

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Analytické a bioanalytické hodnocení vybraných léčiv
pomocí UHPLC**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Libuše Klepalová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

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

V Hradci Králové dne 15. 5. 2017

.....

Libuše Klepalová

Tímto děkuji vedoucí své diplomové práce doc. PharmDr. Petře Kovaříkové, Ph.D. za vstřícný přístup a cenné rady, které mi pomohly při vypracování práce.

Práce vznikla za podpory SVV 260401.

Obsah

Úvod	6
1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	7
1.1 Instrumentace	8
1.1.1 Zásobníky mobilní fáze.....	9
1.1.2 Odplyňovač	9
1.1.3 Čerpadla	10
1.1.4 Dávkovače vzorku	11
1.1.5 Kolona	11
1.1.6 Detektory	12
2. Spojení vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	15
2.1 Ionizace	15
2.1.1 Ionizace elektrosprejem.....	16
2.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku	17
2.1.3 Fotoionizace za atmosférického tlaku	17
2.2 Analyzátoři	17
2.2.1 Kvadrupól (Quadrupole, Q) a trojitý kvadrupól (Triple quadrupole, QqQ)	18
2.2.2 Průletový analyzátor (Time of flight, TOF)	19
2.2.3 Iontová past (Ion trap, IT)	19
2.2.4 Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier-transformation ion cyclotron resonance, FT-ICR).....	20
2.2.5 Orbitrap.....	21
2.3 Detektory	21
2.4 Vybrané operační módy.....	22
3. Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (Ultra-high-performance liquid chromatography, UHPLC).....	23
4. Chromatogram	24
5. Kvantitativní vyhodnocení výsledků.....	24
5.1 Metoda vnějšího standardu	24
5.2 Metoda vnitřního standardu	25
5.3 Metoda standardního přídatku	25
5.4 Metoda vnitřní normalizace.....	25
6. Úprava biologických vzorků.....	26
6.1 Precipitace proteinů.....	26
6.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid extraction, LLE).....	27

6.3	Extrakce na tuhou fázi (Solid-phase extraction, SPE).....	27
7.	Mnohočetný myelom	30
7.1	Bortezomib.....	31
7.2	Karfilzomib	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....		36
8.	Chemikálie, přístroje, pomůcky.....	36
8.1	Chemikálie.....	36
8.2	Biologický materiál.....	36
8.3	Přístroje, pomůcky	36
9.	Příprava zásobních roztoků	37
10.	Instrumentace a chromatografické podmínky.....	37
11.	Analýza karfilzomibu	38
11.1	Výběr mobilní fáze	38
11.2	Ověření linearity.....	38
11.3	Volba vhodného precipitačního činidla.....	38
11.4	Ověření linearity v plazmě	39
12.	Analýza bortezomibu.....	40
12.1	Výběr mobilní fáze	40
12.2	Ověření linearity.....	40
12.3	Volba vhodného precipitačního činidla.....	40
12.4	Větší objem precipitačního činidla.....	41
12.5	Úprava vzorku pomocí hybridní SPE	41
12.6	Ověření linearity v plazmě	42
13.	Výsledky a diskuze	44
13.1	Výběr mobilní fáze	44
13.2	Ověření linearity.....	45
13.3	Výběr precipitačního činidla.....	47
13.4	Ověření linearity v plazmě	49
14.	Závěr.....	52
Abstrakt.....		54
Abstract.....		55
Literatura.....		56

Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a ultra-vysokoúčinná chromatografie představují, ve spojení s hmotnostní spektrometrií, důležité techniky analýzy biologických vzorků. Tato spojení přináší vysokou separační účinnost kapalinové chromatografie, citlivost a selektivitu hmotnostní spektrometrie. V analýze poskytuje informace o identitě a obsahu léčiv, metabolitů, případných nečistot a rozkladných produktů.

Před vlastní chromatografickou analýzou je nutné biologické vzorky upravit, jelikož obsahují množství balastních látek, které by mohly vést k poškození chromatografické kolony. Mezi základní metody úpravy vzorků patří precipitace proteinů, extrakce z kapaliny do kapaliny a extrakce na tuhou fázi. Úprava vzorků mnohdy představuje časově náročnější a k chybám náchylnější krok než vlastní analýza.

Léčiva ze skupiny inhibitorů proteazomu, kam lze zařadit karfilzomib a bortezomib představují pokrok v terapii mnohočetného myelomu.

V teoretické části diplomové práce jsou podány informace o vysokoúčinné kapalinové chromatografii a dále o jejím spojení s hmotnostní spektrometrií. Rovněž jsou zde podány i stručné informace o metodách úpravy biologických vzorků.

Karfilzomibem a bortezomibem se zabývají kapitoly na konci této práce. Vedle základní charakteristiky léčiv jsou zde uvedeny i stručné údaje o vybraných publikovaných studiích zabývajících se jejich analýzou.

V experimentální části je popsán vývoj pilotních chromatografických podmínek pro LC-MS analýzu karfilzomibu a bortezomibu v plazmě a následné testování různých způsobů izolace těchto látek z plazmy.

1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography, HPLC) je dnes velmi často používanou separační metodou. Své využití nalézá v laboratořích všech zaměření. Výhodou vysokoučinné kapalinové chromatografie je možnost současného kvalitativního i kvantitativního hodnocení, a to v relativně krátkém čase a za použití malého množství vzorku. Jedná se o metodu velmi selektivní a citlivou v závislosti na způsobu detekce. Výhodou je také možnost automatizace. Lze tak provádět i velké množství analýz bez nutnosti zásahu operátora. Výstupem jsou pak informace o identitě, obsahu a čistotě analyzované látky [1] [2].

Během HPLC analýzy dochází k mnohonásobnému opakovanému ustalování rovnováhy separovaných látek mezi dvěma fázemi. Fáze umístěná v koloně se nazývá stacionární a fáze, v níž jsou unášeny analyzované látky, je označována jako mobilní [3].

Dle druhu molekulových interakcí lze HPLC rozdělit na čtyři základní typy:

- Chromatografie s normálními fázemi (Normal-phase chromatography, NP)
- Chromatografie s reverzními fázemi (Reversed-phase chromatography, RP)
- Ionově výměnná chromatografie (Ion-exchange chromatography, IEX)
- Molekulová vylučovací chromatografie (Size-exclusion chromatography, SEC)

V případě chromatografie na normálních fázích dominují polární interakce. Mobilní fáze je tvořena nepolárním rozpouštědlem (hexan, heptan aj.) s přídavkem malého množství polární látky (ethanol, methanol, isopropanol aj.), jejíž změny koncentrace mají vliv na retenci analytu na koloně [4]. Mezi nejvíce používané polární sorbenty patří silikagel. Na svém povrchu má přítomny silanolové skupiny (Si – OH). Jeho povrch vykazuje slabě kyselý charakter. pH mobilní fáze by tedy nemělo být vyšší než 8, aby nedocházelo k rozpouštění silikagelu [5]. Mezi další polární stacionární fáze patří oxid hlinitý a polární chemicky vázané fáze obsahující ligandy s kyanovými, diolovými nebo alifatickými aminoskupinami, kterými jsou derivatizovány silanolové skupiny silikagelu [3] [4] [6].

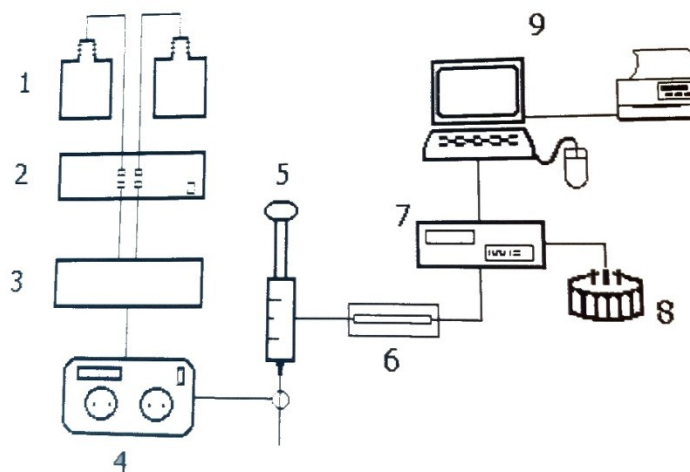
Chromatografie na reverzních fázích je založená především na disperzních silách (hydrofobní nebo van der Waalsovy interakce). Téměř 90% všech HPLC analýz je prováděno v reverzním módu [4]. Mobilní fázi zpravidla tvoří voda, či slabé roztoky kyselin nebo bazí, anebo pufrů. To je v kombinaci s mísitelnými organickými rozpouštědly (například acetonitril, methanol, propan-2-ol, dioxan, tetrahydrofuran). Stacionární fáze je v tomto uspořádání nepolární. Nejpoužívanějším materiálem je C₁₈ (oktadecylsilikagel), který vzniká reakcí silanolových skupin s alkylchlorosilany, kde alkyl je osmnácti uhlíkový nevětvený řetězec. Mezi další reverzní chemicky vázané fáze patří fenylové a alkylfenylové, bifenylové, C₈ (oktylsilikagel) [3] [4] [7].

Podstatou iontově výměnné chromatografie jsou elektrostatické interakce mezi ionizovanými funkčními skupinami stacionární fáze (tzv. měniče) a ionty v mobilní fázi nesoucími opačný náboj. Ionoměniče lze rozdělit na katexy a anexy. Katexy umožňují výměnu kationtů. Jsou tvořeny polymerními polyvalentními kyselinami. Naopak anexy jsou schopny vyměňovat anionty. Tvoří je polymerní polyvalentní baze [3]. Selektivita a retence analytu jsou při IEX velmi závislé na pH a iontové síle mobilní fáze [4].

Molekulová vylučovací chromatografie je založena pouze na separaci molekul v porézním materiálu na základě jejich velikosti. K nejčastěji používaným stacionárním fázím patří gely na bázi methakrylátů, akrylamidů, agarové gely, dextranové gely a kopolymery styrenu a divinylbenzenu. Větší molekuly nebudou příliš vstupovat do pórů, a tudíž kolonu opustí dříve. Oproti tomu malé molekuly (v závislosti na své velikosti a velikosti pórů) budou póry pronikat a doba jejich setrvání na koloně bude delší. SEC nachází uplatnění zejména v biochemii proteinů, kde slouží ke stanovení molekulové hmotnosti [3] [4].

1.1 Instrumentace

Kapalinový chromatograf (Obr. 1) je složen z částí, jejichž úkolem je zabezpečení uchování a transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separace látek, jejich detekce a zaznamenání dat a možnost následného zpracování neměřených údajů [3].



Obr. 1: Schéma HPLC

Zásobníky mobilních fází (1), odplyňovač (2), směšovač (3), čerpadlo (4), dávkovací zařízení (5), kolona (6), detektor (7), sběrač frakcí (8), PC pro záznam dat (9), převzato z [3]

1.1.1 Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze jsou nádoby různého objemu, které je možné uzavřít, aby páry kapalin neunikaly do okolí, ale také aby nedošlo ke kontaminaci obsahu nečistotami z okolního prostředí. K zachycení pevných částic (případných nečistot) z mobilní fáze jsou používány speciální filtry.

Ze zásobníku je mobilní fáze čerpána do vysokotlakého čerpadla a dále na kolonu [3]. V případě izokratické eluce je složení mobilní fáze konstantní. Dochází-li v průběhu analýzy ke změnám ve složení mobilní fáze (změna poměru organické a anorganické složky) jedná se o gradientovou eluci. Tento typ eluce se používá především při analýze vzorků, kde je značný rozdíl mezi retenčními časy jednotlivých složek [6].

1.1.2 Odplyňovač

K odplynění mobilní fáze se využívá vakuový degaser nebo helium, kterým je kapalina probublávána přímo v zásobníku. Dnes častěji používané odplynění pomocí degaseru spočívá v průtoku mobilní fáze kapilárou, jejíž stěny jsou propustné pro

plyny. Kapilára je umístěna ve vakuové komoře. Díky rozdílu tlaku vně a uvnitř kapiláry pak dochází k odplynění kapaliny.

Odplynění mobilní fáze je důležité, aby mimo jiné byla dosažena stabilita základní linie a nebyla snížena citlivost detekce [3].

Porucha vakuového degaseru se může projevit zvýšeným šumem v základní linii a posunem retenčních časů. Rovněž dochází i k výkyvům hodnot tlaku [1].

1.1.3 Čerpadla

Úlohou čerpadla je zajistit stabilní průtok mobilní fáze přístrojem. Vysokotlaká čerpadla lze rozdělit na dvě skupiny, a to na čerpadla pracující za konstantních hodnot tlaku a na čerpadla pracující při konstantním objemu průtoku. U obou typů dochází k vytlačení mobilní fáze pístem nebo membránou ze zásobníku [3].

Pneumatická čerpadla patří do skupiny čerpadel pracujících při konstantním tlaku. Dochází u nich k vypuzení mobilní fáze ze zásobníku díky tlaku plynu, který působí přes píst nebo membránu na stlačitelný zásobník. Pneumatická čerpadla nejsou v dnešní době příliš používána [3].

Výhodou čerpadel injekčního typu je dosažení konstantního průtoku mobilní fáze a nepřítomnost tlakových pulsů. Mezi jejich nevýhody pak lze zařadit limitovaný objem mobilní fáze (objem pracovního válce je 100-500 ml) a čas nutný ke stabilizaci průtoku (15-30 minut)

Pístová čerpadla pracují tak, aby objem mobilní fáze v pracovní části válce byl co nejmenší při maximálním výtlačku. Jedná se o pulzní typ čerpadel [3]. Pístové čerpadlo se skládá z válce, v němž se pomocí motoru pohybuje tam a zpět píst. V oblasti hlavy čerpadla jsou přítomny dva ventily (sací a výtlačný). Při pohybu pístu zpět je výtlačný ventil uzavřený, sací ventil otevřen a dochází ke vtoku mobilní fáze do válce. Následně dojde k uzavření sacího ventilu, otevření výtlačného a pohybem pístu vpřed je mobilní fáze vypuzena na kolonu. Jedná se o nejběžněji používaný typ čerpadel [3] [6].

