distributed in edible plants (tea, red wine, fruits and vegetables). Consumption of quercetin may be associated with a decreased risk of coronary, bacterial and viral diseases.<sup>1</sup> However, in some newly published works the correlation of plasma levels of quercetin in adults and antioxidant capacity has not been confirmed.<sup>2</sup>

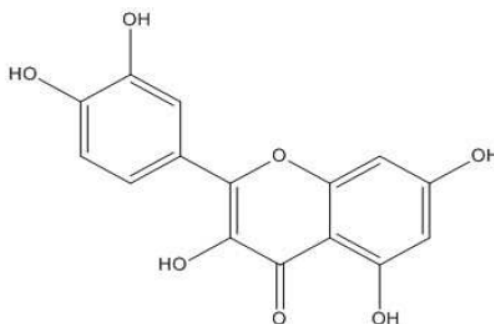


Fig. 1: The structure of quercetin

The aim of this study was to develop and validate a new extraction method for the preparation of biological samples for the determination of quercetin and its nine potential metabolites: phloroglucinol, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanilic acid, 3-hydroxyphenylacetic



acid, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid, rutin, quercetin-3-glucuronide, tamarixetin and isorhamnetin. These metabolites differ substantially in physicochemical properties (pKa, molecular weight, log P, chemical structures etc).

For the first screening in extraction procedure, the silica-based cartridges with C8, C18 ligand and polymer-based MAX (Mixed- mode Anion-eXchange) sorbents were used. MAX is mixed-mode polymeric sorbent that has been optimized to achieve higher selectivity and sensitivity for extracting acidic compounds with anion-exchange groups, which is the case of small acid metabolites of quercetin.

Due to the best retention and subsequent elution of all tested analytes the MAX cartridge was chosen. Other sorbents demonstrated poor retention of small polar acidic molecules. The optimization of elution solvent included optimization of methanol concentration (60 - 95 %) and the choice of organic acid (formic acid 0.5 - 10 % and trifluoroacetic acid 0.1 - 1 %). The mixture of 95 % methanol and 0.5 % trifluoroacetic acid demonstrated the best recovery (60.9 - 105.7% with RSD 0.4 – 9.4 %). Therefore it was chosen as optimal solvent for elution. The acidic pH was defined as a critical factor for the retention of analytes. Subsequently the wash solvent was optimized. The wash procedure consisted of two steps – the washing with water component (0.1 - 5 % ammonium hydroxide, water, 0.01 M ammonium formate buffer with pH 5.0) and the washing with organic solvent (1 - 10 % methanol). Due to good selectivity, the lowest losses of analytes, the best clean-up and removing of interfering compounds the combination of 0.01 M ammonium formate buffer with pH 5.0 and 1 % MeOH was chosen.

The optimized extraction method was used for the determination of quercetin and metabolites in biological samples. The determination of quercetin and its 9 metabolites was performed by developed chromatographic method using ultra high performance liquid chromatography (Acquity UPLC) with tandem mass spectrometry (Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer). The best selectivity between the critical pair of analytes (tamarixetin and isorhamnetin) was achieved using column BEH Shield RP C18 (2.1 x 100 mm; 1.7 $\mu$ m) and gradient elution with methanol and 0.1% formic acid. The ionization was performed in electrospray polarity switching mode and the quantification by selected reaction monitoring (SRM). The method will be validated in terms of linearity, limit of detection and quantification, accuracy, precision, selectivity and matrix effects.

The advantages of newly developed SPE method for the preparation of biological samples prior to UHPLC- MS/MS analysis are simultaneous analysis and extraction of the compounds with different polarity, good recovery and repeatability.

*The study was supported by SVV/2015/260184.*

References:

1. Egert, S., Wolfram, S., Bosy-Westphal, A., Boesch-Saadatmandi, C., Wagner, A.E., Frank, J., Rimbach, G. and Mueller, M.J.: Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 138, 2008, 1615-1621.
2. Shanely, R. A., Knab, M. A, Nieman, C. D., Jin, F., Mcanulty, R. S. and Landram, J. M.: Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans. *Free Radical Research*, 44, 2010, 224–231.

## 8.2. Studentská vědecká konference 2016

Táto konferencia sa konala 27 - 28.4. 2016 na pôde Farmaceutickej fakulty, Univerzity Karlovej v Hradci Králové.

