

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

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

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

Hradec Králové 2019

Michaela Lejnarová

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

Hradec Králové 15. 5. 2019

Michaela Lejnarová

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Haně Kočové Vlčkové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost při konzultacích a čas, který mi věnovala při vypracování diplomové práce. Mé poděkování patří též celému kolektivu na Katedře analytické chemie, jenž mi svým přátelským chováním a přístupem usnadnil celé laboratorní měření.

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 vyhodnocení matricových efektů při LC-MS/MS analýze za použití ionizace elektrosprejem a trojitého kvadrupólu. Konkrétně se jednalo o porovnání metody využívající směrnice kalibračních křivek a metody post-extrakčního přidavku, kdy hlavní cílem bylo posoudit, zda získané hodnoty matricových efektů spolu korelují, či nikoli. Případně 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 předcházela 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 vyhodnocení matricových efektů byly získány velmi různorodé výsledky, a proto v případě hodnocení pomocí směrnice kalibračních křivek byly testovány také různé transformace os kalibračních křivek, jako je logaritmická či reciproká.

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 a line 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. Where appropriate, 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, and therefore, when using slopes of a line of the calibration curves, various ways of constructing these calibration curves, such as logarithmic or reciprocal scaling, were also tested.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Teoretická část	3
3.1.	Ionizační techniky v LC-MS analýze	3
3.1.1.	Ionizace elektrosprejem	4
3.1.2.	Chemická ionizace za atmosférického tlaku	6
3.1.3.	Fotoionizace za atmosférického tlaku	7
3.2.	Vznik matricových efektů	8
3.2.1.	Typ ionizační techniky	10
3.2.2.	Fyzikálně-chemické vlastnosti látek	10
3.2.3.	Typ matrice	10
3.2.4.	Další faktory vzniku ME	12
3.3.	Eliminace matricových efektů	12
3.3.1.	Úprava vzorku	13
3.3.2.	Podmínky chromatografické separace	14
3.3.3.	Podmínky hmotnostní spektrometrie	15
3.3.4.	Metody kalibrace	16
3.4.	Hodnocení matricových efektů	17
3.4.1.	Metoda post-kolonové infuze	17
3.4.2.	Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek	17
3.4.3.	Metoda post-extrakčního přídavku	18
3.4.4.	Směrnice pro určení matricových efektů	19
4	Experimentální část	20
4.1.	Použité přístroje a pomůcky	20
4.2.	Použité chemikálie	20
4.3.	Použité standardy	20
4.4.	Použitý vzorek	21
4.5.	Příprava zásobních roztoků standardů	21
4.6.	Příprava pracovních roztoků	22
4.7.	Příprava roztoku lyofilizovaného séra	23
4.8.	Postup úpravy vzorku	23
4.9.	Příprava roztoků pro hodnocení matricových efektů	23

4.10. UHPLC-MS/MS metoda	24
5 Výsledky a diskuze.....	27
5.1. Výběr podmínek LC separace	27
5.2. Výběr prekurzorových iontů.....	27
5.3. Optimalizace parametrů iontového zdroje.....	28
5.3.1. Napětí na kapiláře	29
5.3.2. Napětí na vstupním kuželu.....	31
5.3.3. Napětí na hexapolu.....	34
5.3.4. Průtok plynu na vstupním kuželu.....	36
5.3.5. Průtok desolvačního plynu	38
5.3.6. Napětí na extraktoru	40
5.4. Výběr produktových iontů.....	42
5.5. Optimalizace kolizní energie a výběr vhodného SRM přechodu	43
5.6. Stanovení matricových efektů	47
5.7. Vyhodnocení ME porovnáním směrníc kalibračních křivek.....	47
5.8. Hodnocení ME pomocí metody post-extrakčního přídavku.....	47
5.9. Porovnání dvou metod vyhodnocení ME	52
6 Závěr	58
7 Seznam použité literatury	60
8 Přílohy.....	65
Seznam obrázků.....	83
Seznam tabulek	85
Seznam zkratk	86

1 Úvod

V současné době je jednou z hlavních technik užívaných při kvalitativním a zejména kvantitativním stanovení 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 výhodná separace složek analyzované směsi, na straně druhé selektivní detekce iontů podle poměru hmotnosti a náboje. V klinické praxi se často jeví lépe než zaběhnuté imunoanalytické metody. Stinné stránky skýtá úprava vzorku, která stále zůstává časově nejnáročnějším krokem analýzy.

I přes její časté využití se naráží na její úskalí, které souvisí zejména s výskytem nežádoucích exogenních a endogenních látek ve vzorku a které ji mohou velmi výrazně ovlivnit. Často ani samotná separace či úprava vzorku není schopná eliminovat interference, které mají za následek nepřesné, falešně pozitivní či negativní výsledky. Interference mohou velmi výrazně pozměnit účinnost ionizace cílených analytů, kdy může docházet jak k potlačení, tak k zesílení ionizace. Tento jev se označuje jako matricové efekty. V současné době existuje celá řada doporučení, jak je možné tyto efekty snížit a zároveň i jak postupovat při jejich vyhodnocení. Matricové efekty jsou součástí validační dokumentace při vývoji metody. Regulační autority v oblasti bio-analytických metod ale většinou přesně nespecifikují, jakým způsobem mají být matricové efekty měřeny a vyhodnocovány, tedy zejména v případě vyhodnocení pomocí směrníc kalibračních křivek.

2 Cíl práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo porovnání výsledků matricových efektů získaných pomocí metody porovnání směrnice kalibračních křivek a metody post-extrakčního přidavku, případně doporučení aplikace těchto metod pro získání správných a přesných hodnot matricových efektů. K analýze bylo vybráno celkem 28 látek, které se lišily relativní molekulovou hmotností, acidobazickými vlastnostmi a dalšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

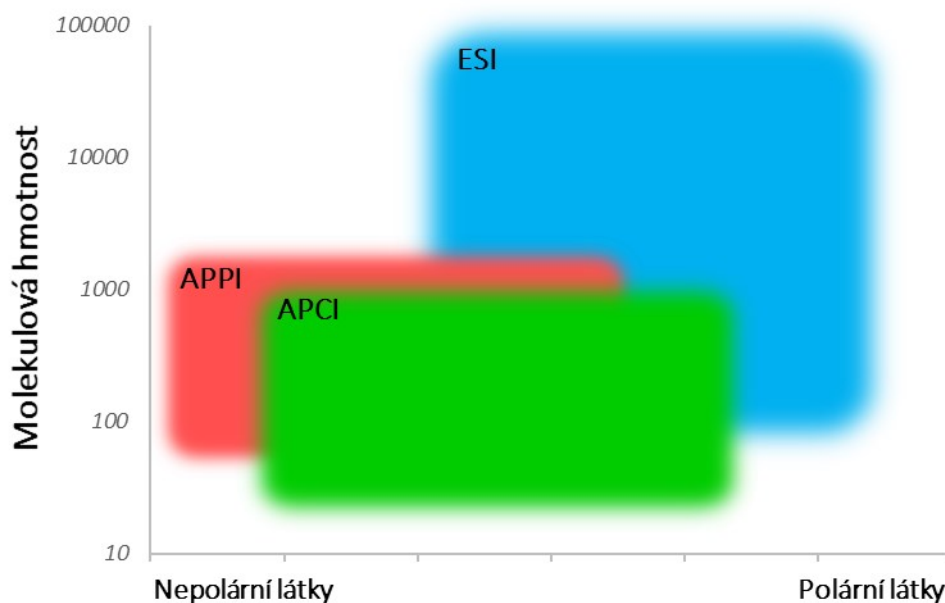
Pro dané účely byly optimalizovány podmínky pro LC-MS/MS analýzu, které zahrnovaly zejména optimalizaci parametrů iontového zdroje, výběr vhodných SRM přechodů a kolizních energií pro jednotlivé látky. Pro účely hodnocení matricových efektů byla vyvinutá metoda aplikována na lyofilizované sérum upravené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