Další možností je zapojení dvou pístů do série. Písty na sobě nejsou vzájemně závislé. Díky tomu je u použití těchto čerpadel minimální výskyt tlakových pulsů.

U membránových čerpadel dochází pomocí pístu ke stlačení hydraulické kapaliny, která tlakem působí přes membránu na mobilní fázi, a ta je následně vypuzena do kolony. Membránová čerpadla se v současnosti příliš nepoužívají.

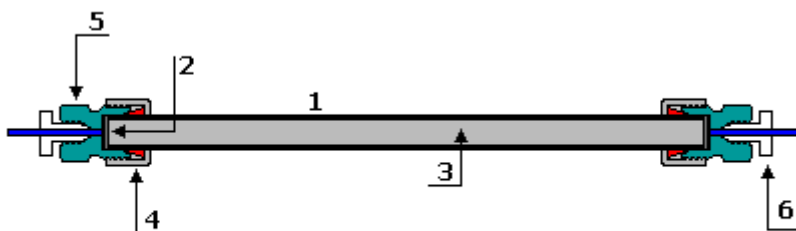
Aby nedocházelo ke krystalizaci pufrů mobilní fáze na povrchu pístů, je nutný jejich oplach, který se uskutečňuje vhodnou kapalinou, buď využitím samospádu, nebo aktivně pomocí peristaltické pumpy [3].

1.1.4 Dávkovače vzorku

Dávkování vzorku značnou měrou ovlivňuje účinnost celého chromatografického procesu. Není-li dávkování dokonalé, může docházet k rozmývání píků. V současné době se používají především automatické dávkovače (tzv. autosamplery), ale existují také manuální smyčková dávkovací zařízení [3]. Výhodou autosampleru je možnost naprogramovaného dávkování rozdílných objemů vzorku z příslušných vialek [4].

1.1.5 Kolona

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii je stacionární fáze umístěna v koloně. Chromatografická kolona (Obr. 2) se skládá z pláště a kovových frit (majících póry o velikosti 0,5 – 2 μm), jejichž úkolem je zajištění těsnosti, rovnoměrné distribuce mobilní fáze a zabránění úniku stacionární fáze z kolony. Na obou koncích kolony jsou přítomny koncové hlavice (se vstupem pro kapiláru) a ochranný kroužek [3] [5] [7].



Obr. 2: Chromatografická kolona

Kovový plášť (1), porézní kovová frit (2), stacionární fáze (3), ochranný kroužek (4), koncová hlavice (5), vstup pro kapiláru se šroubem (6)

převzato z [5].

Kolona je spojena s dávkovačem a detektorem pomocí kovových nebo polyetheretherketonových kapilár a hydraulických spojek [3].

Kolony jsou nejčastěji vyráběny z nerezové oceli nebo plastu (PEEK) [5]. Na vnitřní povrch jsou kladeny určité požadavky. Musí být odolný vůči vysokým tlakům, chemicky inertní a hladký [3] [5].

Běžné analytické kolony mají délku 5 - 250 mm a vnitřní průměr je 3 – 4,6 mm, avšak kolony o vnitřním průměru 2,1 mm jsou také dostupné [7].

1.1.6 Detektory

Účelem detektorů je rozpoznat, kdy jím prochází pouze mobilní fáze, a kdy již byl eluován analyt. Dále pak by mělo být zajištěno, že odezvu detektoru při eluci analytu bude možné kvantifikovat [3] [4].

Detektory lze rozdělit na selektivní a univerzální. Selektivní detektory vykazují odezvu na některou z fyzikálně-chemických vlastností analytu, zatímco univerzální detektory vykazují odpověď na všechny analyty nezávisle na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech [4]. Z jiných pohledů je možné detektory dělit například na destrukční a nedestrukční nebo na koncentrační a hmotnostní [3].

Ideální detektor by měl být univerzální a vysoce citlivý, nedestruktivní, měl by mít široký lineární rozsah a jeho signál by neměl být ovlivňován změnami teploty, průtoku a složení mobilní fáze. Také je od něj očekávána spolehlivost a snadná obsluha. Žádný z detektorů však nedisponuje všemi těmito vlastnostmi zároveň [3] [4].

Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou nejčastěji používané detektory v HPLC analýze léčiv. Pracují na principu měření absorbance analyzovaného vzorku. Eluát z kolony je veden skrz průtokovou celu, kam také dopadá UV záření. Záření prošlé celou je detekováno senzorem, na který dopadá [6]. Při změně koncentrace absorbující látky dochází ke změně hodnoty absorbance. Vztah lze vyjádřit pomocí Lambert-Beerova zákona.

$$A = l \times c \times \epsilon$$

kde ϵ je molární absorpční koeficient, l je tloušťka vrstvy a c je koncentrace.

V analýze léčiv se využívají zejména UV a UV-VIS detektory [3] [2]. Tyto detektory jsou poměrně citlivé a mají široký lineární rozsah [4].

Spektrofotometrické detektory lze rozdělit na detektory:

- s fixní vlnovou délkou (zpravidla 253,7 nm)
Zdrojem záření o této vlnové délce je rtuťová výbojka. Tyto detektory se již v analýze léčiv nepoužívají.
- s volitelnou vlnovou délkou
V tomto případě jako zdroj záření slouží deuteriová nebo xenonová lampy a záření o požadované vlnové délce je izolováno pomocí monochromátoru. Vlnovou délku lze nastavit v rozmezí 190-800 nm.
- s diodovým polem (DAD, Diode-array detector)
Tyto detektory mohou sbírat data současně v celém spektru bez přerušení analýzy [3] [4] [8]. DAD poskytuje velké množství spektrálních údajů bez ovlivnění citlivosti. Naměřená spektra mohou být porovnána s knihovnou spekter [20]. Tento detektor umožňuje rovněž určit čistotu píku (tzn. zda nedochází ke koeluci analytů) [3].

Fluorescenční detektory

Při použití fluorescenčního detektoru dochází při průchodu eluované látky celou k absorpci primárního záření. Molekuly analytu pak přechází do excitovaného stavu. Absorbovaná energie poté může být emitována ve formě fluorescenčního záření o větší vlnové délce, než jakou má primární excitační záření. Zdrojem excitačního záření bývá rtuťová nebo xenonová výbojka.

Fluorescenční detektory jsou konstruovány tak, aby bylo možné zachytit maximální množství fluorescenčního záření násobičem a zároveň, aby byl násobič chráněn před primárním zářením. Násobič tedy bývá umístěn kolmo ke směru primárního záření [3].

Tyto detektory jsou selektivní a velmi citlivé, ale jejich použití je omezeno na analyty vykazující fluorescenci. Pozornost musí být věnována výběru vhodné mobilní fáze, jelikož některá vysoce polární rozpouštědla nebo jiné složky mobilní fáze mohou fluorescenci zhaset [4].

Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory monitorují změny v indexu lomu mobilní fáze a eluované látky. Jedná se o univerzální detektory, avšak méně citlivé než UV detektory. Nevýhodou zde je nemožnost využití gradientové eluce, a to z důvodu nutnosti udržení stabilního indexu lomu mobilní fáze. Další nevýhodou je závislost odezvy detektoru na teplotě. Její změny zapříčiní změny v indexu lomu mobilní fáze. Z toho důvodu je nutné udržovat konstantní teplotu měřící cely [3] [6].

Hmotnostně spektrometrické detektory (MS detektory)

Tento typ detektorů je podrobněji uveden v následující kapitole LC-MS.

2. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

V oblasti farmaceutického výzkumu našla hmotnostní spektrometrie své uplatnění zejména v kombinaci s vysokoúčinnou případně ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Toto spojení přináší kombinaci vysoké separační účinnosti HPLC a citlivé MS detekce. Kombinace je výhodná zejména pro analýzu velmi komplexních vzorků, jako jsou například biologické tekutiny. LC-MS umožňuje identifikaci a kvantitativní hodnocení léčiv a jejich metabolitů, nečistot a rozkladných produktů [3] [4]. MS detektory jsou citlivé, specifické a schopné poskytovat strukturní údaje o analyzované látce [3].

Analýza se uskutečňuje ve čtyřech krocích:

- přivedení vzorku
- ionizace- dochází k převedení neutrálních molekul na ionty
- rozdělení iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje
- detekce separovaných iontů [4]

Při LC-MS dochází k účasti mobilní fáze v procesu ionizace, a proto existují určitá omezení ve výběru jejích složek. Vhodná jsou těkavá rozpouštědla (například methanol, acetonitril) s přidanými těkavými aditivami (kys. mravenčí, octová, octan nebo mravenčan amonný). Aditiva by měla být přítomna pouze v nízkých koncentracích (<1%) [3]. V případě vyšších koncentrací aditiv by mohlo dojít k soutěži analytu a aditiva o získaný náboj a tím pádem ke snížení účinnosti ionizace analytu a ke snížení citlivosti detekce. Průtok mobilní fáze bývá zpravidla 1 μ l/min až 1 ml/min při využití ionizace elektrosprejem. Je-li použita chemická ionizace za atmosférického tlaku, může průtok dosahovat i hodnot vyšších než 1 ml/min [1].

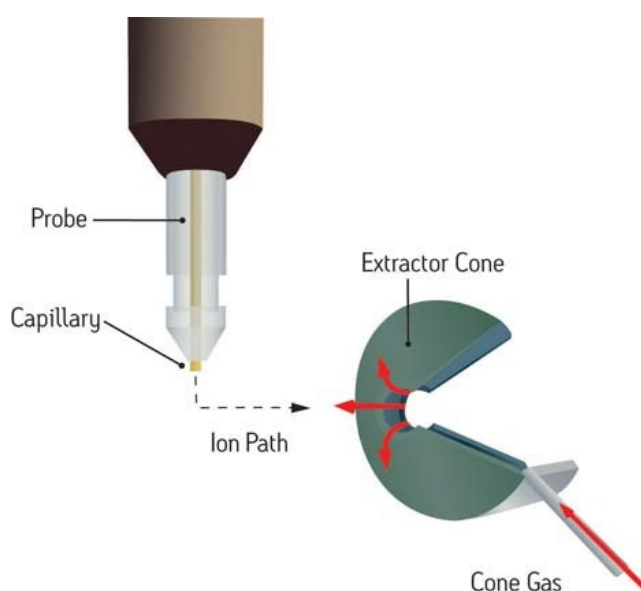
2.1 Ionizace

Existuje celá řada ionizačních technik. Mezi nejpoužívanější metody ve spojení s HPLC patří ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization, ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI), případně fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure photoionization, APPI).

Zmíněné metody patří mezi tzv. měkké ionizační techniky. Při použití těchto techniky není fragmentace tak rozsáhlá, jako při použití tvrdých ionizačních technik, mezi které patří například elektronová ionizace (Electron impact, EI), která se však používá ve spojení s plynovou chromatografií. Volba metody ionizace závisí z velké části na polaritě a teplotní stabilitě analyzované látky. ESI je preferována v případě polárních a iontových molekul a může být použita v případě malých molekul i velkých biomolekul. APCI je naopak používána především pro ionizaci méně polárních látek a malých molekul [7]. APCI není možné použít pro ionizaci termolabilních analytů [9]. Metoda APPI je využívána zejména v případě nepolárních látek s nižší molekulovou hmotností [3].

2.1.1 Ionizace elektrosprejem

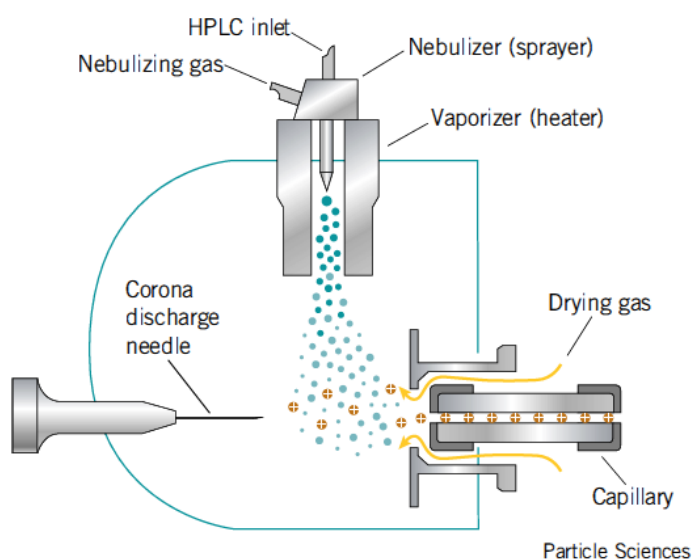
Při ionizaci elektrosprejem (Obr. 3) je na elektrodu aplikováno elektrické pole o napětí 2 - 5 kV. Dochází k tvorbě nabitých kapek na špičce elektrody (kapiláry), do které je přiváděna mobilní fáze s analyty. Působením proudu plynu dochází k odpařování kapaliny a tím pádem i ke zvýšení povrchového náboje kapiček. V určité chvíli dojde k explozi kapek a k jejich zmenšení až na velikost, kdy již dochází k uvolňování iontů z povrchu do plynné fáze [10]. Ty jsou poté odváděny do prostoru s vakuem, aby byly dále detekovány. Produktem jsou především $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^+$ ionty [6].



Obr. 3: Schematické znázornění ionizace elektrosprejem, převzato z [11]

2.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku (Obr. 4) je mobilní fáze s analytem přiváděna vyhřívanou kapilárou (jedná se o přívod mobilní fáze z kapalinového chromatografu), kolem které proudí dusík. Drobné kapičky vzorku jsou přeměněny v plynnou fázi. Molekuly mobilní fáze jsou ionizovány a jejich prostřednictvím dochází následně k ionizaci analytu. [11] [6].



Obr. 4: Schematické znázornění chemické ionizace za atmosférického tlaku, převzato z [12]

2.1.3 Fotoionizace za atmosférického tlaku

Postup fotoionizace za atmosférického tlaku využívá k ionizaci energii UV záření [4]. Tato ionizační technika je s výhodou používána k analýze látek, které nemohou být efektivně ionizovány pomocí ESI nebo APCI [4].

