

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Michaela Lejnarová

Školitel: RNDr. Hana Kočová Vlčková, Ph.D.

Název diplomové práce:

Porovnání dvou způsobů hodnocení matricových efektů při LC-MS/MS analýze

Diplomová práce se zabývá porovnáním dvou metod hodnocení matricových efektů při LC-MS/MS analýze za použití ionizace elektrosprejem a trojitého kvadrupólu jako hmotnostního analyzátoru. Konkrétně se jednalo o porovnání metody využívající porovnání směrníc kalibračních křivek a metody post-extrakčního přídávku. Hlavním cílem bylo posoudit, zda získané hodnoty matricových efektů spolu korelují, či nikoli, objasnit důvody rozdílných výsledků a definovat podmínky umožňující aplikaci obou metod tak, aby byly získány správné a přesné výsledky. Na základě fyzikálně-chemických vlastností jako jsou molekulová hmotnost, acidobazické vlastnosti a rozdělovací koeficient byla vybrána skupina 28 různorodých látek. Vlastnímu hodnocení matricových efektů předcházely výběr vhodné LC metody, optimalizace jednotlivých parametrů iontového zdroje a zároveň výběr vhodného SRM přechodu a kolizní energie pro každou látku. K hodnocení matricových efektů bylo zvoleno lyofilizované sérum jako matrice a proteinová precipitace pomocí acetonitrilu jako technika přípravy vzorků.

Pro obě metody hodnocení matricových efektů byly získány velmi různorodé výsledky, a proto v případě hodnocení pomocí směrníc kalibračních křivek byly testovány také různé transformace os kalibračních křivek, jako je logaritmická či reciproká.

Ze získaných výsledků vyplývá, že pouze metoda post-extrakčního přídávku vede k jednoznačným a správným výsledkům, zatímco metoda využívající směrníc kalibračních křivek poskytuje často variabilní a zkreslené hodnoty. V případě volby metody využívající směrníc kalibračních křivek se získané hodnoty nejvíce shodují s výsledky získanými metodou post-extrakčního přídávku při použití reciproké transformace os.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Michaela Lejnarová

Supervisor: RNDr. Hana Kočová Vlčková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis:

Comparison of two types of matrix effect evaluation for LC-MS/MS analysis

This diploma thesis deals with a comparison of two methods of matrix effect evaluation in LC-MS/MS analysis using electrospray ionization and triple quadrupole. Specifically, it was a comparison of the method using slopes of the calibration curves and the post-extraction addition method, where the main goal was to assess whether the obtained values of matrix effects correlate with each other or not. A further aim of this thesis was to clarify the reasons for the different outcomes and define the conditions of both methods to obtain correct and accurate results. On the basis of physicochemical properties such as molecular weight, acid-base properties, and partition coefficient, a group of 28 diverse substances was selected. The actual evaluation of matrix effects was preceded by the selection of an appropriate LC method, optimization of the individual parameters of the ion source as well as the selection of appropriate SRM transition and collision energy for each substance. To evaluate the matrix effects, lyophilized serum was chosen as a matrix and protein precipitation with acetonitrile as a sample preparation technique.

Very diverse results have been obtained using both methods of evaluation. Therefore, when using slopes of the calibration curves, various ways of constructing these calibration curves, such as logarithmic or reciprocal scaling, were also tested.

The results show that only the post-extraction addition method results in definite and accurate outcomes, while the method using comparison of the slopes of the calibration curves often provides variable and distorted values. When choosing a method using slopes of the calibration curves, the values obtained are most consistent with those obtained by the post-extraction addition method in case the reciprocal scaling is used.

Obsah

1	Úvod	4
2	Cíl a zadání práce	5
3	Teoretická část	6
3.1.	Ionizační techniky v LC-MS analýze	6
3.1.1.	Ionizace elektrosprejem	7
3.1.2.	Chemická ionizace za atmosférického tlaku	9
3.1.3.	Fotoionizace za atmosférického tlaku	10
3.2.	Vznik matricových efektů	11
3.3.	Faktory vzniku ME	13
3.3.1.	Typ ionizační techniky	13
3.3.2.	Typ matrice	14
3.3.3.	Ostatní faktory ovlivnění ionizace	16
3.4.	Eliminace matricových efektů	16
3.4.1.	Úprava vzorku	17
3.4.2.	Podmínky chromatografické separace	19
3.4.3.	Metody kvantifikace	20
3.5.	Hodnocení matricových efektů	21
3.5.1.	Metoda post-kolonové infuze	21
3.5.2.	Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek	22
3.5.3.	Metoda post-extrakčního přídatku	22
3.5.4.	Požadavky regulačních autorit pro hodnocení ME	23
3.6.	Volba analytů pro hodnocení ME	24

1 Úvod

V současné době je jednou z hlavních technik užívaných při kvalitativním a zejména kvantitativním hodnocení léčiv a metabolitů v biologických matricích spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Unikátní spojení kombinuje klady obou přístrojů s výsledkem citlivé, selektivní a robustní analýzy. Na jedné straně účinná separace složek analyzované směsi, na straně druhé selektivní a citlivá detekce s využitím principu tvorby iontů a jejich dělení podle poměru hmotnosti a náboje. V klinické praxi se často jeví lépe než zavedené imunoanalytické metody. Stinné stránky skýtá úprava vzorku, která stále zůstává časově nejnáročnějším krokem analýzy.

I přes časté využití kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí se i tato technika potýká s řadou úskalí, která souvisí zejména s výskytem nežádoucích exogenních a endogenních látek ve vzorku. Jev, kdy interference více či méně výrazně pozměňují účinnost ionizace cílených analytů, se označuje jako matricové efekty. Může docházet k potlačení nebo zesílení ionizace. Matricové efekty mají za následek nepřesné, nesprávné, falešně pozitivní či negativní výsledky. Často ani samotná separace či úprava vzorku není schopna tyto interference eliminovat.

Existuje celá řada doporučení, jak je možné tyto efekty snížit a zároveň, jak postupovat při jejich hodnocení. Přestože nejsou regulační autority v oblasti bio-analytických metod ve svých doporučeních zcela jednotné, shodují se v tom, že stanovení matricových efektů by mělo být součástí validace každé LC-MS metody.

2 Cíl a zadání práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo porovnání výsledků matricových efektů získaných pomocí metody porovnání směrnice kalibračních křivek a metody post-extrakčního přidavku. Následně se pokusit nalézt a definovat doporučení pro aplikaci obou metod tak, aby bylo získáno správných a přesných hodnot matricových efektů. K analýze bylo vybráno celkem 28 látek, které se lišily molekulovou hmotností, acidobazickými vlastnostmi a dalšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