3 Teoretická část

3.1. Ionizační techniky v LC-MS analýze

Chromatografická separace komplexních vzorků spolu s kvantitativním a kvalitativním stanovením sloučenin hmotnostní spektrometrií jsou jedny z nejvíce využívaných technik při analytickém stanovení, a to zejména organických sloučenin zastoupených ve směsích v minimálním, případně až stopovém množství. Teprve vývoj ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku, souhrnně označovaných jako API, jimiž jsou 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 po ionizaci. Ionizace probíhající v kapalně fázi a kompatibilita těchto technik s chromatografií na reverzní fázi, těkavými rozpouštědly a aditivami chromatografické separace, umožňuje zachovat všechny výhody LC systému. Slouží k analýze látek široké škály fyzikálně-chemických vlastností včetně polárních, tepelně labilních léčiv a metabolitů s vysokou molekulovou hmotností [2].

Použitá ionizační technika vyžaduje správné zvolení ionizačního módu na základě acidobazických schopností látek a molekulových hmotností (viz Obrázek 1). Ionizační technika na bázi elektrospreje je využívána při proměrování 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 ke stanovení látek středně polárních s molekulovou hmotností pod 1500 Da [3].



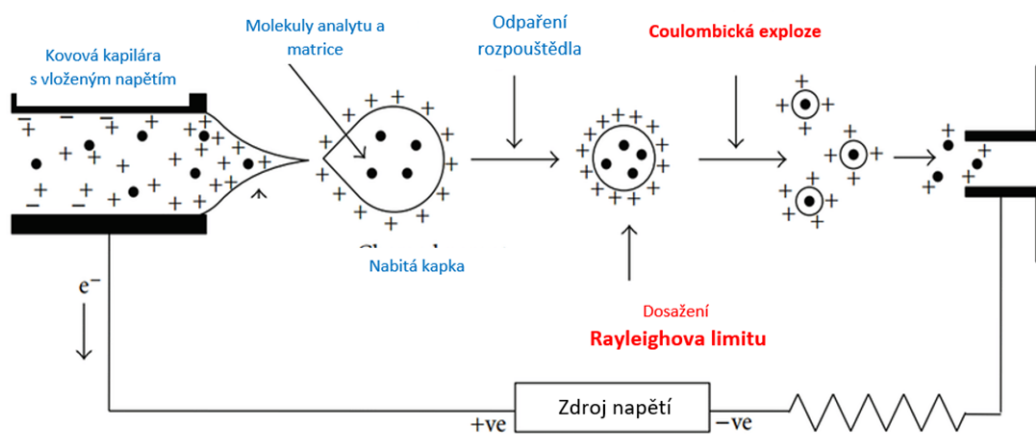
Obrázek 1: Vliv fyzikálně-chemických vlastností látek na výběr ionizační techniky (upraveno dle [3])

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 a ostatních makromolekulárních látek. 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 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 citlivou, robustní a spolehlivou metodu stanovení. Při přechodu iontů do plynné fáze využívá elektrickou energii [4].

Principem je tvorba mnohonásobně nabitých kapek, které se formují působením zmlžujícího plynu na eluent, vystupující z kovové kapiláry, na kterou je vloženo napětí. Následuje odpaření rozpouštědla za současného zvýšení povrchového napětí na povrchu kapky vlivem konstantního množství nábojů na jejím povrchu. S postupem času je dosaženo reyleighova limitu, kdy jsou odpudivé síly na povrchu kapky ještě v rovnováze s jejich povrchovým napětím. Při vzrůstajícím vlivu odpudivých sil ale 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].

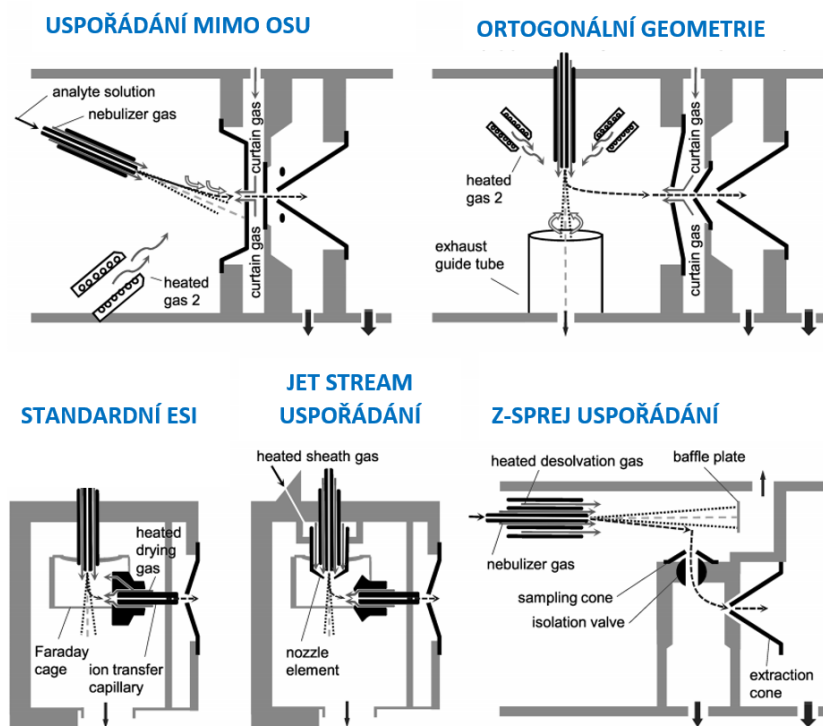


Obrázek 2: Princip ionizace elektrosprejem (upraveno dle [5])

Při vstupu iontů do analyzátoru dochází k nechtěnému jevu, kdy vlivem jejich ochlazení působením vakua vznikají soubory atomů, které nejsou vázány kovalentními vazbami, ale pouze slabšími interakcemi typu vodíkových můstků. Těmto shlukům atomů a molekul se říká klastry a je potřeba jim předcházet použitím sušícího plynu a termostatovanými prostory ionizačního zdroje [3].

Faktorů, které ovlivňují tvorbu iontů touto technikou, je mnoho. Patří mezi ně parametry kovové kapiláry (vložené napětí, tvar a průměr, nerovnosti na jejím povrchu), složení eluentu, povaha zmlžujícího plynu, charakter měřeného analytu i již zmíněná geometrie iontového zdroje. Složky komplexní matrice mohou ionizovat přednostně namísto analytu vlivem vytlačování analytu z povrchu kapky. Použitím vzorku o vysoké koncentraci na druhé straně hrozí ovlivnění lineární odezvy analytu, jelikož prostor na povrchu kapky je omezený [3].