2.2 Analyzátoary

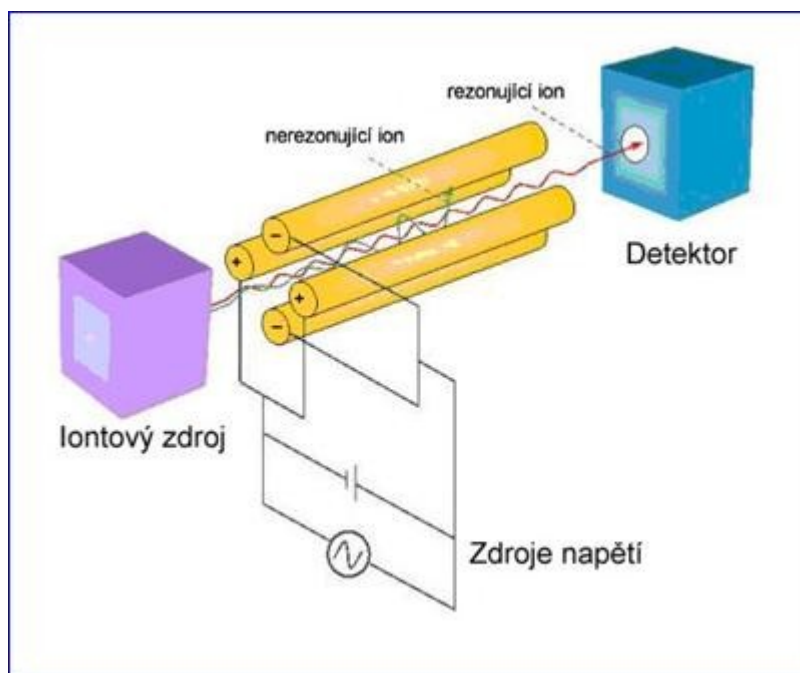
Základní funkcí analyzátoary je rozdělování iontů dle jejich poměru m/z a dále pak jejich urychlení a fokusace [3] [4]. Tento krok se odehrává za vakua [10].

Mezi běžně používané analyzátoři patří:

- kvadrupól a trojitý kvadrupól
- průletový analyzátor
- iontová past
- iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
- orbitrap (elektrostatická iontová past) [4] [10].

2.2.1 Kvadrupól (Quadrupole, Q) a trojitý kvadrupól (Triple quadrupole, QqQ)

Tento analyzátor (Obr. 5) se skládá ze čtyř tyčí, na které je přiváděno střídavé a stejnosměrné napětí. Dle velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí se v danou chvíli ionty s určitým poměrem hmotnosti a náboje pohybují přímo k detektoru. Ionty, které nemají stabilní trajektorii, jsou ze své cesty vychýleny a na detektor nedopadají. Analyzátor lze nastavit do módu skenovacího, kdy je možné proměřit v krátkém čase částice o všech hodnotách m/z . Anebo může pracovat v módu SIM (Selected ion monitoring), což znamená, že je nastaven tak, aby prošly jen částice s daným poměrem m/z [10].



Obr. 5: Schematické znázornění kvadrupólového analyzátoru, převzato z [13]

Kvadrupól může být také použit ve spojení s dalšími MS analyzátory [4].

Trojité kvadrupól se skládá ze tří kvadrupólů zapojených v sérii. Do prvního kvadrupólu vstupují ionty z iontového zdroje. Zde dochází k výběru tzv. prekurzorového iontu. Ostatní ionty dále neprocházejí. Prekurzorové ionty prostupují do druhého kvadrupólu, (fungujícího jako kolizní cela), kde dochází k jejich srážkám s molekulami dusíku nebo argonu. Dochází tak ke vzniku produktových iontů, které jsou následně měřeny ve třetím kvadrupólu. Výhodou trojitého kvadrupólu je vysoká selektivita a citlivost. Je využíván zejména pro kvantitativní analýzy [6].

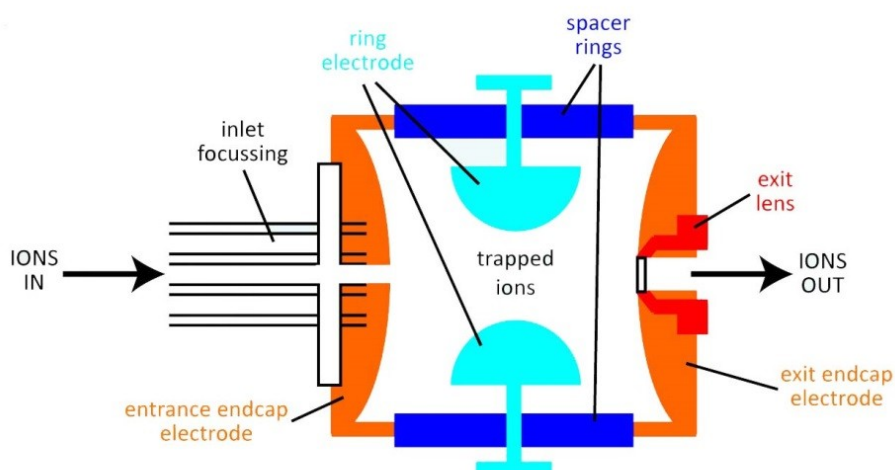
2.2.2 Průletový analyzátor (Time of flight, TOF)

V tomto případě dochází působením elektrického pole k akceleraci iontů do vakuové trubice směrem k detektoru [10]. Všechny urychlené ionty budou mít stejnou hodnotu kinetické energie [6]. Čas, kdy ion dosáhne detektoru je tedy závislý na poměru jeho m/z . Těžší ionty budou putovat k detektoru déle, zatímco lehčí je dosáhnou dříve [4].

2.2.3 Iontová past (Ion trap, IT)

Podobně jako u kvadrupólových analyzátorů je v případě iontové pasti (Obr. 6) přítomno oscilující elektrické pole. Analyzátor je složen ze tří elektrod (prstencová a dvě koncové). Rozdílná napětí jsou aplikována na elektrody, díky čemuž je vytvořen prostor, ve kterém jsou ionty drženy. V tomto poli se pohybují po stabilních trajektoriích s frekvencí závislou na jejich poměru m/z . Se zvýšením hodnoty napětí se pohyb iontů stane nestabilní a jsou tak vypuzeny z cely a následně detekovány [4] [7] [14] [6].

Iontová past poskytuje možnost selektivně zadržet ionty určitého poměru m/z (ostatní jsou vypuzeny z pasti), které mohou být dále fragmentovány [4] [7] [14].



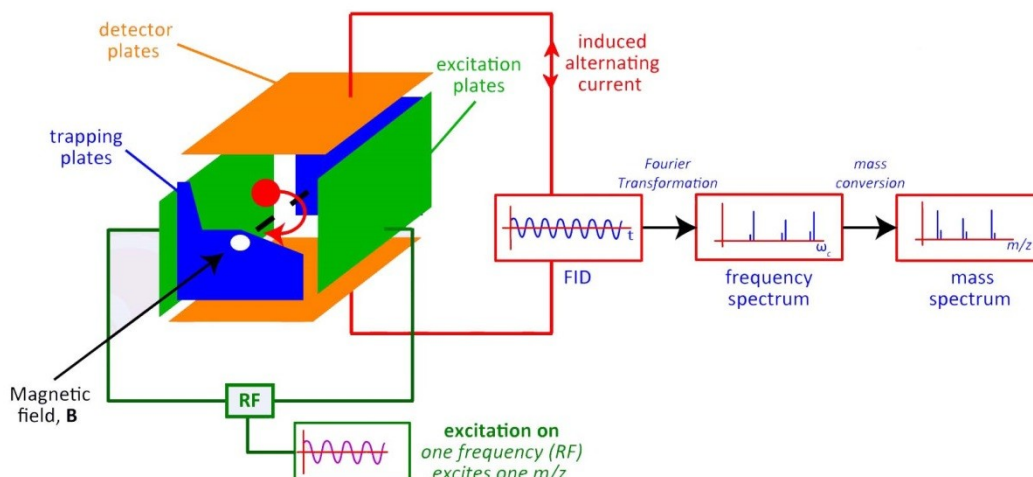
Obr. 6: Schematické znázornění iontové pasti,
převzato z [14]

2.2.4 Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier-transformation ion cyclotron resonance, FT-ICR)

Princip ICR-FT (Obr. 7) je založen na pohybu elektronů v kombinaci magnetického a elektrického pole [3].

Ionty vstupují do modifikované cyklotronové cely (přítomno vakuum $10^{-9} - 10^{-10}$ torrů), kde se začnou pohybovat v magnetickém poli po kruhových trajektoriích s cyklotronovou frekvencí, která odpovídá jejich poměru m/z . Tato frekvence nezávisí na kinetické energii iontu. V opuštění prostoru cely iontům brání desky na jejich koncích. V tomto kroku je poloměr trajektorie pohybu iontů příliš malý na to, aby byl zaznamenán signál. Po excitaci impulsem vysokofrekvenčního napětí přivedeného na excitační desky se ionty začnou pohybovat po cyklotronových orbitách s větším poloměrem. Fourierova transformace slouží k následnému zpracování signálu na frekvenci, která je dále převedena na hmotnostní spektrum. Cella je chlazená tekutým dusíkem a heliem na hodnoty teploty blízké absolutní nule.

Tato technika je nedestruktivní a patří k nejcitlivějším metodám detekce iontů s velmi vysokým rozlišením (vyšší než 10^7) [4] [7] [15].



Obr. 7: Schematické znázornění
iontově cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací,
převzato z [15]

2.2.5 Orbitrap

Orbitrap využívá k zadržení elektronů elektrostatické pole. Elektrony se tedy pohybují kolem centrální elektrody. Oscilují s frekvencí odpovídající jejich hmotnosti. Signál je zpracováván pomocí Fourierovy transformace [16].

Hmotnostní analyzátoři mohou být použity i ve spojení, za vzniku tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Své uplatnění nachází zejména v analýze složitých biologických vzorků.

Dalším trendem v oblasti MS analýzy je použití hybridních analyzátořů. Jde o spojení dvou analyzátořů s cílem kombinovat jejich nejlepší vlastnosti. Využívá se například spojení kvadrupólu a průletového analyzátořu (Q-TOF), lineární iontové pasti a ICR a další [3].

2.3 Detektory

Úkolem detektoru je zaznamenat ionty a zpracovat signál. Jednu skupinu detektorů tvoří ty, které zaznamenají všechny ionty nezávisle na jejich m/z . Tento způsob je založen na měření elektrického proudu vzniklého při srážce iontu s dynodou. Následně pak dochází k zesílení pomocí elektronového násobiče.

Druhá skupina detektorů je tvořena těmi, které zaznamenávají ionty i ve vztahu k m/z . Patří sem iontově cyklotronová rezonance a orbitrap. Jsou kombinací analyzátoru a detektoru v téže měřící cele [10].

2.4 Vybrané operační módy

Hmotnostní spektrometr může pracovat v různých operačních módech. Mezi nejpoužívanější patří sken celého spektra (Full scan), selektivní záznam iontu (Selected ion monitoring, SIM) a selektivní záznam produktových iontů (Selected reaction monitoring, SRM).

V módu skenu celého spektra přístroj zaznamenává kompletní hmotnostní spektra v daném rozsahu m/z . Nevýhodou tohoto módu je obtížnější detekce složek vzorku, které jsou zastoupeny ve velmi malých koncentracích. V takovémto případě je běžně používán mód SIM. V něm je měřen signál jednoho nebo několika vybraných iontů. SRM je mód používán zejména ve spojení s trojitým kvadrupólem pro kvantitativní stanovení. Dochází při něm k záznamu fragmentů zvoleného iontu [3] [6].

3. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-high-performance liquid chromatography, UHPLC)

Snahy o dosažení rychlejší separace vedly k vývoji několika trendů v oblasti HPLC. Jedním z nich je použití částic sorbentu menších než 2 μm v kratších kolonách. Použití takto malých částic s sebou však přináší i výrazný nárůst zpětného tlaku v systému, a tím pádem i určité konstrukční požadavky na přístroj, aby byl schopen za těchto tlaků pracovat. Tlakový limit v běžné vysokoúčinné kapalinové chromatografii se pohybuje v hodnotách 30 - 40 MPa. UHPLC přístroje mohou pracovat při tlaku 100 MPa (1000 barů) a více [3] [4].

Byly popsány dva typy vysokoúčinné kapalinové chromatografie za vysokého tlaku. VHPLC (Very-high pressure LC) pracující při tlaku 40 - 150 MPa (400 - 1500 barů) a UHPLC, kde tlak dosahuje hodnoty nad 150 MPa (1500 barů). Běžně však vše, co přesahuje tlakový limit HPLC (tedy 400 barů) je nazýváno UHPLC [4].

S použitím menších částic sorbentu je dosaženo vyšší účinnosti separace. Platí přímá úměra mezi zpětným tlakem na koloně a délkou kolony, nepřímá úměra k velikosti částic sorbentu a průměru kolony [5].

Při práci za ultra-vysokých tlaků musí být splněna řada požadavků. Čerpadlo i dávkovací systém musí být dostatečně robustní a musí být zajištěna přesnost při dávkování velmi malých objemů. Rovněž i měrná cela detektoru by měla mít malý objem. Vzhledem ke zkrácení doby analýzy a ke zvýšení účinnosti by detektor měl být schopen zaznamenávat data s vysokou frekvencí. Dále pak mechanická odolnost stacionární fáze vůči vysokým hodnotám tlaku a další [3] [4].

Kolony pro UHPLC jsou dlouhé 50 - 150 mm o vnitřním průměru zpravidla 2,1 mm. Naplněné jsou částicemi o velikosti 1,5 - 2,0 μm [3]. Jako materiál sorbentu jsou dostupné: C_{18} , C_8 , C_{18} se zabudovanou karbamátovou funkční skupinou (Shield RP 18) a fenylové stacionární fáze [5].