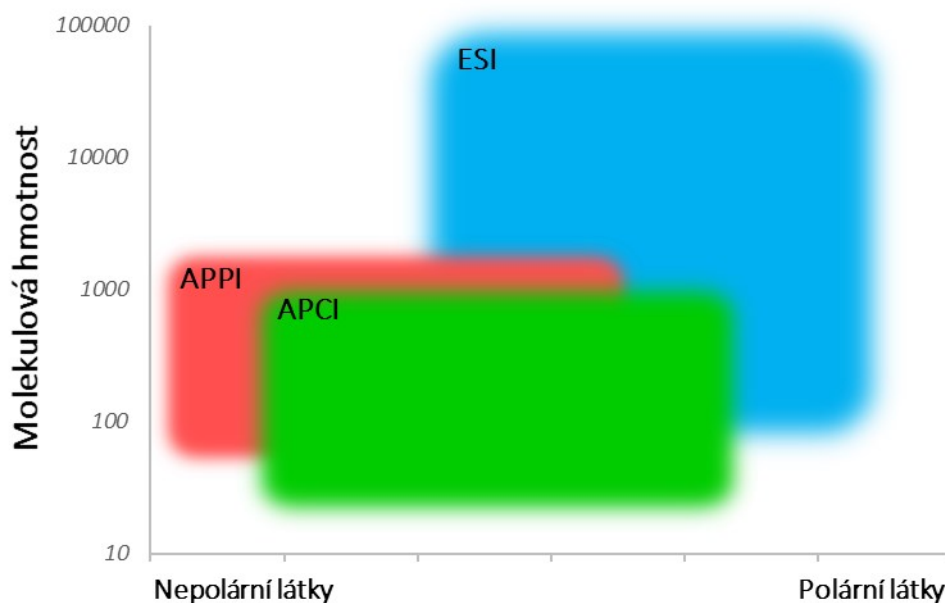
Pro dané účely byly optimalizovány podmínky pro LC-MS/MS analýzu, které zahrnovaly zejména optimalizaci parametrů iontového zdroje, výběr vhodných SRM přechodů a kolizních energií pro jednotlivé látky. Pro účely hodnocení matricových efektů byla vyvinutá metoda aplikována na lyofilizované sérum upravené pomocí proteinové precipitace. Následovalo hodnocení matricových efektů s využitím obou výše zmíněných metod a získaná data byla interpretována a porovnána.

3 Teoretická část

3.1. Ionizační techniky v LC-MS analýze

Chromatografická separace komplexních vzorků spolu s citlivou a selektivní detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie je jednou z nejvíce využívaných technik při analytickém kvalitativním i kvantitativním hodnocení, a to zejména organických sloučenin zastoupených ve směsích v minimálním, případně až stopovém množství. Teprve vývoj ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku (API), například ionizace elektrosprejem (ESI) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), vedl k online spojení těchto dvou analytických přístupů [1]. Pro tyto techniky se také vžilo označení měkké ionizační techniky. To je dáno menší vnitřní energií potřebnou pro ionizaci. Techniky využívající ionizaci za atmosférického tlaku jsou kompatibilní s chromatografií na reverzních fázích a umožňují zachovat všechny výhody LC systému. Slouží k analýze látek široké škály fyzikálně-chemických vlastností včetně polárních, termolabilních léčiv a metabolitů v širokém rozsahu molekulových hmotností [2].

Vhodné zvolení použité ionizační techniky na základě polaritě látek, molekulových hmotností a ionizačního módu zohledňujícího acidobazické vlastnosti látek je nutností (viz Obrázek 1). Ionizační technika na bázi elektrospreje je využívána při analýze látek s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou biopolymery, nekovalentní komplexy a syntetické vysokomolekulární polymery. Zároveň nachází uplatnění v analýze iontových organických sloučenin. Fotoionizace za atmosférického tlaku je s oblibou využívána u látek nepolárních až středně polárních o molekulové hmotnosti do 2000 Da. Technika chemické ionizace za atmosférického tlaku je vhodná pro analýzu středně polárních látek s molekulovou hmotností pod 1500 Da [3][4][5].



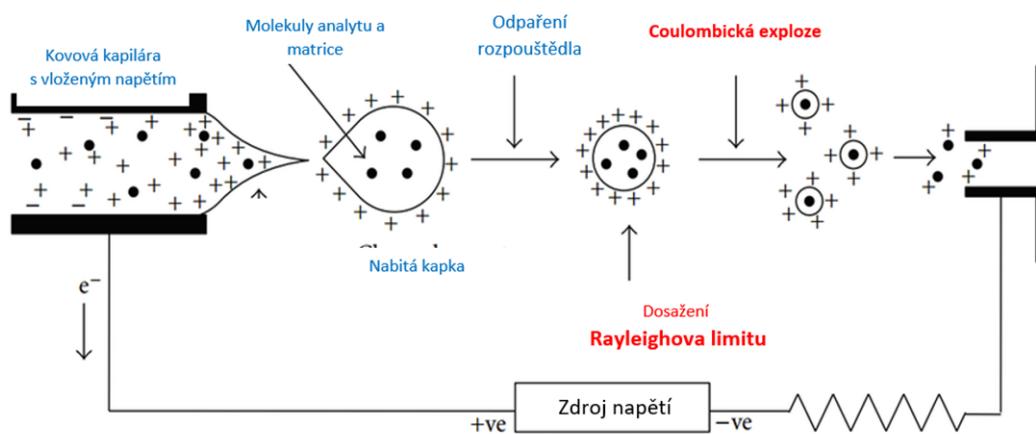
Obrázek 1: Vliv fyzikálně-chemických vlastností látek na výběr API ionizační techniky (upraveno dle [3])

3.1.1. Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (viz Obrázek 2) se uplatňuje v analýze látek s nenulovým dipólovým momentem v širokém rozpětí molekulových hmotností od běžných organických léčiv po látky typu biopolymerů. Jedná se o ionizační techniku, kterou lze uplatnit i u analýz o velmi nízkém průtoku mobilní fáze, a to i pod 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (nanoelektrosprej). Elektrosprej poskytuje jedno nebo vícenásobně nabitě ionty, jejichž vznik závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu, komplexnosti vzorku, vzájemných interakcích látek, koncentraci analytu na povrchu kapky a na parametrech hmotnostního spektrometru [3]. Za použití vhodných podmínek měření tak představuje robustní a spolehlivou metodu. V procesu ionizace je využívána elektrická energie [6].

Nedílnou součástí iontového zdroje je kovová kapilára, na kterou je vkládáno napětí. Z eluentu, který je rozprášen při výstupu z kapiláry pomocí zamlžujícího plynu, vznikají mnohonásobně nabitě kapky. Následuje odpaření rozpouštědla působením sušícího plynu v kombinaci s vysokými teplotami za současného zvýšení povrchového napětí vlivem konstantního množství nábojů na jejím povrchu. Následně je dosaženo Rayleighova limitu, kdy jsou odpuzivé síly na povrchu kapky ještě v rovnováze s jejich povrchovým napětím. Při vzrůstajícím vlivu odpuzivých sil dochází ke coulombické explozi, která

vyústí v rozpad kapky na její menší podjednotky. V této fázi nastává další odpaření rozpouštědla za vzniku zbytkového náboje paralelně s vytržením iontů z kapek [3][4].