Konstrukce elektrospreje může v některých případech ovlivnit míru matricových efektů. Příklady konstrukčních typů elektrospreje jsou znázorněny na Obrázku 3. Mezi standardním ESI uspořádáním a jet stream konstrukcí nejsou signifikantní rozdíly. S použitím ortogonálního uspořádání jsou získány nižší matricové efekty, než s použitím uspořádání mimo osu nebo Z-typu ionizačního zdroje. Pro nanosprej se například nejvíce uplatňuje sprejování pod úhlem 45° [6].

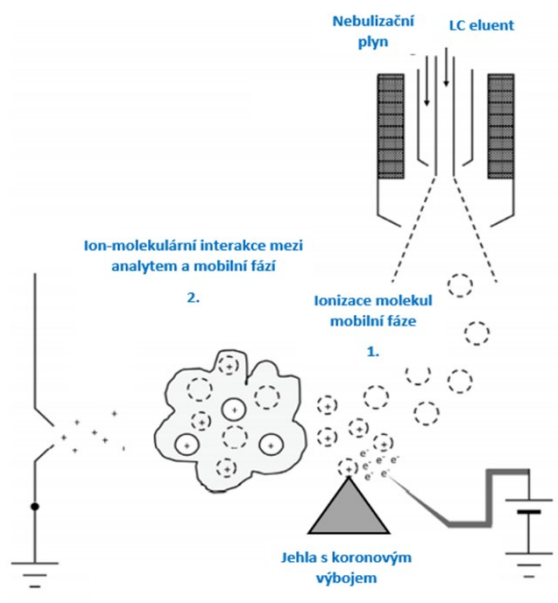


Obrázek 3: Konstrukční typy elektrospreje (upraveno dle [6])

3.1.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

APCI (Obrázek 4) se s oblibou využívá pro její kompatibilitu s vyššími průtoky. 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 [7]. I přes to není stupeň ionizace často dostatečný, a tak se APCI nejčastěji kombinuje s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu, který docílí kontrolované fragmentace pomocí kolizně aktivované disociace [8]. Technika je vhodná u většiny organických sloučenin různé polaritě, avšak ne u látek zcela nepolárních [3].

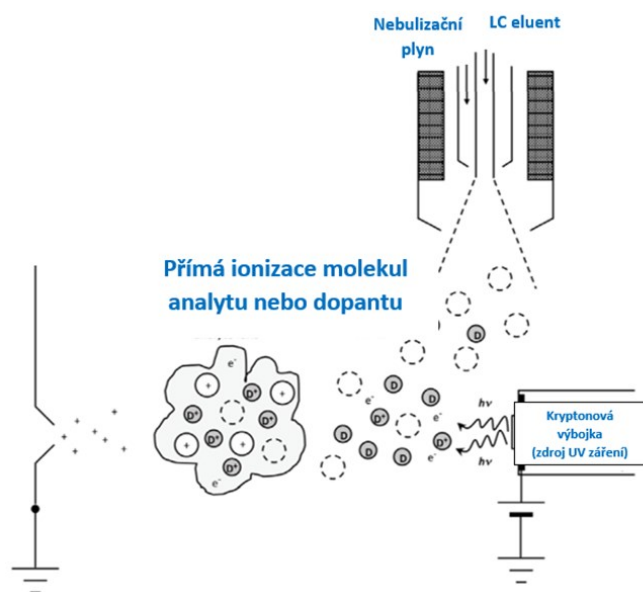
APCI rozhraní využívá kovovou kapiláru také, ale na jejím konci nedochází zmlžením ke vzniku nabitých kapek, jako je tomu u ESI. Napětí je v tomto případě vloženo na výbojovou jehlu, nikoli na kapiláru. Napětím generovaný koronový výboj poté ionizuje nejprve molekuly mobilní fáze, které prostřednictvím ion-molekulárních reakcí napomáhají ionizovat stanovovaný analyt [3]. 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 formovat záporně nabitě ionty záchytem elektronu. Možná je i výměna náboje [9].



Obrázek 4: Princip chemické ionizace za atmosférického tlaku (upraveno dle [10])

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]. Možnou obměnou je použití dopantu, nejčastěji v podobě toluenu, benzenu nebo acetonu. Proces ionizace v pozitivním módu je v tomto případě iniciován fotoionizací dopantu, ze kterého vzniká dopant radikál kation. V následujícím kroku může takto transformovaný dopant ionizovat molekuly rozpouštědla přenosem protonu, a to za předpokladu, že je protonová afinita molekul rozpouštědla 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 přímá ionizace analytu dopantem procesem výměny náboje, a to za předpokladu, že je ionizační energie analytu nižší než ionizační energie radikál kationtu [11].



Obrázek 5: Princip fotoionizace za atmosférického tlaku (upraveno dle [10])

3.2. Vznik matricových efektů

Důvodem stále většího využití LC-MS/MS v klinických laboratořích je její vysoká selektivita, citlivost a robustnost. Nepostradatelná se jeví zejména pro screening dědičných metabolických onemocnění, kde hlavními biochemickými markery jsou steroidy, mastné kyseliny, aminokyseliny, katecholaminy a thyroxin, nebo také pro terapeutické monitorování imunosupresiv a toxikologická stanovení. S čím je ale nutné při validaci, rutinním měření a vývoji metody počítat, jsou matricové efekty. Matricové efekty jsou efekty při analytickém měření způsobené látkami jinými než je stanovovaný analyt, které mají vliv na ionizaci stanovovaného analytu [12]. Mohou také zkomplikovat stanovení limitu detekce (LOD), limitu kvantifikace (LOQ), linearity, přesnosti a správnosti LC-MS/MS metody, a to převážně působením endogenních látek v biologických matricích [13]. Za nejčastější interference jsou zodpovědné soli, elektrolyty nebo polární sloučeniny pozdě eluované při isokratickém měření [14]. V neposlední řadě nechtěné interference zapříčiní i látky exogenní, jako jsou polymery obsažené v plastovém laboratorním nádobí, Li-heparin, jako běžně používaný antikoagulant přidávaný do zkumavek pro odběr krve, pufrů, soli nebo ion-párová činidla [13]. Způsobují rozdíl v odezvě analytu při jeho měření v biologické matrici a při měření v roztoku standardu, konkrétně se jedná o zesílení či potlačení ionizace. Tyto nepředvídatelné jevy, které často nejsou rozpoznatelné na chromatogramu, představují rozsáhlý problém pro API ionizační zdroje [15].

Přesný mechanismus vzniku matricových efektů zatím není zcela znám. Při užití ESI typu ionizace jsou na vině zejména pozměněné vlastnosti kapek vznikajících při ionizaci vlivem přítomnosti netěkavých nebo méně těkavých látek. Dochází ke změně v efektivitě tvorby kapek a k vypařování rozpouštědla. Narušen je pak celý proces tvorby nabitých iontů v plynné fázi, které putují do detektoru [15].

Většina dosud popsaných mechanismů vzniku ME je specifická pro danou ionizační techniku. Jedná-li se o ionizaci elektrosprejem, při měření vyšších koncentrací analytu může dojít k omezení množství nábojů na povrchu kapky, eventuálně až k saturaci analytem, kdy část iontů zůstane zachycena uvnitř kapky. K tomu se přidávají endogenní látky soupeřící s analytem o místo na povrchu kapky [15].