4. Chromatogram

Grafickým znázorněním průběhu separace je chromatogram. Záznam je tvořen sérií píků vycházejících ze základní linie. Každý pík představuje jinou složku analyzovaného vzorku. Čistá mobilní fáze pak tvoří základní linii [17].

Předpokladem úspěšné analýzy jsou takové chromatografické podmínky, za kterých jsou jednotlivé píky ostré, symetrické a rozdělené nejlépe až na úroveň základní linie.

V HPLC je kvalitativní charakteristika retenční (eluční) čas a kvantitativní charakteristika je plocha (případně výška) píku [2].

5. Kvantitativní vyhodnocení výsledků

Kvantitativní hodnocení vychází ze vztahu mezi množstvím analytu a plochou (případně výškou) píku. Zásadním krokem je přesné určení plochy (výšky) píku. Další podmínkou je použití stejné metody pro vyhodnocení plochy (výšky) píku standardu i stanovovaného analytu [1].

5.1 Metoda vnějšího standardu

Často používanou metodou kvantitativního vyhodnocení je metoda kalibrační křivky, také označována jako metoda vnějšího standardu (External standard method). Metoda zahrnuje sestavení kalibrační přímky s využitím vnějších standardů analytu. Přesní objemy vzorků o známých koncentracích (zpravidla 5 - 7 kalibračních standardů) je analyzováno. Jelikož jsou upravovány a měřeny odděleně od neznámého vzorku, tak jsou nazývány „externí standardy“. Následně je sestavena kalibrační přímka, pro kterou lze v případě lineární funkce (nejvýhodnější) uvést vztah:

$$Y = a + bX$$

kde Y je odezva analytu, X je koncentrace analytu, a je posun na ose y, b je směrnice přímky.

Koncentraci X pak lze vyjádřit jako $X = (Y - a) / b$. [1] [8].

V případě nelineární funkce je třeba většího množství standardů a postup je více náchylný k chybám, z tohoto důvodu je využívána pouze v případě chybějící alternativy [8].

5.2 Metoda vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu (Internal standard method) spočívá v přidavku daného objemu roztoku vnitřního standardu ke vzorku i k roztoku standardu [1] [2]. Na vnitřní standard jsou kladeny požadavky chemické inertnosti, eluce v blízkosti píku stanovovaného analytu, podobná koncentrace a tedy i podobná odezva detektoru [2] [6]. V případě LC-MS analýzy je vhodným vnitřním standardem izotopicky značený analyt. Takto značené vnitřní standardy jsou však poněkud finančně náročné [6].

Jedna z variant metody vnitřního standardu je metoda přímého porovnání. Druhou variantou je metoda kalibrační křivky [1].

5.3 Metoda standardního přidavku

Dalším způsobem kvantitativního vyhodnocení naměřených dat je metoda přidavku standardu (Standard addition method), kdy dochází k porovnání plochy píku vzorku s plochou píku vzorku s přidavkem známého množství standardu stanovované látky. Nejprve se provádí analýza přesného objemu vzorku o neznámé koncentraci a poté se dávkuje směs vzorku se známým přidavkem standardu. Metodu lze provést s jedním přidavkem standardu, s více přidavky standardu, či v jiných variantách [1].

5.4 Metoda vnitřní normalizace

Metoda vnitřní normalizace se provádí pomocí jednoho nástřiku, kdy na základě ploch píků chromatogramu je pak vypočítáno procentuální zastoupení jednotlivých analytů [1].

6. Úprava biologických vzorků

Důležitou součástí analýzy je úprava vzorku. Cílem je získat vzorek, který obsahuje co nejméně balastních látek, které se sledovaným analytem mohou interferovat, či mohou poškodit kolonu. Úprava rovněž umožňuje například koncentrovat analyzovaný vzorek nebo analyt převést na vhodný derivát, který je pak možno snáze detekovat [18].

Proces úpravy vzorku je často více časově náročný než samotná HPLC separace a vyhodnocení získaných dat. Tento čas závisí zejména na složitosti a povaze vzorku. Každý krok úpravy může vnášet chybu, která pak ovlivní výsledky stanovení. Proto by také tento proces měl zahrnovat co nejméně kroků a mělo by být množství analytu kvantitativně zachováno [18] [1].

Mezi klasické postupy úpravy vzorku patří:

- precipitace proteinů
- extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid extraction)
- extrakce na tuhou fázi (Solid-phase extraction)
- přímá extrakce

Určité zjednodušení procesu úpravy vzorku představují moderní techniky. Výhodou těchto technik je nižší spotřeba rozpouštědel a analyzovaného vzorku, dále také vyšší selektivita a možnost automatizace. V některých případech rovněž dochází i ke snížení počtu kroků, ke zjednodušení a zkrácení časové náročnosti přípravy vzorku.

Mezi moderní techniky úpravy patří:

- mikroextrakce
- on-line extrakční techniky
- techniky s vysokou selektivitou [1]

6.1 Precipitace proteinů

Precipitace proteinů je velmi jednoduchá, rychlá a snadno optimalizovatelná metoda úpravy biologických vzorků. Lze ji použít samostatně nebo spolu s dalšími postupy.

Jako precipitační činidla se nejčastěji používají: organická rozpouštědla (acetonitril, ethanol, methanol), kyseliny (trichloroctová, chlorovodíková, m-fosforečná aj.), soli vícemocných iontů (síran zinečnatý) a síran amonný. Případně lze použít i různé kombinace deproteinačních činidel [1] [19].

K nevýhodám precipitace patří možnost přítomnosti zbytků nečistot v supernatantu, což může negativně ovlivnit následnou chromatografickou analýzu [1].

6.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid extraction, LLE)

LLE je způsob úpravy vzorku, kdy dochází k rozdělení analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jedna z fází je vodná (např. biologický vzorek) a druhá je tvořena s vodou nemísitelným organickým rozpouštědlem. Hydrofilní složky vzorku preferují vodnou fázi, zatímco hydrofobní budou převážně přítomny v organickém rozpouštědle [18]. Z organických rozpouštědel jsou používány například chloroform, ethylacetát a diethylether [8]. Výtěžnost analytu závisí na několika faktorech: rozdělovací koeficient, pH vodné fáze a pK_a analytu. V případě neutrálních analytů je výtěžnost nezávislá na pH vodné fáze. U kyselých nebo bazických analytů však pH hraje značnou roli, jelikož analyt je schopen přechodu do organické fáze v pouze neionizované podobě [6].

Výhodou této metody je její snadné provedení a nenáročnost vybavení [1]. Mezi nevýhody je možné zařadit vyšší spotřebu organických rozpouštědel a skutečnost, že získaný extrakt nemusí být kompatibilní s následnou analytickou metodou, a tudíž je v tomto případě nutné jej dále upravovat. Při extrakci může také dojít k nežádoucímu vzniku emulze, čemuž lze zabránit použitím vhodné dvojice rozpouštědel a opatrností při třepání [18] [1]. Proces LLE lze rovněž automatizovat.

Vylepšení této metody představuje LLE na tuhém nosiči. Extrakce probíhá na povrchu křemeliny, která tvoří náplň kolonky a plní funkci nosiče k navázání roztoku vzorku. Tato úprava představuje výhodu v odstranění tvorby emulzí a v snadnějším procesu automatizace [1].

6.3 Extrakce na tuhou fázi (Solid-phase extraction, SPE)

SPE je důležitou technikou úpravy vzorku před HPLC analýzou. Tato metoda je založena na principu interakce analytu s tuhou fází (sorbent extrakční kolonky) a

s kapalnou fází (analyzovaný vzorek) [1]. Afinita analytu k pevné fázi musí být větší než k matici vzorku. Adsorbovaný analyt je následně vymyt rozpouštědlem, k němuž má vyšší afinitu než k pevné fázi [8].

Zařízení pro SPE jsou dostupná v různých provedeních, a to jako kolonky, disky nebo vlákna. Nejvíce používané jsou kolonky, které jsou dostupné v široké škále velikostí a kapacit [18] [8]. Výběr vhodné kolonky závisí na vlastnostech analytu a matrice vzorku, povaze rozpouštědla, stupni požadované čistoty a charakteru hlavních nečistot. V současnosti je obsáhlé spektrum dostupných sorbentů zahrnující nepolární-oktadecyl (C_{18}), cyklohexyl, oktyl (C_8); polární- silikagel, fluorisil, diol aj.; iontově výměnné sorbenty a polymerní látky například PS-DVB (polystyren- divinylbenzen), které mají výhodu oproti silikagelovým sorbentům ve stabilitě při širším rozsahu pH [1] [8]. Dalšími dostupnými sorbenty jsou hydrofilně-lipofilní polymerní materiály (kopolymery polyvinylpyrrolidonu a cross-linked PS-DVB), sorbenty kombinující nepolární a iontově výměnné skupiny, molekulárně vtištěné polymery, imunosorbenty a porézní grafit [8].

Průběh SPE je složen z několika po sobě jdoucích kroků:

- aktivace sorbentu (kondicionování) a jeho příprava na interakci se vzorkem. Nejčastěji se k aktivaci používá methanol.
- ekvilibrace sorbentu vodou
- nanesení vzorku
- promytí rozpouštědlem o nízké eluční síle, aby došlo k vymytí balastů a nikoliv analytu. Používá se voda nebo pufr.
- eluce analytu použitím vhodného rozpouštědla kompatibilního s konečnou analytickou metodou [1] [4] [8].

Průtok kapalin přes kolonku může být usnadněn aplikací vakua (odtok kolonky), tlakem v oblasti přívodu na kolonku a centrifugací [8].

K hlavním důvodům, proč použít SPE v procesu úpravy vzorku patří, tak jako u ostatních metod úpravy vzorku, potřeba odstranit látky, které by mohly poškodit kolonu (např. hydrofobní substance, jako oleje, tuky lze odstranit ze vzorku pomocí RP-

SPE). Dále může být SPE využita také k výměně rozpouštědla za takové, které bude kompatibilní s následnou HPLC analýzou. V neposlední řadě pak lze zmínit i možnost in situ derivatizace, a také způsob uchování a transportu vzorku [18].

SPE má mnoho nesporných výhod, jako například: relativně nižší spotřeba organických rozpouštědel, vyšší výtěžnost analytu, snazší proces automatizace postupu, jednodušší získání frakce analytu, účinné zkoncentrování, pohodlnější manuální manipulace a možnost on-line i off-line provedení [18] [1].

Mezi nevýhody SPE lze zařadit variabilitu kolonek (nevýhoda z pohledu reprodukovatelnosti postupu), vyšší finanční náročnost díky zpravidla jednorázovému využití kolonky, a také irreverzibilní adsorpci některých analytů na povrch kolonky [18] [1].

7. Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (Multiple myeloma) je maligní onemocnění vycházející z lymfocytární tkáně a představující asi 10 % ze všech hematologických malignit. Nicméně i přes to se jedná spíše o méně časté onemocnění, tvořící zhruba 1 % všech onkologických onemocnění [20-23]. Věk pacientů se při stanovení diagnózy pohybuje okolo 62 let. Nepatrně vyšší incidence je u mužů.

Na vzniku onemocnění se pravděpodobně podílí mutace na úrovni lymfocytů, které poté zrají v patologické plazmocyty, ty pak produkují četné cytokiny a způsobují projevy onemocnění. Při nemoci dochází k infiltraci kostní dřeně nádorovými buňkami a postupně pak k potlačení krvetvorby. Rovněž produkty plazmocytů aktivují osteoklasty, což má za následek rozvoj těžké osteoporózy. Pro toto onemocnění jsou tedy charakteristická osteolytická ložiska a dále pak přítomnost monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig, tzv. paraprotein) v krvi a/nebo v moči [20-23].

Mezi nejčastější příznaky patří stupňující se bolesti kostí (zejména páteře, kyčlí a dlouhých kostí), osteoporóza, anémie, vysoké hodnoty sedimentace, únava a časté infekce (v důsledku poruchy B-buněčné imunity a později i T-buněčné imunity). Dále se pak vyskytuje například proteinurie a hyperkalcemie. M-Ig se může vázat na určité antigeny a způsobovat například neuropatie a nefropatie [20-23].

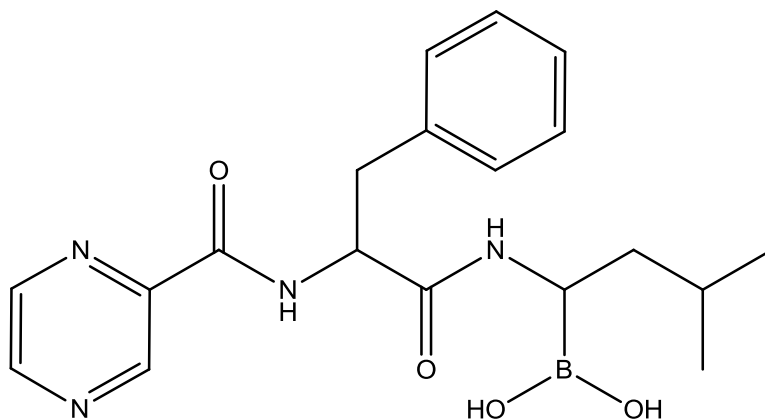
Zahájení léčby se neprovádí okamžitě při stanovení diagnózy asymptomatického onemocnění, ale až poté, co je prokázána přítomnost alespoň jednoho poškození tkání či dysfunkce vzniklé v důsledku nemoci. Jedná se o tzv. kritéria CRAB, tedy: hyperkalcemie (calcium level increased), renální insuficience, anémie a postižení kostí (bone lesions) [20] [23-24]. Předčasná chemoterapeutická léčba asymptomatické formy nemoci nevede k prodloužení doby přežití pacienta [25].