### OPTIMALIZATION AND VALIDATION OF SPE METHOD FOR UHPLC-MS/MS DETERMINATION OF QUERCETIN AND ITS 9 METABOLITES IN BIOLOGICAL MATERIAL

CHRENKOVÁ L., PLACHKÁ K., PILAŘOVÁ V., NOVÁKOVÁ L.

Department of analytical chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague,  
Czech Republic  
e-mail: chrenklu@faf.cuni.cz

The aim of this study was to develop and validate a new extraction method for the preparation of biological samples for the determination of quercetin and its 9 metabolites: phloroglucinol, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanilic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid, rutin, quercetin-3-glucuronide, tamarixetin and isorhamnetin. Due to the best retention and subsequent elution of all analytes the polymeric ion exchanging cartridge MAX was chosen. The mixture of 95 % methanol and 0.5 % trifluoroacetic acid in water was chosen as optimal solvent for elution. The combination of 0.01M ammonium formate buffer pH 5.0 and 1 % methanol in buffer pH 5.0 were chosen as washing solvent. The determination of quercetin and its 9 metabolites was performed using UHPLC-MS/MS. The best selectivity between the critical pair of analytes with the same molecular weight (tamarixetin and isorhamnetin) was achieved using BEH Shield RP18 column and gradient elution with methanol and 0.1% formic acid. The ionization was performed in electrospray polarity switching mode. The quantification was performed by triple quadrupole and selected reaction monitoring (SRM) mode. The method was validated in terms of linearity, sensitivity (LOD, LOQ), accuracy, precision, selectivity and matrix effects. Good linearity demonstrated correlation coefficients value  $\geq 0.990$ . Method precision was expressed as  $RSD \leq 20.0 \%$ . The results of method accuracy were between 79.6 – 116.6 % except for three metabolites (PG, HVA, PAA) for which the results of accuracy 31.1 – 61.4 % were affected by losses during a washing step. The advantage of newly developed SPE method for the preparation of biological samples prior to UHPLC-MS/MS analysis is simultaneous analysis and extraction of the compounds with different physicochemical properties.

*The study was supported by SVV/2016/260292.*

### 8.3. Česká chromatografická škola HPLC 2015

## Česká chromatografická škola HPLC 2015

3. - 6. 5. 2015 v Rožnov pod Radhoštěm

ZA PODPORY GENERÁLNÍHO SPONZORA:

**Čes Waters**  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

#### Organizační výbor

Mgr. Michal Douša, Ph.D.

doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

doc. Mgr. Jan Havliš, Dr.

Ing. Vít Vacenovský

škola

## Development of SPE and UHPLC-MS/MS method for the determination of quercetin and its 9 metabolites

Chrenková L.<sup>1</sup>, Plachká K.<sup>1</sup>, Pilařová V.<sup>1</sup>, Mišík J.<sup>1</sup>, Vlčková H.<sup>1</sup> and Nováková L.<sup>1</sup>

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

e-mail: [chrenklu@faf.cuni.cz](mailto:chrenklu@faf.cuni.cz)

Keywords: *quercetin; metabolites; SPE; UHPLC-MS/MS*

Quercetin is one of the major flavonoids belonging to subgroup of flavonols. It is one of the most potent plant antioxidants which is distributed in edible plants (tea, red wine, fruits and vegetables). Administration of quercetin may be associated with a decreased risk of coronary, bacterial and viral diseases [1]. However, in some newly published works the correlation of plasma levels of quercetin in adults and antioxidant capacity has not been confirmed [2].

The aim of this study was to develop and validate a new extraction method for the preparation of biological samples for the determination of quercetin and its nine potential metabolites: phloroglucinol, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanilic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid, rutin, quercetin-3-glucuronide, tamarixetin and isorhamnetin.

For the first screening in extraction procedure, the silica-based cartridges with C8 and C18 ligand and polymer-based MAX (Mixed-mode Anion-eXchange) sorbents were used.