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 zase 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 substancí [15]. Různá aditiva nebo komponenty matrice se tedy mohou chovat jako ion párová činidla, jejichž přítomnost vede k tvorbě neutrálních komplexů nebo jinak formovaných iontů analytu [16].

Pokud srovnáváme odezvu standardu v biologické matrici s odezvou standardu v samotné mobilní fázi, hovoříme o tzv. absolutních matricových efektech. Mnohem zásadnější je 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 rapidně lišit [17].

Přestože detailní mechanismy vzniku tohoto fenoménu nejsou dosud známy, jsou popsány okolnosti, které jejich vznik podporují nebo potlačují. Jak uvádí doporučené postupy FDA, hodnocení matricových efektů je potřeba začlenit do validace dané metody. Z toho důvodu je pro analytika stěžejní stanovit si hlavní faktory, které mohou interference vyvolat [18].

3.2.1. Typ ionizační techniky

Chemická ionizace za atmosférického tlaku je obecně méně náchylná k matricovým efektům než ionizace elektrosprejem. Při APCI se LC eluent konvertuje do podoby molekulárního plynu a až následně dochází pomocí ion-molekulárních interakcí analytu s ionizovanou mobilní fází ke vzniku stabilních produktových iontů a k ionizaci analytu. Právě výše popsané interakce činí APCI méně náchylnou k matricovým efektům než ESI [19].

3.2.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti látek

Sloučeniny s větší predispozicí k matricovým efektům jsou většinou sloučeniny s vyšší relativní molekulovou hmotností, polaritou a bazicitou [20].

Méně těkavé látky ovlivňují efektivitu tvorby kapek při ionizaci a redukují tak schopnost nabitých kapek konvertovat na ionty v plynné fázi. Interferující látky mající vysokou viskozitu mohou zase zvýšit povrchové napětí nabitých kapek a omezit tak vypařování rozpouštědla, a tím ovlivnit výsledky ionizace [20].

3.2.3. Typ matrice

Přítomnost matricových efektů je závislá na typu analyzované biologické matrice. Nejčastěji analyzovaným typem biologického materiálu v klinických laboratořích je plasma, moč nebo sérum [21].

Plazma i sérum jsou tvořeny velmi širokou škálou polárních a nepolárních látek, jako jsou soli, uhlovodíky, aminokyseliny, organické kyseliny, lipidy atd. Plazma na rozdíl od séra je charakteristická vysokým obsahem proteinů, které mohou vést ke srážení v LC systému, a proto není vhodné používat přímý nástřík vzorku či pouhé ředění vzorku jako jeho úpravu [21]. V případě takto komplexních matric mohou být některé sloučeniny jako lipidy, proteiny, cukry a soli ve vzorku přítomny i po relativně selektivní úpravě vzorků před LC-MS/MS analýzou, jako je například extrakce na tuhou fázi [22].

Největší zdroj matricových efektů představují fosfolipidy. Většina z nich ionizuje v pozitivním módu díky přítomnosti kvarterního dusíku. Okolo 70 % plasmatických fosfolipidů jsou glycerofosfocholiny, které byly identifikovány jako výrazný zdroj matricových efektů v LC-MS/MS analýze. Jedním ze způsobů jak můžeme monitorovat tento potenciální zdroj matricových efektů je přidání 184 > 184 SRM přechodu při vytváření MS metody. Glycerofosfocholiny mají totiž 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 těchto důvodů fosfolipidy mohou způsobit matricové efekty nejen z důvodu koeluce 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 nástřiky [23].

Další významnou složkou plazmy jsou estery cholesterolu a volný cholesterol, které zaujímají 15 - 40 % z celkového lipidového spektra plazmy. K jejich monitorování se využívá charakteristický fragment m/z 369 $[M+H-H_2O]^+$. V neposlední řadě jsou zastoupeny triacylglyceroly, které tvoří přibližně 10 – 15 % celkového množství lipidů v plazmě. Při MS analýze tvoří amoniové adukty $[M+NH_4]^+$. [24].

Moč obsahuje jako hlavní interferující složky hydrofilní reziduální sloučeniny, většinou anorganické soli. Proteiny a fosfolipidy jsou v moči, na rozdíl od plasm, obsaženy pouze v nízkých koncentracích (0,5 – 1 g/l). Moč je nicméně také komplexní, na látky bohatou maticí, kde můžeme nalézt zejména elektrolyty, anorganické soli, organické baze a spoustu dalších sloučenin jako je urea nebo kreatinin. Jak lze očekávat při použití moči jako biologické matrice, vyšší matricové efekty jsou pozorovány při HILIC chromatografii. Velké rozdíly v matricových efektech mezi HILIC a RPLC chromatografií jsou důsledkem vyšší retence solí a polárních sloučenin zahrnujících ureu, kreatinin, glukuronové kyseliny, fenoly, kyselinu močovou, hypupurovou a urobilin na HILIC chromatografii. Tyto sloučeniny jsou méně zachytávány v RPLC módu. [22].

Jedna ze studií matricových efektů v této biologické matici popisuje chování matricových efektů 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 [25].

S větším množstvím interferujících látek v porovnání s močí musíme počítat u orálních tekutin. Dané látky mají jak hydrofilní, tak hydrofobní charakter. Spektrum látek je podobné jako u již zmíněné plazmy, nicméně v nižších koncentracích [21].

3.2.4. Další faktory vzniku ME

Zesílení či zeslabení ionizace může být ovlivněno jakoukoli koelující komponentou vstupující do iontového zdroje. Případů o vlivu složení mobilní fáze na účinnost ionizace je celá řada. Méně probíraným fenoménem je efekt aditiv mobilní fáze na snížení či zvýšení ionizace analytu. Přidání kyseliny do mobilní fáze drasticky ovlivní účinnost ionizace [26]. Z běžně používaných aditiv způsobuje signifikantní snížení signálu například kyselina trifluoroctová. Ne všechny látky jsou ale přidavkem kyselin ovlivněny. Mezi ně patří například parabeny [27].

Rozdílný trend byl pozorován u pufrů v mobilní fázi. Se stoupající koncentrací pufrů, jako je mravenčan amonný a hydroxid amonný, roste i jejich supresivní efekt na ionizaci analytů. U pufrů tedy také záleží na typu a koncentraci. Při koncentracích kolem 1 mM je pozorováno u řady analytů nepatrné zvýšení ionizace. Se vzrůstající koncentrací ale mají pufrů mobilní fáze opačný efekt – silně supresivní. Je to dáno logicky větším množstvím iontů ve spreji. Jak již bylo zmíněno, redukuje tak přístup cílového analytu na povrch kapky a tvorbu iontů. [27].

Další důležitou roli hraje koncentrace analytu. Z hlediska snížení ionizace je nežádoucí vysoká koncentrace analytu v matrici, ale i jeho stopové množství [28].

3.3. Eliminace matricových efektů

Z výše zmíněných vlivů na vznik matricových efektů je patrné, že náchylnost k nepřesnostem se skrývají prakticky v každém kroku analýzy. Pokud chceme dosáhnout co nejpřesnějších a nejspolehlivějších dat, musí být provedena určitá opatření k eliminaci nebo alespoň redukci matricových efektů. Nejjednodušším způsobem je prostý nástřik menšího množství vzorku nebo jeho zředění. Další metody zahrnují optimalizaci přípravy vzorku k odstranění interferujících sloučenin, 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 většinou nestačí k jejich úplné eliminaci. Většina nejběžněji praktikovaných technik úpravy vzorku selhává při odstranění nečistot, které jsou podobné analytu, což vyústí v jejich koeluci s analytem. Úprava podmínek chromatografie je zase časově náročná a stejně nezabrání některým aditivům v mobilní fázi snižovat signál cílového analytu [29].

