

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**LC-HRMS analýza vybraných antihypertenziv
v biologickém materiálu jako průkaz compliance**

Anna Tláskalová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martin Mžik

Hradec Králové 2018

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Anna Tláskalová

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Martinu Mžikovi za odborné vedení při vypracování mé diplomové práce, za čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky. Děkuji i Mgr. Jakubovi Pavlíkovi, DiS. za pomoc a podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Anna Tláskalová

Konzultant: Mgr. Martin Mžik

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Název diplomové práce: LC-HRMS analýza vybraných antihypertenziv v biologickém materiálu jako průkaz compliance

Arteriální hypertenzí trpí ve věku 25 – 64 let kolem 40 % české populace. I když je v současné době k dispozici řada účinných antihypertenziv, optimálního krevního tlaku je při léčbě dosaženo pouze u 30 % pacientů, což je způsobeno především špatnou adharencí pacientů k léčbě, kteří své léky užívají nesprávně nebo vůbec. Adherence pacienta k léčbě, stejně jako farmakokinetika, představuje nejvýznamnější zdroj variability v odpovědi na léčbu a významně ovlivňuje její výsledek. Monitorování plazmatických hladin antihypertenziv je jedním z nástrojů moderní medicíny, který umožňuje jak efektivní kontrolu špatně kompenzovaných pacientů, tak úpravu dávkovacího schématu.

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací extrakční metody pro vybraná antihypertenziva (amilorid, amlodipin, betaxolol, bisoprolol, carvedilol, celiprolol, indapamid, metoprolol, moxonidin, nebivolol, nitrendipin, rilmenidin, urapidil) a následnou validací celé analytické metody pro potřeby posouzení compliance pacientů a pro ověření správnosti předepsaného dávkování na základě stanovení koncentrace antihypertenziv v séru s využitím UHPLC-HRMS. Nejvhodnější extrakční metodou byla extrakce z kapaliny do kapaliny pomocí ethylacetátu, u které bylo dosaženo optimální výtěžnosti a opakovatelnosti. Následná validace analytické metody byla provedena podle směrnice Evropské lékové agentury (EMA). Všechny hodnocené validační parametry splnily požadovaná kritéria a metoda byla úspěšně zavedena do praxe. Během 12 měsíců bylo vyšetřeno 92 pacientů (někteří i opakovaně) a celkem byla stanovena hladina u 173 antihypertenziv (nejčastěji amlodipin, bisoprolol a indapamid). Z celkového počtu 92 pacientů bylo 17,4 % non-adherentních.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Anna Tláskalová

Supervisor – specialist: Mgr. Martin Mžik

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Title: LC-HRMS analysis of selected antihypertensive drugs in biological material
for compliance assessment

About 40 % of Czech population between the ages of 25 and 64 suffer from arterial hypertension. Although an array of effective antihypertensives is available nowadays, optimal blood pressure during treatment is reached by mere 30 % of the patients. This is mainly due to the patients' poor adherence to the treatment, who use their medicaments incorrectly or not at all. The adherence of a patient to the treatment, as well as pharmacokinetics, represent the most significant source of variability of the answer to the treatment and notably influences its outcome. The monitoring of plasmatic levels of antihypertensives is one of the methods of modern medicine which enables both an effective supervision of the incorrectly compensated patients, and the adjustment of dosage scheme.

This diploma thesis focuses on development and optimisation of extraction procedures for selected antihypertensives (amiloride, amlodipine, betaxolol, bisoprolol, carvedilol, celiprolol, indapamide, metoprolol, moxonidine, nebivolol, nitrendipine, rilmenidine, urapidil). The method, subsequently validated in accordance with the Guidelines of European Medicines Agency (EMA), was used for determination of concentrations of antihypertensives in a serum by UHPLC-HRMS, assessment of compliance of patients and verification of correctness of the prescribed dosage.

The most suitable extraction method was the liquid-liquid extraction using ethyl acetate, where an optimal yield and repeatability were accomplished. All validation parameters met the required criteria, and the method was successfully put into practice. Within 12 months, 92 patients were examined (some even repeatedly) and the levels of a total of 173 samples were determined (mostly amlodipine, bisoprolol, and indapamide). Out of the total 92 patients, 17, 4 % were non-adherent.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD	11
2. TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1. Úprava biologického materiálu před (U)HPLC analýzou	13
2.1.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny	14
2.1.2. Extrakce na pevné fázi	16
2.1.3. Proteinová precipitace	17
2.1.4. Moderní trendy v úpravě vzorku	19
2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	21
2.3. Hmotnostní spektrometrie	24
2.3.1. Součásti hmotnostního spektrometru	24
2.3.2. Skenovací módy	28
2.4. Validace bioanalytické metody	28
2.4.1. Typy validací	29
2.4.2. Validací parametry (směrnice EMA a FDA)	29
3. CÍL PRÁCE	33
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1. Chemikálie, přístroje a pomůcky	34
4.1.1. Chemikálie	34
4.1.2. Přístroje a pomůcky	35
4.2. Pracovní postupy	36
4.2.1. Příprava roztoků	36
4.2.2. Příprava přečištěného blankového séra	40
4.2.3. Vývoj metody	41

4.2.4.	Validace	42
4.2.5.	Příprava klinických vzorků	45
5.	VÝSLEDKY	46
5.1.	Příprava přečištěného blankového séra	46
5.2.	Výběr vhodné extrakční metody a extrakčního rozpouštědla	47
5.2.1.	Extrakce z kapaliny do kapaliny	47
5.2.2.	Proteinová precipitace	53
5.3.	Opakovatelnost extrakce a výběr IS	54
5.4.	UHPLC-HRMS analýza	55
5.5.	Validace	56
5.6.	Měření klinických vzorků	63
6.	DISKUZE	64
7.	ZÁVĚR	67
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization/Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Atmospheric pressure photoionization/Fotoionizace za atmosférického tlaku
CFME	Continuous flow microextraction/Mikroextrakce za stálého průtoku
CV	Variation coefficient/Variační koeficient
DCM	Dichlormethan
DI-SDME	Direct immersion single drop microextraction/Mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla s přímým ponořením
DLPME	Dispersive liquid phase microextraction/Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
EMA	European Medicines Agency/Evropská léková agentura
ESI	Electrospray ionization/Ionizace elektrosprejem
EtAC	Ethylacetát
FDA	Food and Drug Administration/Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FLD	Fluorescence detector/Fluorescenční detektor
FT-ICR	Fourier transform-Ion cyclotron resonance/Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
HESI	Heated-electrospray ionization/Ionizace vyhřívaným elektrosprejem
HF-LPME	Hollow fiber liquid phase microextraction/Mikroextrakce do kapaliny s využitím dutého vlákna
HPLC	High performance liquid chromatography/Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRMS	High resolution mass spectrometry/Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením

HS-SDME	Head space single drop microextraction/Mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla umístěné nad vzorkem
ICH	International Council on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use/ Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků pro léčiva pro humánní užití
IS	Internal standard/Vnitřní standard
IT	Ion trap/Iontová past
LC	Liquid chromatography/Kapalinová chromatografie
LIT	Linear ion trap/Lineární iontová past
LLE	Liquid-liquid extraction/Extrakce z kapaliny do kapaliny
LLLME	Liquid-liquid-liquid microextraction/Mikroextrakce do kapalných fází
LLOQ	Lower limit of quantification/Spodní mez stanovitelnosti
LPME	Liquid phase microextraction/Mikroextrakce do kapalných fází
MEPS	Microextraction by packed sorbent/Mikroextrakce plněným tuhým sorbentem s využitím stříkačky
MF	Matrix faktor/Matricový faktor
MISPE	Molecularly imprinted solid phase extraction/Extrakce na pevné fázi využívající molekulárně vtištěný polymer
MS	Mass spectrometry/Hmotnostní spektrometrie
M-SPE	Magnetic solid phase extraction/Extrakce na pevné fázi využívající magnetický sorbent
MTBE	<i>tert</i> -butyl-methylether
PDA	Photodiode-array detector/Detektor diodového pole
Q	Quadrupole/Kvadrupólový analyzátor
QC	Quality control/Kontrola kvality
QqQ	Triple quadrupole/Trojité kvadrupól
RAM	Restricted access materials/Materiál s omezeným přístupem
RIC	Reconstructed ion current/Záznam rekonstruovaného iontového proudu

S.D.	Standard deviation/Směrodatná odchylka
SBSE	Stir bar sorptive extraction/Sorpční extrakce míchadlem
SDME	Single drop microextraction/Mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla
SIM	Selected ion monitoring/Záznam vybraného iontu
SPE	Solid phase extraction/Extrakce na pevné fázi
SPME	Solid phase microextraction/Mikroextrakce na pevné fázi
SRM	Selected reaction monitoring/Sken vybraných reakcí
TFC	Turbulent flow chromatography/Chromatografie s turbulentním průtokem
TIC	Total ion current/Záznam celkového iontového proudu
TO	Transfuzní oddělení
TOF	Time of flight/Analyzátor doby letu
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography/Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHR	Ultra high resolution/Ultra vysoké rozlišení
ULOQ	Upper limit of quantification/Horní limit kvantifikace

1. ÚVOD

Arteriální hypertenzi trpí ve věku 25 – 64 let kolem 40 % české populace. Společně s obezitou, kouřením, diabetes mellitus a dyslipidemií je arteriální hypertenze jedním z významných rizikových faktorů kardiovaskulárních komplikací (cévních mozkových příhod, ischemické choroby srdeční atd.). I když je v současné době k dispozici řada účinných antihypertenziv, optimálního krevního tlaku je při léčbě dosaženo pouze u 30 % pacientů, což je způsobeno především špatnou adharencí (compliance) pacientů k léčbě, kteří své léky užívají nesprávně nebo vůbec [1]. K hlavním důsledkům špatné adherence, které vedou k nárůstu morbidity, mortality, počtu hospitalizací a nákladů na léčbu, patří: akutní riziko z neléčení, neúčinnost léčby, zvýšené riziko komplikací, rezistence, dekompenzace onemocnění, předávkování, zvýšené riziko nežádoucích účinků a interakcí. Z toho vyplývá, že adherence pacienta k léčbě, stejně jako farmakokinetika, představuje nejvýznamnější zdroj variability v odpovědi na léčbu a též významně ovlivňuje výsledek léčby. Monitorování adherence je důležitou součástí péče především u chronických onemocnění vyžadujících dlouhodobou terapii. Adherence může být měřena několika metodami. Významný nástroj představují objektivní přímé metody (stanovení koncentrace léčiva v tělních tekutinách), dále pak metody objektivní nepřímé (elektronické počítání tablet, analýza databáze o výdeji léčiv) a subjektivní (výpověď pacienta) [2].

V klinické praxi se pro terapeutické monitorování léčiv velmi často využívá kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), která se vyznačuje selektivitou, citlivostí, nízkou spotřebou biologického materiálu a schopností současného stanovení několika léčiv v jednom vzorku, což značně snižuje časovou náročnost analýz. Stanovení léčiv pomocí LC-MS umožňuje zároveň kvalitativní analýzu (jednoznačné určení látky) i kvantitativní analýzu (stanovení koncentrace léčiv v tělních tekutinách). Tento přístup přináší pacientům řadu benefitů, např. pomocí stanovení koncentrace léčiva lze individualizovat dávkování a tím lépe dosáhnout cílů terapie, nebo při odhalení non-andherence se pacienta snažíme motivovat k dodržování terapie, a tak předcházet komplikacím plynoucím z dekompenzovaného onemocnění.

Experimentální část této diplomové práce se zabývá vývojem a validací bioanalytické metody za účelem stanovení vybraných antihypertenziv (amilorid, amlodipin, betaxolol, bisoprolol, carvedilol, celiprolol, indapamid, metoprolol,

moxonidin, nebivolol, nitrendipin, rilmenidin, urapidil) v lidském séru pomocí UHPLC-HRMS jako průkaz compliance pacienta, krátce je zmíněna i aplikace metody. V teoretické části je popsán princip extrakčních technik používaných pro úpravu vzorku před analýzou, jejich výhody, nevýhody a moderní trendy. Následující kapitoly jsou věnovány instrumentaci kapalinového chromatografu, stručnému popisu hmotnostního spektrometru a validaci bioanalytické metody dle platných směrnic (EMA a FDA).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Úprava biologického materiálu před (U)HPLC analýzou

Biologický materiál představuje z analytického hlediska velmi složitou matici, kterou nelze analyzovat přímo, proto je vyžadován určitý typ úpravy. Nejčastěji analyzovanými biologickými materiály pro stanovení hladin léčiv jsou plná krev, plazma nebo sérum. Pro toxikologické nebo farmakologické účely lze dále využít moč, stolici, žluč, sliny, pot, slzy, cerebrospinální tekutinu, mateřské mléko, vlasy, nehty nebo tkáň. Postup úpravy vzorku by měl reflektovat nejen fyzikálně-chemické vlastnosti cílových analytů, ale i složení konkrétní analyzované matrice. Ve vzorcích mohou být přítomny proteiny, enzymy, lipidy, sacharidy, metabolity, voda, organické a anorganické ionty nebo buněčné elementy. Tyto složky mohou během analytického měření potlačit signál pro cílový analyt, poskytnout falešně pozitivní odezvu detektoru, znečistit či poškodit chromatografický systém nebo hmotnostní spektrometr. Dalším důvodem úpravy vzorku před analýzou může být zvýšení kompatibility s daným chromatografickým systémem nebo zakoncentrování vzorku kvůli nízké citlivosti detektoru [3, 4].

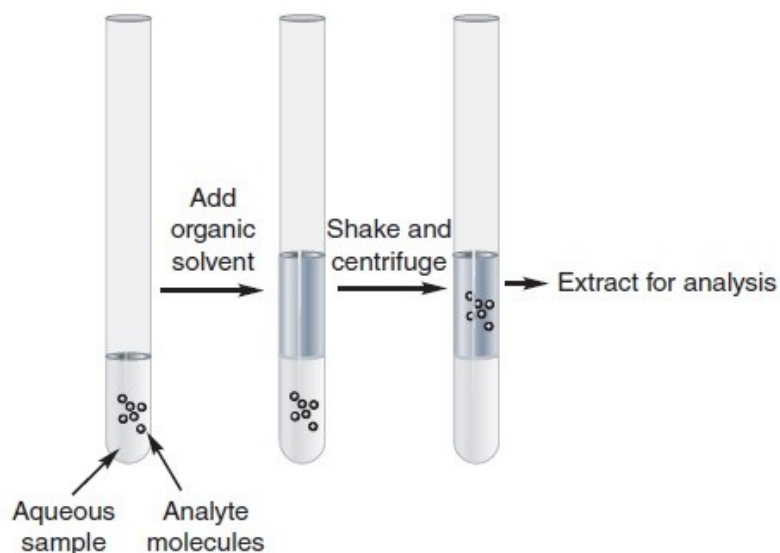
Odběr a příprava vzorku tvoří až 80 % z celkového času potřebného pro danou analýzu [5]. Jsou to zároveň velmi důležité kroky, které zahrnují izolaci i zakoncentrování analytů a ovlivňují úspěch bioanalytického měření (identifikaci a kvantifikaci). Je žádoucí, aby příprava vzorku byla provedena adekvátně, protože tento krok představuje nejvýznamnější zdroj chyb a má dopad na přesnost a správnost analytického výsledku [5, 6].

Nejdůležitějšími technikami přípravy vzorků v bioanalytických metodách jsou extrakce z kapaliny do kapaliny (kap. 2.1.1), extrakce na pevné fázi (kap. 2.1.2) a proteinová precipitace (kap. 2.1.3). Zmíněné konvenční postupy jsou hojně využívány v analytických laboratořích.

V posledních letech vzrůstá tendence přípravu vzorku zjednodušovat, automatizovat, snižovat její časovou náročnost, zvyšovat selektivitu procesu extrakce, redukovat spotřebu použitého biologického materiálu a extrakčních rozpouštědel. Tyto přístupy představují moderní trendy v úpravě vzorku (kap. 2.1.4) [7].

2.1.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid extraction, LLE) je jednou z nejstarších a nejpoužívanějších technik vyvinutých pro úpravu vzorku před analýzou. Princip extrakce je založen na distribuci cílových analytů mezi dvěma navzájem nemísitelnými kapalnými fázemi, které jsou tvořeny biologickým vzorkem (hydrofilní fáze) a extrakčním rozpouštědlem (lipofilní fáze) (Obr. č. 1) [8]. Do zkumavky s biologickým vzorkem (plazma, sérum, moč apod.) se přidá organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou, čímž se vytvoří dvoufázový systém. Poté se obsah zkumavky po určitou dobu protřepává, aby se vzorek obsahující cílový analyt promíchal s organickým rozpouštědlem. Během míchání přecházejí molekuly analytu z hydrofilní fáze vzorku do extrakčního rozpouštědla. Zároveň dochází k vyčištění vzorku, protože většina přítomných endogenních látek a nečistot zůstává v biologické matrici [3]. Po centrifugaci se oddělená organická fáze odebere a odpaří se např. proudem dusíku nebo ve vakuové odparce. Tím dojde k odstranění použitého extrakčního rozpouštědla a zakoncentrování vzorku. Odparek se většinou rekonstituuje v mobilní fázi a takto upravený vzorek se analyzuje.