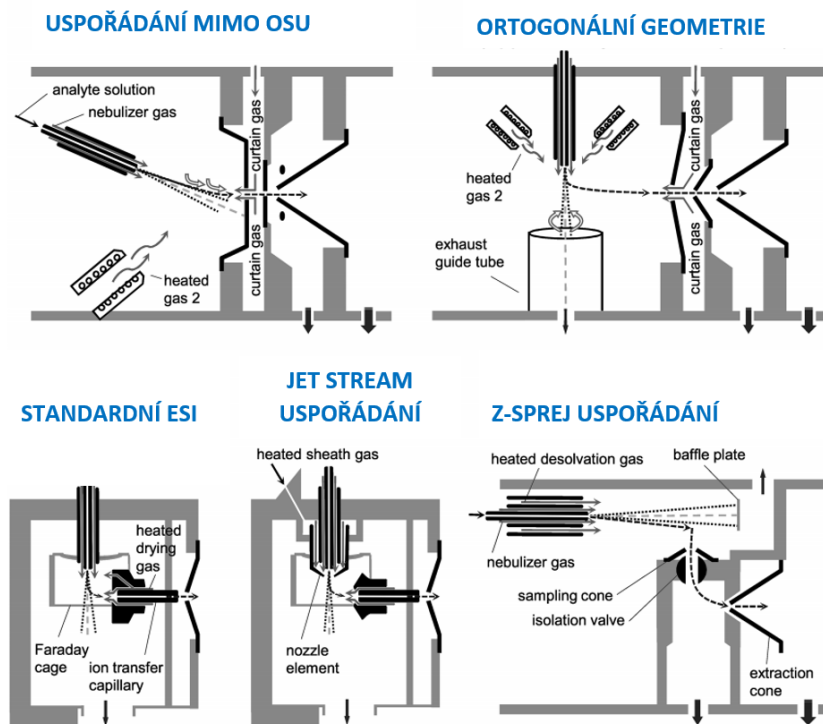


Obrázek 2: Princip ionizace elektrosprejem (upraveno dle [7])

Při transportu iontů z oblasti atmosférického tlaku do vakua dochází k nechtěnému jevu, kdy vlivem jejich ochlazení vznikají soubory atomů, které nejsou vázány kovalentními vazbami, ale pouze slabšími interakcemi typu vodíkových můstků. Tyto shluky atomů a molekul jsou nazývány klastry a jejich tvorbě je potřeba předcházet. Mezi preventivní opatření ionizačního zdroje proti vzniku klastrů patří funkce sušícího plynu, který odstraní vodní páry a nenabitě molekuly, a dále dostatečné vyhřívání prostor uvnitř ionizačního zdroje [3].

Faktorů, které ovlivňují tvorbu iontů v elektrospreji, je mnoho. Patří mezi ně parametry kovové kapiláry (vložené napětí, tvar a průměr, nerovnosti na jejím povrchu), složení eluentu, povaha zmlžujícího plynu, nastavení teploty a průtoku plynů, charakter měřeného analytu i geometrie iontového zdroje. Složky komplexní matrice mohou ionizovat přednostně namísto analytu, například vlivem vytlačování analytu z povrchu kapky. Analýzu ovlivňuje také koncentrace analytu. Prostor na povrchu kapky je omezený a vyšší koncentrace iontů může mít za následek ovlivnění lineární odezvy analytu [3].

Konstrukce elektrospreje může v některých případech ovlivnit míru matricových efektů. Příklady konstrukčních typů elektrospreje jsou znázorněny na Obrázku 3 [8].



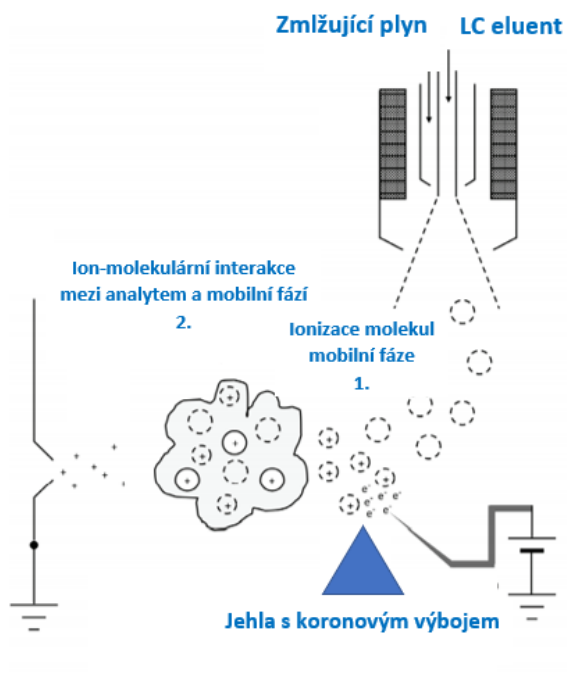
Obrázek 3: Konstrukční typy elektrospreje (upraveno dle [8])

3.1.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

APCI (Obrázek 4) se s oblibou využívá pro kompatibilitu s vyššími průtoky mobilní fáze. I přes to, že se jedná o měkkou ionizační techniku, na rozdíl od ESI vykazuje větší stupeň fragmentace pozorované v MS skenu. Toho se využívá při potřebě strukturní charakterizace látek [9]. I přes to není stupeň fragmentace často dostatečný, a tak se APCI nejčastěji kombinuje s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu, který docílí kontrolované fragmentace pomocí kolizně aktivované disociace [10]. Technika je vhodná u většiny organických sloučenin různé polariry, avšak ne u látek zcela nepolárních či látek vysoce polárních [3].

APCI rozhraní využívá také kovovou kapiláru ke zmlžení. Napětí je však v tomto případě vloženo na výbojovou jehlu, nikoli na kapiláru. Napětím generovaný koronový výboj poté ionizuje nejprve molekuly mobilní fáze, které prostřednictvím ion-molekulárních reakcí napomáhají ionizovat analyt [3]. Na rozdíl od ionizace elektrosprejem, u tohoto typu iontového zdroje probíhá ionizace ve fázi plynné. V průběhu ionizace jsou charakteristické rozmanité interakce mezi stanovovaným analytem a reakčním plynem. K ionizaci může dojít přenosem protonu, dále je velice

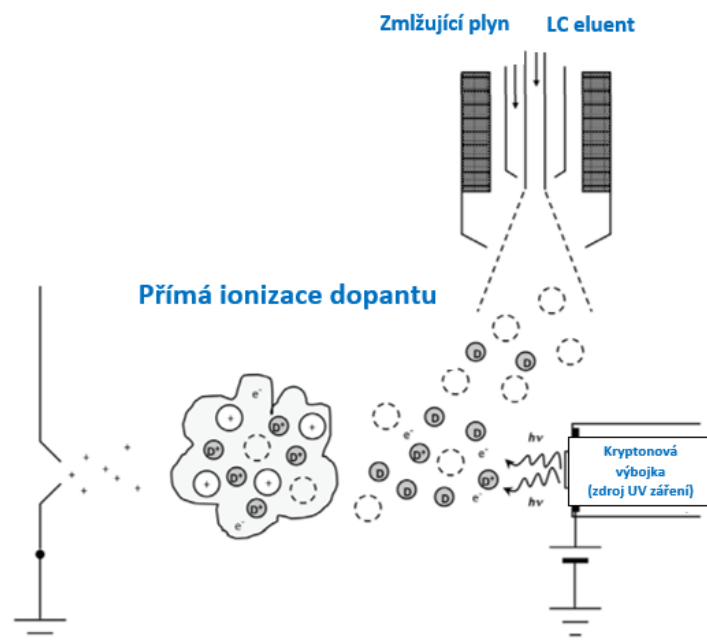
častá tvorba aduktů a sloučeniny s vysokou elektronovou afinitou mohou tvořit záporně nabitě ionty záchytem elektronu. Možná je i výměna náboje [11].