3.3.1. Úprava vzorku

Úprava vzorku představuje důležitý předstupeň vlastního měření, jehož cílem je selektivní izolace analytu z matrice a zajištění co nejnižšího procenta matrice v analyzovaném vzorku [30]. Dochází k eliminaci látek, které vykazují odlišnou polaritu než analyt. Analyt právě s látkami, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, koeluje [31]. Čím menší množství matrice se do iontového zdroje dostane, tím více se minimalizuje její vliv na výsledky. Toho je docíleno prostým nástřikem vzorku bez předchozí úpravy nebo zředěním. Vše se ale praktikuje na úkor citlivosti metody [32]. Konvenční techniky, často používané v praxi, zahrnují metodu extrakce z kapaliny do kapaliny, metodu extrakce na tuhou fázi a proteinovou precipitaci. V posledních letech je snaha zvýšit selektivitu a citlivost těchto metod [30].

Jednou z nejvíce používaných a nejméně náročných technik úpravy vzorku je metoda proteinové precipitace (PP). Vyznačuje se ale nízkou selektivitou i čistotou vzorku a je zde velká pravděpodobnost snížení nebo zvýšení ionizace při použití elektrospreje jako iontového zdroje. Principem je denaturace proteinů přítomných v matrici. K denaturaci dochází působením extrémních externích podmínek, jako je prostředí silné baze nebo kyseliny, zvýšená teplota nebo působení organického rozpouštědla, jako je acetonitril nebo metanol. V procesu denaturace dochází ke změně v terciární a sekundární struktuře proteinu, což postupně oslabuje jeho vazbu s analytem [30].

Další z technik je metoda extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE). Tato technika využívá principu dvou nemísitelných kapalin pro extrakci analytu. Mezi její nevýhody patří nízká, variabilní výtěžnost, větší spotřeba vzorku, nízká selektivita a s tím související vyšší riziko matricových efektů [30].

Metoda extrakce na tuhé fázi (SPE) je založena na interakci mezi funkčními skupinami analytu a stacionární fází. Ve srovnání s předchozími zlepšuje výtěžnost extrakce a redukuje nutnost použití interferujících rozpouštědel [33]. Ačkoli je metoda ve spojení s hmotnostní spektrometrií s oblibou využívána, i zde dochází k ovlivnění ionizace. Je známo, že chemické nečistoty v SPE systému jako jsou polyetylen glykoly a ftaláty, mohou být extrahovány společně s organickými rozpouštědly v posledních fázích extrakce. Pro efektivnější eluci zadržovaných analytů se často výrobci doporučuje použití směsi organických rozpouštědel s upravenou hodnotou pH. Takovéto podmínky ještě

více napomáhají rozpouštění výše zmíněných nečistot, které způsobují matricové efekty [30].

Se snahou předejít nechtěným interferencím jsou tyto techniky zdokonalovány. Jeden z nových přístupů modifikace těchto metod představuje hybridní spojení PP-SPE. Začíná se přidáním okyseleného acetonitrilu do plasmu nebo séra, kde dojde k proteinové precipitaci. Následně dochází k centrifugaci a vzniklý supernatant je dávkován na SPE kolonu, která 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 pokročilé techniky úpravy vzorku [30].

3.3.2. 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 v proměňování iontových sloučenin. U těchto sloučenin ovlivňuje pH mobilní fáze retenci, selektivitu i citlivost separace. Studie vědecké skupiny Chambers a spol. [34] se zabývala vlivem pH mobilní fáze na matricové efekty při nízkém (2,7) a vyšším (9) pH. Výsledky jasně ukazují, že retenční časy nejvíce hydrofilních fosfolipidů jsou nezávislé na pH, zatímco více hydrofobní di-alkyl fosfolipidy vyžadují k vymytí z kolony delší proud organické fáze při vyšším pH. Navíc bylo zjištěno, že vyšší pH mobilní fáze vedlo k lepší ESI+ citlivosti pro mnoho bazických sloučenin. Stejná studie také potvrdila zlepšení separace, tedy i menší náchylnost k matricovým efektům, při kombinaci více typů stacionárních fází s různou selektivitou. Pokud bychom ještě více chtěli zvýšit rychlost, rozlišení a citlivost metody, je na místě použití ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie (UHPLC), která profituje z menšího poloměru částic v koloně (1,7 μm) a vyšších tlaků [15].

Využít se dají i ostatní typy chromatografické separace. Jedna studie srovnává například 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 plasmu, 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 [35].

Redukce matricových efektů souvisí také s volbou stacionární fáze. Každý analyt je unikátní svými vlastnostmi a na výběr stacionární fáze musí být nahlíženo individuálně. Obecně platí, že nejvíce efektivní je použití stacionární fáze s různými mechanismy retence, například kombinace 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. Pro tyto polární sloučeniny bude tedy výhodnější zvážit kolony na iontově výměnném principu nebo HILIC chromatografii, namísto klasických kolon na reverzní fázi. V případě plasmy, obsahující převážně nepolární sloučeniny, je důležité zvolit kolonu, která je schopná odlišné retence pro tyto sloučeniny a pro cílový analyt. Pro záchyt analytu může být výhodné použití kolony s fenylovými nebo pentafluorfenylpropylovými skupinami, jelikož fosfolipidy aromatickou skupinou většinou nedisponují [36].

Co se průtokové rychlosti týká, začlenění nižších průtokových rychlostí je výhodou. Zlepšuje se tím účinnost ionizace a zároveň se méně kontaminantů dostává do iontového zdroje [36].

3.3.3. Podmínky hmotnostní spektrometrie

Jak bylo zmíněno výše, APCI je méně náchylná k matricovým efektům, avšak ani s použitím této techniky se nelze matricovým efektům zcela vyhnout. Záleží také na designu výrobce. Při kontaminaci vzorku se vyplatí využít miniaturizované formy ESI, jako například kapilární nebo nano-LC-MS/MS. Důvodem je nižší průtoková rychlost, která redukuje velikost nabitých kapiček, což má za následek menší povrchové napětí na jejich povrchu. Na uvolnění iontu do plynné fáze je tedy potřeba menší množství rozpouštědla, které nese nižší riziko interferencí. Z hlediska polarity ionizace je negativní mód považován za více specifický, a tedy méně náchylný ke snížení ionizace. Pravidlo ale nelze obecně uplatnit pro všechny typy analytů [15].

Technika echo-píku simuluje použití vnitřního standardu. Uplatňuje dva nástřiky vzorku a jeho standardů v krátké sekvenci za sebou. Při eluci těsně za sebou by měly být ovlivněny matricovými efekty na stejné úrovni [16].

Dalším parametrem, který může analýzu ovlivnit je geometrie iontového zdroje. Lineární uspořádání je více náchylné k matricovým efektům, nežli Z-sprej geometrie [16].