Due to the best retention and subsequent elution of all tested analytes the MAX cartridge was chosen. The optimization of elution solvent included optimization of methanol concentration and the choice of organic acid. The mixture of 95 % methanol and 0.5 % trifluoroacetic acid in water was chosen as optimal solvent for elution due to the best recovery. Subsequently the wash solvent was optimized. Due to good selectivity, the lowest losses of analytes, the best clean-up and removing of interfering compounds the combination of 0.01M ammonium formate buffer pH 5.0 and 1 % methanol in buffer pH 5.0 was chosen.

The optimized extraction method was used for the determination of quercetin and metabolites in biological samples. The determination of quercetin and its 9 metabolites was performed using ultra high performance liquid chromatography (Acquity UPLC) with tandem mass

spectrometry (Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer). The best selectivity between the critical pair of analytes (tamarixetin and isorhamnetin) was achieved using column BEH Shield RP C18 (2.1 x 100 mm; 1.7 $\mu$ m) and gradient elution with methanol and 0.1% formic acid. The ionization was performed in electrospray polarity switching mode and the quantification by selected reaction monitoring (SRM). The method will be validated in terms of linearity, limit of detection and quantification, accuracy, precision, selectivity and matrix effects.

The advantages of newly developed SPE method for the preparation of biological samples prior to UHPLC- MS/MS analysis are simultaneous analysis and extraction of the compounds with different polarity, good recovery and repeatability.

*The study was supported by SVV/2015/260184.*

#### **References:**

- [1]. S. Egert, S. Wolfram, A. Bosy-Westpha, C. Boesch-Saadatmandi, A.E. Wagner, J. Frank, G. Rimbach, M. J. Mueller, Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 138 (2008) 1615.
- [2] R.A. Shanely, A.M. Knab, D.C. Nieman, F. Jin, S.R. McNulty, M.J. Landram, Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans. *Free Radical Res.*, 44 (2010) 224.



## 8.4. O cenu Karla Štulíka 2016

Súťaž sa konala 3. - 4.2.2016 v Ústí nad Labem

### VÝVOJ A VALIDACE SPE A UHPLC-MS/MS METOD PRO STANOVENÍ KVERCETINU A JEHO 9 METABOLITŮ V SÉRU

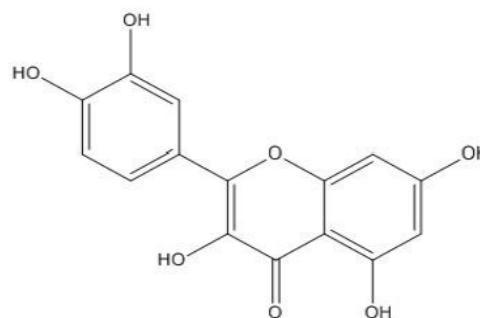
*Lucia Chrenková<sup>1</sup>, Kateřina Plachká<sup>1</sup>, Veronika Pilařová<sup>1</sup>, Jakub Mišík<sup>1</sup>, Hana Vlčková<sup>1</sup>,  
Lucie Nováková<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova,  
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

E-mail: [chrenklu@faf.cuni.cz](mailto:chrenklu@faf.cuni.cz)

#### Úvod

Kvercetin (Obr. 1) je sekundární metabolit řazený do skupiny flavonoidů, přesněji do podskupiny flavonolů. Je považován za jeden z nejúčinnějších rostlinných antioxidantů. Konzumace flavonoidů obecně a kvercetinu především může být spojena se snížením rizika koronárních, bakteriálních a virových



**Obr. 1:** Struktura kvercetinu.

onemocnění. Primárním potravinovým zdrojem je čaj, červené víno, ovoce a zelenina<sup>1,2</sup>. V některých nově publikovaných pracích se však neprokázala korelace mezi plazmatickými koncentracemi kvercetinu a jeho antioxidační aktivitou u lidí<sup>3</sup>.

Na základě spolupráce s Katedrou farmakologie a toxikologie byla právě tato skutečnost hlavním důvodem vyvinutí a validace UHPLC-MS/MS a SPE metod pro stanovení kvercetinu a jeho 9 metabolitů: Floroglucinol (PG); kyselina homovanilinová (HVA); kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (PAA); kyselina 3-(3hydroxyfenyl)propionová (HFP); kyselina 3-hydroxyfenyloctová (HFA); kvercetin-3-glukuronid (Q3Gl); rutin (RUT); tamarixetin (TMX) a isoramnetin (IRN) v biologickém vzorku. Metabolity pocházely ze dvou rozdílných strukturních skupin: skupina fenolických kyselin (PG, HVA, PAA, HFP, HFA) a skupina flavonoidních metabolitů (RUT, Q3Gl, IRN, TMX), proto se separované látky významně

lišily ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech (log P, pKa), a z toho pramenily komplikace při vývoji extrakční i separační metody.