Obrázek 4: Princip chemické ionizace za atmosférického tlaku (upraveno dle [12])

3.1.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku (Obrázek 5) na rozdíl od APCI umožňuje také analýzu silně nepolárních sloučenin. Uspořádání celého systému se prakticky shoduje s instrumentací APCI, rozdíl však spočívá v mechanismu ionizace. K ionizaci je využívána nejčastěji kryptonová výbojka, která je zároveň zdrojem UV záření a zabezpečuje selektivní předání energie analytu, a tedy jeho přímou ionizaci [3]. Častěji však ionizace probíhá s použitím dopantu, kdy jsou využívány toluen, benzen nebo aceton. Proces ionizace v pozitivním módu je v tomto případě iniciován fotoionizací dopantu, ze kterého vzniká dopant radikál kationt. V následujícím kroku může takto transformovaný dopant ionizovat molekuly rozpouštědla mobilní fáze přenosem protonu, a to za předpokladu, že je protonová afinita molekul rozpouštědla mobilní fáze větší než protonová afinita deprotonovaného radikálu kationtu. Protonované molekuly rozpouštědla poté přenáší proton na molekulu analytu, za podmínky vyšší protonové afinity analytu. Další alternativou je ionizace analytu dopantem procesem výměny náboje, a to za předpokladu, že je ionizační energie analytu nižší než ionizační energie radikál kationtu vzniklého z dopantu [13].



Obrázek 5: Princip fotoionizace za atmosférického tlaku (upraveno dle [12])

3.2. Vznik matricových efektů

Důvodem stále širšího využití LC-MS/MS v klinických laboratořích je vysoká selektivita, citlivost a robustnost. Nepostradatelná se tato metoda jeví pro screening dědičných metabolických onemocnění, kde hlavními biochemickými markery jsou steroidy, mastné kyseliny, aminokyseliny, katecholaminy a thyroxin, nebo také pro terapeutické monitorování imunosupresiv, toxikologická stanovení a mnohé další. S čím je ale nutné při vývoji metody, validaci a rutinním měření počítat, jsou matricové efekty. Matricové efekty jsou jevy, které způsobují rozdíl v odezvě analytu při měření v biologické matrici a v roztoku standardu, způsobené látkami jinými, než je stanovovaný analyt. Tyto jevy vedou k zesílení či potlačení ionizace. Pro API ionizační zdroje představují rozsáhlý problém [4][14]. Důsledkem je ovlivnění limitu detekce (LOD), limitu kvantifikace (LOQ), linearity, přesnosti a správnosti LC-MS/MS metody [14]. Matricové efekty mohou být způsobeny látkami endogenními, jako jsou soli, fosfolipidy, elektrolyty nebo polární sloučeniny [15]. Významný vliv mají i chemikálie používané při úpravě vzorku a chromatografické separaci. Těmito exogenními látkami mohou být polymery obsažené v plastovém laboratorním nádobí, Li-heparin, jako běžně používaný antikoagulant přidávaný do zkumavek pro odběr krve, pufrů, soli, ion-párová činidla nebo ftaláty uvolňované z kolonek při extrakci na tuhé fázi (SPE) [14].

Přesný mechanismus vzniku matricových efektů zatím není zcela znám. Při použití ESI ovlivňují ionizaci zejména pozměněné vlastnosti kapek vznikajících při ionizaci vlivem přítomnosti netěkavých nebo méně těkavých látek. Dochází ke změně v efektivitě tvorby kapek v důsledku kompetice o náboj nebo transfer do plynné fáze mezi analytem a složkami matrice. Narušen je pak celý proces tvorby nabitých iontů v plynné fázi, které putují do analyzátoru a detektoru [16].

Dle další teorie interferující látky s vyšší viskozitou zvyšují povrchové napětí kapek, čímž limitují vypařování rozpouštědla a schopnost analytu přejít do plynné fáze. Netěkavé látky mohou zabránit kapkám dosáhnout kritický poloměr, který ionty v plynné fázi potřebují k emitaci, popřípadě se mohou účastnit koprecipitace analytu. V návaznosti na to mohou být ionty analytu v takto kondenzované fázi neutralizovány deprotonačními reakcemi zásaditých látek [16]. Různá aditiva nebo složky matrice se tedy mohou chovat jako ion-párová činidla, jejichž přítomnost vede k tvorbě neutrálních komplexů nebo jinak formovaných iontů analytu [17].

Pokud je srovnávána odezva standardu v biologické matrici s odezvou standardu v samotné mobilní fázi, jedná se o tzv. absolutní matricové efekty. Větší význam má při validaci, vyhodnocení a získání spolehlivých farmakokinetických dat bioanalytické metody nepřítomnost relativních matricových efektů. Slovo relativní zde odkazuje na nutnost porovnání hodnot matricových efektů z různých zdrojů biologických matric. Stejný typ biologické matrice (například plasma) použitý při různých měřeních může obsahovat rozdílné endogenní sloučeniny, které mohou koeluovat s analytem, a které mohou ovlivnit efektivitu ionizace. Zejména dlouhodobé studie sbírají vzorky od stovek subjektů hodnocení, jejichž molekulární složení plasmy, moči nebo obojího se může významně lišit [18].

3.3. Faktory vzniku ME

Přestože detailní mechanismy vzniku matricových efektů nejsou dosud známy, jsou popsány okolnosti, které jejich vznik podporují nebo potlačují. Jak uvádí doporučené postupy vypracované Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) i dalšími autoritami [19][20] **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** , hodnocení matricových efektů je potřeba začlenit do validace dané metody. Z toho důvodu je pro analytika stěžejní definovat hlavní faktory, které mohou matricové efekty vyvolat.

3.3.1. Typ ionizační techniky

Převážná část mechanismů ovlivnění ionizace je specifická pro použitou ionizační techniku. Mohou být rozděleny do dvou skupin, a to na mechanismy uplatňující se v kapalně fázi a mechanismy ovlivňující ionizaci ve fázi plynné. Větší vliv na ionizaci mají děje odehrávající se v kapalně fázi. To bylo demonstrováno prací [21], která využívala duální ionizační zdroje. Mezi principy ovlivnění ionizace v kapalně fázi patří již zmíněná soutěž o místo na povrchu kapky mezi analytem a složkou matrice, ovlivnění efektivity tvorby kapek a vypařování rozpouštědla látkami, které zvyšují viskozitu a zároveň povrchové napětí, tvorba pevných částic analytu s netěkavými látkami a chování složek matrice nebo aditiv mobilní fáze jako ion-párová činidla a jejich interakce s ionty analytu [22][23]. Principy zodpovědné za zeslabení ionizace jsou v plynně fázi odlišné. Analyt může být převeden do plynně fáze jako ion nebo se stát součástí nabitého klastru tvořeného rozpouštědlem. Dále může být náboj ztracen neutralizačními reakcemi nebo přenosem náboje v důsledku přítomnosti vysoce bazických sloučenin.

Většina zdrojů uvádí, že ESI je k ovlivnění ionizace matricovými efekty více náchylnou ionizační technikou. To souvisí právě se způsobem ionizace. V případě ESI dochází k předání náboje analytu v kapalně fázi podle mechanismu popsaného v kapitole 3.1.1. Jiným mechanismem vznikají ionty v plynně fázi, jako je tomu například u APCI, kdy se LC eluent konvertuje do podoby molekulárního plynu a až následně dochází pomocí ion-molekulárních interakcí analytu s ionizovanou mobilní fází ke vzniku stabilních iontů, a tím k ionizaci analytu [24]. Ovlivnění ionizace matricovými efekty u APCI navíc přímo nesouvisí s nasycením náboji, jelikož maximální množství iontů, které vzniká ionizací v plynně fázi, je mnohem větší v závislosti na nadbytečné produkci iontů reakčního plynu [25]. Existují ovšem studie, které tyto teorie vyvrací. Takovým příkladem může být výzkum vědecké skupiny Garcia-Ac a kol. [26], ve kterém byly matricové efekty testovány na šesti různých sloučeninách s využitím ESI, APCI a APPI.