3.3.4. Metody kalibrace

Další z možností eliminace matricových efektů je využití kalibračních technik. Použit se dá metoda vnějšího standardu nebo metoda vnitřního standardu, který se přidává přímo do vzorku, kde je stanovován cílový analyt, což značně zkracuje čas analýzy. Použití standardů navíc eliminuje vliv rozměrů kolony, fluktuace průtoku a teploty na měření [37].

Nejlepší možnou techniku kalibrace 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. Rozsah potlačení signálu je u každého vzorku rozdílný a liší se v závislosti na povaze matrice. Nicméně přidání SIL- IS jako vnitřního standardu ke každému vzorku může tyto efekty kompenzovat. Přidáním SIL jako vnitřního standardu nekompenzujeme pouze matricové efekty, nýbrž i variability při úpravě vzorku, separaci a při měření hmotnostní spektrometrií [37].

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 [38]. Při výběru SIL-IS se preferují izotopy ^{13}C a ^{15}N před deuteriem. Je to dáno nižší lipofilitou deuteria, která může za dřívější eluci na koloně s reverzní fází. Obecně platí, že SIL-IS by měl s analytem kompletně koeluovat, což je potřeba na chromatogramech každého vzorku ověřit. Menší odchylky v elučních časech mohou být eliminovány změnou gradientu. Problém představují měření většího množství analytů, při kterém by měl být každému analytu přiřazen jeho vlastní SIL-IS, což je často finančně velmi náročné a občas i komerčně nedostupné [37]. Dále je důležité, aby byl rozdíl hmot mezi analytem a SIL-IS minimálně o 3 hmotnostní jednotky. Tento typ vnitřního standardu je považován za ideální, vykazuje-li identické chování jako analyt při úpravě vzorku, na chromatogramu a při ionizaci [15].

3.4. Hodnocení matricových efektů

Matricové efekty lze hodnotit třemi základními přístupy: metodou post-kolonové infuze, metodou porovnání směrnice kalibračních křivek a metodou post-extrakčního přídávku. Nicméně pouze poslední dvě zmíněné metody je možné použít ke kvantitativnímu vyjádření ME.

3.4.1. 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 úprav vzorku na matricové efekty, vhodnou analytickou kolonu, kde se matricové efekty vyskytují a kde je během chromatografické separace naopak nenajdeme, a vliv aditiv mobilní fáze na odezvu analytu [1]. Metoda poskytuje pouze kvalitativní vyhodnocení matricových efektů s identifikací retenčních časových zón na chromatogramu, kde je nejpravděpodobnější šance výskytu fenoménu potlačení či zesílení ionizace. Vyhodnocení je prováděno monitorováním odezvy konstantně proudícího analytu do extraktu vzorku z chromatografického systému. Pumpa zajišťující infuzi přivádí konstantní proud analytu do mobilní fáze přímo za výstupem eluentu z chromatografické kolony a před vstupem do iontového zdroje. Všechny endogenní komponenty matrice, které vystupují z kolony a způsobují matricové efekty, jsou zaznamenány jako potlačení či zesílení ionizace přidaného analytu ve specifických místech na chromatogramu. Pokud má být stanovováno více analytů v jedné metodě, je potřeba je nastříkovat odděleně [39].

3.4.2. Metoda porovnání směrnice kalibračních křivek

Zde je ke kvantitativnímu určení matricových efektů nutné porovnání směrnice kalibračních křivek sestavených pro standard v rozpouštěcí směsi a pro standard v matrici (Obrázek 6). Pokud jsou matricové efekty nepřítomné, 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. Aby se předešlo matricovým efektům v případech, kdy musí být analyzovány různé vzorky podobné matrice, někteří autoři navrhuji proměřit kalibrační křivky

standardní matrice, která bude podobná matici ve vzorku, ale bez cílových analytů. Získat takový typ matrice může být někdy problém [40].



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

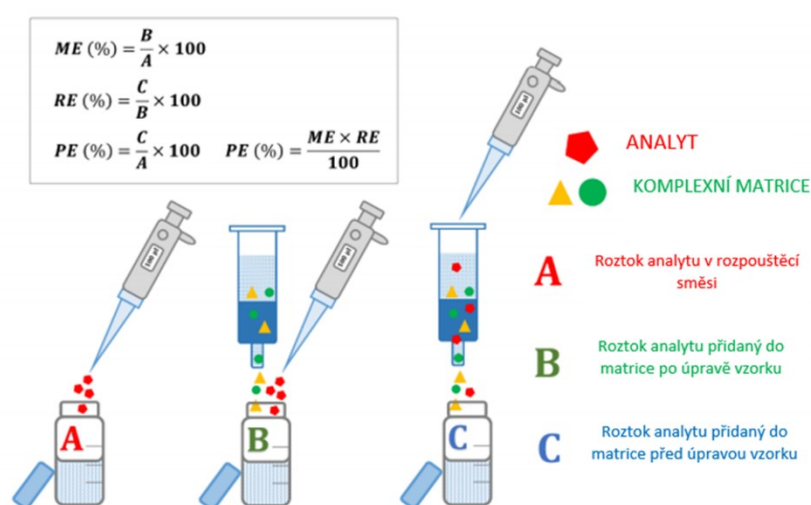
3.4.3. Metoda post-extrakčního přídavku

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. Velikost 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 plasmě se shodovali a žádné absolutní matricové efekty nejsou pozorovány.

Vyhodnocení absolutních matricových efektů se vyznačuje nižší relevancí, tudíž by měla být větší pozornost věnována relativním matricovým efektům. Zjištění přítomnosti relativních matricových efektů může být dosaženo srovnáním relativních směrodatných odchylek (% RSD) v opakujících se nástřicích ($n = 5$) standardů a vzorků, které pochází z různých skupin matrice [39]. Detailněji pak přímým srovnáním MS/MS odezvy (ploch píků) analytu přidaného do produktů extrakce pocházejících z různých zdrojů biologických matric. Veškeré variability, vyjádřené jako CV (%), mohou být považovány za relativní matricové efekty cílového analytu. Důležité je také rozlišovat použití různých druhů ionizace [17].



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

3.4.4. Směrnice pro určení matricových efektů

K ověření spolehlivosti metody je nutné provést validaci metody. Směrnice pojednávající o validaci analytických metod vydaly dvě agentury – Evropská léková agentura (EMA) a Ústav pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Směrnice obou institucí se shodují v tom, že stanovení matricových efektů by mělo být součástí validace každé LC-MS metody, nicméně velmi výrazně se liší ve způsobu jejich stanovení. Zatímco FDA umožňuje stanovení ME pomocí směrníc kalibračních křivek a nikterak přesněji nspecifikuje způsob naměření těchto dat a ani způsob jejich vyhodnocení [18], EMA je podstatně specifitější a doporučuje stanovit ME vždy a při použití 6 blankových matric od různých dárců. Zároveň tato směrnice také doporučuje způsob hodnocení ME pomocí post-extrakční metody na 2 koncentračních hladinách a stanovuje limity $\leq 15\%$, případně $\leq 20\%$ pro LLOQ [41].