Obr. č. 1: Princip LLE [3]

Distribuci analytu mezi oběma fázemi popisuje Nernstův zákon:

$$K_D = \frac{C_1}{C_2}$$

K_D je distribuční koeficient, C_1 je koncentrace analytu v organické fázi a C_2 je koncentrace analytu ve vodné fázi vzorku. Platí, že čím vyšší je hodnota distribučního koeficientu, tím vyšší je účinnost extrakce analytu do extrakčního rozpouštědla [3, 4]. Proces extrakce je ovlivněn celou řadou faktorů, např.:

- *Hodnota pH vzorku:* Řada stanovovaných látek má kyselý nebo zásaditý charakter, a proto jsou ve vodném prostředí disociovány. Do extrakčního rozpouštědla ale přechází pouze nedisociované analyty. Z tohoto důvodu se upravuje pH biologického vzorku vhodnými pufrů.
- *Extrakční rozpouštědlo:* Výběr rozpouštědla není určován pouze vlastnostmi analytu (polarita, rozpustnost ve vodě, interakce analytu s rozpouštědlem, např. hydrofobní, dipólové), ale i vlastnostmi rozpouštědla (hustota a viskozita, polaritní index, těkavost, čistota, inertnost k analytu).
- *Poměr organické a vodné fáze:* Extrahovatelnost analytu se s rostoucím poměrem zvyšuje.
- *Počet extrakcí:* Extrakce je účinnější, pokud je provedena opakovaně s menšími objemy extrakčního rozpouštědla, než jedenkrát s celkovým objemem rozpouštědla.
- *Další faktory ovlivňující extrakci:* délka, intenzita a poloha zkumavky při třepání, délka a počet otáček při centrifugaci.

Hlavní výhody LLE jsou: jednoduchost provedení, nenáročná instrumentace, možnost extrahovat látky přítomné ve vysokých i stopových koncentracích, reprodukovatelnost a možnost zakoncentrování analytu. LLE má i své nevýhody: nevhodnost pro hydrofilní sloučeniny, tvorba emulzí při extrakci, získaný extrakt nemusí být kompatibilní s chromatografickým systémem a je nutné jej odpařit a odparek rekonstituovat ve vhodném rozpouštědle, vysoká spotřeba rozpouštědel a též relativní časová náročnost [3–5, 7].

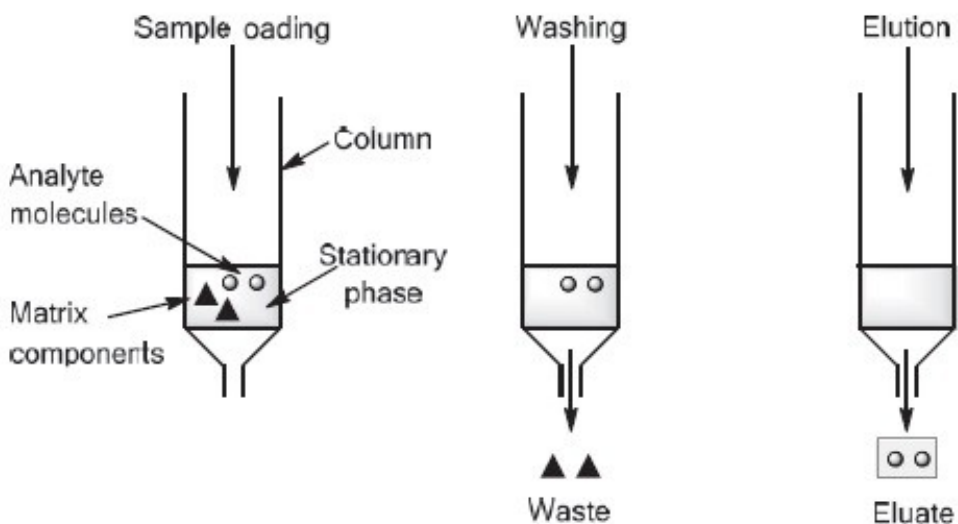
2.1.2. Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (Solid phase extraction, SPE) je velmi běžná a často používaná technika v oblasti úpravy biologických vzorků, především plazmy, séra a moči. Je založena na principu adsorpce cílového analytu na povrchu stacionární fáze (extrakční kolonka) pomocí polárních, nepolárních, iontových a afinitních interakcí a následné extrakci vhodným eluentem [3, 7]. V současnosti existuje široká škála sorbentů a správná volba typu sorbentu je nezbytná pro úspěšnou aplikaci SPE. Prvním typem sorbentu jsou nepolární stacionární fáze (reverzní), např. oxid křemičitý modifikovaný C4, C8, C18, fenylem nebo organickými kopolymery na bázi styrenu. Typickými polárními sorbenty (normální fáze) jsou např. samotný oxid křemičitý nebo oxid křemičitý spojený s polárními funkčními skupinami, jako je aminopropyl, diol, kyanopropyl. Pro separaci velmi polárních analytů, kationtů a aniontů se používají iontoměniče, které lze rozdělit na silné katexy (oxid křemičitý spojený s propylsulfonovými skupinami), silné anexy (trimethylaminopropyl navázaný na oxid křemičitý) a slabé katexy (karboxypropylsilikát), slabé anexy (dimethylaminopropyl navázaný na oxid křemičitý). Poslední skupinu tvoří polymery (polystyren-divinylbenzen, polymethylmethakrylát), jejichž hlavní výhodou je stabilita v širokém rozmezí pH. Při výběru stacionární fáze jsou rozhodující vlastnosti analytu (polarita, disociační konstanta) a také vlastnosti rozpouštědla [3, 4, 7].

Postup SPE se skládá z několika kroků (Obr. č. 2):

1. **Aktivace sorbentu v kolonce:** Nejprve se kolonka promyje polárním organickým rozpouštědlem, nejčastěji se používá methanol. Tím dojde k aktivaci funkčních skupin sorbentu. Zároveň se vymyjí případné nečistoty.
2. **Ekvilibrace stacionární fáze:** Kolonka je proplachována vodou nebo vodnými pufrů, aby byly odstraněny zbytky methanolu a optimalizováno prostředí pro extrakci. Methanol je silným elučním činidlem, proto musí být tento krok proveden pečlivě, aby nedošlo ke ztrátám analytu.
3. **Nanesení vzorku:** Analyty jsou zadržovány v kolonce díky interakcím s aktivovanými funkčními skupinami sorbentu. Podmínkou je, aby tyto interakce byly silnější než afinita analytu k biologické matici.
4. **Promývání:** K promývání se použije jeden nebo více promývacích roztoků, ve kterých je cílový analyt nerozpustný. Účelem kroku je odstranění balastních látek matrice, tzn. vyčištění vzorku.

5. **Eluce:** Eluční činidlo přeruší interakce cílového analytu s funkčními skupinami stacionární fáze a dojde k uvolnění analytu z kolonky. Vzniklý eluát je použit pro analýzu [3, 4, 7, 9].



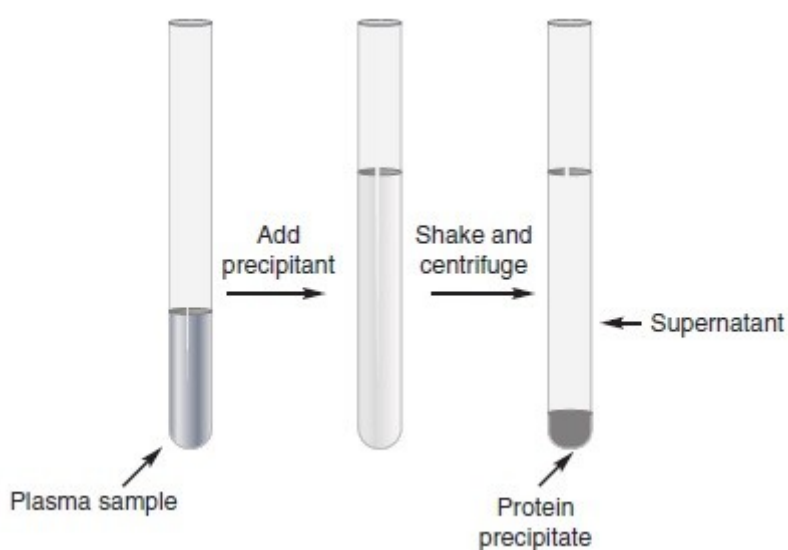
Obr. č. 2: SPE – nanesení vzorku, promývání, eluce [3]

Výhody SPE jsou: vysoká výtěžnost, selektivita, mezi dvěma fázemi se netvoří emulze, zakoncentrování vzorku, možnost automatizace. Naopak k nevýhodám patří: relativně vysoká spotřeba rozpouštědel i vzorku, pracnost a časová náročnost, kolonky se obvykle dají použít jednorázově, což vede ke zvýšení ekonomických nákladů [7, 9].

2.1.3. Proteinová precipitace

Proteinová precipitace (Protein precipitation, PP, srážení proteinů) je určena k odstranění bílkovin z analyzované plazmy nebo séra. Přímý nástřik plazmy na chromatografickou kolonu se nedoporučuje, protože obsažené bílkoviny se vlivem kontaktu s organickými rozpouštědly a pufrů mobilní fáze srážejí a znehodnocují LC kolony.

Princip proteinové precipitace znázorňuje Obr. č. 3. Vzorek plazmy nebo séra se pipetuje do malé centrifugační zkumavky, pipetovaný objem je obvykle 10 – 1000 μl . Následně se přidá precipitační činidlo a obsah zkumavky se promíchá. Proteiny v přítomnosti precipitačního činidla podléhají denaturaci a vysráží se. Důležitým krokem je centrifugace, kdy dochází k oddělení sraženiny a supernatantu, provádí se při 10 000 – 15 000 $\times g$ [3]. Supernatant může být přímo použit pro analýzu nebo se nechá odpařit do sucha a následně se rekonstruuje ve vhodném rozpouštědle (mobilní fázi), čímž se docílí zakoncentrování analytu.



Obr. č. 3: Princip proteinové precipitace [3]

Jako precipitační činidla se používají:

- *organická rozpouštědla mísitelná s vodou*: acetonitril, methanol, isopropanol, aceton, ethanol;
- *organické sloučeniny*: močovina, guanidin;
- *silné kyseliny*: kyselina chloristá, kyselina trichloroctová, kyselina trifluoroctová, kyselina mravenčí, kyselina chlorovodíková, kyselina metafosforečná – výsledné pH vzorku je kyselé, což může vést k nestabilitě analytu a k poškození chromatografické kolony (náchylnost k hydrolyze);

- *soli vícemocných iontů*: síran zinečnatý, síran měďnatý, wolframan sodný, hydroxid barnatý;
- *tanin, síran amonný*;
- *kombinace precipitačních činidel*;
- *zahřívání*: 100 °C po dobu 5 – 10 minut – není příliš účinné, může vést k rozkladu cílových analytů.

Hlavní výhody proteinové precipitace jsou: rychlý postup, vyžaduje minimální vybavení, vývoj metody je poměrně jednoduchý. Proteinová precipitace je účinná při odstraňování proteinů, přesto nedochází k úplnému vyčištění vzorku. V supernatantu zůstává komplexní směs endogenních a exogenních látek, což může způsobit interference nebo matricové efekty při chromatografické analýze a snížit selektivitu metody. Dalšími nevýhodami jsou: nízká specificita pro cílový analyt, ztráta analytu vazbou na precipitát a naředění vzorku precipitačním činidlem [3, 4, 7].

Kromě precipitace mohou být proteiny odstraněny i enzymovou deproteinací (papain, trypsin, subtilisin), odstředěním nebo membránovou filtrací. Membránová filtrace se rozděluje podle velikosti pórů semipermeabilní membrány na ultrafiltraci (velikost pórů membrány 1 – 10 nm), reverzní osmózu (zachytí částice menší než 1 nm) a mikrofiltraci (zachytí částice větší než 10 nm). Během filtrace prochází semipermeabilní membránou pouze volná frakce analytu, ostatní látky (proteiny, vázaná frakce analytu) jsou membránou zachyceny. Tím se získá relativně čistý a nenaředěný permeát, nevýhodou je ztráta analytu (vázaná frakce analytu a vazba na membránu) [7].

2.1.4. Moderní trendy v úpravě vzorku

Moderní techniky úpravy vzorku vycházejí především z principů LLE a SPE. K dalším trendům patří např. extrakce ze suché kapky krve, séra, plazmy nebo moči a automatizace úpravy vzorku, tzv. on-line spojení s chromatografickým systémem, které umožňuje přímý nástřik vzorku na kolonu. Pro tento účel jsou využívány sorbenty s omezeným přístupem (Restricted access materials, RAM) nebo kolony s velikostí částic stacionární fáze 50 – 60 μm , u kterých je možno použít vysoký průtok mobilní fáze (Turbulent flow chromatography, TFC) [5, 10].

2.1.4.1. *Moderní techniky vycházející z principu LLE*

Nevýhody extrakce z kapaliny do kapaliny, zejména tvorba emulzí a vysoká spotřeba organických rozpouštědel, vedly k rozvoji nových mikroextrakčních technik (Liquid phase microextraction, LPME), které tyto nedostatky eliminují a jejichž hlavní předností je potřeba velmi malého množství biologického vzorku:

- **HF-LPME (Hollow fiber liquid phase microextraction)** – mikroextrakce analytů probíhá z biologického vzorku do dutého porézního vlákna (např. polypropylen). Může být provedena v *systému dvoufázovém* (póry i lumen vlákna jsou vyplněny organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou), nebo *třífázovém* (póry obsahují s vodou nemísitelné organické rozpouštědlo, lumen vlákna je vyplněno vodným akceptorovým médiem) a v *režimu statickém* nebo *dynamickém* [5, 11].
- **SDME (Single drop microextraction)** – využívá principu mikroextrakce do kapky organického rozpouštědla nemísitelného s vodou, existuje několik způsobů provedení, např.:
 - **DI-SDME (Direct immersion single drop microextraction)** – kapka organického rozpouštědla nemísitelného s vodou vytvořená na konci jehly injekční stříkačky je ponořena do biologického vzorku, po skončení extrakce je kapka zasunuta zpět do jehly a přímo nastříknuta do chromatografického systému.
 - **CFME (Continuous flow microextraction)** – biologický vzorek během extrakce proudí kolem kapky organického rozpouštědla.
 - **HS-SDME (Head space single drop microextraction)** – umožňuje extrakci těkavých analytů, kapka organického rozpouštědla je umístěna nad vzorek.
 - **LLLME (Liquid-liquid-liquid microextraction)** – extrakce analytů probíhá z biologického vzorku do organického rozpouštědla o nižší hustotě než voda a následně do vodné fáze tvořené kapkou na konci jehly.
- **DLPME (Dispersive liquid phase microextraction)** – extrakční směs (organické rozpouštědlo a disperzní činidlo) je rychle vstříknuta injekční stříkačkou do biologického vzorku, tím se vytvoří kapičky organického rozpouštědla rozptýlené v celém objemu vzorku a proběhne extrakce,

po centrifugaci je organický sediment obsahující cílový analyt odebrán a analyzován [5].

2.1.4.2. Moderní techniky vycházející z principu SPE

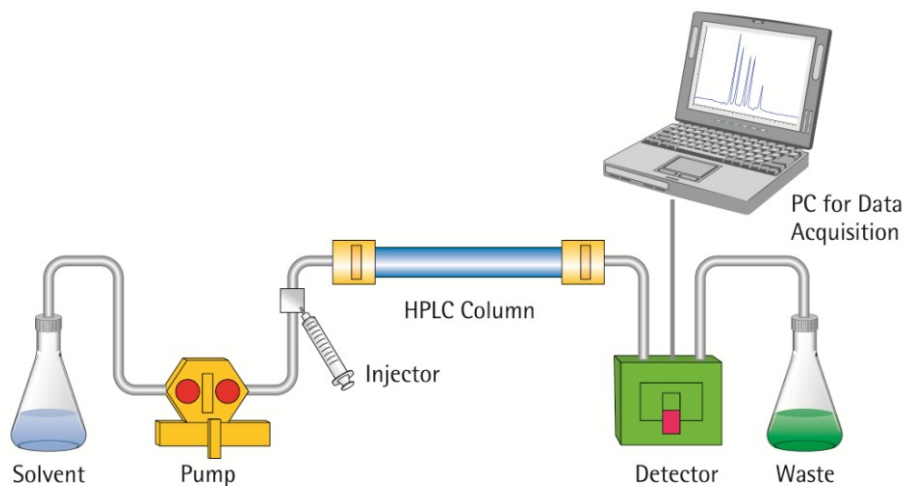
Princip SPE využívá celá řada moderních technik úpravy vzorku, k jejichž hlavním výhodám patří zejména zakoncentrování vzorku, minimální množství potřebných extrakčních rozpouštědel i biologické matrice:

- **M-SPE (Magnetic solid phase extraction)** – cílový analyt se adsorbuje na magnetický sorbent umístěný do vzorku, ze kterého je po separaci vnějším magnetickým polem izolován elucí vhodným rozpouštědlem.
- **MISPE (Molecularly imprinted solid phase extraction)** – využívá molekulárně vtištěných polymerů, které mají vysoce specifickou rozpoznávací schopnost pro cílový analyt [5, 12].
- **MEPS (Microextraction by packed sorbent)** – extrakce analytů probíhá uvnitř stříkačky, kde se analyt nejprve adsorbuje na stacionární fázi a po vymytí balastů je eluován vhodným rozpouštědlem, důležitou předností je možnost plné automatizace [5, 6].
- **SPME (Solid phase microextraction)** – cílové analyty jsou zachycovány na tenkém vlákně tvořeném oxidem křemičitým, potaženým vhodným sorpčním materiálem (např. polydimethylsiloxanem), až do vytvoření rovnováhy mezi množstvím analytu ve vzorku a na vlákně, poté je provedena analýza [5, 10, 12].
- **SBSE (Stir bar sorptive extraction)** – do biologického vzorku je zavedeno míchadlo potažené polymerem (nejčastěji polydimethylsiloxanem), během míchání se analyty adsorbují na polymer a po procesu desorpce jsou analyzovány [5, 12].

2.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography, HPLC) je separační technika, která umožňuje kvalitativní

i kvantitativní stanovení analytů a pro své četné výhody (rychlost, přesnost, vysoká citlivost, automatizovaný provoz) je široce používána v oblasti analýzy léčiv.