Studie prokázala nižší hodnoty matricových efektů s použitím ESI u tří z pěti vybraných látek [26].

Náchylnost APPI k matricovým efektům je ze tří výše zmíněných ionizačních technik prozkoumána nejméně. Výsledky studie Hanolda a kol. z roku 2004 [27] prokázaly, že APPI je méně náchylná k ovlivnění ionizace matricovými efekty a zároveň k efektům, které způsobují pufrы použité při elektroforéze, ve srovnání s APCI a ESI.

V případě výběru ionizačního módu je nutno zohlednit chemickou strukturu analytu spolu se složením mobilní fáze. V přítomnosti trifluoroctové kyseliny nelze například docílit efektivní ionizace v negativním ionizačním módu, zatímco použití kyseliny mravenčí a octové ionizaci umožňuje. Pozitivní ionizační mód nelze zvolit, pokud je v mobilní fázi obsažena sloučenina silně alkalické povahy, jako tetrapropylamonium, naopak prostředí amonium hydroxidu je vyhovující [22].

Geometrie iontového zdroje může do jisté míry také ovlivnit účinnost ionizace. Studie Holčapka a kol. [28] srovnávala vliv pěti různých ionizačních zdrojů a přístrojových geometrií na zeslabení ionizace při využití ion-párové HPLC-MS analýzy. Nejnižší snížení signálu bylo pozorováno při použití Z-sprej geometrie. Zároveň udává, že ortogonální uspořádání s kolmou trajektorií iontů vstupujících do analyzátoru způsobuje nižší kontaminaci zdroje než lineární uspořádání. Ortogonální uspořádání se vyznačuje tím, že pouze ionty vybrané polarity vstupují do analyzátoru, kdežto ionty s opačným nábojem nebo neutrální částice nikoli. Na druhé straně bylo zjištěno, že rozdíly mezi některými typy geometrií iontového zdroje nejsou nikterak signifikantní. Studie Stahnkeho a kol. [8] naopak odporuje předešlému tvrzení o ovlivnění ionizace s použitím Z-sprej geometrie. Tato studie udává nižší hodnoty matricových efektů s použitím ortogonálního uspořádání. Informace týkající se vlivu geometrie iontového zdroje na ionizaci nejsou tedy dosud zcela jednoznačné.

3.3.2. Typ matrice

Přítomnost matricových efektů je závislá na typu analyzované biologické matrice. Nejčastěji analyzovanými typy biologických materiálů v klinických laboratořích jsou plasma, moč a sérum [29].

Plasma i sérum jsou tvořeny velmi širokou škálou polárních a nepolárních látek, jako jsou soli, uhlovodíky, aminokyseliny, organické kyseliny, lipidy atd. Plasma na rozdíl od séra je charakteristická vysokým obsahem proteinů, které mohou vést ke srážení v LC

systemu, a proto není vhodné používat přímý nástřík vzorku či pouhé ředění vzorku jako jeho úpravu [29]. V případě takto komplexních matric mohou být některé sloučeniny jako lipidy, cukry a soli ve vzorku přítomny i po relativně selektivní úpravě vzorků před LC-MS/MS analýzou, jako je například extrakce na tuhou fázi [30].

Největší zdroj matricových efektů v plasmě představují fosfolipidy. Většina z nich ionizuje v pozitivním módu díky přítomnosti kvarterního dusíku. Okolo 70 % plasmatických fosfolipidů jsou glycerofosfocholiny. Jedním ze způsobů, jak může být tento potenciální zdroj matricových efektů monitorován, je přidání $184 > 184$ SRM přechodu při vytváření MS metody. Glycerofosfocholiny mají při vysoké energii ve zdroji a nízké kolizní energii tendenci disociovat na trimethylamonium-ethyl fosfátové ionty (m/z 184). Kromě glycerofosfocholinů také sfingomyeliny prochází touto disociací a mohou být monitorovány tímto přechodem. Protože fosfolipidy jsou vysoce lipofilní látky, jsou velmi silně zadržovány na stacionárních fázích typu RP chromatografie a nemusí tedy dojít k jejich vymytí v průběhu analýzy. Z tohoto důvodu fosfolipidy mohou způsobit matricové efekty nejen koelucí s analytem, ale mohou způsobit také náhodné falešné matricové efekty způsobené právě jejich vymytím z předchozí analýzy. Tento typ matricových efektů lze rozeznat na základě vysoké variability matricových efektů mezi jednotlivými nástříky [31].

Další významnou složkou plasmy jsou estery cholesterolu a volný cholesterol, které zaujmají 15 - 40 % z celkového lipidového spektra plasmy. K jejich monitorování se využívá charakteristický fragment s m/z 369 $[M+H-H_2O]^+$. V neposlední řadě jsou zastoupeny triacylglyceroly, které tvoří přibližně 10 – 15 % celkového množství lipidů v plasmě. Při MS analýze tvoří amoniové adukty $[M+NH_4]^+$ [32].

Moč je také komplexní, na látky bohatou matricí, kde se vyskytují zejména elektrolyty, anorganické soli, organické baze a spousta dalších sloučenin jako je urea nebo kreatinin. Proteiny a fosfolipidy jsou v moči, na rozdíl od plasmy, obsaženy pouze v nízkých koncentracích (0,5 – 1 g/l) [30]. Jedna ze studií zabývající se vlivem matricových efektů popisuje matricové efekty při analýze devíti nekonjugovaných žlučových kyselin. Ukázala minimální závislost matricových efektů na množství, pozici a orientaci hydroxylů v jejich chemické struktuře, nicméně byl patrný trend zvyšujících se matricových efektů v závislosti na klesající hydrofobicitě žlučových kyselin [33].

S větším množstvím interferujících látek v porovnání s močí je nutné počítat u orálních tekutin. Látky nejčastěji se vyskytující v této biologické matrici mají jak hydrofilní, tak hydrofobní charakter. Spektrum látek je podobné jako u plasmy, ale v nižších koncentracích [29].

3.3.3. Ostatní faktory ovlivnění ionizace

Zesílení či zeslabení ionizace může být ovlivněno jakoukoli koelující složkou vstupující do iontového zdroje. Poměrně často probíraným tématem je efekt aditiv mobilní fáze na snížení či zvýšení ionizace analytu. Přidání některých aditiv do mobilní fáze výrazně ovlivní účinnost ionizace [34]. Z běžně používaných aditiv způsobuje signifikantní snížení signálu například kyselina trifluoroctová. Ne všechny látky jsou ale přídavkem kyselin ovlivněny. Mezi ně patří například parabeny [35].

Vliv na ionizaci má také přítomnost pufrů v mobilní fázi. U těchto látek také záleží na typu a koncentraci. Při koncentracích kolem 1 mM je pozorováno u řady analytů nepatrné zvýšení efektivity ionizace. Se vzrůstající koncentrací mají pufrů v mobilní fázi, jako například mravenčan amonný a hydroxid amonný, opačný efekt – silně supresivní. Je to dáno logicky větším množstvím iontů ve spreji. Jak již bylo zmíněno, redukují tak přístup cílového analytu na povrch kapky a tvorbu iontů analytu [35].