Terapie mnohočetného myelomu má za cíl ničení patologických buněk a léčbu komplikací vzniklých v důsledku onemocnění [26]. Dříve byla za standard léčby považována kombinace prednisonu s melfalanem. Podobně jako melfalan lze použít cyklofosfamid, který je méně myelotoxický a lze jej na rozdíl od melfalanu použít před autologní transplantací buněk [25]. Mezi nová nadějná léčiva patří například

karfilzomib, bortezomib a ixazomib. Nicméně se bohužel stále jedná o nevléčitelné onemocnění s možností relapsu [27] [25].

Důležitá je i podpůrná terapie komplikací onemocnění samotného, ale i jeho léčby. Lze sem zařadit podávání bisfosfonátů, terapii bolesti, kombinací nesteroidních analgetik s opioidy, dále pak léčbu infekcí a případných fraktur [26].

7.1 Bortezomib



Obr. 8: Vzorec bortezomibu

Bortezomib (Obr. 8) - [N-(2,3-pyrazin)karbonyl-L-fenylalanin-L-leucin boritá kyselina] (PS-341) je léčivo patřící do skupiny inhibitorů proteazomu. Bortezomib působí reverzibilní inhibicí 26S jednotky proteazomu. Toto léčivo je indikováno u pacientů s relabujícím mnohočetným myelomem, jejichž onemocnění je rezistentní proti jiným léčivům [28].

Výhodou bortezomibu je rychlý nástup léčebné odpovědi a zlepšení renálních funkcí při jejich selhávání z důvodu onemocnění.

Mezi časté nežádoucí účinky patří pokles trombocytů (jejich počet se po skončení aplikace během týdne vrací k původním hodnotám) a periferní neuropatie, která vzniká i v důsledku samotného onemocnění [22].

Bylo publikováno mnoho studií zabývajících se analýzou a hodnocením bortezomibu. Jako příklad byly vybrány následující studie:

Ve studii provedené Theresou Pekol a kol. byla provedena identifikace metabolitů v plasmě odebrané pacientům, kterým byla i.v. aplikována dávka bortezomibu ($1,6 - 2,0 \text{ mg/m}^2$) a dále pak *in vitro* studie metabolitů z lidských jaterních mikrozomů. K analýze vzorků byla použita kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Ke studii metabolitů v plazmě byla použita YMC ODS-AQ kolona ($3 \mu\text{m}$, $2 \times 100 \text{ mm}$). Mobilní fáze byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí jako složky A a 0,1% kyseliny mravenčí ve směsi acetonitrilu a vody (90:10), jako složky B. Byla využita ionizace elektrosprejem. Ve studii metabolitů z lidských jaterních mikrozomů byla použita C_{18} kolona ($5 \mu\text{m}$, $3,8 \times 150 \text{ mm}$). Mobilní fáze byla složena z 0,05% roztoku kyseliny trifluoroctové, jako složka A a 0,05% roztoku kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu, jako složka B. Byla použita gradientová eluce. K analýze byl použit UV/VIS detektor (254 nm).

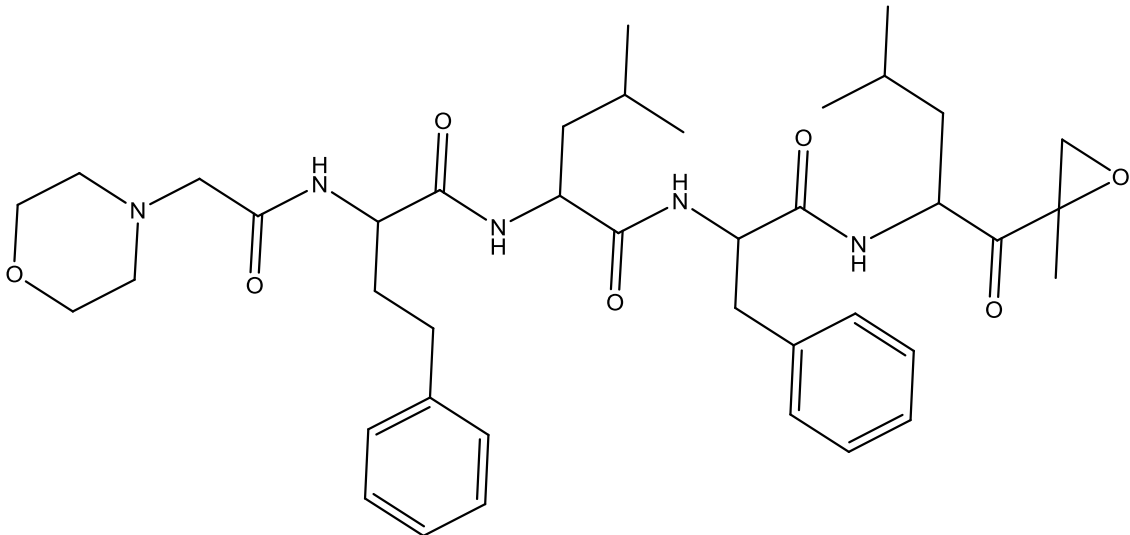
Hlavní způsob metabolizace v plazmě byla oxidativní deboronace za vzniku dvou diastereomerických karbinolamidových metabolitů, u nichž dochází následně k degradaci na příslušné amidy. Rovněž byla popsána hydrolyza těchto amidových derivátů na karboxylové kyseliny. Dále pak byly popsány i další metabolity. Profil metabolitů bortezomibu v jaterních mikrozomech byl podobný, jako v plazmě [28].

Ve studii provedené Chang Shu a kol. byla vytvořena a validována LC-MS/MS metoda pro současné hodnocení šesti běžně užívaných léčiv v terapii mnohočetného myelomu. Jednalo se o léčiva: bortezomib, thalidomid, cyklofosamid, lenalidomid, dexamethason a adriamycin. Jako stacionární fáze byla zvolena BEH C_{18} kolona ($2,5 \mu\text{m}$, $2,1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$). Anorganickou složkou mobilní fáze byl 0,1% roztok kyseliny mravenčí a organickou složku tvořil acetonitril. Byla využita gradientová eluce. Hmotnostní analyzátor byl tvořen trojitým kvadrupólem a ionizace byla prováděna elektrosprejem. Pro úpravu vzorku byla použita metoda SPE [29].

Studie, kterou provedl Jannick Clemens a kol. popisuje vývoj a validaci metody pro kvantifikaci bortezomibu v myelomových buňkách a médiu. K analýze byla využita UHPLC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Jako stacionární fáze byla použita kolona BEH C_{18} ($1,7 \mu\text{m}$, $2,1 \times 50 \text{ mm}$). Mobilní fáze se skládala z 0,01% HCOOH a 5 % acetonitrilu, jako složka A a acetonitril s 0,01 % HCOOH jako složka B. Byla využita

gradientová eluce. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min. Byla zvolena ionizace elektrosprejem. K úpravě vzorků byly použity precipitace proteinů a metoda extrakce z kapaliny do kapaliny [30].

7.2 Karfilzomib



Obr. 9: Vzorec karfilzomibu

Karfilzomib (Obr. 9) - [(2*S*)-*N*-[(*S*)-1-[(*S*)-4-methyl-1-[(*R*)-2-methyloxiran-2-yl]-1-oxopentan-2-ylkarbamoyl]-2-fenylethyl]-2-[(*S*)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenylbutanamido]-4-methylpentanamid, také označován jako PR-171 je tetrapeptidový epoxyketonový derivát epoxomycinu, patřící do skupiny inhibitorů proteazomu druhé generace. [31] [12]. Svou chemickou strukturou i mechanismem účinku se liší od bortezomibu. Karfilzomib je na rozdíl od bortezomibu ireverzibilní inhibitor a váže se na jiné místo proteazomu [32].

Karfilzomib podléhá značné a rychlé metabolizaci za vzniku metabolitů bez známé biologické aktivity [33]. Proces probíhá extrahepatálně. Na rozdíl od bortezomibu zde cytochrom P450 příliš nehraje roli a plazmatické hladiny nejsou závislé na funkčním stavu jater pacienta [32] [34]. Hlavní metabolické cesty jsou hydrolýza epoxidové skupiny a štěpení peptidázou za vzniku fragmentů a diolu karfilzomibu, jako hlavních produktů [33]. Ve formě metabolitů dochází poté k vyloučení léčiva močí. Jen méně než 1 % podané dávky je vyloučeno jako parentní

látka v moči a feces [34] [33]. Plazmatický poločas karfilzomibu je 15 - 30 minut [32]. Clearance není ovlivněna funkcí ledvin pacienta [33].

Mezi běžné nežádoucí účinky léčby patří: únava, nauzea a poruchy krvevotvorby. Pro toto léčivo je charakteristický nízký výskyt periferní neuropatie, jako nežádoucího účinku léčby.

Někteří pacienti rezistentní na léčbu bortezomibem mohou být úspěšně léčeni karfilzomibem a naopak, při rezistenci na karfilzomib může zůstat citlivost na bortezomib [32].

Toto léčivo má potenciál využití i při léčbě dalších onemocnění, jako například Waldenströмова makroglobulinemie, lymfom, amyloidosa a další [32].

Ze studií zabývajících se hodnocením karfilzomibu v biologickém materiálu byla jako příklad vybrána následující:

Studie provedená autory Yang a kol. popisuje s využitím LC-MS/MS identitu a kvantitativní profil metabolitů i karfilzomibu v plazmě, moči a žluči po aplikaci léčiva potkanům.

Pro analýzu profilu metabolitů byla využita kolona C₁₈ (150 x 4,6 mm, 3 μm). Jako mobilní fáze byl použit 0,4% roztok kyseliny mravenčí s přídavkem hydroxidu amonného k nastavení hodnoty pH na 3,2. Organická složka mobilní fáze byl acetonitril. Byla použita gradientová eluce.

Ke kvantitativnímu hodnocení karfilzomibu a metabolitů byla využita C₁₈ kolona (2,1 x 50 mm, 3,5 μm). Mobilní fáze se skládala z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí a methanolu. Byla využita gradientová eluce [31].

Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout pilotní chromatografické podmínky pro LC-MS analýzu karfilzomibu a bortezomibu v plazmě a otestovat různé metody extrakce těchto látek z plazmy.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8. Chemikálie, přístroje, pomůcky

8.1 Chemikálie

Bortezomib, Euroasian Chemicals, Indie

Karfilzomib, Euroasian Chemicals, Indie

Acetonitril, Sigma Aldrich, Česká republika

Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich, Česká republika

Methanol, Sigma Aldrich, Česká republika

Mravenčan amonný, Sigma Aldrich, Česká republika

Ultračistá voda, Millipore purification systém, Německo

8.2 Biologický materiál

Králičí plasma, Zoo servis Dvůr Králové na d Labem, Česká republika

8.3 Přístroje, pomůcky

Analytické váhy, Helago, Česká republika

Centrifuga IEC CL31R Multispeed, Thermo electron corporation, USA

Termomixer, Eppendorf, Německo

Ultrazvuková lázeň, Kraitex, Slovenská republika

Vortex mixer, Wizard scientifica, Itálie

Laboratorní sklo

Mikrozkumavky, Eppendorf, Německo

Mikropipety, Eppendorf, Německo

Vialky a inzerty pro HPLC

Hybrid SPE, Supelco, Německo

Phree Phospholipid Removal Plates, Phenomenex, USA

9. Příprava zásobních roztoků

Pro následné analýzy byly připraveny zásobní roztoky karfilzomibu a bortezomibu o koncentraci 1 mg/ml. Jednotlivé substance byly naváženy na analytických vahách a rozpuštěny v acetonitrilu. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě 2 – 8 °C. Ze zásobních roztoků byly dále v čas potřeby naředěny pracovní roztoky o potřebných koncentracích.

10. Instrumentace a chromatografické podmínky

HPLC sestava Prominence (Shimadzu, Japonsko) - složená z: 20 A3 degasseru, dvou LC-20AD pump, SIL-20 AC autosampleru, CTO-20 AC kolonového prostoru, CBM-20 AD komunikačního modulu, PC s chromatografickým programem LC Solution 1.22 SP1.

Chromatografická kolona: Ascentis C₁₈ 10 x 3 mm, 3 μm, (Supelco, Německo)

Průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min

Teplota na koloně: 25 °C

Objem vzorku nastříknutého na kolonu: 10 μl

Hmotnostní spektrometr LCQ Advantage MAX s iontovou pastí (ESI⁺ ionizace) (ThermoFisher, USA)

Nastavení hmotnostního spektrometru: napětí 4V, teplota iontového zdroje 200 °C, průtok plynu: 20/40 arbitrárních jednotek.

Kolizní energie v případě analýzy karfilzomibu: 28 %

Kolizní energie v případě analýzy bortezomibu: 30 %

Karfilzomib SRM přechody: 548,25 → 549,75; 565,25 → 566,75

Bortezomib SRM přechody: 225,50 → 226,50; 252,50 → 253,50

11. Analýza karfilzomibu

11.1 Výběr mobilní fáze

V případě mobilní fáze byly testovány jako vodná složka (složka A) voda, HCOOH 0,01%, HCOOH 0,005% a 2mM roztok mravenčanu amonného. Jako organická složka (složka B) byl použit acetonitril. V případě vody a acetonitrilu byl testován různý poměr obou složek (70 % nebo 80 % B). V případě ostatních mobilních fází bylo použito vždy 80 % B.

Pro vývoj metody byl připraven vzorek karfilzomibu naředěním ze zásobního roztoku 50% acetonitrilem na koncentraci 0,5 µg/ml.

Jako nejvhodnější mobilní fáze bylo vybráno složení voda a acetonitril s obsahem 80% B.

11.2 Ověření linearity

Pro ověření linearity byly ze zásobního roztoku naředěny pracovní roztoky o koncentracích karfilzomibu: 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 400ng/ml a 500 ng/ml. Roztoky byly ředěny 90% acetonitrilem.

11.3 Volba vhodného precipitačního činidla

Ze zásobního roztoku karfilzomibu byl naředěním acetonitrilem připraven pracovní roztok dané látky o koncentraci 2,5 µg/ml, který byl použit pro přípravu následujících vzorků.