Obr. č. 4: Instrumentace HPLC [13]

Hlavní komponenty HPLC systému ukazuje Obr. č. 4. Mobilní fáze je uchovávána v *zásobníku*. Odtud je přes filtry (zachycení nečistot) čerpána *pumpou* do chromatografického systému. Plyny rozpuštěné v mobilní fázi jsou odstraňovány v *odplyňovacím zařízení (degaser)*, které bývá zařazeno mezi zásobníkem a pumpou. Pokud je třeba měnit složení mobilní fáze během analýzy (gradientová eluce), tak se používá *zařízení pro mísení mobilních fází (směšovač)*. Pokud se složení mobilní fáze nemění, jedná se o tzv. izokratickou eluci. Vzorek rozpuštěný v mobilní fázi nebo podobném rozpouštědle je *dávkačem vzorku (autosampler)* aplikován do nástřikové smyčky, ze které se po přepnutí vícecestného ventilu dostává do protékající mobilní fáze, dávkovaný objem je obvykle 1 – 100 μl . Srdcem kapalinového chromatografu je *kolona*, kde probíhá vlastní separační proces založený na rozdílných interakcích jednotlivých složek analyzované směsi s kapalnou mobilní fází a stacionární fází (sorbenť uvnitř kolony). Separace se může odehrávat v závislosti na vlastnostech cílových analytů v různých chromatografických režimech, např. normální fáze (polární sorbent – silikagel, nepolární mobilní fáze – hexan) nebo reverzní fáze (nepolární sorbent – chemicky modifikovaný silikagel, polární mobilní fáze – směs pufru s methanolem nebo acetonitrilem). Za kolonou je umístěn

detektor, ve kterém se vytváří signál v závislosti na ne/přítomnosti analytu. Využívá se několik typů detektorů, např. spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické, chemiluminiscenční, vodivostní, bezkontaktní vodivostní, univerzální detektory na bázi aerosolu nebo hmotnostní spektrometry (kapitola 2.3). Signál detektoru je zpracován *počítačem vybaveným softwarem* do chromatografického záznamu neboli chromatogramu tvořeného elučními křivkami (píky). Mezi základní parametry chromatografické separace patří retenční čas (časový úsek: nástřik vzorku – vrchol píku, R_t), výška píku h , retenční faktor k , počet teoretických pater N , výškový ekvivalent teoretického patra H , faktor symetrie S , šířka píku v polovině (nebo jedné dvacetině) jeho výšky ($w_{0,5}$ resp. $w_{0,05}$), rozlišení R a poměr signálu k šumu S/N [3, 14–17].

Potřeba analyzovat větší sekvence složitých vzorků, které obsahují hodně analytů často přítomných v nízkých koncentracích, a s tím související požadavky na vyšší účinnost separace, lepší rozlišení, rychlejší analýzu a přiměřenou selektivitu metody vedly k rozvoji HPLC instrumentace a ke vzniku ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC) [18].

Pro UHPLC analýzu se standardně používají kratší kolony (délka 30 – 100 mm, vnitřní průměr 2,1 mm), které jsou naplněné sorbentem celkově porézních, nebo povrchově porézních částic o velikosti 1,3 – 2 μm . Částice menší než 2 μm poskytují větší povrch pro interakce se složkami vzorku a tím dochází ke zvýšení separační účinnosti a lepšímu rozlišení píků. Zároveň takto malé částice kladou větší odpor k toku mobilní fáze, což vede k nežádoucím jevům, jako je vznik teplotního gradientu a zvětšování zpětného tlaku na koloně. Z tohoto důvodu UHPLC systémy pracují při tlaku do 1000 – 1300 bar (HPLC do 400 bar). Díky vysoké separační účinnosti lze použít kratší kolony a tím značně zrychlit dobu analýzy. To je však spojeno s vyššími nároky na detekční systém, který musí snímat data s vysokou frekvencí. Pro UHPLC instrumentaci jsou dále typická robustnější čerpadla a dávkovací systémy, kovové kapiláry a jejich propojení, taktéž je kladen důraz na zmenšení mimokolonových objemů, kvalitu a odolnost stacionární fáze (teplotní, chemická stabilita a stabilita při vysokém tlaku). K dalším výhodám, kromě výše zmíněných, patří i nižší spotřeba analyzovaného vzorku, nižší spotřeba rozpouštědel, vyšší citlivost a jednoduchý transfer metod vyvinutých pro HPLC [16, 19, 20].

2.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry, MS) je citlivá, analytická instrumentální technika založená na principu ionizace molekul a následné separaci vzniklých iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) [21]. Hmotnostní spektrometry se běžně používají jako detektory ve spojení s HPLC systémem v oblasti bioanalýzy za účelem identifikace metabolitů v biologické matrici, potvrzení identity sloučenin a kvantifikaci analytů i ve velmi nízkých koncentracích [3].

2.3.1. Součásti hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru [21].

2.3.1.1. Iontový zdroj

V iontovém zdroji dochází k převodu analytů do plynného stavu se současnou ionizací přítomných neutrálních molekul. Existuje celá řada nejrůznějších ionizačních technik, nicméně v LC-MS bioanalýze se nejčastěji používají:

- ***Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization, ESI)*** – je vhodná pro středně polární až polární sloučeniny; mobilní fáze s analyty vstupuje do iontového zdroje kapilárou, na jejímž konci dochází k nebulizaci pomocí dusíku a zároveň k nabití vzniklých kapek (na kapiláru je přiváděno vysoké napětí); postupným odpařováním mobilní fáze se kapičky zmenšují a zvyšující se odpuzivé síly mezi ionty se stejným nábojem způsobí po překročení povrchového napětí (Rayleighův limit) tzv. Coulombickou explozi; výsledkem procesu, který probíhá za atmosférického tlaku, jsou samostatné ionty s jedním nebo více náboji [3].
- ***Ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)*** – používá se pro středně polární až nepolární analyty; zdrojem ionizace je koronární výboj, k němuž dochází díky vysokému napětí přiváděnému na kovovou jehlu, která je součástí iontového zdroje; nejprve jsou ionizovány molekuly mobilní fáze a ty dále předávají náboj molekulám analytu prostřednictvím ion-molekulárních reakcí [3].

- **Fotoionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric pressure photoionization, APPI*)** – je podobná APCI; ionizace malých nepolárních molekul je způsobena přímou ionizací pomocí fotonů z UV výbojky, ionizovanou mobilní fází (solventem asistovaná ionizace) nebo ionizací za pomoci dopantu [3].

2.3.1.2. Hmotnostní analyzátor

Srdcem hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor, kde ve vakuu probíhá rozdělení iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z), jejich urychlení a přesun do detektoru. Existuje několik typů hmotnostních analyzátorů: kvadrupól, trojrozměrná iontová past, lineární iontová past, analyzátor doby letu, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací a orbitrap [15, 16].

Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (kvadrupól, Quadrupole, Q) se skládá ze čtyř kovových tyčí, na které je vloženo stejnosměrné napětí (kladně a záporně nabitě tyče tvoří protilehlé dvojice) a vysokofrekvenční střídavé napětí (všechny tyče). Ionty po vstupu do kvadrupólu oscilují, na detektor se dostanou pouze ty, které vytvářejí stabilní trajektorii, ionty s nestabilní trajektorií jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. V praxi je často používán trojitý kvadrupól (QqQ), který je sestaven ze dvou kvadrupólových analyzátorů a kolizní cely, nebo se kvadrupól využívá v kombinaci s dalšími analyzátoři (Q-TOF, Q-Orbitrap) [3].

Trojrozměrná iontová past

Části trojrozměrné iontové pasti (3D-Ion trap, IT) tvoří prstencová elektroda a dvě koncové elektrody, na které je vloženo stejnosměrné a střídavé napětí. Ionty, které vstupují do IT vysokou rychlostí, jsou zpomaleny a zadrženy v elektrickém poli uvnitř IT, následně mohou být fragmentovány a podle m/z vypuzovány na detektor. Využití iontové pasti je především v kvalitativní analýze [3, 22].

Lineární iontová past

Lineární iontová past (Linear ion trap, LIT) je funkčním hybridem kvadrupólového analyzátoru a trojrozměrné iontové pasti (na obou koncích kvadrupólu jsou umístěny elektrody). Hlavní výhodou je vyšší iontová kapacita, která umožňuje spolehlivější kvantitativní stanovení [17, 22].

Analyzátor doby letu

Iontům je v analyzátoru doby letu (Time of flight analyser, TOF) udělena kinetická energie (elektromagnetickým pulzem), tím jsou urychleny do letové trubice (oblast bez elektrického pole), kde se pohybují různou rychlostí směrem k detektoru. Doba letu iontů, která se měří, je nepřímo úměrná hodnotě m/z (těžší ionty mají delší dobu letu) [3, 23].

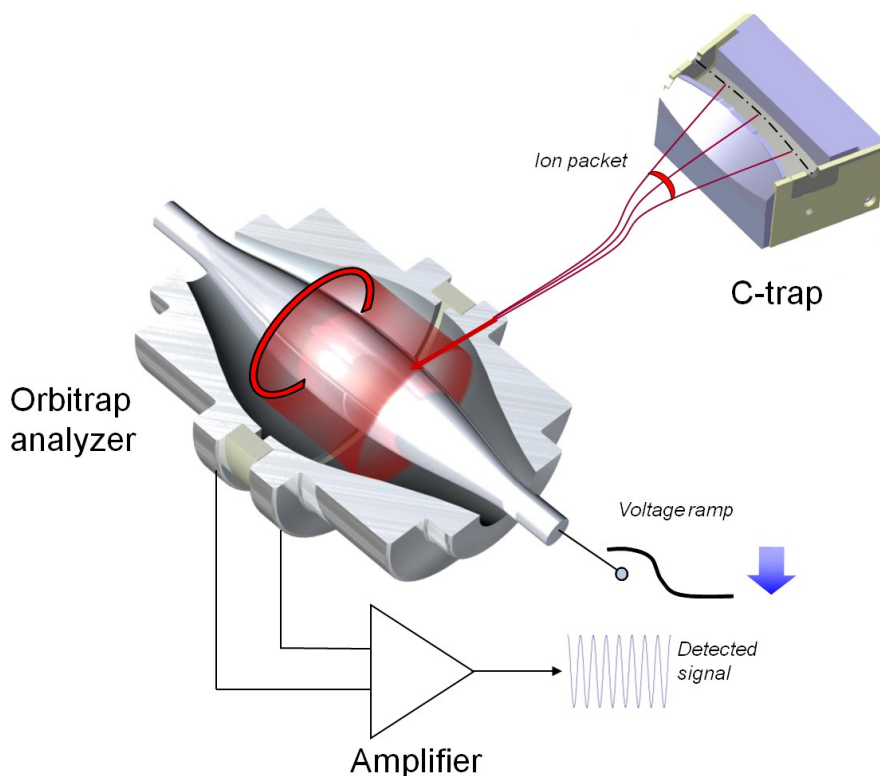
Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform - Ion cyclotron resonance, FT-ICR)

Ionty jsou zachyceny v silném magnetickém poli v cyklotronové cele, kde se pohybují po spirálovité trajektorii. Každý iont s hodnotou m/z má charakteristickou cyklotronovou frekvenci. Čím nižší je měřená frekvence, tím vyšší je hodnota m/z . Hmotnostní spektrum je získáno přepočtem frekvencí do stupnice m/z tzv. Fourierovou transformací. Přednostmi tohoto analyzátoru je vysoké rozlišení a správnost určení m/z [3, 23].

Orbitrap

Analyzátor orbitrap (orbitální past) byl na trh uveden v roce 2005 firmou Thermo Fisher Scientific. Orbitrap je sestaven z centrální vřetenovité a vnější trubicovité elektrody, na které je vloženo vysoké napětí (Obr. č. 5). Ionty vstupují do prostoru silného elektrického pole mezi elektrodami, kde se pohybují po stabilních iontových trajektoriích podél a okolo centrální elektrody. Frekvence harmonické oscilace podél středové osy závisí pouze na poměru m/z . Proud indukovaný pohybujícími se ionty je detekován vnější elektrodou a po Fourierově transformaci

signálu je získáno hmotnostní spektrum. Orbitrap se vyznačuje nejen velmi vysokým rozlišením a dynamickým rozsahem, ale i vysokou správností určení m/z [21, 23, 24].



Obr. č. 5: Schéma orbitální pasti [25]

2.3.1.3. Detektor

Detektor slouží k zesílení signálu a detekci iontů, proces probíhá ve vakuu. Data jsou sbírána softwarem v počítači, výsledkem je hmotnostní spektrum (graf závislosti absolutní/relativní intenzity iontů na jejich m/z). V MS se používají tři typy detektorů: elektronásobič, fotonásobič a Faradayova klec. Specifickým případem je hmotnostní spektrometr Orbitrap, kde se ionty indukovaný proud zaznamenává a přímo transformuje na signál [16, 17, 26].

2.3.2. Skenovací módy

V hmotnostní spektrometrii se pro identifikaci látek a kvantitativní analýzu využívá několik typů skenovacích módů:

- Záznam **TIC (Total ion current, Full scan)** – vzniká měřením celkového iontového proudu.
- Záznam rekonstruovaného iontového proudu (**RIC, reconstructed ion current**) – získává se z TIC, jedná se o záznam intenzity vybrané m/z v čase.
- Záznam vybraného iontu (**SIM, selected ion monitoring**) – MS měří jednu vybranou specifickou hodnotu m/z.
- Sken vybraných reakcí (**SRM, selected reaction monitoring**) – je vhodný pro kvantitativní analýzu; jedná se o záznam vybraného fragmentu m/z vzniklého z vybraného prekurzorového iontu.
- Tandemová MS/MS využívá i další skeny – např. sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů, sken neutrálních ztrát [15, 16, 22].

2.4. Validace bioanalytické metody

Cílem validace bioanalytické metody je prokázat, že vyvinutá metoda je spolehlivá, reprodukovatelná a vhodná pro zamýšlené použití. Validace bioanalytických metod se nejčastěji řídí podle směrnic: *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* schválenou americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) [27] a *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods* přijatou Evropskou lékovou agenturou (European Medicines Agency, EMA) [28]. V praxi se ještě využívá směrnice *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků pro léčiva pro humánní užití (International Council on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH), která je vhodná pro analytické aplikace, např. hodnocení léčivých přípravků [29].

2.4.1. Typy validací

Dle směrnic EMA a FDA se rozlišují tři typy validací:

1. **Plná validace** je důležitá v případě analýzy nového léčiva, vývoje a implementace nové bioanalytické metody, nebo pokud je do existující metody určené ke kvantifikaci přidán nový analyt (např. metabolit).
2. **Částečná validace** je vyžadována při modifikaci již validované bioanalytické metody, např. přenos do jiné laboratoře, změna detekčních systémů, biologické matrice nebo postupů zpracování vzorků atd.
3. **Kros-validace** porovnává validační parametry např. mezi dvěma bioanalytickými metodami (referenční a srovnávací) nebo v případě použití stejné bioanalytické metody v různých laboratořích [27, 28].

2.4.2. Validační parametry (směrnice EMA a FDA)

K základním sledovaným parametrům během validace bioanalytické metody patří: selektivita, preciznost (precision), přesnost (accuracy), opakovatelnost, kalibrační závislost, citlivost, stabilita, výtěžnost a matricové efekty.

Selektivita (Selectivity)

Selektivita analytické metody znamená schopnost odlišit cílový analyt od endogenních složek matrice a dalších složek přítomných ve vzorku (metabolity léčiva, produkty degradace vznikající při přípravě vzorku, další xenobiotika). Hodnotí se analýzou vzorků obsahujících pouze biologickou matici (plazma, sérum, moč atd. bez přítomnosti léčiva) získanou minimálně z 6 individuálních zdrojů [27, 28].

Přesnost (Accuracy) a preciznost (Precision)

Přesnost (Accuracy) bioanalytické metody vyjadřuje blízkost shody mezi stanovenou průměrnou a skutečnou koncentrací analytu (vyjádřeno v procentech). Preciznost (Precision) bioanalytické metody popisuje blízkost jednotlivých opakujících se měření (vyjádřeno jako variační koeficient, CV). Přesnost i preciznost se hodnotí jak v rámci jedné série analýz (intra-batch), tak i mezi sériemi (inter-batch), a to měřením minimálně pěti vzorků pro každou ze tří (FDA) nebo čtyř (EMA) koncentračních

úrovni. Musí být splněny tyto požadavky: **1)** pro přesnost (accuracy) – průměrná hodnota se musí pohybovat v rozmezí $100 \pm 15 \%$; u LLOQ $100 \pm 20 \%$, **2)** pro preciznost (precision) – hodnota CV nesmí překročit 15% ; u LLOQ 20% [27, 28].

Výtěžnost (Recovery)

Směrnice FDA definuje výtěžnost jako odpověď detektoru získanou po extrakci analytu z biologické matrice ve srovnání s odezvou detektoru u blankového extraktu s přídavkem odpovídajícího množství analytů. Měření by mělo být provedeno na třech koncentračních úrovních. Výtěžnost extrakce nemusí dosahovat 100% , důležitá je její opakovatelnost [27].