Další důležitou roli hraje koncentrace analytu. Z hlediska účinnosti ionizace je nežádoucí vysoká koncentrace analytu v matrici, ale i jeho stopové množství [36].

3.4. Eliminace matricových efektů

Z výše zmíněných vlivů působících na vznik matricových efektů je patrné, že možné riziko nechtěných interferencí se objevuje prakticky v každém kroku analytické metody. Pro dosažení co nejpřesnějších a nejspolehlivějších dat, musí být provedena určitá opatření k eliminaci nebo alespoň kompenzaci matricových efektů. Postupy na odstranění matricových efektů zahrnují optimalizaci přípravy vzorku, změnu parametrů vysokoúčinné kapalinové chromatografie k zabránění koeluce analytů a interferujících sloučenin, a v neposlední řadě změnu parametrů hmotnostní spektrometrie k redukci výskytu matricových efektů v iontovém zdroji. Ani to ovšem často nestačí k jejich úplné eliminaci. Většina nejběžněji praktikovaných technik úpravy vzorku selhává při odstranění látek, které jsou svými vlastnostmi podobné analytu, což může vyústit v jejich koeluci s analytem [37].

3.4.1. Úprava vzorku

Úprava vzorku představuje důležitý předstupeň analýzy, jehož cílem je selektivní izolace analytu z matrice a zajištění co nejnižšího vlivu matrice v analyzovaném vzorku. Dochází například k eliminaci látek, které vykazují odlišnou polaritu než analyt, a to při použití extrakčních technik nebo k odstranění vysokomolekulárních proteinů v důsledku působení precipitačních činidel. Analyt právě s látkami, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, koeluje. Čím menší množství matrice se do iontového zdroje dostane, tím více se minimalizuje její vliv na ionizaci a výsledky analýzy. Toho je docíleno prostým zředěním vzorku. Vše se ale praktikuje na úkor citlivosti metody. Nedostatečné zakoncentrování vzorku analytu před jeho nástřikem obecně snižuje citlivost a zvyšuje limit detekce. Potenciální zdroje matricových efektů, které nejsou efektivně odstraněny, mohou navíc zkracovat životnost chromatografické kolony a kontaminovat iontový zdroj a iontovou optiku hmotnostního spektrometru [22][38][39].

Konvenční techniky úpravy vzorku, často používané v praxi, zahrnují metodu extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), metodu extrakce na tuhou fázi a proteinovou precipitaci (PP) [39].

Jednou z nejvíce používaných a nejméně náročných technik úpravy vzorku je metoda proteinové precipitace. Vyznačuje se ale nízkou selektivitou i čistotou vzorku a je zde velká pravděpodobnost ovlivnění účinnosti ionizace při použití elektrospreje jako iontového zdroje. Principem proteinové precipitace je denaturace proteinů přítomných v matrici. K denuraci dochází působením extrémních externích podmínek, jako je zvýšená teplota nebo působení organického rozpouštědla, například acetonitrilu nebo metanolu. V procesu denaturace dochází ke změně v terciární a sekundární struktuře proteinu, což postupně oslabuje jeho vazbu s analytem. Ostatní nečistoty neproteinové povahy v podobě fosfolipidů a mastných kyselin při precipitaci odstraněny nejsou, a proto se tato technika kombinuje například s SPE. Výrobci v oblasti analytického vybavení uvádí na trh nejrůznější obměny destiček na proteinovou precipitaci, do kterých jsou zároveň zakomponovány sorbenty, které nabízí selektivní odstranění fosfolipidů z precipitované plasmu. Tyto destičky se dají zkombinovat i s ostatními principy úpravy vzorku [39].

Metoda extrakce z kapaliny do kapaliny využívá přechodu analytu z vodné fáze do organického rozpouštědla na základě hodnot rozdělovacího koeficientu. LLE se

vyznačuje dobrou výtěžností a reprodukovatelností, je relativně nenáročná na provedení, nevyžaduje speciální instrumentaci, lze ji aplikovat na extrakci malých i velkých množství vzorku a umožňuje zakoncentrování analytu. V procesu extrakce dochází k odstranění látek, které nejsou rozpustné v použitém organickém rozpouštědle, například interferencí ve formě solí a polárních látek, což je výhodné při odstraňování matricových efektů. Sloučeniny, které vykazují podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako cílový analyt, a tedy i obdobnou rozpustnost, jsou ovšem extrahovány spolu s analytem. Metoda je navíc hůře automatizovatelná, s rizikem nechtěné emulzifikace. Mezi její nevýhody patří také větší objem použitých rozpouštědel [39][40][41][42].

Metoda extrakce na tuhé fázi je založena na interakci mezi funkčními skupinami analytu a tuhou fází. Vyznačuje se dobrou výtěžností extrakce a redukuje množství použitých rozpouštědel [43]. Ačkoli je metoda ve spojení s hmotnostní spektrometrií s oblibou využívána, i zde může v některých případech docházet k ovlivnění ionizace. Je známo, že chemické nečistoty v SPE systému jako jsou polyetylenglykoly a ftaláty, mohou být extrahovány společně s analytem v průběhu eluce, kdy je vlivem působení organického rozpouštědla narušena interakce analytu se sorbentem a analyt je vymyt z kolonky. Pro efektivnější eluci zadržovaných analytů se často výrobci doporučuje použití směsi organických rozpouštědel s přísadkou bazí nebo kyselin. Takovéto podmínky ještě více napomáhají rozpouštění výše zmíněných nečistot, které způsobují matricové efekty [39][40][41].

Se snahou předejít nechtěným interferencím jsou výše zmíněné extrakční techniky stále zdokonalovány. Jeden z nových přístupů modifikace těchto metod představuje hybridní spojení PP-SPE. Začíná se přidáním okyseleného acetonitrilu k plasmě nebo séru, kde dojde k proteinové precipitaci. Následuje centrifugace a vzniklý supernatant je dávkován na SPE kolonu se sorbentem, například s oxidem zirkoničitým, který slouží jako chemický filtr specificky vázající endogenní fosfolipidy. Obměna SPE, která využívá molekulárně vtištěných polymerů jako sorbentů, se stává zase více selektivní k cílovému analytu. V praxi se využívají i další techniky úpravy vzorku, například extrakce ze suché kapky matrice, ultrafiltrace nebo mikrodialýza umožňující monitorování *in vivo* [39][40].

3.4.2. Podmínky chromatografické separace

Vhodně zvolenými podmínkami jako je separační mód, stacionární fáze, typ mobilní fáze, včetně pH, lze docílit odseparování interferujících látek matrice, a tedy snížit vliv matrice na ionizaci sledovaného analytu. Volbou gradientové eluce lze také předejít nechtěným interferencím způsobenými rezidui z předchozího nástřiku. Povaha mobilní fáze hraje důležitou roli zejména při analýze ionizovatelných sloučenin. U těchto sloučenin ovlivňuje pH mobilní fáze retenci i selektivitu separace [44].

Využit se dají i další chromatografické metody. Studie vědecké skupiny Desfontaine a kol. [44] srovnává na příklad výskyt matricových efektů v moči a plasmě při použití RPLC-MS a SFC-MS. Výsledky vzorků moči jasně demonstrují menší vliv matricových efektů při použití superkritické fluidní chromatografie. V případě plasmy, která byla upravena metodou SPE před vlastní analýzou, se také ukázala lepší technikou SFC, avšak při proteinové precipitaci nebylo možné pro jednu z technik jednoznačně rozhodnout. Dále bylo prokázáno, že při použití RPLC byla moč více náchylná k zesílení ionizace, zatímco u plasmy došlo k zeslabení ionizace. Hodnoty matricových efektů se tak velmi liší v závislosti na analyzované matrici i zvolené chromatografické technice [44].