4 Experimentální část

4.1. Použité přístroje a pomůcky

- Acquity Ultra Performance LC, WATERS, Česká republika
 - ACQ-binary solvent manager – čerpadlo
 - ACQ-sample manager – autosampler
 - ACQ-column manager – kolonový termostat
 - ACQ-TUV Detector – UV detektor
- Hmotnostní spektrometr – Quattro microTM API, WATERS, Česká republika
- Kolona Acquity UPLC® BEH C18 (100 mm x 2,1; 1,7 μm), WATERS, Irsko
- Analytické váhy - Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- Automatické pipety – Eppendorf Reference® 2, EPPENDORF, Česká republika
- Minitřepačka – Ika VORTEX Lab dancer, IKA, Německo
- Ultrazvuková vodní lázeň – Sonorex Digitec, BANDELIN electronic, Německo
- Centrifuga – Hettich MIKRO 200 / 200 R, HETTICH, Německo

4.2. Použité chemikálie

- Ultračistá voda, vyrobená na Farmaceutické fakultě v HK pomocí Milli-Q, MERCK MILIPORE, Německo
- Acetonitril ≥ 99.9%, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS, VWR CHEMICALS, USA
- Methanol ≥ 99.9%, HiPerSolv CHROMANORM®, ULTRA for LC-MS, VWR CHEMICALS, USA
- Kyselina mravenčí, Eluent additive for LC-MS, 98%, HONEYWELL FLUKA, Německo

4.3. Použité standardy

- Acebutolol hydrochlorid >98.0% (Medchemexpress, USA)
- atenolol ≥ 98.0% (Sigma aldrich, Německo)
- atomoxetin 99,9% (zásoby katedry analytické chemie)
- atorvastatin, trihydrát vápenatá sůl ≥ 98.0% (Sigma aldrich, Německo)
- daclatasvir 99.3% (Medchemexpress, USA)
- dexametazon 98% (Sigma aldrich, Německo)
- β-estradiol 97% (Sigma aldrich, Německo)

- estron minimum 99% (Sigma aldrich, Německo)
- hydrokortizon $\geq 98\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- (s)-(+)-ibuprofen 99% (Sigma aldrich, Německo)
- indometacin 98% (Thermo fisher scientific, USA)
- kofein bezvodý 99% (Sigma aldrich, Německo)
- maraviroc (Toronto research chemicals, Kanada)
- paracetamol 99.0% (Sigma aldrich, Německo)
- perfloxacin-mesylát dihydrát $\geq 97\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- pitavastatin calcium (Toronto research chemicals, Kanada)
- pravastatin lakton 98% (Toronto research chemicals, Kanada)
- ritonavir 99.68% (Medchemexpress, USA)
- rutin hydrát $\geq 94.0\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- salicylová kyselina $\geq 99.0\%$ (Fluka, Francie)
- simeprevir 99.34% (Sigma aldrich, Německo)
- sofosbuvir 99.95% (Medchemexpress, USA)
- tamsulosin hydrochlorid $\geq 98\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- telmisartan $\geq 98\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- tetracyklin hydrochlorid $\geq 95\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- tryptofan $\geq 98\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- uracil $\geq 99.0\%$ (Sigma aldrich, Německo)
- vardenafil hydrochlorid trihydrát $\geq 98\%$ (Sigma aldrich, Německo)

4.4. Použitý vzorek

- Lyofilizované serum LYO HUM N (Erba Lachema s.r.o., Česká republika)

4.5. Příprava zásobních roztoků standardů

Z navážky standardních látek byly připraveny zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle (viz Tabulka 1). Rozpouštědlo bylo vybráno na základě hodnot rozdělovacích koeficientů látek. K rozpuštění určitých standardů bylo zapotřebí většího množství rozpouštědla. Zásobními roztoky standardů, které byly připraveny v nižší koncentraci, byly uracil, tamsulosin, pravastatin, atorvastatin, rutin a daclatasvir, viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Seznam použitých sloučenin, jejich zkratky a rozpouštědla k přípravě zásobních roztoků.

Sloučenina	Zkratka	Rozpouštědlo	Koncentrace roztoku [mg/ml]
Uracil	URA	H ₂ O	0,5
Salicylová kyselina	SAL	50% ACN	1
Paracetamol	PAR	50% ACN	1
Kofein	KOF	H ₂ O	1
Tryptofan	TRY	50% ACN	1
Ibuprofen	IBU	ACN	1
Atomoxetin	ATO	ACN	1
Atenolol	ATE	50% ACN	1
Estradiol	EST	ACN	1
Perfloxacin	PER	50% ACN	1
Acebutolol	ACE	50% ACN	1
Indometacin	IND	ACN	1
Hydrokortizon	HYD	50% ACN	1
Dexametazon	DEX	50% ACN	1
Tamsulosin	TAM	50% ACN	0,5
Tetracyklin	TTC	50% ACN	1
Pravastatin	PRA	50% ACN	0,5
Pitavastatin	PIT	50% ACN	1
Vardenafil	VAR	ACN	1
Telmisartan	TEL	ACN	1
Atorvastatin	ATOR	50% ACN	0,5
Rutin	RUT	H ₂ O	0,5
Maraviroc	MAR	ACN	1
Sofosbuvir	SOF	ACN	1
Ritonavir	RIT	ACN	1
Daclatasvir	DAC	50% ACN	0,5
Simeprevir	SIM	ACN	1
Tocotrienol	TOC	ACN	1
Estron	ESTR	ACN	1

4.6. Příprava pracovních roztoků

Z jednotlivých zásobních roztoků byly připraveny celkem tři směšné roztoky (mix 1, 2, 3), které byly naředěny na požadovanou koncentraci 5×10^{-5} g/ml pomocí 5% ACN. Z takto naředěných směsí o koncentraci 5×10^{-5} g/ml bylo odebráno 0,2 ml, ke kterým bylo následně přidáno 0,8 ml 5% ACN. Výsledná koncentrace činila 1×10^{-5} g/ml. Pro další ředění bylo odebráno 0,1 ml z každé směsi o koncentraci 1×10^{-5} g/ml a přidáno 0,9 ml 5% ACN, kdy výsledná koncentrace činila 1×10^{-6} g/ml. Ze standardů byly takto připraveny roztoky standardů o koncentracích vhodných k měření na hmotnostním spektrometru. Pracovní roztoky byly skladovány při teplotě 4 °C.

4.7. Příprava roztoku lyofilizovaného séra

Lyofilizované sérum bylo dle pokynů výrobce skladováno na tmavém místě při teplotě – 20°C. Po opatrném otevření, aby nedošlo k nechtěné ztrátě lyofilizátu bylo do lahvičky odměřeno přesně 5,00 ml ultračisté vody. Lahvička byla uzavřena a krouživým pohybem patřičně promíchána. Byla ponechána po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Nechtěnému vzniku pěny bylo zabráněno promícháním v průběhu čekání.

4.8. Postup úpravy vzorku

Ke 200 µl čistého séra bylo přidáno 400 µl ACN. Takto vzniklá směs byla po 10 min centrifugována při 20°C rychlostí 14000 otáček/min v délce 10 min. Následně bylo odebráno 480 µl supernatantu. Poté byly smíchány oba supernatanty vždy od každé koncentrační hladiny a zfiltrány přes stříkačkový filtr z polytetrafluorethylenu o velikosti pórů membrány 0,22 µl.