Kalibrační křivka (Calibration curve)

Kalibrační křivka popisuje závislost mezi odezvou detektoru a známou koncentrací analytu. Sestavuje se zvláště pro každý analyt na základě měření minimálně šesti vzorků (bez blanku a nulového vzorku) připravených z odpovídající matrice. Svým rozsahem pokrývá očekávané koncentrace analytu, je vymezena dolním limitem kvantifikace (LLOQ) a horním limitem kvantifikace (ULOQ). Součástí měření je i nulový vzorek (biologická matrice s vnitřním standardem) a slepý vzorek (pouze biologická matrice). Pro sestavení kalibrační závislosti by se měl využít co nejjednodušší regresní model (lineární), vážková analýza nebo složitější modely musí být jasně zdůvodněny. Obě směrnice vyžadují zpětný přepočítání kalibračních bodů. Výsledné hodnoty by se neměly vychýlit o více než 15% , výjimkou je bod LLOQ, kde je povolená odchylka 20% . Tato kritéria musí splnit 75% kalibračních vzorků (minimálně však 6, EMA); směrnice FDA hovoří o minimálně čtyřech ze šesti kalibračních vzorků [27, 28].

Stabilita (Stability)

Hodnocení stability analytu ve vzorku (pro konkrétní biologickou matrici a obalový materiál) zajišťuje, že během skladování, úpravy a analýzy vzorku nedojde k nežádoucímu ovlivnění koncentrace. Měření se provádí na dvou koncentračních

hladinách. Podmínky testů stability by měly co nejvíce odpovídat skutečnému zacházení se vzorkem. Výsledné koncentrace se nesmí vychýlit o více než 15 %. Testuje se:

- **Krátkodobá stabilita (short-term)** – většinou se hodnotí při laboratorní teplotě nebo teplotě zpracování vzorku po dobu 4 – 24 hodin.
- **Dlouhodobá stabilita (long-term)** – QC vzorky (Quality control) jsou uchovávány za stejných skladovacích podmínek, a to minimálně po stejnou dobu jako vzorky studované.
- **Stabilita při zmrazení a rozmrazení (freeze-thaw)** – je opakováno několik cyklů zmrazení a rozmrazení vzorku (dle směrnice FDA minimálně tři cykly).
- **Stabilita zpracovaných vzorků (post-preparative)** – stanovuje se stabilita upravených vzorků, např. v autosampleru.
- **Stabilita zásobních roztoků (stock-solution)** – hodnotí se za skladovacích a pracovních podmínek [27, 28].

Matricové efekty (Matrix effect)

Při využití hmotnostního spektrometru je nutné stanovit matricové efekty. Pro každý analyt a vnitřní standard je nutné určit matricový faktor (matrix faktor, MF), který se vypočítá jako poměr plochy píku vzorku obsahujícího biologickou matici, do které je po extrakci přidán analyt, k ploše píku vzorku obsahujícího pouze čisté rozpouštědlo a analyt. Matricové efekty se normalizují pomocí vnitřního standardu, tj. stanovuje se poměr mezi $MF_{(analyt)}$ a $MF_{(IS)}$. Měření se provádí nejméně na dvou koncentračních hladinách s použitím biologické matrice získané z 6 individuálních zdrojů. Výsledné odchylky nesmí přesáhnout 15 % [28].

Směrnice EMA dále definuje parametry:

- **Kros-kontaminace (Carry-over)** – jedná se o nežádoucí kontaminaci způsobenou neúplnou elucí analytu ze systému v důsledku jeho vysoké koncentrace. Hodnotí se analýzou blankového vzorku, která následuje ihned po analýze vzorku s vysokou koncentrací.
- **Diluční integrita (Dilution integrity)** – je požadováno, aby ředění koncentrovaných vzorků nemělo vliv na přesnost a preciznost.

- **Spodní mez stanovitelnosti (Lower limit of quantification, LLOQ)** – je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze spolehlivě stanovit s přijatelnou přesností a precizností (do 20 %) [28].

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

- a) vývoj a optimalizace extrakční metody pro vybraná antihypertenziva (amilorid; amlodipin; betaxolol; bisoprolol; carvedilol; celiprolol; indapamid; metoprolol; moxonidin; nebivolol; nitrendipin; rilmenidin a urapidil),
- b) následná validace celé bioanalytické metody pro potřeby posouzení compliance pacientů na základě stanovení koncentrace antihypertenziv v séru s využitím ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem o vysokém rozlišení (UHPLC-HRMS).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie, přístroje a pomůcky

4.1.1. Chemikálie

4.1.1.1. Standardy

- Amlodipin besylát, USP Reference Standard
- Betaxolol hydrochlorid, USP Reference Standard
- Bisoprolol fumarát, USP Reference Standard
- Carvedilol ≥ 98 % (HPLC), Sigma-Aldrich, USA
- Celiprolol hydrochlorid, European Pharmacopoeia Reference Standard, Štrasburk, Francie
- Hydrát hydrochloridu amiloridu ≥ 98 % (TLC), Sigma-Aldrich, Itálie
- Indapamid, Sigma-Aldrich, Čína
- Metoprolol tartrát ≥ 98 % (titration), Sigma-Aldrich, Itálie
- Moxonidin hydrochlorid ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Čína
- Nebivolol hydrochlorid ≥ 98 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Čína
- Nitrendipin > 95 %, Sigma-Aldrich, USA
- Rilmenidin hemifumarát, Sigma-Aldrich, USA
- Urapidil hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Německo

4.1.1.2. Vnitřní standardy

- Diazepam-d₅ roztok 1 mg/ml v methanolu, certifikovaný referenční materiál, Sigma-Aldrich, Německo
- Metoprolol-d₇ hydrochlorid, CLEARSYNTH, Kanada
- Reserpin, certifikovaný referenční materiál, TraceCERT®, Sigma-Aldrich, Německo
- Sufentanil-d₅ roztok 100 µg/ml v methanolu, certifikovaný referenční materiál, Sigma-Aldrich, Německo

4.1.1.3. Rozpouštědla

- Acetonitril LC-MS Chromasolv, Sigma-Aldrich, Izrael
- Dichlormethan, Sigma-Aldrich, Německo
- Ethylacetát LC-MS, Merck, Německo
- Hexan, Honeywell, Německo
- Methanol Chromasolv LC-MS $\geq 99,9$ %, Honeywell, Německo
- MTBE (*tert*-butyl-methylether) Chromasolv pro HPLC $\geq 99,8$ %, Sigma-Aldrich, Německo

4.1.1.4. Ostatní

- Aktivní uhlí, Sigma-Aldrich, Německo
- Hydroxid sodný 0,5 mol/l, BioUltra, pro luminiscenci, ≥ 98.0 % (T), Sigma-Aldrich, Německo
- Ultračistá voda (generátor Millipore)

4.1.2. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Radwag, Polsko
- Automatická pipeta Finnpiquette F1, Thermo Scientific, Finsko (rozsah 2 – 20 μ l, 20 – 200 μ l, 100 – 1000 μ l, 10 – 100 μ l, 5 – 50 μ l)
- Centrifuga Sigma, Německo
- Ultracentrifuga Hermle, Německo
- Laboratorní sklo (kádinky, vialky, inzerty)
- Polypropylenové zkumavky 2 ml a 5 ml, Sarstedt, Německo
- Špičky k automatické pipetě Finntip Flex 200 a Finntip Flex 1000
- Třepačka (Vortex) IKA Vibrax VXR Basic (typ VX2E), Německo
- Třepačka s rotačním pohybem
- UHPLC-MS, ThermoFisher Scientific, Německo
- Ultrazvuková lázeň Transsonic 420, Německo
- Vakuová odparka Christ, Německo

4.2. Pracovní postupy

4.2.1. Příprava roztoků

4.2.1.1. Příprava zásobních roztoků standardů

Pro vývoj a validaci metody byly používány zásobní roztoky standardů o třech koncentračních hladinách:

- 0,01 mg/ml (moxonidin; rilmenidin),
- 0,1 mg/ml (amilorid; amlodipin; betaxolol; bisoprolol; indapamid; nebivolol; nitrendipin),
- 1 mg/ml (carvedilol; celiprolol; metoprolol; urapidil).

Nejprve byly připraveny roztoky všech standardů o jednotné koncentraci 1 mg/ml. Standardy byly naváženy do plastových zkumavek a rozpuštěny v odpovídajícím objemu methanolu s využitím ultrazvuku. Cílové koncentrace zásobních roztoků (0,01 a 0,1 mg/ml) byly získány dalším ředěním methanolem. Všechny zásobní roztoky byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

4.2.1.2. Příprava zásobních roztoků vnitřních standardů

Během vývoje metody bylo testováno několik vnitřních standardů: izotopicky značené diazepam-d₅, metoprolol-d₇, sufentanil-d₅ a neznačený reserpin. Látky metoprolol-d₇ a reserpin byly naváženy do plastových zkumavek a rozpuštěny v příslušném objemu methanolu tak, aby odpovídaly koncentraci 1 mg/ml. Diazepam-d₅ a sufentanil-d₅ byly zakoupeny již ve formě methanolických roztoků o koncentracích 1 mg/ml (diazepam-d₅) a 0,1 mg/ml (sufentanil-d₅).

Zásobní roztoky vnitřních standardů vznikly dalším ředěním výchozích roztoků methanolem na požadované koncentrace uvedené níže:

- 5 000 ng/ml – roztok diazepamu-d₅,
- 10 000 ng/ml – roztoky metoprololu-d₇, reserpinu a sufentanilu-d₅.

Při vývoji a validaci metody byl používán směsný methanolický roztok vnitřních standardů (IS), který byl připraven smísením zásobních roztoků vnitřních standardů. Výsledné koncentrace jednotlivých IS ve směsném roztoku a cílové koncentrace IS ve vzorcích jsou uvedeny v Tab. č. 1 a Tab. č. 2.

Tab. č. 1: Koncentrace jednotlivých vnitřních standardů ve směsném roztoku

Látka	Koncentrace [ng/ml]
diazepam-d ₅	1 000
metoprolol-d ₇	2 000
reserpin	100
sufentanil-d ₅	100

Tab. č. 2: Výsledné koncentrace jednotlivých vnitřních standardů ve vzorcích

Látka	Koncentrace [ng/ml]
diazepam-d ₅	50
metoprolol-d ₇	100
reserpin	5
sufentanil-d ₅	5

Směsný roztok vnitřních standardů byl připraven v dostatečném množství pro potřeby vývoje a validace metody. Všechny zásobní roztoky vnitřních standardů byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

4.2.1.3. Příprava bodů kalibrační křivky

Pro validační účely bylo připraveno sedm směsných (multianalytových) roztoků představujících kalibrační body (K₁ – K₇). Smísením vypočítaných objemů zásobních roztoků standardů s methanolem byl získán kalibrační bod o nejvyšší koncentraci K₇. Individuální kalibrační body K₆ – K₁ byly připraveny postupným naředěním z předcházejících koncentrovanějších kalibrátorů. Výsledné koncentrace kalibrátorů včetně cílových koncentrací ve vzorku jsou uvedeny v Tab. č. 3 a Tab. č. 4. Všechny kalibrátory byly připraveny v dostatečném množství pro celý proces vývoje a validace metody a skladovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

Tab. č. 3: Koncentrace kalibrátorů

Standard	Koncentrace [ng/ml]						
	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇
Amilorid	39,0	78,0	156,3	312,5	625,0	1250,0	2500,0
Amlodipin	19,5	39,0	78,0	156,3	312,5	625,0	1250,0
Betaxolol	39,0	78,0	156,3	312,5	625,0	1250,0	2500,0
Bisoprolol	78,0	156,3	312,5	625,0	1250,0	2500,0	5000,0
Carvedilol	156,3	312,5	625,0	1250,0	2500,0	5000,0	10000,0
Celiprolol	312,5	625,0	1250,0	2500,0	5000,0	10000,0	20000,0
Indapamid	39,0	78,0	156,3	312,5	625,0	1250,0	2500,0
Metoprolol	312,5	625,0	1250,0	2500,0	5000,0	10000,0	20000,0
Moxonidin	5,0	9,8	19,5	39,0	78,0	156,3	312,5
Nebivolol	19,5	39,0	78,0	156,3	312,5	625,0	1250,0
Nitrendipin	39,0	78,0	156,3	312,5	625,0	1250,0	2500,0
Rilmenidin	9,8	19,5	39,0	78,0	156,3	312,5	625,0
Urapidil	156,3	312,5	625,0	1250,0	2500,0	5000,0	10000,0

Tab. č. 4: Výsledné koncentrace analytů ve vzorku

Standard	Koncentrace [ng/ml]						
	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₆	K ₇
Amilorid	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0
Amlodipin	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0
Betaxolol	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0
Bisoprolol	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0
Carvedilol	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0	400,0
Celiprolol	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0	400,0	800,0
Indapamid	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0
Metoprolol	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0	400,0	800,0
Moxonidin	0,2	0,4	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5
Nebivolol	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0
Nitrendipin	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0
Rilmenidin	0,4	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5	25,0
Urapidil	6,3	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0	400,0

4.2.1.4. Příprava QC roztoků

Pro účely validace metody byly připraveny methanolvé QC (Quality control) roztoky o třech koncentračních hladinách (QCA, QCB a QCC) zvolených dle kritérií směrnice EMA. Kontrolní roztok LLOQ (spodní mez stanovitelnosti) odpovídal nejnižšímu kalibračnímu bodu K₁.

Roztok QCC byl připraven z kalibračního bodu K₇ ředěním methanolem, přičemž obsah analyzovaných standardů činil 75 % původní koncentrace. Roztok QCB reprezentoval střední kontrolní rozmezí a obsahoval 75 % kalibračního bodu K₅. Nejméně koncentrovaný roztok QCA představoval trojnásobnou hodnotu LLOQ. Roztoky QCA a QCB byly získány ředěním roztoku QCC methanolem. Koncentrace standardů v jednotlivých QC roztocích a cílové koncentrace ve vzorcích jsou uvedeny v Tab. č. 5 a Tab. č. 6. Všechny QC roztoky včetně LLOQ byly připraveny v dostatečném množství pro celý proces validace a skladovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

Tab. č. 5: Koncentrace standardů v QC roztocích

Standard	Koncentrace [ng/ml]			
	LLOQ	QCA	QCB	QCC
Amilorid	39,0	117,0	468,8	1875,0
Amlodipin	19,5	58,5	234,4	937,5
Betaxolol	39,0	117,0	468,8	1875,0
Bisoprolol	78,0	234,0	937,5	3750,0
Carvediol	156,3	468,8	1875,0	7500,0
Celiprolol	312,5	937,5	3750,0	15000,0
Indapamid	39,0	117,0	468,8	1875,0
Metoprolol	312,5	937,5	3750,0	15000,0
Moxonidin	5,0	15,0	58,5	234,4
Nebivolol	19,5	58,5	234,4	937,5
Nitrendipin	39,0	117,0	468,8	1875,0
Rilmenidin	9,8	29,3	117,0	468,8
Urapidil	156,3	468,8	1875,0	7500,0

Tab. č. 6: Výsledné koncentrace analytů ve vzorcích na koncentračních hladinách
LLOQ, QCA, QCB a QCC

Standard	Koncentrace [ng/ml]			
	LLOQ	QCA	QCB	QCC
Amilorid	1,6	4,7	18,8	75,0
Amlodipin	0,8	2,3	9,4	37,5
Betaxolol	1,6	4,7	18,8	75,0
Bisoprolol	3,1	9,4	37,5	150,0
Carvediol	6,3	18,8	75,0	300,0
Celiprolol	12,5	37,5	150,0	600,0
Indapamid	1,6	4,7	18,8	75,0
Metoprolol	12,5	37,5	150,0	600,0
Moxonidin	0,2	0,6	2,3	9,4
Nebivolol	0,8	2,3	9,4	37,5
Nitrendipin	1,6	4,7	18,8	75,0
Rilmenidin	0,4	1,2	4,7	18,8
Urapidil	6,3	18,8	75,0	300,0

4.2.2. Příprava přečištěného blankového séra

Pro veškeré potřeby vývoje a validace metody bylo používáno přečištěné směsné sérum. Zásobní směsné sérum bylo získáno z transfuzního oddělení smísením séra několika desítek dárců krve. Následně bylo sérum přečištěno postupem vycházejícím z publikace M. Peitzsch a kol. [30]. K 4 ml séra ve zkumavce bylo přidáno 80 mg aktivního uhlí. Tato směs byla míchána 24 hodin na třepačce s rotačním pohybem a poté centrifugována 10 minut při 3 000 x g. Vzniklý supernatant byl přenesen do nové zkumavky a opět centrifugován po dobu 5 minut při 15 000 x g. Posledním krokem úpravy séra byla ultracentrifugace supernatantu při 80 000 x g po dobu 20 min. Přečištěné sérum bylo rozalíknotováno a uchováváno v mrazicím boxu při -20 °C.

4.2.3. Vývoj metody

4.2.3.1. Výběr vhodné extrakční metody a extrakčního rozpouštědla

Jako způsoby úpravy vzorku byly zkoušeny metody extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a proteinová precipitace. U každé z těchto metod byla testována různá organická rozpouštědla s ohledem na potřebnou výtěžnost a opakovatelnost.

Extrakce z kapaliny do kapaliny

Mezi testované extrakční kapaliny byla zahrnuta následující rozpouštědla: ethylacetát, hexan, MTBE, dichlormethan a směsi ethylacetát:dichlormethan (9:1), ethylacetát:MTBE (8:2), ethylacetát:MTBE:dichlormethan (8:1:1). K 96 μ l blankového séra byly přidány 4 μ l roztoku kalibračního bodu K₄ (střední hodnota kalibračního rozmezí) a 500 μ l extrakčního rozpouštědla. U vybraných rozpouštědel byla extrakce z kapaliny do kapaliny testována jak v neutrálním prostředí (bez úpravy pH), tak v alkalickém (přídavek 20 μ l 0,5 mol/l NaOH).

Vzorky byly 10 minut třepány na vortexu (rychlost 1 200 ot/min) a poté centrifugovány (5 minut; 15 000 x g; 20 °C). Z každého vzorku bylo odebráno 300 μ l supernatantu, přeneseno do nové zkumavky a následně odpařeno ve vakuové odparce při teplotě 40 °C. Odparek byl rekonstituován ve 100 μ l směsi methanol:voda (50:50), přenesen do vialky s inzertem a analyzován.