Redukce matricových efektů souvisí také s volbou stacionární fáze. Každý analyt je unikátní svými vlastnostmi a na výběr stacionární fáze musí být nahlíženo individuálně. Efektivním řešením je na příklad použití stacionární fáze s různými mechanismy retence, tedy vícemodálních kolon, například s kombinací chromatografie na reverzní fázi a iontově výměnné chromatografie. Při vývoji nové analytické metody je důležité brát v úvahu polaritu analytu a typ matrice. V analýze moči nebudou příliš brány v úvahu proteiny, jako spíše vyšší obsah solí a ostatních polárních sloučenin. V případě plasmy, obsahující převážně fosfolipidy, je důležité zvolit kolonu, která je schopná odlišné retence pro tyto nepolární sloučeniny a cílový analyt. Pro retenci analytu může být výhodné také použití kolony s fenylovými nebo pentafluorfenylpropylovými skupinami, jelikož fosfolipidy aromatickou skupinou většinou nedisponují [22][45].

Co se průtokové rychlosti týká, začlenění nižších průtokových rychlostí je výhodou z hlediska redukce matricových efektů. Dochází ke zlepšení účinnosti ionizace [45].

3.4.3. Metody kvantifikace

Další z možností ošetření matricových efektů je jejich kompenzace s využitím přístupů kvantifikace. Využití standardů eliminuje zejména vliv chyby při úpravě vzorku a nástřiku. V LC-MS analýze je s oblibou používána metoda využívající vnitřního standardu, který se přidává k analyzovanému i referenčnímu vzorku ve stejném množství. Vnitřní standard nesmí být jednou ze složek vzorku, měl by být co nejvíce strukturně podobný analytu, musí mít shodnou retenci jako stanovovaný analyt, musí být stabilní, mít požadovanou čistotu a odezva detekce by měla být pro analyt i vnitřní standard podobná. Metoda vnitřního standardu má své uplatnění především v případě, kdy je nezbytné před vlastní HPLC analýzou provést složitější úpravu vzorku. Navíc kompenzuje změny v odezvě hmotnostního spektrometru při LC-MS analýze. Další možností je metoda přidavku standardu, která se s oblibou využívá při stanovení vzorků, u kterých je špatně dostupná matrice bez stanovovaného analytu, na příklad v případě stanovení inzulínu v plasmě, kterou je prakticky nemožné bez přítomnosti inzulínu získat. V tomto případě je východiskem příprava analyzovaného vzorku a vzorku s přidáním známým množstvím analytu. Koncentraci stanovovaného analytu v neznámém vzorku lze poté vypočítat porovnáním ploch píků v obou vzorcích [46][47].

Nejlepší možnou techniku kvantifikace v LC-MS analýze představuje přidání stabilního izotopicky značeného vnitřního standardu (SIL-IS) do měřeného vzorku. Jelikož SIL-IS bude na koloně zadržován ve stejném retenčním čase jako cílový analyt, bude zároveň vykazovat stejnou míru potlačení či zesílení signálu a shodnou ionizaci. Přidáním SIL-IS nejsou kompenzovány pouze matricové efekty, nýbrž i variability při úpravě vzorku a při měření hmotnostní spektrometrií [46]. Tento typ vnitřního standardu je považován za ideální, protože vykazuje identické chování jako analyt při úpravě vzorku, na chromatogramu a při ionizaci [16]. Obecně platí, že SIL-IS by měl s analytem kompletně koeluovat, což je potřeba na chromatogramech každého vzorku ověřit. Dále je důležité, aby byl rozdíl hmot mezi analytem a SIL-IS minimálně o 3 hmotnostní jednotky. Izotopicky značená analoga jsou sloučeniny, jejichž atomy v molekule jsou nahrazeny jejich stabilnějšími izotopy. Mezi ně patří například ^2H , ^{13}C , ^{15}N nebo ^{18}O [48]. Při výběru SIL-IS se preferují izotopy ^{13}C a ^{15}N před deuteriem, jelikož deuteriem značený vnitřní standard nevykazuje dostatečnou koeluci s analytem, což může vést k rozdílům v ionizaci analytu a vnitřního standardu. Problém představuje měření většího množství analytů, při

kterém by měl být každému analytu přiřazen jeho vlastní SIL-IS, což je často finančně velmi náročné nebo nereálné díky komerční nedostupnosti všech SIL-IS [46].

3.5. Hodnocení matricových efektů

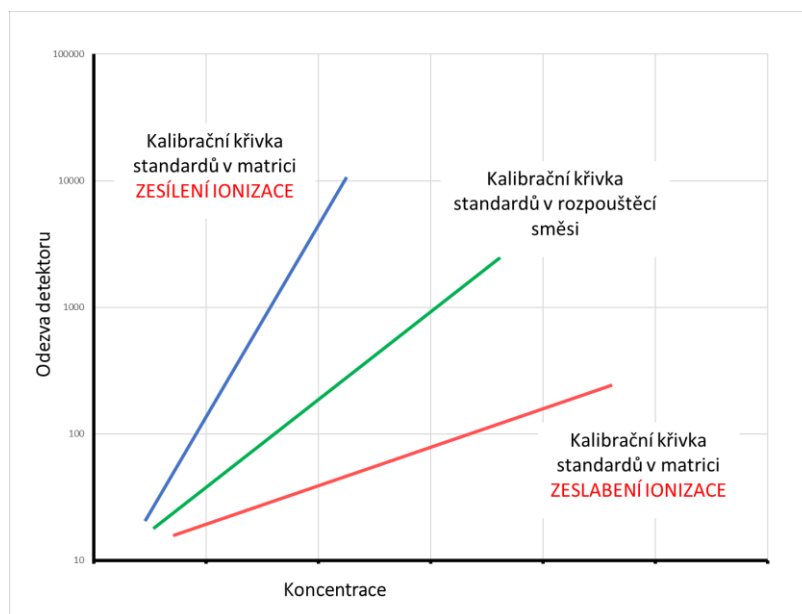
Matricové efekty lze hodnotit třemi základními přístupy: metodou post-kolonové infuze, metodou porovnání směrníc kalibračních křivek a metodou post-extrakčního přídatku. Poslední dvě zmíněné metody je možné použít ke kvantitativnímu vyjádření ME.

3.5.1. Metoda post-kolonové infuze

Jedná se o dynamickou techniku, která umožňuje odhalit vliv matricových efektů na odezvu analytu během celé chromatografické separace. Výsledky umožňují určit vliv různých metod úpravy vzorku na matricové efekty, vhodnou analytickou kolonu, kde se matricové efekty vyskytují a kde během chromatografické separace nejsou identifikovány, dále vliv aditiv mobilní fáze na odezvu analytu [1]. Metoda tedy poskytuje pouze kvalitativní hodnocení matricových efektů. Při této metodě je na kolonu nastříknuta matrice po předchozí úpravě a její záznam je porovnáván se záznamem samotného rozpouštědla vzorku. Pumpa zajišťující infuzi přivádí analyt do mobilní fáze přímo za výstupem eluentu z chromatografické kolony a před vstupem do iontového zdroje. Detektor monitoruje odezvu konstantně proudícího analytu do těchto dávkovaných vzorků. Všechny endogenní složky matrice, které vystupují z kolony a způsobují matricové efekty, jsou zaznamenány jako potlačení či zesílení ionizace přidaného analytu v podobě pozitivních nebo negativních píků ve specifických místech na chromatogramu [23].