### **Experimentální část**

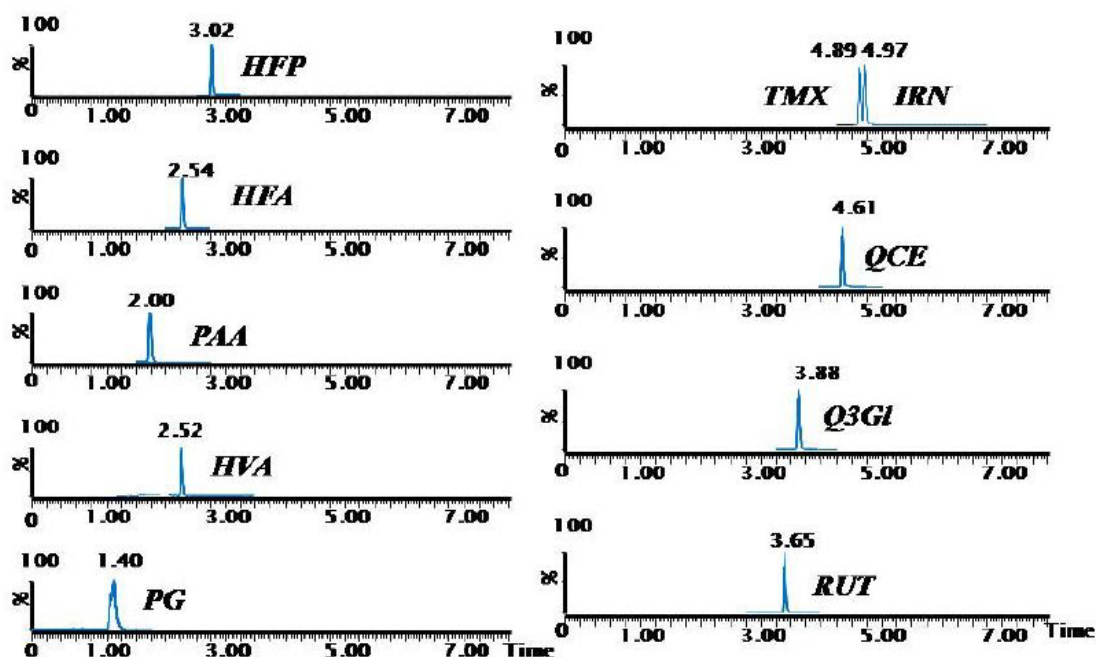
K práci byly použity standardy látek: Floroglucinol, Kyselina homovanilinová, Rutin, Kvercetin – Sigma-Aldrich, Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, Kvercetin-3-glukuronid, Tamarixetin, Isoramnetin – Extrasynthese, Kyselina 3-hydroxyfenyloctová, Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová – Toronto research chemicals. Všechny využití standardy byly o čistotě HPLC 90-99%. Rozpouštědla metanol a acetonitril (Sigma-Aldrich) byla v čistotě LC-MS grade. Jako činidla byly použity: roztok hydroxidu amonného ( $\geq 25\%$ ), kyselina octová, kyselina trifluoroctová, kyselina mravenčí (Sigma Aldrich) a kyselina trihydrogenfosforečná (Penta). Jako biologický materiál bylo použito sérum Lyonorm Hum N (Ebra Lachema). UHPLC-MS/MS separace byly uskutečněny na chromatografickém systému Acquity UPLC (Waters, Milford, USA). Byly využity stacionární fáze s částicemi o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$ : Acquity UPLC CSH C18, Acquity CSH Fluoro-Phenyl, Acquity UPLC BEH Shield RP18, Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl a Acquity UPLC BEH C18 (průměr 2,1 mm, délka 100 mm). Podmínky separace byly následující gradientová eluce: metanol a 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, průtok 0,35 ml/min, teplota kolony 40 °C. Ionizace separovaných látek proběhla za pomoci elektrospreje (ESI) v kladném i záporném módu. K detekci stanovovaných látek byl použit trojitý kvadrupól Quattro Micro (Waters, Milford, USA) s využitím monitorování vybrané reakce (SRM). Extrakční metoda byla uskutečněna za pomoci SPE Manifoldu SUPELCO Visiprep 24<sup>TM</sup> DL (Supelco Analytical) a jako extrakční kolonky byly využity Oasis Max 1cc Cartridge 10 mg 30  $\mu\text{m}$  (Waters), Discovery DSC-C8 1 ml Tube, 100 mg (Supelco Analytical) a Discovery DSC-18 1 ml Tubes, 100 mg (Supelco Analytical).