Byla testována následující precipitační činidla: acetonitril, acetonitril s přídavkem 0,1 % HCOOH, acetonitril s přídavkem 0,01 % HCOOH, methanol, methanol s přídavkem 0,1 % HCOOH, methanol s přídavkem 0,01 % HCOOH

Pro výpočet výtěžnosti a „suprese“ byly připraveny následující vzorky:

1) Vzorek plazmy s karfilzomibem přidaným před úpravou:

do 50 µl plasmy byly přidány 2 µl pracovního roztoku karfilzomibu a vzorek byl intenzivně protřepán na vortexu. Následně bylo přidáno 250 µl precipitačního činidla a vzorek byl třepán 2 minuty na termomixeru za

laboratorní teploty. Následně byl vzorek centrifugován při 10 000 otáček po dobu 10 minut. Poté byl mikropipetou odebrán supernatant.

2) Porovnávací vzorek:

k 20 μl vody bylo přidáno 250 μl precipitačního činidla a poté 2 μl pracovního roztoku karfilzomibu. Vzorek byl třepán na termomixeru po dobu 2 minut.

3) Vzorek s přidavkem karfilzomibu po úpravě:

k 50 μl plasmy bylo přidáno 250 μl precipitačního činidla. Vzorek byl třepán na termomixeru a následně centrifugován při 10 000 otáček po dobu 10 minut. Byl odebrán supernatant a k němu přidány 2 μl pracovního roztoku karfilzomibu a vzorek byl promíchán.

Všechny vzorky byly připraveny 3 \times . Výtěžnost byla počítána porovnáním odezvy vzorků 1 a 3, „suprese“ porovnáním vzorků 3 a 2.

11.4 Ověření linearity v plazmě

Pro analýzu karfilzomibu v plazmě byly naředěním zásobního roztoku acetonitrilem připraveny pracovní roztoky o koncentracích 15 $\mu\text{g/ml}$, 7,5 $\mu\text{g/ml}$ a 3,75 $\mu\text{g/ml}$.

Byly připraveny vzorky plasmy o koncentracích: 26,25 ng/ml, 52,5 ng/ml, 112,5 ng/ml, 225 ng/ml, a 450 ng/ml.

Postup přípravy byl následující: k 50 μl plasmy bylo přidáno potřebné množství pracovního roztoku karfilzomibu. Vzorek byl promíchán na vortexu a následně bylo přidáno 250 μl precipitačního činidla (acetonitril s přidavkem 0,01 % HCOOH). Vzorek byl třepán dvě minuty na termomixeru a dále pak centrifugován při 10 000 otáček po dobu 10 minut. Odebraný supernatant byl analyzován.

Byly připraveny dvě série vzorků, z nichž byl každý vzorek nastříknut na kolonu třikrát.

12. Analýza bortezomibu

12.1 Výběr mobilní fáze

Při výběru mobilní fáze byly testovány jako vodná složka (složka A) voda, HCOOH 0,005%, HCOOH 0,01%, HCOOH 0,1%, 2mM roztok mravenčanu amonného a 1mM roztok mravenčanu amonného. Jako organická složka (složka B) byl použit acetonitril. Bylo použito vždy 65 % B.

Pro vývoj metody byl připraven vzorek bortezomibu naředěním ze zásobního roztoku 50% acetonitrilem na koncentraci 0,5 µg/ml.

Jako nejvhodnější mobilní fáze byla vybrána HCOOH 0,1% a acetonitril s obsahem 65 % B.

12.2 Ověření linearity

V případě analýzy bortezomibu byly připraveny pracovní roztoky o koncentracích: 7 ng/ml, 15 ng/ml, 31 ng/ml, 62 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml a 500 ng/ml. Roztoky byly ředěny 90% methanolem a každý pracovní roztok obsahoval přídavek 0,02 % kyseliny mravenčí. Roztoky byly připraveny metodou postupného ředění.

12.3 Volba vhodného precipitačního činidla

Ze zásobního roztoku bortezomibu byl připraven pracovní roztok o koncentraci bortezomibu 7,5 µg/ml, který byl použit pro přípravu následujících vzorků.

Byla testována následující precipitační činidla: acetonitril, acetonitril s přídávkem 0,1 % HCOOH, acetonitril s přídávkem 0,01 % HCOOH, methanol, methanol s přídávkem 0,1 % HCOOH, methanol s přídávkem 0,01 % HCOOH

Pro výpočet výtěžnosti a „suprese“ byly připraveny následující vzorky:

1) Vzorek plazmy s bortezomibem přidaným před úpravou:

k 50 µl plasmy byly přidány 2 µl pracovního roztoku bortezomibu a vzorek byl intenzivně protřepán na vortexu. Následně bylo přidáno 250 µl precipitačního

čínidla a vzorek byl třepán 2 minuty na termomixeru. Následovala centrifugace 10 000 otáček po dobu 10 minut a odběr supernatantu.

2) Porovnávací vzorek

k 20 μ l vody bylo přidáno 250 μ l precipitačního činidla a poté 2 μ l pracovního roztoku bortezomibu. Vzorek byl třepán na termomixeru po dobu 2 minut.

3) Vzorek s přidavkem bortezomibu po úpravě

k 50 μ l plasmy bylo přidáno 250 μ l precipitačního činidla. Vzorek byl třepán na termomixeru a následně centrifugován při 10 000 otáček po dobu 10 minut. Byl odebrán supernatant a k němu přidány 2 μ l pracovního roztoku bortezomibu a vzorek byl promíchán.

Všechny vzorky byly připraveny 3 \times . Výtěžnost byla počítána porovnáním odezvy vzorků 1 a 3, „suprese“ porovnáním vzorků 3 a 2.

12.4 Větší objem precipitačního činidla

Byl testován postup precipitace s větším objemem (500 μ l) precipitačního činidla (acetonitril s přidavkem 0,1 % HCOOH), při zachování stejného objemu plazmy (50 μ l). Pro hodnocení výtěžnosti a „suprese“ byly vzorky připraveny analogickým postupem, který již byl popsán výše.

12.5 Úprava vzorku pomocí hybridní SPE

Během tohoto experimentu bylo testováno použití dvou druhů kolonek pro odstranění fosfolipidů, tzv. Hybridní SPE (Supelco, Phenomenex).

Pracovní roztok bortezomibu byl naředěn ze zásobního roztoku acetonitrilem na koncentraci 7,5 μ g/ml. Vzorky plazmy byly nejprve precipitovány pomocí 500 μ l acetonitrilu s obsahem 0,1 % HCOOH. Poté byl supernatant nanesen na kolonky pro odstranění fosfolipidů, které byly předem aktivované methanolem.

Postup úpravy vzorků byl analogický k postupu úpravy vzorků při testování precipitačního činidla.

1) Vzorek plazmy s borteomibem přidaným před úpravou:

k 100 µl plasmy byly přidány 4 µl pracovního roztoku borteomibu a vzorek byl intenzivně protřepán na vortexu. Následně bylo přidáno 500 µl precipitačního činidla a vzorek byl třepán 2 minuty na termomixeru. Následovala centrifugace 10 000 otáček po dobu 10 minut a odběr supernatantu.

2) Porovnávací vzorek

k 20 µl vody bylo přidáno 500 µl precipitačního činidla a poté 4 µl pracovního roztoku borteomibu. Vzorek byl třepán na termomixeru po dobu 2 minut.

3) Vzorek s přídavkem borteomibu po úpravě

k 100 µl plasmy bylo přidáno 500 µl precipitačního činidla. Vzorek byl třepán na termomixeru a následně centrifugován při 10 000 otáček po dobu 10 minut. Byl odebrán supernatant, nanesen na kolonku a k němu přidány 4 µl pracovního roztoku borteomibu.

Pro každou kolonku byly připraveny dvě sady vzorků. Každý vzorek byl analyzován 3 x.

12.6 Ověření linearity v plazmě

Při ověření linearity byly naředěním zásobního roztoku připraveny pracovní roztoky borteomibu o koncentracích 15 µg/ml, 7,5 µg/ml a 3,75 µg/ml. Z těchto roztoků byl přidáván požadovaný objem do jednotlivých vzorků prázdné plazmy.

K ověření linearity byly připraveny vzorky plazmy o koncentracích: 52,5 ng/ml, 112,5 ng/ml, 225 ng/ml, 300 ng/ml, 450 ng/ml, 600 ng/ml, 750 ng/ml a 1050 ng/ml. Vzorky byly připraveny následujícím postupem: k 50 µl plasmy bylo přidáno požadované množství pracovního roztoku borteomibu. Vzorek byl promíchán na vortexu. Následně bylo přidáno 500 µl precipitačního činidla (acetonitril s přídavkem 0,1 % HCOOH) a vzorek byl třepán dvě minuty na termomixeru při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek centrifugován při 10 000 otáček po dobu 10 minut. Odebraný supernatant byl podroben analýze.

Byly připraveny dvě sady vzorků, z nichž každý vzorek byl nastříknut na kolonu 3 x. Vzorky byly analyzovány pomocí gradientové metody. Složka A byla 0,1% kyselina

mravenčí, složka B byl acetonitril. Profil použitého gradientu byl následující: 0 – 15 min. (30 – 70 % B), 15,0 – 15,1 (70 – 30% B), 15,1 – 20 min. (30 % B).

13. Výsledky a diskuze

13.1 Výběr mobilní fáze

Nejprve bylo potřeba nalézt vhodné složení mobilní fáze, při kterém by bylo dosaženo citlivé odezvy detektoru a relativně krátkého času analýzy. Z několika testovaných složení mobilní fáze se v případě analýzy **karfilzomibu** ukázala jako nejvhodnější mobilní fáze obsahující vodu a jako organickou složku acetonitril v poměru 20 : 80. Při tomto složení bylo dosaženo nejvyšší odezvy detektoru (Tabulka 1). K eluci karfilzomibu docházelo kolem 3,8 minuty a doba analýzy byla 6 minut (Obr. 10).

V případě analýzy **bortezomibu** bylo dosaženo nejlepší odezvy detektoru při použití mobilní fáze ve složení mravenčan amonný 2mM a acetonitril (v poměru 35 : 65). Relativní směrodatná odchylka opakovaných nástřiků (Tabulka 3) v tomto případě však byla o něco vyšší, než při použití mobilní fáze složené z 0,1% HCOOH a acetonitrilu, kdy rovněž docházelo k velmi dobré odezvě detektoru (Tabulka 2). Z tohoto důvodu bylo složení mobilní fáze zvoleno následující: 0,1% HCOOH a acetonitril v poměru 35 : 65. K eluci bortezomibu docházelo kolem 2,5 minuty a doba analýzy byla 5 minut (Obr. 11).

Karfilzomib 0,5 µg/ml	
Složka A	Odezva detektoru
voda	141 735 973,00
HCOOH 0,01%	76 872 938,00
HCOOH 0,005%	108 399 212,00
AmFm 2mM	125 993 239,33

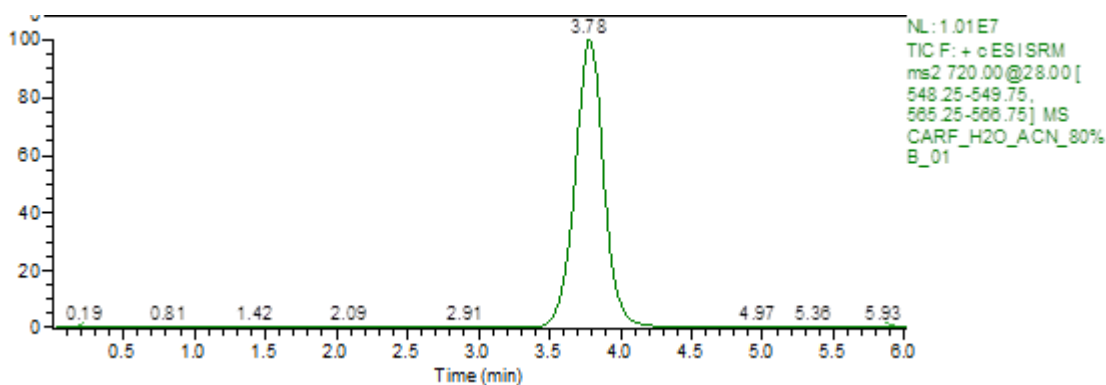
Tabulka 1: Odezva detektoru při testování různých složek A mobilní fáze pro analýzu karfilzomibu

Bortezomib 0,5 µg/ml	
Složka A	Odezva detektoru
voda	4 238 582,33
HCOOH 0,1%	8 903 829,33
HCOOH 0,01%	5 024 903,67
HCOOH 0,005%	4 192 301,67
AmFm 2mM	9 646 800,50
AmFm 1mM	8 435 388,67

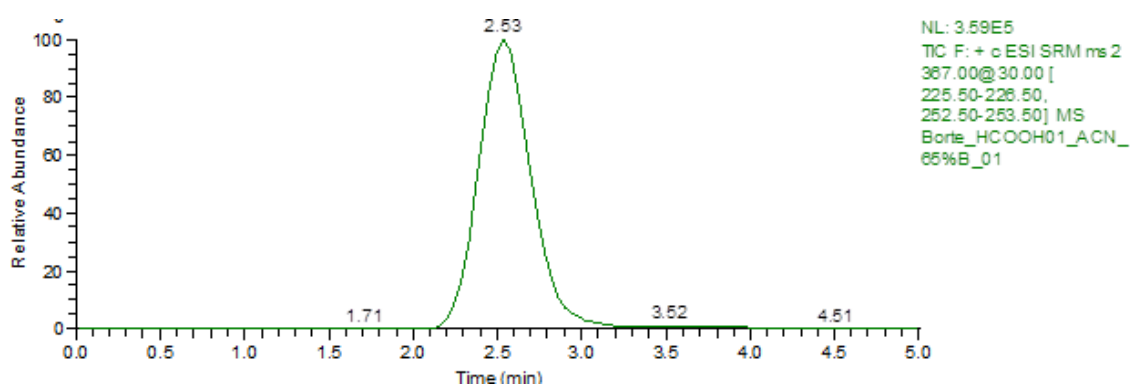
Tabulka 2: Odezva detektoru při testování různých složek A mobilní fáze pro analýzu bortezomibu