Pro výpočet výtěžnosti extrakce byl připraven referenční vzorek, který obsahoval 96 μ l směsi methanol:voda (50:50) a 4 μ l roztoku kalibračního bodu K₄. Obsah zkumavky byl přenesen do vialky s inzertem a vložen do autosampleru pro následnou analýzu.

Proteinová precipitace

Druhou testovanou metodou úpravy vzorků byla proteinová precipitace. K 96 μ l blankového séra byly přidány 4 μ l roztoku kalibračního bodu K₄ a 400 μ l organického rozpouštědla. Jako precipitační činidla byly použity methanol a acetonitril. Vzorky byly 2 minuty třepány na vortexu (1 200 ot/min) a následně centrifugovány (5 minut; 15 000 x g; 20 °C). Supernatant byl analyzován.

Pro výpočet výtěžnosti extrakce byl současně připraven referenční vzorek, který vznikl smísením 4 μl roztoku kalibračního bodu K_4 s 96 μl 80% acetonitrilu a byl přenesen do vialky s inzertem.

4.2.3.2. Opakovatelnost extrakce a výběr IS

Pro testování opakovatelnosti extrakce a výběru IS byly použity kalibrační body K_1 a K_2 . Za tímto účelem byly připraveny vzorky, které obsahovaly 91 μl blankového séra, 5 μl IS, 4 μl roztoku kalibračního bodu (K_1 nebo K_2) a 500 μl ethylacetátu. Vzorky byly dále upraveny metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (viz kap. 4.2.3.1).

Současně byly připraveny referenční vzorky pro kalibrační body K_1 a K_2 , které byly složeny z 96 μl směsi methanol:voda (50:50) a 4 μl roztoku kalibračního bodu K_1 nebo K_2 . Po promíchání byl obsah zkumavek přenesen do vialek s inzerty.

4.2.4. Validace

Validace metody vycházela ze směrnice EMA a byla provedena během třech měřících sekvencí ve třech různých dnech. V rámci validačních měření byly hodnoceny tyto parametry: kalibrační závislost, přesnost, preciznost, opakovatelnost, mezilehlá přesnost, výtěžnost, matricové efekty, selektivita, stabilita v autosampleru a stabilita při zmrazení a rozmrazení. Validací plán přípravy vzorků je uveden v Tab. č. 7.

Tab. č. 7: Validační plán přípravy vzorků

Vzorek	Počet připravovaných vzorků		
	1. SEKVENCE	2. SEKVENCE	3. SEKVENCE
Slepý vzorek	2	2	2
K ₀	2	2	2
K ₁	2	2	2
K ₂	2	2	2
K ₃	2	2	2
K ₄	2	2	2
K ₅	2	2	2
K ₆	2	2	2
K ₇	2	2	2
LLOQ (= K ₁)	6	6	6
QCA	6	6	6
QCB	6	6	6
QCC	6	6	6
Výtěžnost		4	
Matricové efekty		4	
Stabilita při zmrazení a rozmrazení			3
Stabilita v autosampleru			3

4.2.4.1. Příprava kalibračních vzorků

V každé z validačních sekvencí byly měřeny dvě série kalibračních bodů (K₁ - K₇). Jednotlivé vzorky byly připraveny následujícím způsobem: 96 µl blankového séra ve zkumavkách bylo smíšeno s 5 µl IS. Poté byly do každé zkumavky napipetovány vždy 4 µl příslušného roztoku kalibračního bodu. Současně byl připraven nultý kalibrátor K₀ a slepý vzorek. K₀ obsahoval 100 µl blankového séra a 5 µl IS. Slepý vzorek byl zastoupen pouze 100 µl blankového séra bez přídavku standardů a IS pro hodnocení tzv. carry-overu. Po přidání 500 µl ethylacetátu do každé zkumavky byly vzorky upraveny metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (viz kap. 4.2.3.1).

4.2.4.2. Příprava QC vzorků

QC vzorky (LLOQ, QCA, QCB a QCC) byly připravovány v každé validační sérii (n=6). K 96 μl blankového séra bylo pipetováno 5 μl IS a 4 μl roztoku zastupujícího danou koncentrační úroveň (K_1 ; QCA; QCB; QCC). Po přidání 500 μl ethylacetátu byly vzorky zpracovány metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (viz kap. 4.2.3.1).

4.2.4.3. Výťažnost extrakce

Měření výtěžnosti extrakce bylo provedeno na třech koncentračních úrovních (QCA, QCB a QCC) vždy z počtu 4 vzorků v sérii (Tab. č. 5 a Tab. č. 6).

Do zkumavky se 100 μl blankového séra bylo přidáno 500 μl ethylacetátu. Po provedení extrakce z kapaliny do kapaliny byly odparky rekonstituovány v 91 μl směsi methanol:voda (50:50) s přidavkem 5 μl IS a 4 μl jednoho z QC zásobních roztoků. Po promíchání byl obsah zkumavek přepipetován do vialek s inzerty a analyzován.

4.2.4.4. Matricové efekty

Matricové efekty byly testovány na třech koncentračních úrovních (QCA, QCB a QCC). K 91 μl směsi methanol:voda (50:50) bylo přidáno 5 μl IS a 4 μl jednoho z QC zásobních roztoků. Po promíchání byl obsah zkumavek přenesen do vialek s inzerty. Pro každou koncentrační úroveň byly připraveny 4 vzorky.

4.2.4.5. Stabilita při zmrazení a rozmrazení

Dle směrnice EMA je v rámci validačních parametrů vyžadováno hodnocení stability při zmrazení a rozmrazení vzorku na dvou koncentračních hladinách. Pro tento účel sloužily roztoky QCB a QCC. Vzorky pro analýzu stability vznikly smísením 672 μl blankového séra a 28 μl roztoku QCB nebo QCC. Po promíchání bylo vždy 330 μl přeneseno do nové zkumavky. Tak byly vytvořeny dva zásobní sérové pooly pro každou koncentrační úroveň označené 1QCB, 2QCB, 1QCC, 2QCC. Zkumavky 2QCB a 2QCC byly ponechány v lednici. Zkumavky 1QCB a 1QCC byly zmrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 minut a poté rozmrazeny umístěním do teplé vody (cca $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) na dobu 5 minut. Tento krok byl opakován celkem třikrát. Následně bylo

do všech zkumavek (1QCB, 2QCB, 1QCC, 2QCC) pipetováno 16,5 µl IS. Po promíchání bylo vždy z jedné zkumavky přeneseno 3 × 100 µl do nových zkumavek. Tak vznikl triplikát z každé zkumavky. Po přidání 500 µl ethylacetátu byly vzorky dále zpracovány metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (viz kap. 4.2.3.1).

4.2.4.6. *Stabilita v autosampleru*

Stabilita v autosampleru byla posuzována na koncentračních úrovních QCB a QCC. Vzorky, které obsahovaly 96 µl blankového séra, 5 µl IS a 4 µl roztoku QCB nebo QCC, byly po přidání 500 µl ethylacetátu zpracovány metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (viz kap. 4.2.3.1) a analyzovány. Následně byly ponechány 24 hodin v autosampleru, opět nastříknuty na kolonu a vyhodnoceny.

4.2.4.7. *Selektivita*

Směrnice EMA vyžaduje pro hodnocení selektivity analýzu blankových vzorků biologické matrice minimálně ze šesti zdrojů. V našem případě se jednalo o sérum, které bylo získáno od náhodně vybraných šesti jedinců ve věku do 30 let, kdy byla nízká pravděpodobnost užívání antihypertenziv. Ke 100 µl séra bylo přidáno 500 µl ethylacetátu a po provedení extrakce z kapaliny do kapaliny (viz kap. 4.2.3.1) byly vzorky analyzovány.

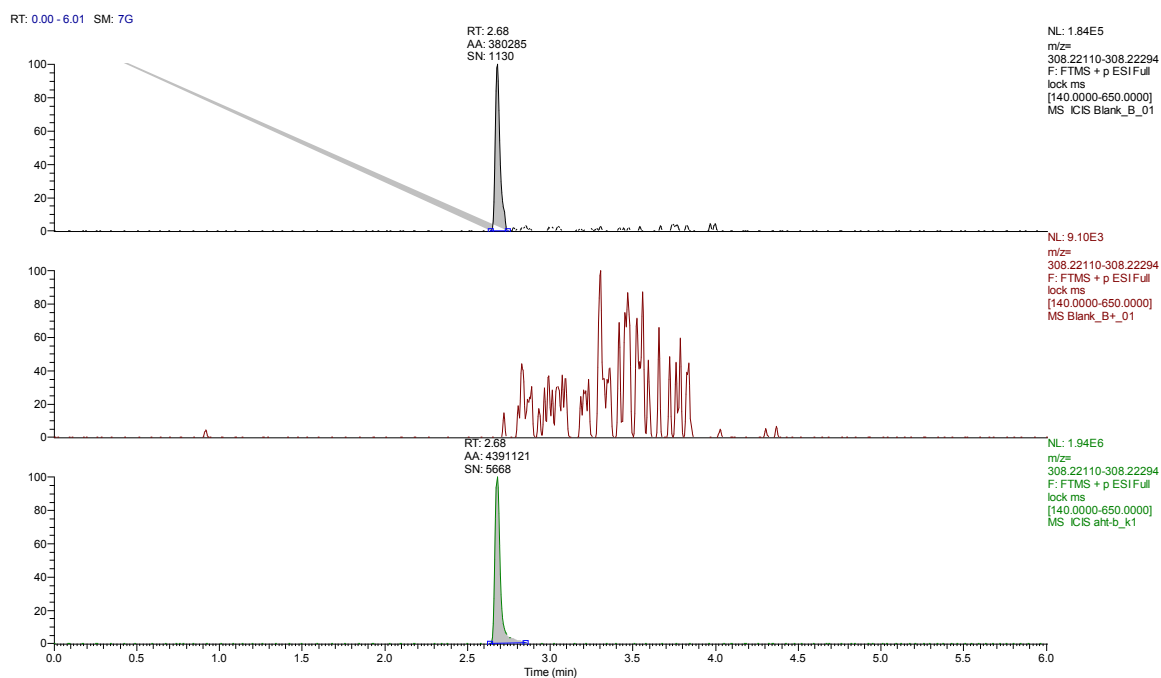
4.2.5. Příprava klinických vzorků

Do zkumavky se 100 µl patientského séra bylo přidáno 5 µl IS a 500 µl ethylacetátu. Vzorky byly zpracovány metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (viz kap. 4.2.3.1) a analyzovány.

5. VÝSLEDKY

5.1. Příprava přečištěného blankového séra

Pro vývoj metody jsme použili sérový pool z transfuzního oddělení, který jsme získali smísením séra několika náhodně vybraných dárců krve. Při počátečním testování se ukázalo, že některý z dárců musel užívat β -blokátor betaxolol. I když se betaxolol vyskytoval v poměrně malém množství ($\pm 10\%$ hodnoty LLOQ), docházelo k falešnému navýšování měřené koncentrace. Pro správný vývoj metody a následnou validaci bylo žádoucí sérum přečistit výše uvedeným postupem. Chromatografický záznam blankového séra z transfuzního oddělení bez přečištění a po přečištění ukazuje Obr. č. 6.



Obr. č. 6: 1 – blankové sérum z TO bez přečištění; 2 – blankové přečištěné sérum;
3 – Betaxolol (K_1 =LLOQ)

Základní biochemické parametry směsného a přečištěného blankového séra jsou uvedeny v Tab. č. 8. Z těchto parametrů vyplývá, že proces přečištění neovlivnil „kvalitu“ matrice, tj. množství proteinů a lipidů zůstalo téměř zachováno. Pouze došlo

k odstranění nízkomolekulárních hydrofobních látek, které se naadsorbovaly na aktivní uhlí (parametr celkový T3 a T4).

Tab. č. 8: Základní biochemické parametry směsného a přečištěného blankového séra

Parametr	Směsné sérum z TO	Přečištěné sérum
Celková bílkovina (g/l)	77,3	76,1
Cholesterol (mmol/l)	5,41	4,25
Triacylglyceroly (mmol/l)	1,69	1,35
Trijodthyronin (T3) – celkový (nmol/l)	1,93	<0,30 (LOD)
Thyroxin (T4) – celkový (nmol/l)	115,1	6,77

5.2. Výběr vhodné extrakční metody a extrakčního rozpouštědla

5.2.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakci z kapaliny do kapaliny jsme prováděli s extrakčními rozpouštědly dichlormethan (DCM), ethylacetát (EtAC), hexan, MTBE a jejich kombinacemi: ethylacetát:dichlormethan (9:1), ethylacetát:MTBE (8:2), ethylacetát:MTBE:dichlormethan (8:1:1). Procentuální výtěžnost standardů u jednotlivých rozpouštědel jsme získali na základě výpočtu poměru plochy analytu ve vzorku k ploše analytu v čistém rozpouštědle. To znamená, že do výsledné výtěžnosti se promítal i vliv matricových efektů, nicméně pro účely vývoje extrakční metody je tento fakt nepodstatný. Výsledky procentuální výtěžnosti standardů jsou uvedeny v Tab. č. 9 a Tab. č. 10 včetně variačních koeficientů.

Nejprve jsme testovali extrakci v neutrálním prostředí (bez úpravy pH) za použití dichlormethanu, ethylacetátu, hexanu a MTBE jako extrakčních rozpouštědel (Tab. č. 9). V případě dichlormethanu byla výtěžnost pro většinu standardů větší než 50 %, kromě amlodipinu (37,4 %), indapamidu (10,0 %) a amiloridu, který se prakticky neextrahoval. Hexan se ukázal být nejméně vhodnou extrakční kapalinou, protože požadovanou výtěžnost jsme získali pouze u betaxololu (110,3 %), bisoprololu (85,0 %) a metoprololu (78,8 %). U amlodipinu, nitrendipinu a rilmenidinu se výtěžnost

pohybovala okolo akceptovatelných 50 %. Ostatní standardy se extrahovaly v zanedbatelném množství nebo vůbec. Velké rozdíly v účinnosti extrakce se objevovaly při použití MTBE (6,1 – 142,5 %). Hodnotu 120 % přesahovaly amlodipin, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, metoprolol a nitrendipin, což mohlo být způsobeno výraznými pozitivními matricovými efekty. Naopak u amiloridu, indapamidu a moxonidinu jsme nedosáhli výtěžnosti větší než 50 %. MTBE bylo vhodnou extrakční kapalinou pouze pro carvedilol (87,4 %), nebivolol (96,5 %), rilmenidin (99,9 %) a urapidil (66,7 %). Nejlepší výtěžnosti s dobrou opakovatelností u všech standardů jsme získali při extrakci do ethylacetátu (68,3 – 119,0 %). Pouze u amiloridu nebyla výtěžnost zcela optimální (68,3 %), ale oproti dichlormethanu (0,6 %), hexanu (0 %) a MTBE (6,1 %) jsme extrakcí ethylacetátem dosáhli nejvyšší hodnoty.

Tab. č. 9: Výtěžnost standardů extrahovaných z blankového séra v neutrálním prostředí včetně variačního koeficientu

Standard	Výtěžnost [%]			
	DCM	EtAC	Hexan	MTBE
Amilorid	0,6 ± 14,1	68,3 ± 3,7	0	6,1 ± 11,3
Amlodipin	37,4 ± 7,5	100,9 ± 2,9	55,3 ± 9,5	126,6 ± 10,7
Betaxolol	99,0 ± 7,5	116,1 ± 3,2	110,3 ± 5,7	140,7 ± 6,7
Bisoprolol	113,1 ± 6,2	110,4 ± 3,6	85,0 ± 5,6	142,5 ± 8,7
Carvedilol	56,3 ± 8,0	94,0 ± 3,2	4,6 ± 6,8	87,4 ± 5,9
Celiprolol	100,9 ± 2,6	116,1 ± 3,7	0,4 ± 5,0	130,5 ± 3,7
Indapamid	10,0 ± 9,9	105,4 ± 3,3	0	20,5 ± 1,5
Metoprolol	121,0 ± 5,6	119,0 ± 2,8	78,8 ± 5,3	139,0 ± 5,2
Moxonidin	77,1 ± 6,7	93,2 ± 3,3	0	44,9 ± 5,0
Nebivolol	54,5 ± 8,3	93,8 ± 3,8	6,5 ± 4,1	96,5 ± 8,0
Nitrendipin	56,3 ± 8,9	72,0 ± 4,6	55,0 ± 6,6	129,4 ± 8,3
Rilmenidin	81,1 ± 8,5	99,2 ± 2,3	50,2 ± 9,6	99,9 ± 7,8
Urapidil	101,1 ± 6,2	104,9 ± 3,8	0,6 ± 2,8	66,7 ± 17,5

Analyzované standardy nejsou kyselé povahy, proto jsme zjišťovali, zda se účinnost extrakce nezvýší úpravou pH prostředí hydroxidem sodným, který měl koncentraci 0,5 mol/l (Tab. č. 10). V případě extrakce do dichlormethanu měla zmíněná úprava pH výrazně pozitivní vliv na výtěžnost všech standardů (Graf č. 1),

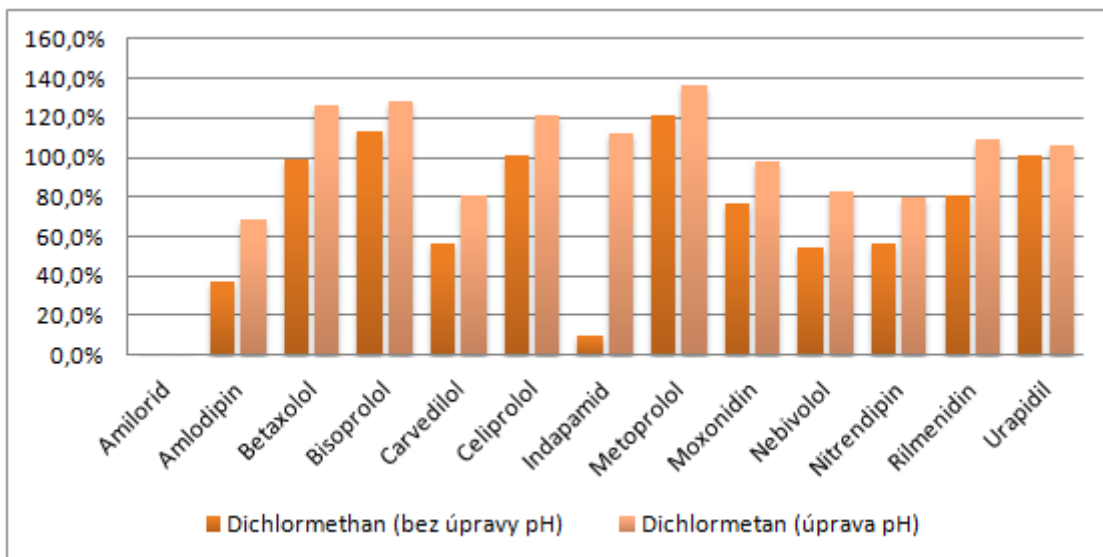
kromě amiloridu, který i přesto byl minimálně extrahován (1,1 %). Naopak u hexanu jsme ani přidavkem hydroxidu sodného nedokázali extrahovat standardy amilorid, carvedilol, celiprolol, indapamid, moxonidin a urapidil, které vykazovaly v neutrálním prostředí nulovou výtěžnost. U amlodipinu, betaxololu, bisoprololu, metoprololu, nebivololu, nitrendipinu a rilmenidinu se výtěžnost dokonce výrazně snížila (Graf č. 2). Negativně se projevila úprava pH také u MTBE, kde došlo ke snížení výtěžnosti všech standardů (Graf č. 3). Rozdílně ovlivnil přidavek hydroxidu sodného extrakci ethylacetátem (Graf č. 4). Ke snížení hodnot došlo u amiloridu, betaxololu, bisoprololu, celiprololu, indapamidu, metoprololu, nitrendipinu a urapidilu. Vyšší výtěžnosti jsme získali u amlodipinu, carvedilolu, nebivololu a rilmenidinu. Pouze u moxonidinu nebyla výtěžnost ovlivněna vůbec.