### **Výsledky a diskuze**

#### **1. UHPLC-MS/MS metoda:**

Na základě nejlepší selektivity pro separaci kritického páru izomerů (isoramnetin a tamarixetin), ale i vhodné selektivity pro všechny ostatní látky, byla zvolena stacionární fáze Acquity UPLC BEH Shield RP18 (Obr. 2). Pro každý analyt byl optimalizován SRM přechod, kolizní energie, napětí na vstupním kuželu a dwell time. Vhodnost zvolených separačních podmínek byla potvrzená testem způsobilosti systému (SST) a výsledky validačních měření, které jsou uvedené v kapitole Validace metody.





Obr. 2: Separace kvercetinu (QCE) a jeho 9 metabolitů (Floroglucinol (PG), Kyselina homovanilínová (HVA), Rutin (RUT), Kvercetin (QCE), Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (PAA), Kvercetin-3-glukuronid (Q3GI), Tamarixetin (TMX), Isoramnetin (IRN), Kyselina hydroxyfenyloctová (HFA), Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová (HFP)) s využitím optimalizované UHPLC-MS/MS metody.

## 2. SPE metoda

Prvním krokem při vývoji extrakční metody byla volba extrakční kolonky. Testované sorbenty byly odlišné svým složením. C8 a C18 jsou silikagelové kolonky modifikované řetězcem o daném počtu uhlíků. Naopak kolonka MAX je polymerní iontově-výměnná stacionární fáze obsahující kvartérní amin. Na základě nezadržení vícerých analytů PG, PAA, HFA na reverzní silikagelové kolonce C8 a nezadržení analytů PG, PAA, QCE, TMX, IRN na stacionární fázi C18 byly tyto kolonky nevhodné. Naopak všechny zkoumané analyty byly zadrženy na iontově-výměnné polymerní stacionární fázi MAX, proto byla další optimalizace uskutečněna právě na této kolonce.

Eluční činidlo bylo složené z organické a kyselé složky<sup>4</sup>. Byly vyzkoušeny různé koncentrace (60-98%) metanolu i acetonitrilu ve směsi s kyselinou mravenčí o koncentraci 0,5-10% nebo kyselinou trifluoroctovou o koncentraci 0,1-1%. Na základě nejlepší výtěžnosti pro všechny separované látky byl za nevhodnější eluční činidlo vybrán roztok 95% metanolu s 0,5% kyselinou trifluoroctovou.

Optimalizace promývacího činidla byla provedena dle doporučených postupů výrobce. V prvním kroku byl jako promývací činidlo využit roztok hydroxidu amonného o koncentracích 0,1-5% a ve druhém kroku 1-10% vodný roztok metanolu<sup>4</sup>. Při využití promývacích činidel s vyšším obsahem organické složky však docházelo k vymývání analytů z kolonky, proto výtěžnost nebyla optimální. Dalším testováním bylo zjištěno, že kombinace promytí pufrům - 10 mM mravenčanu amonného o pH 5 a v druhém kroku 1% metanolem ředěným do pufru o pH 5 je nejlepší volbou.

Obdobným postupem jako při optimalizaci s využitím standardů byly připraveny vzorky séra. Výtěžnost byla nižší než při optimalizaci, proto byla dalším krokem volba vhodného precipitačního činidla, neboť se předpokládalo, že dochází k navázání analytů na bílkoviny séra. Jako první byla vyzkoušena precipitační činidla s obsahem organického rozpouštědla, což mělo za následek výrazné ovlivnění retence analytů na SPE. Proto bylo přistoupeno k precipitaci pomocí vodných roztoků kyselin (kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina trifluoroctová, kyselina trihydrogenfosforečná) o různých koncentracích. Nejlepší výtěžnost poskytoval vodný roztok 1% kyseliny fosforečné, který však neměl precipitační účinek.