Složka A	RSD %
HCOOH 0,1%	7,43
AmFm 2mM	8,33

Tabulka 3: Relativní směrodatná odchylka opakovaných nástřiků



Obr. 10: Chromatogram analýzy vzorku karfilzomibu o koncentraci 0,5 µg/ml při použití mobilní fáze o složení voda : acetonitril (20 : 80)

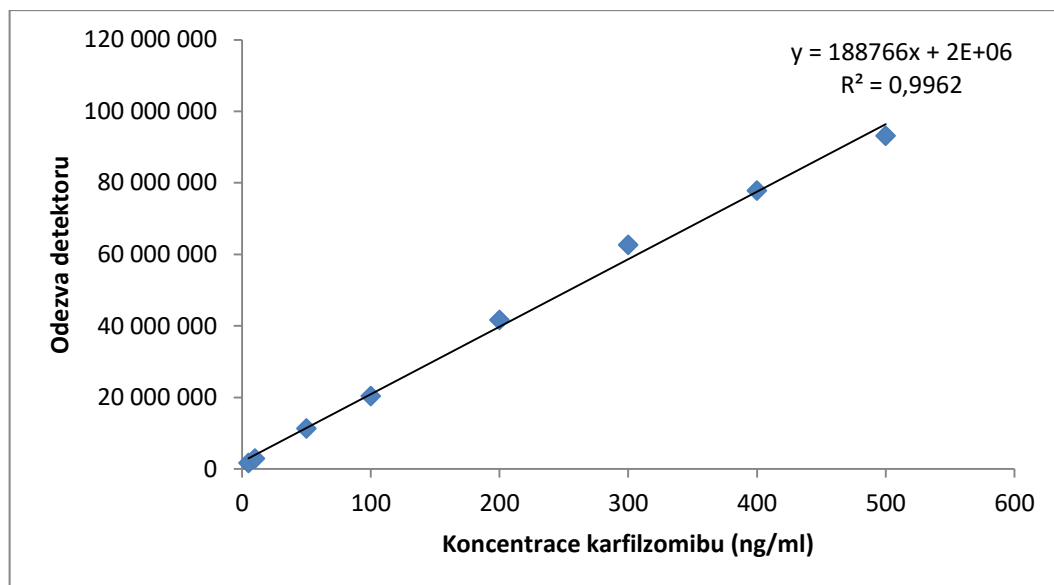


Obr. 11: Chromatogram analýzy vzorku bortezomibu o koncentraci 0,5 µg/ml při použití mobilní fáze o složení 0,1% HCOOH : acetonitril (35 : 65)

13.2 Ověření linearity

Následně bylo nutné ověřit, zda obě optimalizované metody poskytují v daném koncentračním rozmezí lineární odezvu detektoru.

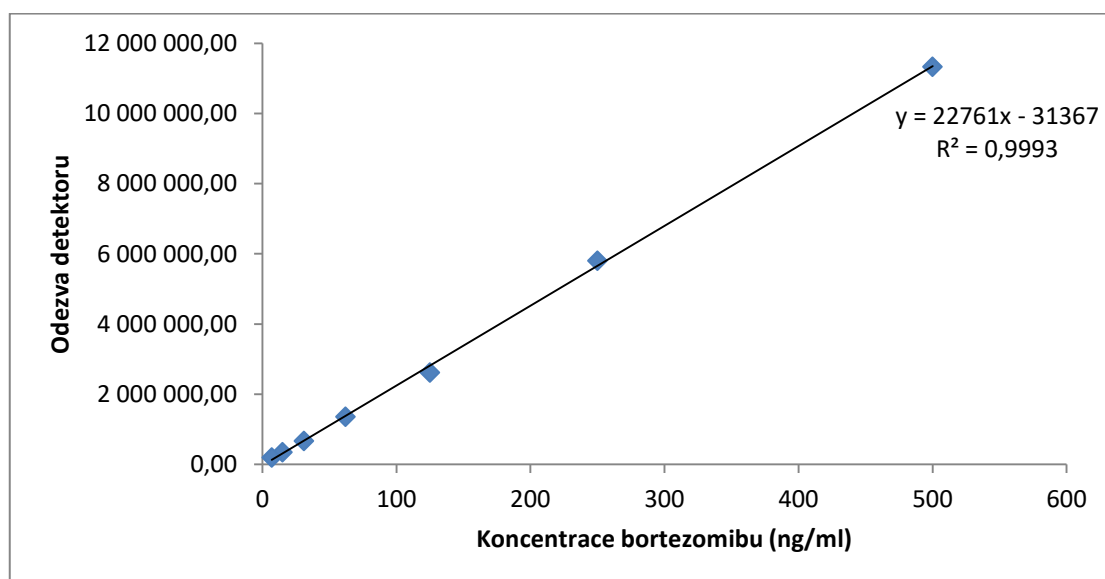
V případě **karfilzomibu** byla připravena série vzorků o koncentracích 5 – 500 ng/ml. Jednotlivé vzorky byly poté nastříknuty na kolonu a analyzovány. Následně byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 12), jako závislost ploch píků léčiva na koncentraci roztoku a byl vypočítán koeficient determinace R^2 .



Obr. 12: Graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci karfilzomibu

Pro ověření linearity **bortezomibu** byla připravena série vzorků o koncentracích 7 – 500 ng/ml. Každý vzorek byl nastříknut 3 × a pro sestrojení kalibrační přímky (Obr. 13) byly použity průměrné hodnoty jednotlivých nástřiků. Byl vypočítán koeficient determinace R^2 .

Hodnoty R^2 získané pro obě léčiva dosahují akceptovatelných hodnot, a proto bylo možné vyvinuté chromatografické podmínky dále použít pro analýzu vzorků plazmy.



Obr. 13: Graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci bortezomibu

13.3 Výběr precipitačního činidla

Úprava biologických vzorků je nedílnou součástí jejich analýzy, neboť neupravené vzorky obsahují balastní látky, které mohou poškodit chromatografickou kolonu a způsobovat „supresi“ při MS detekci. K úpravě vzorků byla v první fázi použita technika precipitace proteinů, jelikož jde o rychlou a jednoduchou úpravu vzorků. Bylo testováno šest různých precipitačních činidel. Z naměřených hodnot byla následně pro každé činidlo vypočítána výtěžnost a „suprese“. K výpočtu průměrů byly vždy použity hodnoty ze tří samostatně připravených vzorků. Výsledky pro analýzu **karfilzomibu** jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tabulky 4 a 5). Vždy bylo použito 250 µl daného precipitačního činidla na 50 µl plazmy.

Precipitační činidlo	Výtěžnost %		
	Průměr	SD	RSD %
ACN	89,56	3,68	4,11
ACN+0,01 % HCOOH	97,48	2,45	2,52
ACN+0,1 % HCOOH	94,80	2,54	2,68
MeOH	89,14	2,20	2,47
MeOH+0,01 % HCOOH	101,79	2,63	2,59
MeOH+0,1 % HCOOH	92,52	2,36	2,55

Tabulka 4: Analýza karfilzomibu – výtěžnost

Precipitační činidlo	„Suprese“ %		
	Průměr	SD	RSD %
ACN	68,21	7,18	10,53
ACN+0,01 % HCOOH	91,86	2,67	2,90
ACN+0,1 % HCOOH	64,20	6,16	9,60
MeOH	45,81	2,27	4,96
MeOH+0,01 % HCOOH	70,11	4,80	6,84
MeOH+0,1 % HCOOH	79,84	3,02	3,78

Tabulka 5: Analýza karfilzomibu - „suprese“

Vyšší výtěžnosti bylo dosaženo vždy v případě, kdy precipitační činidlo obsahovalo přídavek kyseliny mravenčí, ve většině případů se jako vhodnější ukázala nižší z testovaných koncentrací kyseliny. Z těchto činidel byl po zhodnocení výtěžnosti a „suprese“ jako nejvhodnější vybrán acetonitril s přídavkem 0,01 % kyseliny mravenčí.

Jako v případě analýzy karfilzomibu, byla u vzorků s obsahem **bortezomibu** nejvyšší výtěžnost dosažena při použití precipitačních činidel s přidavkem kyseliny mravenčí. Nejvyšší výtěžnost pak byla dosažena u acetonitrilu s přidavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Jednalo se o vzorky, kdy bylo na 50 µl plazmy použito 250 µl precipitačního činidla. Nicméně v tomto případě však „suprese“ dosahovala poměrně vysokých hodnot. Při precipitaci methanolem s přidavkem 0,1 % kyseliny však překvapivě docházelo k velmi špatné reprodukovatelnosti výtěžnosti extrakce, a proto nejsou hodnoty získané pro toto činidlo v následujících tabulkách uvedeny. Hodnoty výtěžností a „suprese“ jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulky 6 a 7).

Precipitační činidla bez přidavku kyseliny se rovněž neosvědčila, tak jako v případě analýzy karfilzomibu.

Precipitační činidlo	Výtěžnost %		
	Průměr	SD	RSD %
ACN	65,74	3,49	5,30
ACN+0,01 % HCOOH	70,34	6,18	8,79
ACN+0,1 % HCOOH	90,86	4,44	4,89
MeOH	73,61	3,94	5,35
MeOH+0,01 % HCOOH	83,32	5,30	6,36

Tabulka 6: Analýza bortezomibu – výtěžnost, při použití 250 µl precipitačního činidla

Precipitační činidlo	„Suprese“ %		
	Průměr	SD	RSD %
ACN	46,48	5,45	11,72
ACN+0,01 % HCOOH	63,12	4,99	7,91
ACN+0,1 % HCOOH	56,27	7,28	12,94
MeOH	73,05	5,90	8,07
MeOH+0,01 % HCOOH	64,96	0,91	1,40

Tabulka 7: Analýza bortezomibu – „suprese“, při použití 250 µl precipitačního činidla

Vzhledem k tomu, že fosfolipidy jsou považovány za častý zdroj ovlivnění signálu u MS detekce, bylo ve snaze snížit „supresi“ testováno použití dvou typů kolonek pro odstranění těchto balastů (Supelco, Phenomenex). Nicméně ani v jednom případě, nebyl tento krok úpravy vzorku vhodný, jelikož zřejmě docházelo k silnému zadržení bortezomibu na kolonce.

Další možností, jak zlepšit hodnoty „suprese“ bylo použít větší množství precipitačního činidla. Testován byl acetonitril s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí, který dosahoval v předchozích experimentech nejvyšších hodnot výtěžnosti. Kromě toho byly testovány dvě různá složení mobilní fáze, s cílem otestovat, zda ke snížení „suprese“ nedojde také úpravou chromatografických podmínek. V prvním případě bylo použito 65 % B. Ve druhém případě bylo použito 50 % B, čas analýzy byl z tohoto důvodu prodloužen o 3 minuty. Výsledky hodnot „suprese“ pro obě mobilní fáze za použití 500 µl acetonitrilu s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 8).

Mobilní fáze	„Suprese“ %
65 % B	67,53
50 % B	74,24

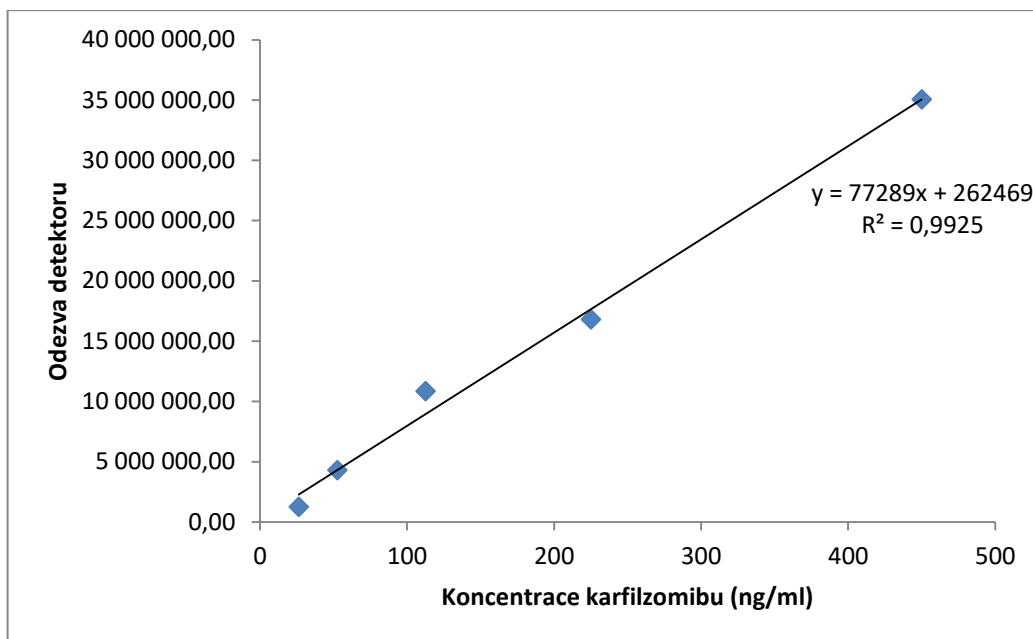
Tabulka 8: Analýza bortezomibu – „suprese“, testování použití 500 µl ACN s 0,1 % HCOOH , mobilní fáze s obsahem 65 % B a 50 % B

Při použití vyššího množství precipitačního činidla došlo k částečnému snížení „suprese“, ale pro dosažení lepších hodnot by byla nutná další optimalizace metody (například využití gradientové eluce nebo jiná technika úpravy vzorků).

13.4 Ověření linearity v plazmě

V dalším kroku bylo třeba ověřit v pilotním experimentu, zda vyvinuté chromatografické podmínky spolu s vybranou metodou úpravy vzorku poskytují lineární odezvu detektoru pro analýzu těchto léčiv v plazmě.