Po úpravě pH prostředí hydroxidem sodným (0,5 mol/l) jsme dále testovali výtěžnost extrakce za použití směsí rozpouštědel ethylacetát:dichlormethan (9:1), ethylacetát:MTBE (8:2), ethylacetát:MTBE:dichlormethan (8:1:1) (Tab. č. 10). Výtěžnost byla nižší než např. u ethylacetátu v neutrálním prostředí, proto jsme tyto směsi neuvažovali jako vhodné extrakční kapaliny.

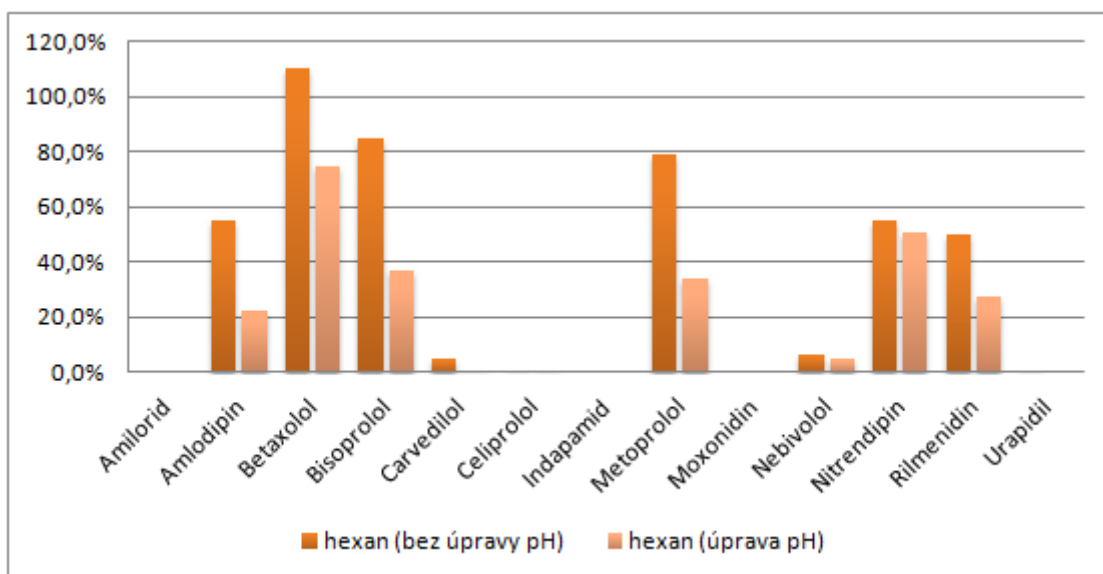
Jak vyplývá z uvedených výsledků, nejlepší výtěžnost s dobrou opakovatelností pro všechny standardy jsme získali u extrakce do ethylacetátu v neutrálním prostředí (bez úpravy pH). Z tohoto důvodu jsme pro úpravu vzorku extrakcí z kapaliny do kapaliny a následnou validaci metody zvolili ethylacetát jako nejvhodnější extrakční kapalinu.

Tab. č. 10: Výtěžnost standardů extrahovaných z blankového séra při úpravě pH hydroxidem sodným včetně variačních koeficientů

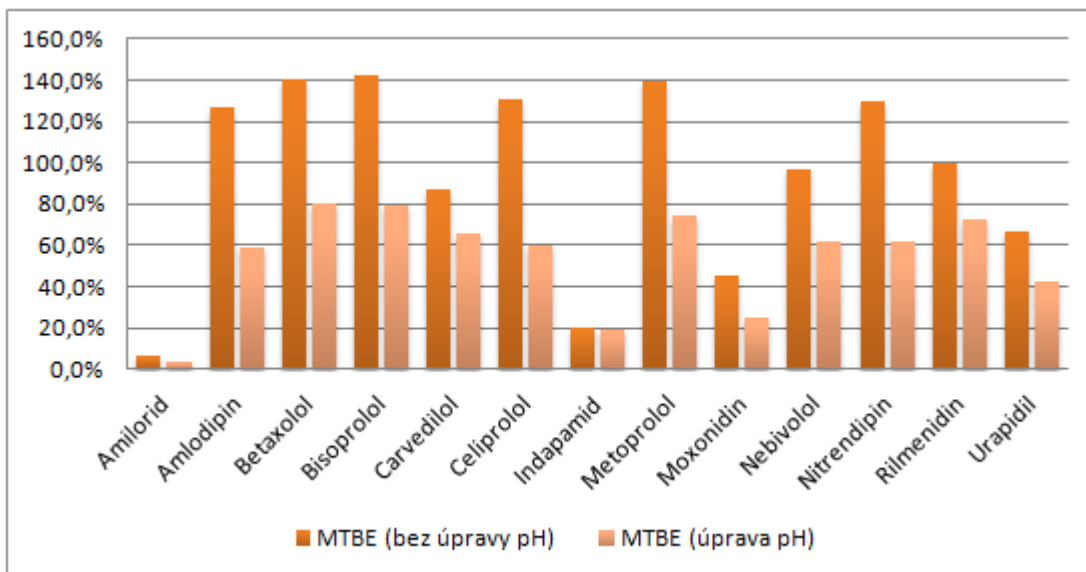
Standard	Výtěžnost [%]						
	DCM	EtAC	Hexan	MTBE	EtAC:DCM (9:1)	EtAC:MTBE (8:2)	EtAC:MTBE:DCM (8:1:1)
Amilorid	1,1 ± 9,2	54,1 ± 2,3	0	3,3 ± 4,0	35,6 ± 2,2	37,3 ± 2,6	34,1 ± 3,0
Amlodipin	68,2 ± 13,2	112,7 ± 3,6	22,7 ± 2,9	59,4 ± 6,1	49,3 ± 3,7	56,6 ± 5,2	56,4 ± 7,7
Betaxolol	126,1 ± 2,7	109,5 ± 2,5	74,5 ± 2,9	80,3 ± 4,3	75,5 ± 0,4	78,9 ± 3,7	82,3 ± 1,9
Bisoprolol	128,5 ± 2,3	100,3 ± 3,0	36,7 ± 2,5	79,1 ± 3,2	70,9 ± 2,0	76,7 ± 3,8	80,5 ± 3,7
Carvedilol	81,2 ± 3,3	105,9 ± 2,7	0,6 ± 9,9	65,3 ± 6,3	60,7 ± 7,8	48,9 ± 7,1	55,4 ± 7,3
Celiprolol	121,0 ± 3,3	99,0 ± 3,0	0,1 ± 3,0	59,6 ± 4,0	63,1 ± 2,9	66,8 ± 3,2	70,9 ± 2,8
Indapamid	112,2 ± 3,6	101,2 ± 1,8	0	18,7 ± 12,2	72,5 ± 4,5	75,7 ± 2,0	79,5 ± 3,4
Metoprolol	136,3 ± 1,8	109,3 ± 2,9	33,7 ± 2,3	74,0 ± 3,3	71,8 ± 0,7	77,1 ± 5,3	81,3 ± 3,5
Moxonidin	97,8 ± 2,9	93,1 ± 2,8	0	25,2 ± 2,2	56,2 ± 0,3	57,7 ± 2,6	61,2 ± 2,8
Nebivolol	82,9 ± 3,7	109,0 ± 1,5	4,9 ± 2,9	61,6 ± 6,1	63,6 ± 4,8	47,0 ± 8,7	59,1 ± 8,6
Nitrendipin	79,7 ± 28,3	68,1 ± 1,4	50,8 ± 0,7	61,4 ± 9,2	56,7 ± 17,3	29,9 ± 8,3	38,4 ± 11,4
Rilménidin	109,3 ± 2,2	102,0 ± 4,4	27,2 ± 3,6	72,2 ± 6,4	66,6 ± 3,5	71,5 ± 2,2	73,4 ± 1,7
Urapidil	105,9 ± 1,4	95,2 ± 1,9	0	42,2 ± 4,0	58,4 ± 6,0	72,1 ± 1,6	76,1 ± 2,5



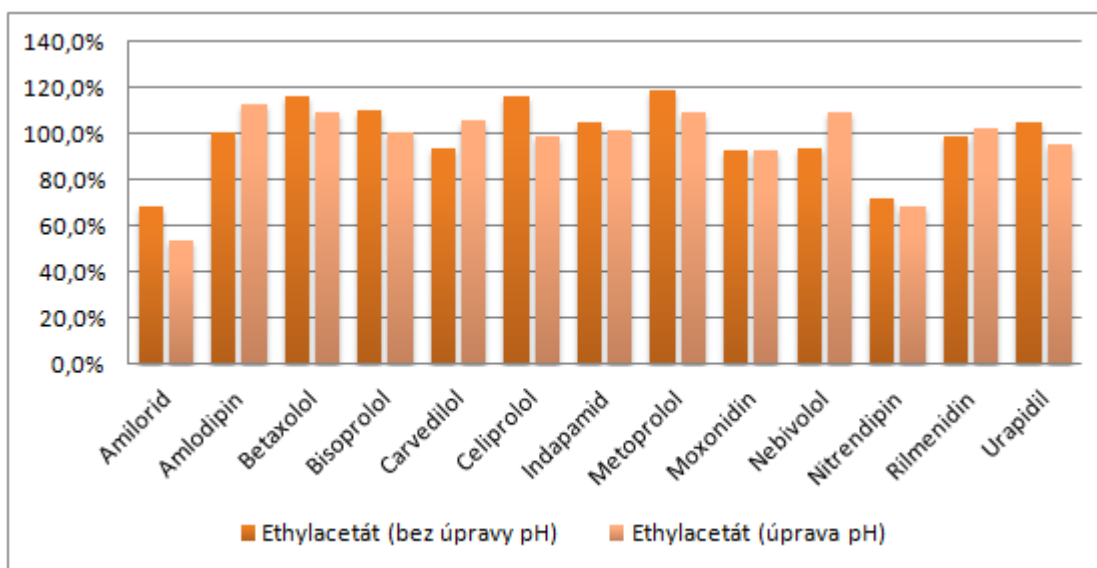
Graf č. 1: Výtěžnost standardů po extrakci do dichlormethanu



Graf č. 2: Výtěžnost standardů po extrakci do hexanu



Graf č. 3: Výtěžnost standardů po extrakci do MTBE



Graf č. 4: Výtěžnost po extrakci do ethylacetátu

5.2.2. Proteinová precipitace

Druhým testovaným extrakčním postupem byla proteinová precipitace. Jako precipitační činidla jsme zkoušeli acetonitril a methanol, která jsme přidávali ke vzorku v poměru 1:4. Koncentrace standardů ve vzorku odpovídala kalibračnímu bodu K_4 (střední hodnota kalibračního rozmezí). Tak jako v případě LLE jsme výtěžnost extrakce počítali z poměru plochy analytu ve vzorku k ploše analytu v čistém rozpouštědle. Procentuální výtěžnosti standardů jsou uvedeny v Tab. č. 11.

V případě acetonitrilu i methanolu se výtěžnost všech standardů pohybovala okolo 100 %. Nicméně ve srovnání s LLE se absolutní plochy pod píkem značně snížily v důsledku pětinasobného naředění vzorku organickou fází. Nastal problém s citlivostí metody, zvláště u standardů jako amlodipin, moxonidin, nitrendipin nebo rilmenidin, kde jsme potřebovali dosáhnout nízkého limitu kvantifikace. Z tohoto důvodu jsme proteinovou precipitaci nezvolili jako metodu úpravy vzorku.

Tab. č. 11: Proteinová precipitace - výtěžnost standardů

Standard	Výtěžnost [%]	
	Acetonitril	Methanol
Amilorid	96,6	121,3
Amlodipin	101,4	110,6
Betaxolol	93,7	103,9
Bisoprolol	98,6	114,4
Carvedilol	100,6	106,1
Celiprolol	103,0	120,9
Indapamid	98,1	100,4
Metoprolol	101,7	108,2
Moxonidin	101,9	104,2
Nebivolol	100,3	106,5
Nitrendipin	95,0	99,6
Rilmenidin	98,5	108,7
Urapidil	125,8	136,9

5.3. Opakovatelnost extrakce a výběr IS

Opakovatelnost extrakce jsme hodnotili na koncentrační úrovni odpovídající kalibračnímu bodu K_1 (LLOQ) a K_2 , abychom ověřili, zda je extrakční metoda reprodukovatelná i pro nízké koncentrace analytů. Současně jsme hodnotili vliv vnitřních standardů diazepamu- d_5 , metoprololu- d_7 , sufentanilu- d_5 a reserpinu. V Tab. č. 12 a 13 je ve formě variačního koeficientu vyjádřena opakovatelnost extrakce ($n=5$), kdy první sloupec odpovídá opakovatelnosti extrakce bez vlivu IS, v dalších sloupcích je vyjádřen vliv vnitřního standardu. Z výsledků vyplývá, že nejméně přijatelným IS by byl reserpin, který u některých standardů opakovatelnost dokonce zhoršil. Při přepočtu na sufentanil- d_5 se hodnoty variačního koeficientu u většiny analytů zlepšily, nicméně nejlepších výsledků jsme dosáhli s přepočtem na diazepam- d_5 nebo metoprolol- d_7 .

V rámci první série validačního měření jsme vyhodnocovali vliv vnitřních standardů metoprololu- d_7 a diazepamu- d_5 na linearitu kalibrační závislosti a opakovatelnost měření. V případě metoprololu- d_7 jsme získali nejpříznivější výsledky pro všechny analyty, proto jsme jej vybrali jako jediný vnitřní standard pro celý validační proces.

Tab. č. 12: Opakovatelnost extrakce pro K_1

Standard	Variační koeficient [%]				
	Bez vlivu IS	Diazepam- d_5	Metoprolol- d_7	Reserpin	Sufentanil- d_5
Amilorid	10,2	6,6	7,5	7,6	6,9
Amlodipin	11,8	7,3	8,3	13,5	12,2
Betaxolol	7,5	1,9	2,1	7,5	6,1
Bisoprolol	8,2	3,6	3,0	8,8	7,4
Carvedilol	5,2	4,4	5,3	4,5	3,8
Celiprolol	12,6	2,0	3,7	8,4	7,2
Indapamid	12,0	5,9	5,4	10,1	8,9
Metoprolol	9,2	3,4	1,3	7,8	6,4
Moxonidin	9,0	3,5	3,2	9,5	8,0
Nebivolol	6,1	3,3	4,7	4,3	3,0
Nitrendipin	28,1	18,0	15,1	16,9	17,3
Rilmenidin	8,4	3,0	4,7	9,2	7,8
Urapidil	7,1	4,9	8,0	10,3	9,0

Tab. č. 13: Opakovatelnost extrakce pro K₂

Standard	Variační koeficient [%]				
	Bez vlivu IS	Diazepam-d ₅	Metoprolol-d ₇	Reserpin	Sufentanil-d ₅
Amilorid	1,3	2,5	2,0	6,5	3,5
Amlodipin	4,6	4,8	3,9	6,8	5,3
Betaxolol	2,4	0,5	0,8	7,7	4,6
Bisoprolol	2,8	0,8	1,0	8,0	4,8
Carvedilol	3,8	5,4	4,4	4,0	3,0
Celiprolol	3,2	2,2	1,4	7,1	4,4
Indapamid	3,9	2,4	1,8	7,8	5,2
Metoprolol	3,1	1,0	1,6	8,3	5,1
Moxonidin	1,1	1,9	1,3	6,5	3,3
Nebivolol	5,2	6,1	5,3	4,9	4,4
Nitrendipin	6,9	8,3	7,7	4,3	4,7
Rilmenidin	4,0	1,7	2,4	9,1	5,9
Urapidil	6,1	3,4	4,3	11,1	8,0

5.4. UHPLC-HRMS analýza

Stanovení hladin vybraných antihypertenziv jsme prováděli na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením Q-Exactive Focus ve spojení se systémem pump Dionex Ultimate 3000 RS (Thermo Scientific). Hmotnostní spektrometr, vybavený Ionizačním zdrojem HESI-II (Heated-electrospray ionization), operoval v pozitivním módu ionizace s nastavením těchto parametrů: spray voltage + 3.5 kV; S-lens RF level + 70 V; capillary temperature 350 °C; aux gas heater temperature 350 °C; sheet gas flow 45 arbitrary units; auxiliary gas flow 15 arbitrary units.