### 3. Validace metody

Za daných podmínek byla extrakční metoda validována. Hodnocené byly parametry: linearita, limit detekce a kvantifikace, správnost, přesnost a matricové efekty. Metoda vykazovala dobrou lineární závislost s koeficientem determinace vyšším než 0,990 v rozmezí 0,25 - 1 µg/ml pro PG a HVA, 0,075-1 µg/ml pro PAA, HFA, HFP, QCE, 0,025-1 µg/ml pro RUT, Q3GI, 0,01-1 µg/ml pro TMX a IRN.

**Tab. I:** Výsledky přesnosti a správnosti. LLOQ- lower limit of quantification, LQC- low quality control, MQC- middle quality control, HQC- high quality control.

konc. hladina		PG	HVA	PAA	HFA	HFP	RUT	QCE	Q3GI	TMX	IRN
LLOQ	[%]	34,1	48,2	38,9	84,0	106,2	89,1	101,5	123,0	111,2	90,9
	RSD	8,0	10,9	10,5	20,5	5,4	10,2	15,2	3,4	6,2	13,7
LQC	[%]	34,3	50,1	34,7	82,1	108,9	85,8	108,5	107,3	97,9	96,7
	RSD	13,9	13,7	11,4	12,9	12,4	12,0	11,0	17,7	10,7	11,0
MQC	[%]	31,1	55,2	41,8	82,3	103,7	86,1	106,7	113,2	95,3	99,9
	RSD	2,2	9,3	19,7	7,5	15,7	12,8	20,0	12,4	14,8	15,5
HQC	[%]	35,6	61,4	44,1	69,6	109,9	102,2	116,6	94,9	116,4	113,5
	RSD	15,9	1,4	9,8	3,1	18,8	13,4	16,5	11,8	12,1	14,2

Správnost a přesnost byly měřené na 4 koncentračních hladinách, které odpovídaly koncentraci LLOQ - lower limit of quantification, LQC - low quality control, MQC - middle quality control a HQC - high quality control. Jako ukazatel správnosti byla využita výtěžnost látek a přesnost byla potvrzena RSD menším než 20% (Tab. I).

## **Závěr**

Výhodou nově vyvinuté SPE metody pro přípravu biologických vzorků a pro analýzu pomocí UHPLC-MS/MS je paralelní analýza a extrakce látek s různou polaritou, a zároveň dobrá opakovatelnost. U obou metod byly optimalizované podmínky separace, aby bylo dosaženo co nejlepší selektivity a rozlišení. Celkový čas analýzy byl jen 7,5 minuty včetně ekvilibrace. Následně byla provedena validace této metody, která umožňuje využití metody pro sledování hladin kvercetinu a jeho metabolitů v plazmě pacientů. S přihlédnutím k výtěžnosti kvercetinu a jeho primárních metabolitů v lidském těle byla tato metoda zvalidována i přes nižší výtěžnosti látek ze skupiny sekundárních metabolitů PG, HVA, PAA, protože pro tyto látky byl kritický promývací krok, který způsobil jejich nižší výtěžnost.

## **Poděkování**

*Tento výzkum byl finančně podpořený projektem SVV/2015/260184.*

## **Literatura**

1. Erdman J.W. Jr., Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J.: *J. Nutr.* 137, 718S-737S (2007).
2. Graefe E.U., Derendorf H., Veit M.: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 37, 219-233 (1999).
3. Shanely, R. A., Knab. M. A, Nieman C. D., Jin F., Mcanulty R. S. and Landram J. M.: *Free Radical Res.* 44, 224–231 (2010).
4. Waters: CARE AND USE MANUAL: *OASIS MIXED-MODE ION-EXCHANGE CARTRIDGES AND 96-WELL PLATES 2014 (USA)*, 1-5. Dostupné na internetové stránce: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/716001391.pdf>, staženo 2. ledna 2016