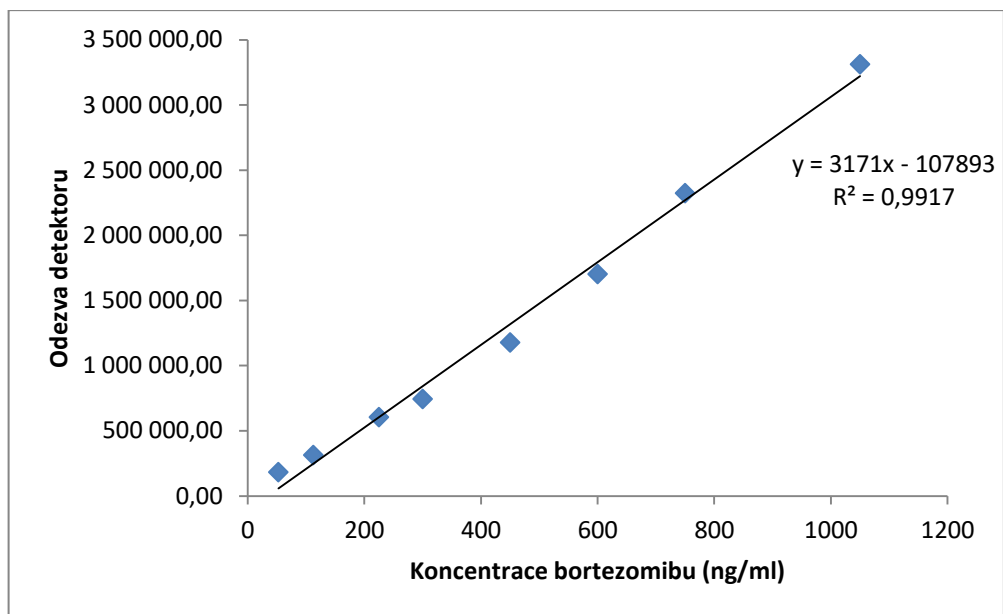
Pro ověření linearity **karfilzomibu** v plazmě byly připraveny vzorky o koncentraci 26,25 – 450 ng/ml. Každý vzorek byl nastříknut na chromatografickou kolonu 3 × a z průměrných hodnot byl sestaven graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci karfilzomibu v plazmě (Obr. 14). Byl vypočítán koeficient determinace R^2 . V případě tohoto léčiva byly R^2 větší než 0,99, což lze s ohledem na skutečnost, že pro analýzy nebyl používán vnitřní standard, považovat za akceptovatelnou hodnotu.



Obr. 14: Graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci karfilzomibu v plazmě

Pro ověření linearity **bortezomibu** v plazmě byly připraveny vzorky o koncentraci 52,5 – 1050 ng/ml. Každý vzorek byl nastříknut na chromatografickou kolonu 3 ×. Z průměrných hodnot byl poté sestrojen graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci bortezomibu v plazmě a vypočítán koeficient determinace R^2 (Obr. 15).

Vzhledem k tomu, že v případě isokratických metod a mobilních fází s obsahem 50 % nebo 65 % acetonitrilu nebylo dosaženo lineární odezvy detektoru, zřejmě díky velké „supresi“, byl v posledním kroku testován pro analýzu vzorků plazmy jednoduchý gradient. Profil použitého gradientu byl následující: 0 – 15 min. (30 – 70 % B), 15,0 – 15,1 (70 – 30 % B), 15,1 – 20 min. (30 % B). Pro přesnější popis celého koncentračního rozmezí bylo připraveno větší množství vzorků plazmy. Podobně jako v případě karfilzomibu, bylo dosaženo za daných okolností akceptovatelné hodnoty R^2 . Avšak, v tomto případě bude dále před validací metody nutné stanovit hodnoty „suprese“ při použití těchto gradientových podmínek a případně profil gradientu dále upravit.



Obr. 15: Graf závislosti odezvy detektoru na koncentraci bortezomibu v plazmě, gradientová metoda

14. Závěr

V této diplomové práci byly vyvinuty pilotní chromatografické podmínky pro HPLC-MS analýzu karfilzomibu a bortezumibu v plazmě. Separace probíhala na chromatografické koloně Ascentis C₁₈ (10 x 3 mm, 3 μm). Analyty byly detekovány za využití ionizace elektrosprejem a iontové pasti jako analyzátoru.

Nejprve bylo hledáno vhodné složení mobilní fáze. V případě analýzy karfilzomibu byla vybrána mobilní fáze voda a acetonitril (20 : 80). Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min a analýzy trvala 6 minut. K eluci karfilzomibu docházelo kolem 3,8 minuty. Při analýze bortezumibu byla nejvhodnější mobilní fáze 0,1% kyselina mravenčí a acetonitril (35 : 65). Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min a doba analýzy byla 5 minut. K eluci bortezumibu docházelo kolem 2,5 minuty.

Následovalo ověření, zda optimalizované chromatografické podmínky umožňují dosáhnout ve zvoleném koncentračním rozmezí lineární odezvu detektoru. Linearita byla v případě karfilzomibu prokázána v koncentračním rozmezí 5 – 500 ng/ml. Pro bortezumib bylo koncentrační rozmezí 7 – 500 ng/ml.

Ve druhé části experimentální práce byly testovány různé postupy extrakce těchto látek z plazmy. Z důvodu rychlosti a jednoduchosti byla v první řadě zvolena technika precipitace proteinů. Bylo testováno šest různých precipitačních činidel a z naměřených hodnot byla vypočítána výtěžnost a „suprese“. Při úpravě vzorků karfilzomibu bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti a nejnižší „suprese“ při použití 250 μl acetonitrilu s přídatkem 0,01 % kyseliny mravenčí na 50 μl plazmy. V případě bortezumibu bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti při použití 250 μl acetonitrilu s přídatkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Při analýze bortezumibu však u všech testovaných činidel docházelo k poměrně vysoké hodnotě „suprese“. Použití kolonek pro odstranění fosfolipidů se ukázalo jako nevhodné, z důvodu silného zadržení analytu na kolonce. Při použití většího množství precipitačního činidla, konkrétně 500 μl, byly hodnoty „suprese“ částečně sníženy.

Posledním krokem bylo u daných analytů ověření linearity v plazmě. V případě karfilzomibu byla linearita testována v koncentračním rozmezí 26,25 – 450 ng/ml a

hodnoty R^2 dosahovaly akceptovatelných hodnot pro tyto pilotní analýzy. Linearita pro analýzu bortezomibu v plazmě byla testována v koncentračním rozmezí 52,5 – 1050 ng/ml. V tomto případě bylo pro dosažení akceptovatelné linearitě nutné použít jednoduchý gradient: 0 – 15 min. (30 – 70 % B), 15,0 – 15,1 min. (70 – 30 % B), 15,1 – 20 min. (30 % B).

V této práci byly vyvinuty pilotní metody pro analýzu karfilzomibu a bortezomibu v plazmě, které budou v další práci následně optimalizovány, zejména s ohledem na volbu vhodného vnitřního standardu a další případné snížení „suprese“ signálu.

Abstrakt

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií zaujímá zásadní místo v analýze léčiv v biologickém materiálu, a to zejména díky své citlivosti, specifitě a schopnosti poskytovat strukturní údaje o analyzovaných látkách.

Mnohočetný myelom představuje závažné hematologické onemocnění, tvořící asi 1 % všech onkologických nemocí. Nová léčiva ze skupiny inhibitorů proteazomu - karfilzomib a bortezomib představují nadějnou léčbu pro pacienty s relabujícím mnohočetným myelomem nebo v případě rezistence onemocnění na jiná léčiva.

Cílem této práce bylo vyvinout pilotní chromatografické podmínky pro HPLC-MS analýzu karfilzomibu a bortezomibu v plazmě a následně otestovat různé metody extrakce těchto látek z plazmy. Separace probíhala na koloně Ascentis C₁₈ 10 x 3 mm, 3 μm, (Supelco, Německo). V obou případech byla využita ionizace elektrosprejem a iontová past jako analyzátor. V případě karfilzomibu byla nejvhodnější mobilní fází kombinace vody a acetonitrilu (20 : 80). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,3 ml/min. Pro analýzu bortezomibu byla jako nejvhodnější mobilní fáze zvolena 0,1% HCOOH a acetonitril (35 : 65). Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min. Pro úpravu vzorku karfilzomibu v plazmě byla použita metoda precipitace proteinů, kdy na 50 μl plasmy bylo použito 250 μl acetonitrilu s přídavkem 0,01 % HCOOH. Pro úpravu bortezomibu v plazmě byla také využita metoda precipitace proteinů. V tomto případě bylo použito větší množství precipitačního činidla, a to 500 μl acetonitrilu s přídavkem 0,1 % HCOOH.

Abstract

High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry plays a crucial role in drug analysis from biological materials, mainly due to its sensitivity, specificity and ability to provide structural information on the analytes.

Multiple myeloma is a serious hematologic disease, accounting for about 1 % of all oncological diseases. New drugs from the group of proteasome inhibitors namely, carfilzomib and bortezomib represent a great promises for patients with relapsing multiple myeloma or in the case of the resistant to other anticancer drugs.

The aim of this work was to develop pilot chromatographic conditions for HPLC-MS analysis of carfilzomib and bortezomib and evaluate different extraction of these drugs from plasma. Separation was carried out on an Ascentis column C₁₈ 10 x 3 mm, 3 µm, (Supelco, Germany). Electrospray ionization with ion trap mass analyzer were used in both cases. The mobile phase consisting of water and acetonitrile (20:80) was the most appropriate for carfilzomib. The flow rate of the mobile phase was set to 0.3 ml/min. For bortezomib, a mixture of 0.1% HCOOH and acetonitrile (35: 65) was chosen as the most suitable mobile phase. The mobile phase flow rate was 0.3 ml / min. A protein precipitation using 250 µl of acetonitrile with 0,01 % HCOOH per 50 µl of plasma was selected for carfilzomib. The same sample preparation method was chosen for bortezomib. However, in this case, higher volume of precipitating agents had to be used, namely 500 µl of acetonitrile with the addition of 0.1 % HCOOH.

Literatura

- [1] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [2] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN 9788026081753.
- [3] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [4] KAZAKEVICH, Yuri. a Rosario. LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 0471681628.
- [5] www.hplc.cz [staženo 20.4.2017].
- [6] HANSEN, Steen, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Knut RASMUSSEN. *Introduction to pharmaceutical chemical analysis*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012. ISBN 9780470661222.
- [7] CHRISTIAN, Gary D., Purnendu K. DASGUPTA a Kevin SCHUG. *Analytical chemistry*. 7th ed. Hoboken: Wiley, c2014. ISBN 978-0-470-88757-8.
- [8] CAZES, Jack. *Encyclopedia of chromatography*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, c2010. ISBN 9781420084597.
- [9] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/apci-ionisation.xhtml> [staženo 1.5.2017].
- [10] FRIEDECKÝ, D.; LEMR, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.*, **2012**, *20*, 152-157.
- [11] http://www.waters.com/waters/en_US/Common-ionization/nav.htm?locale=en_US&cid=10073251 [staženo 1.5. 2017].
- [12] <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/mass-spectrometry-bioanalysis.html> [staženo 5. 5. 2017].
- [13] <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/JVATK.htm> [staženo 3. 4. 2017].
- [14] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/qit.xhtml> [staženo 27. 4. 2017].
- [15] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/fticrms.xhtml> [staženo 27. 4. 2017].
- [16] WATSON, David G. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone Elsevier, 2012. ISBN 978-0-7020-4621-6.

- [17] http://www.waters.com/waters/en_US/Chromatographic-Bands%2C-Peaks-and-Band-Spreading/nav.htm?cid=134803614&locale=en_US [staženo 3. 4. 2017].
- [18] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a Joseph L. GLAJCH. *Practical HPLC method development*. 2nd ed. New York: Wiley, c1997. ISBN 0-471-00703-x.
- [19] POLSON, C.; et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2003**, 785, 263-275.
- [20] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024725024.
- [21] POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER. *Molekulární hematologie*. Praha: Galén, c2013. ISBN 9788072629428.
- [22] SANDECKÁ, V.; et al. Zkušenosti s používáním bortezomibu (Velcade) v České republice od roku 2004. *Onkologie*, **2011**, 5, 141-145.
- [23] STARUB, J.; et al. Mnohočetný myelom- časná diagnostika. *Med. Pro Praxi*, **2009**, 6, 197-199.
- [24] ROHOŇ, Peter. *Molekulární biologie v hematoonkologii - od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 9788024422244.
- [25] <http://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--lecba—chemoterapie> [staženo 1.2.2017].
- [26] <http://www.linkos.cz/myelom-c90/o-mnohocetne-myelomu/> [staženo 1.2.2017].
- [27] HÁJEK, R.; KREJČÍ, M.; POUR, L.; ADAM, Z. Multiple Myeloma. *Klin. Onkol.*, **2011**, 24, 10-13.
- [28] PEKOL, T.; et al. Human metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib: identification of circulating metabolites. *Drug Metab. Dispos.*, **2005**, 33, 771-777.
- [29] SHU, Chang; et al. LC–MS/MS method for simultaneous determination of thalidomide, lenalidomide, cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone and adriamycin in serum of multiple myeloma patients. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2016**, 1028, 111-119.
- [30] CLEMENS, J.; et al. Stability of the proteasome inhibitor bortezomib in cell based assays determined by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1345, 128-138.
- [31] YANG, J.; et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Metabolism, Distribution, and Excretion of Carfilzomib in Rats. *Drug Metab. Dispos.*, **2011**, 39, 1873-1882.
- [32] KORTUEM, K. M. a A. K. STEWART. Carfilzomib. *Blood*, **2013**, 121, 893-897.

[33] HOY, Sheridan M. Carfilzomib Triple Combination Therapy: A Review in Relapsed Multiple Myeloma. *Targ. Oncol.*, **2016**, *11*, 255-262.

[34] MCBRIDE, A., J. O. KLAUS a K. STOCKERL-GOLDSTEIN. Carfilzomib: A second-generation proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma. *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **2015**, *72*, 353-360.