Měření probíhalo v módu FullMS (skenování celého spektra) v rozmezí m/z 140 – 650 s rozlišením 70 000. Analyty byly měřeny jako vodíkové adukty [M+H]⁺ s přesností měření < 2 ppm. Pro účely vnitřní kalibrace hmot byl vybrán polysiloxan (m/z 144.17468) jako tzv. lock mass. Seznam analytů je uveden v Tab. č. 14.

Tab. č. 14: Seznam analytů

Analyt	Sumární vzorec	[M+H] ⁺	Rt (min)
Amilorid	C ₆ H ₈ ClN ₇ O	230.0552	1.74
Amlodipin	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	409.1525	2.97
Betaxolol	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	308.222	2.69
Bisoprolol	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	326.2326	2.54
Carvedilol	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	407.1965	2.88
Celiprolol	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₄	380.2544	2.45
Indapamid	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S	366.0674	2.95
Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	268.1907	2.27
Moxonidin	C ₉ H ₁₂ ClN ₅ O	242.0803	1.63
Nebivolol	C ₂₂ H ₂₅ F ₂ NO ₄	406.1824	2.99
Nitrendipin	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₆	361.1394	3.54
Rilmenidin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O	181.1335	2.07
Urapidil	C ₂₀ H ₂₉ N ₅ O ₃	388.2343	2.21
Metoprolol-d ₇	C ₁₅ H ₁₈ D ₇ NO ₃	275.2347	2.27

Pro separaci analytů jsme použili kolonu Luna Omega Polar C18 50 × 2.1 ID, 1,6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) chráněnou odpovídající předkolonkou (C18, Phenomenex). Separaci jsme prováděli v gradientovém módu s rychlostí průtoku mobilní fáze 0,6 ml/min a při 45 °C. Složení mobilní fáze bylo následující: roztok A – 0,1% HCOOH; roztok B – ACN:MeOH (50:50) s obsahem 0,1% HCOOH. Program gradientu: 99 % A 0 – 0,5 min; 0 % A 0,5 – 3,5 min; proplach kolony při 100% organice a následná ekvibrace do výchozích podmínek. Celková doba analýzy byla 6 minut.

5.5. Validace

Po zjištění optimálních podmínek vyvíjené metody ke stanovení vybraných antihypertenziv jsme přistoupili k validaci. V rámci validačního procesu jsme posuzovali parametry: kalibrační závislost, přesnost, preciznost, opakovatelnost, mezilehlá přesnost, výtěžnost, matricové efekty, selektivita, stabilita v autosampleru a stabilita při zmrazení a rozmrazení. Všechny hodnocené parametry splňovaly kritéria směrnice EMA.

V Tab. č. 15 jsou pro jednotlivé standardy o příslušné koncentrační hladině (LLOQ, QCA, QCB a QCC) uvedeny výsledné hodnoty přesnosti a preciznosti

pro každou z validačních sérií včetně výsledků mezi sériemi, celkové směrodatné odchylky a celkového průměru změřené koncentrace. Výsledky splňují kritéria směrnice EMA a pohybují se v rámci povolených odchylek, tj. na LLOQ v rozmezí $\pm 20 \%$ a na koncentračních hladinách QCA, QCB, QCC $\pm 15 \%$.

Výsledky pro parametry matricové efekty a výtěžnost jsou zahrnuty v Tab. č. 16. Efekt matrice jsme hodnotili z důvodu využití hmotnostního spektrometru. Bylo splněno kritérium směrnice EMA, tj. získané hodnoty se nevychýlily o více než 15 %. Pouze v případě amlodipinu a amiloridu byla odchylka hraniční. Jelikož jsou matricové efekty korigovány pomocí vnitřního standardu, mohl by být pro lepší kompenzaci u amlodipinu a amiloridu zvolen jiný vnitřní standard. Metoprolol- d_7 je ale vhodným vnitřním standardem pro všechna analyzovaná antihypertenziva a splňuje požadovaná kritéria.

Výtěžnost (Tab. č. 16) se pohybovala v rozmezí 70 – 102 %, až na amlodipin, moxonidin, nebivolol, nitrendipin a rilmenidin (50 – 70 %). I při nižších hodnotách výtěžnosti jsme dosahovali dobré opakovatelnosti a citlivosti metody na všech koncentračních hladinách.

Výsledky měření stability v autosampleru a stability při zmrazení a rozmrazení na koncentračních úrovních QCB a QCC ukazuje Tab. č. 17. Byla splněna kritéria směrnice EMA.

Tab. č. 15: Výsledky validace – vyhodnocení QC vzorků

Standard	Hladina	Koncentrace ve vzorku [ng/ml]	1. série		2. série		3. série		Mezi sériemi			
			Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Celkový průměr stanovené koncentrace [ng/ml]	Celková S.D.	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]
Amilorid	LLOQ	1,56	10,0	0,4	6,4	3,1	14,6	-16,7	1,49	0,20	13,5	-4,4
	QCA	4,68	2,3	-4,4	9,1	-11,4	11,0	-4,6	4,36	0,37	8,5	-6,8
	QCB	18,75	2,6	9,9	2,4	3,5	2,1	0,3	19,61	0,94	4,8	4,6
	QCC	75,00	0,8	0,0	4,0	-6,8	2,1	0,1	73,31	3,06	4,2	-2,3
Amlodipin	LLOQ	0,78	4,7	14,4	11,0	7,6	10,6	-1,1	0,83	0,09	10,3	7,0
	QCA	2,34	2,6	-13,9	12,7	-2,4	14,2	8,0	2,28	0,33	14,5	-2,7
	QCB	9,34	4,2	2,0	4,1	2,8	2,6	2,7	9,58	0,33	3,4	2,5
	QCC	37,50	3,3	5,3	2,2	10,3	1,3	6,5	40,26	1,21	3,0	7,4
Betaxolol	LLOQ	1,56	3,6	2,0	2,6	1,5	3,2	5,6	1,61	0,06	3,4	3,1
	QCA	4,68	1,3	-7,5	1,7	-8,9	2,4	-0,9	4,41	0,19	4,2	-5,8
	QCB	18,75	1,2	11,0	0,9	3,9	1,9	11,1	20,37	0,73	3,6	8,6
	QCC	75,00	1,5	6,6	1,2	5,9	1,9	0,0	78,12	2,57	3,3	4,2
Bisoprolol	LLOQ	3,12	3,6	-15,3	6,3	-13,7	5,0	7,7	2,90	0,37	12,6	-7,1
	QCA	9,36	3,1	-5,9	3,0	-2,0	2,0	-2,6	9,03	0,28	3,1	-3,5
	QCB	37,50	1,0	11,9	1,6	12,2	3,4	3,1	40,90	1,84	4,5	9,1
	QCC	150,00	0,9	3,3	2,1	1,8	3,4	-11,0	147,04	10,40	7,1	-2,0
Carvedilol	LLOQ	6,25	3,8	-12,1	5,9	-13,5	7,7	-16,5	5,37	0,32	5,9	-14,0
	QCA	18,75	2,9	-1,8	4,6	-5,4	0,8	0,8	18,35	0,72	3,9	-2,1
	QCB	75,00	3,0	12,2	2,8	0,8	4,1	10,9	80,95	4,70	5,8	7,9
	QCC	300,00	2,1	0,2	2,5	-13,5	2,9	-13,9	272,85	21,34	7,8	-9,1

Tab. č. 15 (pokračování): Výsledky validace – vyhodnocení QC vzorků

Standard	Hladina	Koncentrace ve vzorku [ng/ml]	1. série		2. série		3. série		Mezi sériemi			
			Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Celkový průměr stanovené koncentrace [ng/ml]	Celková S.D.	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]
Celiprolol	LLOQ	12,50	3,6	17,2	2,0	15,0	4,1	3,4	13,98	0,89	6,4	11,9
	QCA	37,50	1,2	1,6	4,7	-0,5	3,2	-7,8	36,66	1,93	5,3	-2,2
	QCB	150,00	2,0	10,5	2,7	3,3	2,5	1,6	157,69	6,86	4,4	5,1
	QCC	600,00	0,9	1,3	2,1	-6,6	4,0	-14,5	560,51	42,15	7,5	-6,6
Indapamid	LLOQ	1,56	3,2	10,2	2,6	16,0	4,2	14,1	1,77	0,07	3,8	13,5
	QCA	4,68	1,8	-8,8	5,6	-12,2	1,3	-4,8	4,28	0,20	4,6	-8,6
	QCB	18,75	2,8	5,3	3,3	2,2	3,1	9,4	19,80	0,79	4,0	5,6
	QCC	75,00	1,6	0,3	2,7	6,8	2,4	-1,5	76,43	3,22	4,2	1,9
Metoprolol	LLOQ	12,50	0,6	6,6	1,0	0,0	1,3	9,2	13,16	0,51	3,9	5,3
	QCA	37,50	0,7	-6,6	0,8	-8,9	2,5	0,1	35,57	1,57	4,4	-5,2
	QCB	150,00	0,5	10,2	0,6	0,9	3,0	10,2	160,65	7,28	4,5	7,1
	QCC	600,00	0,6	1,7	0,4	-7,1	3,5	-9,3	570,63	31,08	5,4	-4,9
Moxonidin	LLOQ	0,20	1,6	10,7	4,6	12,0	6,7	9,2	0,22	0,01	4,5	10,6
	QCA	0,60	2,1	-15,0	1,8	-8,8	3,4	-9,0	0,53	0,02	4,1	-10,9
	QCB	2,34	2,3	2,0	1,6	4,8	1,8	6,4	2,44	0,06	2,5	4,4
	QCC	9,38	2,1	-0,4	0,8	-5,5	3,0	-7,2	8,97	0,33	3,7	-4,4

Tab. č. 15 (pokračování): Výsledky validace – vyhodnocení QC vzorků

Standard	Hladina	Koncentrace ve vzorku [ng/ml]	1. série		2. série		3. série		Mezi sériemi			
			Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]	Celkový průměr stanovené koncentrace [ng/ml]	Celková S.D.	Preciznost (Precision) (CV %)	Přesnost (Accuracy) [%]
Nebivolol	LLOQ	0,78	3,4	-10,5	8,6	-10,7	6,2	-11,1	0,70	0,04	6,0	-10,8
	QCA	2,34	1,9	-6,8	10,1	-7,4	1,9	-0,9	2,22	0,14	6,3	-5,0
	QCB	9,38	2,3	10,3	9,0	9,1	3,9	11,7	10,35	0,56	5,4	10,4
	QCC	37,50	1,3	3,7	3,7	-2,6	2,8	-6,0	36,88	1,81	4,9	-1,6
Nitrendipin	LLOQ	1,56	16,3	-7,3	9,4	2,4	12,0	-9,0	1,49	0,19	13,0	-4,6
	QCA	4,68	9,8	-5,9	8,5	-6,2	3,3	-6,4	4,39	0,31	7,1	-6,2
	QCB	18,75	9,1	8,9	7,0	12,0	9,7	11,3	20,76	1,67	8,0	10,7
	QCC	75,00	4,2	-1,9	7,0	-6,2	5,1	-0,9	72,78	4,11	5,6	-3,0
Rilmenidin	LLOQ	0,39	4,4	8,4	4,1	8,2	2,7	14,6	0,43	0,02	4,5	10,4
	QCA	1,17	2,6	-8,2	3,8	-9,0	1,6	-0,7	1,10	0,05	4,9	-6,0
	QCB	4,68	1,2	6,8	3,0	1,1	2,5	8,8	4,94	0,19	3,8	5,6
	QCC	18,75	2,9	0,3	1,8	-7,2	3,5	-10,5	17,66	0,99	5,6	-5,8
Urapidil	LLOQ	6,25	6,4	-9,0	7,7	11,0	15,7	7,4	6,44	0,87	13,5	3,1
	QCA	18,75	6,1	8,4	8,7	-6,6	5,9	4,2	19,13	1,73	9,1	2,0
	QCB	75,00	1,4	8,3	2,4	7,7	1,3	1,4	79,35	3,03	3,8	5,8
	QCC	300,00	2,2	-10,8	4,4	4,3	3,3	-4,3	289,20	21,40	7,4	-3,6

Tab. č. 16: Výsledky validace – matricové efekty a výtěžnost

Standard	Hladina	Matricové efekty [%]	Výtěžnost [%]
Amilorid	QCA	87,5 ± 2,6	102,4 ± 3,9
	QCB	90,6 ± 3,5	102,1 ± 4,3
	QCC	89,5 ± 1,8	98,9 ± 2,5
Amlodipin	QCA	87,7 ± 1,7	73,8 ± 2,3
	QCB	89,2 ± 2,3	66,4 ± 6,1
	QCC	88,3 ± 1,8	69,9 ± 4,5
Betaxolol	QCA	106,6 ± 2,1	85,7 ± 2,7
	QCB	104,2 ± 2,9	80,9 ± 6,3
	QCC	95,6 ± 2,3	82,2 ± 2,2
Bisoprolol	QCA	105,7 ± 1,7	85,5 ± 7,9
	QCB	97,6 ± 2,7	81,0 ± 5,3
	QCC	99,0 ± 1,9	83,3 ± 7,1
Carvedilol	QCA	92,3 ± 3,2	80,3 ± 7,6
	QCB	91,5 ± 2,9	81,8 ± 4,0
	QCC	92,0 ± 1,3	85,1 ± 2,3
Celiprolol	QCA	98,4 ± 2,4	75,5 ± 7,7
	QCB	93,7 ± 1,9	73,4 ± 5,3
	QCC	94,6 ± 2,2	74,0 ± 7,8
Indapamid	QCA	87,4 ± 3,9	79,4 ± 6,6
	QCB	87,6 ± 3,0	80,7 ± 6,8
	QCC	91,0 ± 1,6	84,0 ± 2,0
Metoprolol	QCA	101,0 ± 2,2	87,9 ± 3,3
	QCB	99,4 ± 2,9	81,0 ± 4,0
	QCC	95,3 ± 1,4	84,8 ± 1,6
Moxonidin	QCA	87,5 ± 2,6	63,3 ± 3,9
	QCB	88,1 ± 3,5	64,4 ± 6,4
	QCC	89,5 ± 1,8	67,5 ± 2,5
Nebivolol	QCA	88,3 ± 3,9	50,7 ± 7,5
	QCB	87,2 ± 3,5	55,6 ± 6,3
	QCC	91,4 ± 0,7	56,8 ± 3,0
Nitrendipin	QCA	87,1 ± 6,1	61,7 ± 6,7
	QCB	87,2 ± 3,3	57,6 ± 3,3
	QCC	90,7 ± 2,6	55,5 ± 6,5
Rilmenidin	QCA	93,0 ± 2,8	69,8 ± 2,7
	QCB	96,2 ± 3,2	71,4 ± 4,0
	QCC	95,0 ± 0,7	67,1 ± 1,3
Urapidil	QCA	103,6 ± 1,2	78,6 ± 9,0
	QCB	97,5 ± 3,7	77,3 ± 5,7
	QCC	105,6 ± 6,8	85,1 ± 1,6

Tab. č. 17: Výsledky validace – stabilita v autosampleru, stabilita při zmrazení a rozmrazení

Standard	Hladina	Stabilita při zmrazení a rozmrazení [%]	Stabilita v autosampleru [%]
Amilorid	QCB	-4,5	1,4
	QCC	-1,2	-1,7
Amlodipin	QCB	-0,1	1,8
	QCC	0,3	-2,5
Betaxolol	QCB	-0,1	0,6
	QCC	-3,0	-1,3
Bisoprolol	QCB	2,4	-0,6
	QCC	-2,7	1,6
Carvedilol	QCB	-3,9	0,7
	QCC	-3,9	2,7
Celiprolol	QCB	6,4	-1,5
	QCC	0,2	-0,6
Indapamid	QCB	3,1	-2,2
	QCC	-5,4	-1,2
Metoprolol	QCB	-2,5	0,2
	QCC	-4,0	-0,4
Moxonidin	QCB	3,3	-1,6
	QCC	-3,4	-0,8
Nebivolol	QCB	3,4	0,2
	QCC	-1,8	-1,6
Nitrendipin	QCB	-5,9	-0,8
	QCC	-3,9	-2,6
Rilmenidin	QCB	8,9	-2,1
	QCC	-1,4	-2,8
Urapidil	QCB	-10,3	-1,6
	QCC	-10,6	2,1

5.6. Měření klinických vzorků

Vyvinutou a optimalizovanou UHPLC-HRMS metodu ke stanovení vybraných antihypertenziv v lidském séru jsme po úspěšné validaci převedli do klinické praxe. Primárně ji využívají lékaři z antihypertenčních poraden ke sledování a kontrole nastavené terapie u špatně kompenzovaných pacientů, tj. ke zjištění, zda pacienti dodržují předepsanou terapii nebo zda je velikost dávky dostačující a léčivo dosáhne potřebných terapeutických hladin. Ve výsledku vyvinutá metoda lékaři umožní upravit dávkování a může také včas odhalit non-compliantního pacienta.