3.5.2. Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek

Zde je ke kvantitativnímu určení matricových efektů využíváno porovnání směrnic kalibračních křivek sestavených pro standard v rozpouštěcí směsi a pro standard v matrici (Obrázek 6). Pokud nejsou matricové efekty přítomné, obě kalibrační křivky jsou identické. V případě, že je směrnice kalibrační křivky látky v matrici nižší, než je tomu u látky ve standardním roztoku, došlo k potlačení ionizace. Opačný případ indikuje zesílení ionizace [49].



Obrázek 6: Metoda hodnocení matricových efektů – porovnání směrnic kalibračních křivek (upraveno dle [40])

3.5.3. Metoda post-extrakčního přídavku

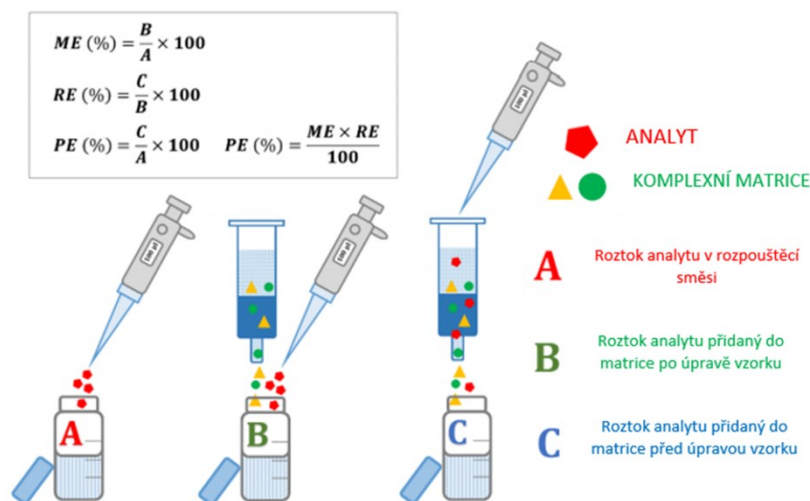
Metoda post-extrakčního přídavku (Obrázek 7) porovnává signál analytu v rozpouštěcí směsi a signál analytu přidaného do matrice po provedení extrakce. Stejná koncentrace analytu v obou roztocích je nutností. Jakékoli odchylky v odezvě značí buď snížení ionizace, nebo její zvýšení, tedy přítomnost matricových efektů. Míra matricových efektů se spočítá podle následujícího vzorce:

$$ME(\%) = \frac{B}{A} * 100 - 100$$

kde B představuje průměr ploch píků standardu přidaného do matrice po extrakci a hodnota A symbolizuje průměrnou plochu píku standardního roztoku. Hodnoty $ME(\%) > 0\%$ značí zesílení ionizace, kdežto hodnoty $ME(\%) < 0\%$ značí zeslabení

ionizace. Pokud se matricové efekty rovnají nule, znamená to, že odezva analytu v mobilní fázi a v extraktu plasmy obohaceném o analyty se shodovala, a žádné absolutní matricové efekty nejsou pozorovány.

Zjištění přítomnosti relativních matricových efektů může být dosaženo srovnáním relativních směrodatných odchylek (% RSD) v opakujících se nástřicích (n = 5) standardů a vzorků matrice ze stejných zdrojů [18] [23].



Obrázek 7: Metoda post-extrakčního přidavku (upraveno dle [16])

3.5.4. Požadavky regulačních autorit pro hodnocení ME

Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) je ve svých doporučeních velice obecný. Matricové efekty zmiňuje v rámci hodnocení selektivity. Pouze poukazuje na to, že je důležité matricové efekty hodnotit. Hodnocení by mělo podle této autority zahrnovat porovnání směrnice kalibračních křivek v různých zdrojích biologické matrice, zahrnuje tedy i hodnocení relativních matricových efektů, ale bližší způsob nespecifikuje [19].

Pokyny Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčivé přípravky (ICH) zcela kopírují doporučení Evropské lékové agentury (EMA). Ty jsou o něco specifičtější. Zdůrazňují potřebu hodnotit matricové efekty s použitím 6 blankových matric od různých dárců. Zároveň tato směrnice také doporučuje způsob hodnocení matricových efektů pomocí post-extrakční metody na 2 koncentračních hladinách. Uvádí, že správnost by měla být v rozsahu +/- 15 % od nominální hodnoty, tedy standardního roztoku, a hodnoty relativních matricových efektů by měly být nižší než 15 % [20].

3.6. Volba analytů pro hodnocení ME

V experimentální části bylo použito 28 látek různých fyzikálně-chemických vlastností. Variability vybraných látek bylo dosaženo zejména různými hodnotami rozdělovacího koeficientu, odlišnými acidobazickými vlastnostmi a molekulovými hmotnostmi. Na základě rozdělovacích koeficientů bylo pro jednotlivé látky vybráno vhodné rozpouštědlo. Látky s hodnotou $\log P > 2$ byly rozpuštěny v acetonitrilu, látky s $\log P$ v rozmezí 0 – 2 v 50% acetonitrilu a sloučeniny se zápornými hodnotami $\log P$ byly rozpuštěny v ultračisté vodě. Fyzikálně-chemické vlastnosti látek shrnuje Tabulka 1

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti látek použitých v experimentální části

SMĚSNÝ ROZTOK 1	Mr	LogP	pKa (kyselé)	pKa (bazické)
Uracil	112,09	-1,04	8,95	-
Paracetamol	151,16	0,48	9,86	1,72
Acebutolol	336,20	1,77	13,78	9,40
Maravirok	513,67	5,30	14,80	10,24
Salicylová kys.	138,12	2,01	3,01	-
Pravastatin	424,53	0,59	-	-
Sofosbuvir	529,45	2,21	9,39	-
Ritonavir	720,31	4,24	13,68	2,84
Ibuprofen	206,29	3,50	4,41	-
Estron	270,16	3,13	-	-
SMĚSNÝ ROZTOK 2	Mr	LogP	pKa (kyselé)	pKa (bazické)
Atenolol	266,34	0,34	13,88	9,43
Kofein	194,19	-0,63	-	0,52
Tetracyklin	444,43	0,62	4,50	11,02
Daklatasvir	738,39	4,67	11,15	6,09
Tamsulosin	408,51	2,14	10,08	8,78
Atomoxetin	255,35	3,36	-	10,15
Telmisartan	514,62	6,48	3,86	5,01
Indometacin	357,79	4,25	3,96	-
SMĚSNÝ ROZTOK 3	Mr	LogP	pKa (kyselé)	pKa (bazické)
Tryprofan	204,23	0,70	2,30	9,71
Perfloxacin	333,36	1,92	0,16	7,41
Rutin	610,52	-0,90	6,17	-
Vardenafil	488,60	3,64	9,86	7,15
Hydrokortizon	362,46	1,76	12,47	-
Pitavastatin	880,29	2,92	4,13	-
Dexametazon	392,46	2,03	12,13	-
Atorvastatin	558,64	3,85	4,29	0,38
Simeprevir	749,29	4,82	3,77	1,70