Za dobu 12 měsíců od zavedení metody do praxe bylo vyšetřeno 92 pacientů, někteří i opakovaně. Celkem bylo analyzováno 173 antihypertenziv. V Tab. č. 18 jsou rozepsána jednotlivá antihypertenziva včetně jejich terapeutického rozmezí. Pro každé antihypertenzivum je ve sloupcích uvedeno číslo, které odpovídá počtu stanovených hladin pod/nad/v rámci terapeutického rozmezí a počet negativních nálezů. Z celkového počtu 173 analytů byly v průběhu roku nejčastěji měřeny amlodipin, bisoprolol a indapamid. Naopak na celiprolol nebyl jediný požadavek a zbylá antihypertenziva byla stanovována méně než desetkrát. Z počtu 173 stanovení bylo 14,5 % negativních. Vztaheno na pacienty, kde alespoň jedno z požadovaných antihypertenziv bylo negativní, se jedná o 17,4 % non-compliantních jedinců.

Tab. č. 18: Měření klinických vzorků

Analyt	Terapeutické rozmezí [ng/ml]	Počty měřených analytů				Celkem
		negativní	pod terapeutickým rozmezím	v rámci terapeutického rozmezí	nad terapeutickým rozmezím	
Amilorid	5-50	0	0	1	0	1
Amlodipin	3-15	8	12	31	17	68
Betaxolol	5-50	2	0	2	4	8
Bisoprolol	10-100	4	15	33	1	53
Carvediol	20-150	1	0	0	0	1
Celiprolol	50-500	0	0	0	0	0
Indapamid	5-50	2	2	8	3	15
Metoprolol	35-500	1	0	3	0	4
Moxonidin	1-2 (4)	0	1	0	0	1
Nebivolol	< 20	3	0	0	1	4
Nitrendipin	10-50	2	3	3	0	8
Rilmenidin	1-5	0	0	1	5	6
Urapidil	100-200	2	0	0	2	4

6. DISKUZE

Antihypertenziva amilorid; amlodipin; betaxolol; bisoprolol; carvedilol; celiprolol; indapamid; metoprolol; moxonidin; nebivolol; nitrendipin; rilmenidin a urapidil jsme stanovovali v lidském séru pomocí UHPLC-HRMS. Jako metodu úpravy vzorku před analýzou jsme zvolili LLE. Nejvhodnější extrakční kapalinou byl ethylacetát, pomocí kterého jsme dokázali extrahovat všech 13 vybraných antihypertenziv s dobrou výtěžností, opakovatelností a matricovými efekty.

LLE jako extrakční metodu s využitím detekce pomocí hmotnostní spektrometrie zvolili i jiní autoři zabývající se podobnou problematikou; např. stanovení urapidilu [31], nebivololu [32] nebo bisoprololu [33] metodou LC-MS pro účely farmakokinetických studií preklinického hodnocení, bioekvivalenčních studií a rutinní analýzy klinické praxe. Využívanými extrakčními rozpouštědly byly směsi MTBE:dichlormethan (80:20), diethylether:dichlormethan (50:50) a samotný MTBE. LLE pro stanovení větší skupiny antihypertenziv použili J. Tomková a kol. [34], jednalo se o β -blokátory acebutolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nebivolol a sotalol. Extrakční kapalinou byl butylacetát, měření prováděli na UHPLC-UHR-TOF MS. Metoda byla úspěšně aplikována v klinické praxi při monitorování hladin těchto léků. Ve většině případů ale autoři dosahovali nižších výtěžností než my při extrakci do ethylacetátu.

Další metodou úpravy vzorku před analýzou je SPE. Tuto extrakční techniku jsme na rozdíl od jiných autorů netestovali. SPE využili H. Morihisa a kol. pro stanovení indapamidu v lidském séru metodou LC-MS/MS (ESI) s aplikací pro bioekvivalenční studie [35]; dále J. V. Shah a kol., kteří současně kvantifikovali amilorid a hydrochlorothiazid v lidské plazmě pomocí LC-MS (ESI) [36] a H. H. Maurer a kol., kteří vyvinuli LC-MS/MS (APCI) metodu pro kvantifikaci 22 β -blokátorů (acebutolol, diacetolol, alprenolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, bupranolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, labetalol, metoprolol, nadolol, nebivolol, oxprenolol, penbutolol, propranolol, sotalol, talinolol a timolol) pro potřeby klinické toxikologie a monitorování compliance [37]. Podobný způsob extrakce zvolili autoři pro současné stanovení amlodipinu a nebivololu [38], měření prováděli na UHPLC-MS/MS za účelem farmakokinetických studií. Větší skupinu kardiovaskulárních léčiv (zahrnující i antihypertenziva) v lidské plazmě analyzovali González Mendia O. a kol., jednalo se o spojení SPE-UHPLC-PDA-FLD s využitím

v klinické praxi [39]. Komplexnější problematikou se zabývali i L. Kristoffersen a kol., kteří vyvíjeli HPLC-MS (ESI) metodu pro současné stanovení 6 β -blokátorů (atenolol, sotalol, metoprolol, bisoprolol, propranolol a carvedilol), 3 blokátorů kalciových kanálů (amlodipin, diltiazem a verapamil), 4 antagonistů angiotenzinu II (losartan, irbesartan, valsartan a telmisartan) a 1 antiarytmika (flecainid) ve vzorcích post-mortem plné krve pro forenzní účely [40].

Porovnáním extrakčních metod SPE a LLE z hlediska linearity, přesnosti, správnosti, výtěžnosti a matricových efektů se zabývali L. Chytil a kol. ve své publikaci popisující vývoj a validaci LC-MS/MS metody pro kvantifikaci rilmenidinu v lidském séru [41]. Z práce vyplývá, že pomocí metody SPE dosáhli lepších hodnot u většiny validačních parametrů ve srovnání s LLE. Především se jednalo o matricové efekty, linearitu a zpětný přepočítání bodů na kalibrační přímku. Autoři však neoptimalizovali výběr vnitřního standardu, i když testovali 9 kombinací organických rozpouštědel a pufrů. Zvolený trimipramin- d_3 nebyl vhodný pro korekci matricových efektů (113 - 135 %) a zajištění optimální opakovatelnosti extrakce z kapaliny do kapaliny.

Často používaným extrakčním postupem je proteinová precipitace. Spojení proteinové precipitace a UHPLC-MS s využitím při monitorování terapeutických hladin a adherence použili nejen A. De Nicoló a kol. pro stanovení amlodipinu, atenololu, klonidinu, chlortalidonu, doxazosinu, hydrochlorothiazidu, nifedipinu, olmesartanu, ramiprilu a telmisartanu v lidské plazmě [42], ale i B. C. H. van der Nagel a kol., kteří stanovovali osm často předepisovaných antihypertenziv (enalapril, perindopril, losartan, valsartan, amlodipin, nifedipin, hydrochlorothiazid, spironolakton), kde precipitačním činidlem byla směs acetonitril:methanol (1:1) [43]. V první uvedené práci autoři použili acetonitril jako precipitační činidlo, následovalo odpaření supernatantu, což je zdoluhavý krok, který značně prodloužil čas potřebný na přípravu vzorku.

Proteinová precipitace byla druhým extrakčním postupem, který jsme testovali při vývoji naší metody. Podobně jako výše zmínění autoři jsme zkoušeli precipitační činidla acetonitril a methanol. I když tento postup vykazoval dobrou (> 90 %) a opakovatelnou výtěžnost, proteinovou precipitaci jsme ne zvolili jako vhodnou extrakční metodu z důvodu značného naředění vzorku organickou fází – u některých analytů jsme nedosáhli požadované citlivosti. Zakoncentrování vzorků odpařením organické fáze jsme primárně netestovali, upřednostnili jsme optimalizaci LLE.

Rozsáhlejší analýzou větší skupiny kardiovaskulárních léčiv, kde kromě antihypertenziv byla zahrnuta i antidiabetika, hypolipidemika,

antikoagulancia a antiagregancia, se zabývali např. autoři O. Gonzalez a kol. nebo E. Dias a kol. Vzorke upravovali proteinovou precipitací, kde precipitačními činidly byly např. acetonitril nebo roztok methanolu se síranem zinečnatým, následovalo LC-MS/MS stanovení hladin sledovaných látek v lidské plazmě [44–46].

7. ZÁVĚR

V diplomové práci je popsán vývoj a validace UHPLC-HRMS metody ke stanovení antihypertenziv amiloridu; amlodipinu; betaxololu; bisoprololu; carvedilolu; celiprololu; indapamidu; metoprololu; moxonidinu; nebivololu; nitrendipinu; rilmenidinu a urapidilu v lidském séru pro účely zjištění compliance pacientů a ověření správnosti nastaveného dávkování. Testovali jsme dva způsoby úpravy vzorku před analýzou: proteinovou precipitaci a extrakci z kapaliny do kapaliny. Proteinovou precipitací pomocí methanolu a acetonitrilu jsme získali velice dobré výsledky výtěžnosti, ale důsledkem naředění vzorku organickou fází nastal problém s citlivostí metody. Z tohoto důvodu jsme pro úpravu vzorku před analýzou využili extrakci z kapaliny do kapaliny pomocí ethylacetátu, kde jsme dosáhli optimální výtěžnosti i opakovatelnosti extrakce pro všechna vybraná antihypertenziva. Celková doba přípravy vzorku nepřesáhla 30 minut. Během měření jsme testovali i LLE s úpravou pH pomocí hydroxidu sodného (0,5 mol/l), nicméně výtěžnost byla ve většině případů menší. Pro vývoj metody jsme použili sérum přečištěné aktivním uhlím. Kvantitativní stanovení antihypertenziv jsme prováděli metodou vnitřního standardu. Nejlepší výsledky u všech analytů jsme získali při použití metoprololu-d₇. Metodu jsme úspěšně zvalidovali podle směrnice EMA. Hodnocené parametry kalibrační závislost, přesnost, preciznost, opakovatelnost, mezilehlá přesnost, výtěžnost, matricové efekty, selektivita, stabilita v autosampleru a stabilita při zmrazení a rozmrazení splňovaly daná kritéria. Po zavedení metody do klinické praxe jsme analyzovali již 92 patientských vzorků. Nejčastěji jsme stanovovali koncentraci amlodipinu, bisoprololu a indapamidu. Non-compliance jsme odhalili u 17,4 % vyšetřovaných pacientů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WIDIMSKÝ, J., et. al., Doporučení pro diagnostiku a léčbu arteriální hypertenze ČSH 2017. *Hypertenze & kardiovaskulární prevence*, **2018**, 7, 1-23. Dostupné z: <http://www.hypertension.cz/sqlcache/widimsky-1-hypertenze-kv-prevence-2018.pdf>, zobrazeno 3. dubna 2018.
- [2] VYTRÍŠALOVÁ, M. Adherence k medikamentózní léčbě – známá neznámá. *Remedia*, **2009**, 19, 225–230.
- [3] HANSEN, S. H.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. (Eds) *Bioanalysis of Pharmaceuticals. Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*. 1st Ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester 2015. ISBN 9781118716816.
- [4] MEDVEDOVICI, A.; BACALUM, E.; DAVID, V. Sample preparation for large scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques. *Biomed. Chromatogr.*, 2018. **32**(1): p. 1-57.
- [5] NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta*, 2009. **656**(1–2): p. 8–35.
- [6] PEREIRA, J.; CÂMARA, J. S.; COLMSJÖ, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent: An emerging, selective and high-throughput extraction technique in bioanalysis. *Biomed. Chromatogr.*, 2014. **28**(6): p. 839-847.
- [7] NOVÁKOVÁ L.; DOUŠA M., et. al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd., Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [8] CANTWELL, F. F.; LOSIER, M. Chapter 11 Liquid-liquid extraction. *Compr. Anal. Chem.*, 2002. **37**: p. 297–340.
- [9] WATSON, G. D. *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, str. 417-419. 3rd Ed. Elsevier Ltd., China 2012. ISBN 978-0-7020-4621-6.
- [10] KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and

- pharmaceutical analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2003. **22**(4): p. 232–244.
- [11] ZHAO, L.; LEE H. K. Liquid-phase microextraction combined with hollow fiber as a sample preparation technique prior to gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2002. **74**(11): p. 2486–2492.
- [12] SAHA, S., et.al., Modern Extraction Techniques for Drugs and Medicinal Agents. In: Grumezescu, A. M.; Holban, A. M. (Eds) *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food: Handbook of Food Bioengineering, Vol. 4*. Elsevier Inc., Oxford 2017. ISBN 978-0-12-811521-3.
- [13] <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>,
zobrazeno 20. března 2018.
- [14] DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2006. ISBN-13: 978-0-471-72789-7, ISBN-10: 0-471-72789-X.
- [15] McMASTER, M. C. *LC/MS A Practical User's Guide*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2005. ISBN-13: 978-0-471-65531-2, ISBN-10: 0-471-65531-7.
- [16] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M., et. al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd., Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [17] ŠESTÁK, V. *Analytické a bioanalytické hodnocení nových protinádorových léčiv*. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2017.
- [18] NOVÁKOVÁ, L.; SVOBODA P.; PAVLÍK J. Ultra-high performance liquid chromatography. In: FANALI, S.; HADDAD, P. R.; POOLE, C. F.; RIEKKOLA MARJA-LIISA. (Eds) *Handbooks in Separation Science. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition*. 2nd Ed., Elsevier Inc., Oxford 2017. ISBN 978-0-12-805393-5.
- [19] KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT J. *Rychlá chromatografie, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/466603/mod_resource/content/1/Lekce%205_UHPLC_uprava2017.pdf, zobrazeno 22. března 2018.
- [20] GUILLARME, D.; VEUTHEY, JEAN-LUC. (Eds) *UHPLC in Life Sciences*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2012. ISBN 978-1-84973-388-5.

- [21] GROSS, J. H. *Mass Spectrometry: A textbook*. 3rd Ed., Springer International Publishing AG, Cham 2017. ISBN 978-3-319-54397-0.
- [22] KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT J. *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie*. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod_resource/content/6/Lekce_6_MS.pdf, zobrazeno 25. března 2018.
- [23] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní analyzátory*. Mass Spectrometry Group, Univerzita Pardubice. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf, zobrazeno 26. března 2018.
- [24] Exactive Series Operating Manual (P/N 1344742, Revision B, June 2015), Thermo Fisher Scientific Inc.
- [25] *Thermo Fisher Scientific, C.*
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/OrbitrapMA%26Injector.png>, zobrazeno 8. dubna 2018.
- [26] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. Mass Spectrometry Group, Univerzita Pardubice. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf, zobrazeno 26. března 2018
- [27] Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. 2001, Rockville, MD, USA.
- [28] European Medicines Agency, *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011, Londýn, Velká Británie.
- [29] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, revize 2005*. 1995, Ženeva, Švýcarsko.
- [30] PEITZSCH, M., et. al. An LC-MS/MS method for steroid profiling during adrenal venous sampling for investigation of primary aldosteronism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2015. **145**: p. 75–84.
- [31] NIROGI, R., et. al. Quantification of urapidil, α -1-adrenoreceptor antagonist, in plasma by LC-MS/MS: Validation and application to pharmacokinetic studies. *Biomed. Chromatogr.*, 2011. **25**(12): p. 1319–1326.

- [32] NANDANIA, J., et. al. Quantitative determination of nebivolol from human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2013. **923–924**: p. 110–119.
- [33] PESTE, G., et. al. A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma samples. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009. **2009**: p. 1-8.
- [34] TOMKOVÁ, J., et. al. Fast and sensitive analysis of beta blockers by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 2017. **31(7)**: p. 1-16.
- [35] MORIHISA, H., et. al. Determination of indapamide in human serum using 96-well solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008. **870(1)**: p. 126–130.
- [36] SHAH, J., et. al. Simultaneous quantification of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Anal.*, 2017. **7(5)**: p. 288–296.
- [37] MAURER, H. H., et. al. Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatogr. A*, 2004. **1058(1–2)**: p. 169–181.
- [38] PATEL, B. M., et. al. Novel bio analytical method development, validation and application for simultaneous determination of nebivolol and S-amlodipine in human plasma using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018. **151**: p. 244–251.
- [39] GONZÁLEZ MENDIA, O., et. al. Efficient Method Development and Validation for the Determination of Cardiovascular Drugs in Human Plasma by SPE-UHPLC–PDA–FLD. *Chromatographia*, 2017. **80(4)**: p. 605–615.
- [40] KRISTOFFERSEN, L., et. al. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid

- chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007. **850**(1–2): p. 147–160.
- [41] CHYTIL, L., et. al. Development of a fast LC-MS/MS method for quantification of rilmenidine in human serum: Elucidation of fragmentation pathways by HRMS. *J. Mass Spectrom.*, 2010. **45**(10): p. 1179–1185.
- [42] DE NICOLÒ, A., et. al. UHPLC–MS/MS method with protein precipitation extraction for the simultaneous quantification of ten antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **129**: p. 535–541.
- [43] VAN DER NAGEL, B. C. H., et. al. High-throughput quantification of 8 antihypertensive drugs and active metabolites in human plasma using UPLC–MS/MS. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2017. **1060**: p. 367–373.
- [44] GONZALEZ, O., et. al. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010. **878**(28): p. 2685-2692.
- [45] GONZALEZ, O., et. al. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011. **879**(3–4): p. 243–252.
- [46] DIAS, E., et. al. An LC-MS assay for the screening of cardiovascular medications in human samples. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2013. **937**: p. 44–53.