4.9. Příprava roztoků pro hodnocení matricových efektů

Metodou úpravy vzorku byla zvolena proteinová precipitace pomocí ACN. Poměr precipitačního činidla a rekonstituovaného lyofilizovaného séra byl 2:1. Bylo tedy nutné zjistit celkový poměr jednotlivých rozpouštědel (H₂O a ACN) v zásobních roztocích standardních látek, aby tento poměr byl dodržen nejen v průběhu precipitace, ale i v pracovních roztocích použitých na ředění jednotlivých kalibračních roztoků. Tímto krokem bylo zabráněno nechtěnému ovlivnění odezvy rozdílným složením rozpouštědel. Složení rozpouštědel v jednotlivých zásobních roztocích rozdělených do mixů znázorňuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Množství jednotlivých rozpouštědel v zásobních roztocích standardů

MIX 1	H ₂ O [µl]	ACN [µl]	MIX 2	H ₂ O [µl]	ACN [µl]	MIX 3	H ₂ O [µl]	ACN [µl]
Uracil	100	0	Atenolol	25	25	Tryptofan	25	25
Paracetamol	25	25	Kofein	50	0	Perfloxacin	25	25
Acebutolol	25	25	Tetracyklin	25	25	Rutin	100	0
Maraviroc	0	50	Daclatasvir	50	50	Vardenafil	0	50
Salicylová kyselina	25	25	Tamsulosin	50	50	Hydrokortizon	25	25
Pravastatin	50	50	Atomoxetin	0	50	Pitavastatin	25	25
Sofosbuvir	0	50	Telmisartan	0	50	Dexametazon	25	25
Ritonavir	0	50	Indometaci	0	50	Atorvastatin	50	50
Ibuprofen	0	50				Simeprevir	0	50
Estron	0	50						
celkerm	225	375	celkem	200	300	celkem	275	275

K 490 μl filtrátu (nebo rozpouštědla – $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, 33/66) bylo pipetováno 10 μl z jednotlivých směsných roztoků o koncentraci x_3 . Konkrétní hodnoty neznámé x_3 jsou uvedené v Tabulce 3. Tímto byly připraveny roztoky obohaceného lyofilizovaného séra o koncentracích uvedených (viz Tabulka 3). Tímto způsobem vznikly dvě řady kalibračních roztoků, standardní a matricové, obohacené po úpravě vzorků. Tyto roztoky byly změřeny a použity k vyhodnocování matricových efektů.

Tabulka 3: Číselné hodnoty neznámé x_3

Koncentrace [g/ml]	x_3 [μl]
1×10^{-6}	5×10^{-5}
5×10^{-7}	5×10^{-5}
1×10^{-7}	1×10^{-5}
5×10^{-8}	5×10^{-6}
1×10^{-8}	1×10^{-6}
5×10^{-9}	5×10^{-7}
2×10^{-9}	2×10^{-7}
1×10^{-9}	1×10^{-7}

4.10. UHPLC-MS/MS metoda

Optimalizované hodnoty napětí na vstupním kuželu a hodnoty kolizní energie pro jednotlivé standardy spolu s vybranými produktovými a prekurzorovými ionty jsou včetně retenčních časů jednotlivých látek uvedeny v Tabulce 4 a 5.

Finální nastavení UHPLC metody po optimalizaci jednotlivých parametrů

Látky byly měřeny na analytické koloně, která byla tvořena předkolonou + vlastní kolonou Acquity BEH C 18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm). Gradientová eluce mobilní fáze sestávala ze směsi rozpouštědla A (0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí) a rozpouštědla B (ACN). Počáteční složení mobilní fáze bylo tvořeno 95% A. Mezi 0 a 8,50 min se podíl A snížil z 95% na 2% a přetrval až do 10. minuty. Následoval návrat k počátečnímu složení mobilní fáze mezi 10,00 a 10,10 min a ten přetrval až do konce analýzy, tedy 12. minuty. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min.

Finální nastavení MS metody po optimalizaci jednotlivých parametrů

Byla využita ionizace elektrosprejem v pozitivním i negativním módu. Při využití ionizace v pozitivním módu bylo nastavení parametrů následující: napětí na kapiláře 0,75 kV, napětí na extraktoru 3 V, napětí na hexapolu 0,5 V, teplota iontového zdroje 130°C, desolvační teplota 450°C, průtok plynu při desolvaci 800 l/hod a průtok plynu na

vstupním kuželu 120 l/hod. Při ionizaci v módu negativním bylo napětí na kapiláře 2,5 kV, napětí na extraktoru 5 V, napětí na hexapolu bylo 1 V, teplota v iontovém zdroji byla 130°C, desolvatační teplota byla 450°C, průtok plynu při desolvataci byl 1000 l/hod a průtok plynu na vstupním kuželu byl 120 l/hod.

Tabulka 4: Přehled optimalizovaných hodnot napětí na vstupním kuželu a kolizní energie spolu s prekurzorovými a produktovými ionty a jejich retenčními časy pro každou z látek v pozitivním módu

MIX 1	Rt	Retenční okno [min]	Prekurzor m/z	Produktový ion m/z	Napětí na vstupním kuželu [V]	Kolizní energie [V]
Uracil	0,99	0,79 > 1,19	112,58	69,94	25	15
Paracetamol	1,72	1,52 > 1,92	151,70	110,14	10	15
Acebutolol	2,17	1,98 > 2,38	336,79	116,20	30	15
Maraviroc	2,63	2,43 > 2,83	513,97	389,53	30	20
Salicylová kys.	neionizuje v pozitivu					
Pravastatin	koeluuje s pitavastatinem					
Sofosbuvir	3,23	3,03 > 3,43	529,80	243,43	25	20
Ritonavir	4,51	4,31 > 4,71	721,03	296,44	30	20
Ibuprofen	neionizuje v pozitivu					
Estron	4,053	3,70 > 4,25	271,09	133,07	25	20
MIX 2	Rt	Retenční okno [min]	Prekurzor m/z	Produktový ion m/z	Napětí na vstupním kuželu [V]	Kolizní energie [V]
Atenolol	1,54	1,34 > 1,74	266,76	190,29	35	20
Kofein	1,90	1,70 > 2,10	194,75	138,21	35	20
Tetracyklin	2,17	1,97 > 2,37	444,75	154,22	20	30
Daclatasvir	2,38	2,18 > 2,58	739,13	582,70	50	35
Tamsulosin	2,63	2,43 > 2,83	408,51	228,41	30	25
Atomoxetin	3,09	2,89 > 3,29	255,78	117,02	15	40
Telmisartan	3,25	3,05 > 3,45	514,94	497,60	45	35
Indometacin	4,55	4,35 > 4,75	357,70	138,89	25	15
MIX 3	Rt	Retenční okno [min]	Prekurzor m/z	Produktový ion m/z	Napětí na vstupním kuželu [V]	Kolizní energie [V]
Tryptofan	1,77	1,57 > 1,97	204,77	188,32	15	10
Perfloxacin	2,01	1,81 > 2,21	333,71	290,48	30	15
Rutin	neionizuje v pozitivu					
Vardenafil	2,50	2,30 > 2,70	488,85	151,39	45	50
Hydrokortizon	2,94	2,74 > 3,14	362,80	309,36	30	15
Pitavastatin	3,05	2,85 > 3,25	421,74	290,27	40	25
Dexametazon	3,27	3,07 > 3,47	392,79	373,18	15	10
Atorvasatatin	4,39	4,19 > 4,59	558,88	440,64	35	20
Simeprevir	6,70	6,50 > 6,90	750,00	315,58	45	30

Tabulka 5: Přehled optimalizovaných hodnot napětí na vstupním kuželu a kolizní energie spolu s prekurzorovými a produktovými ionty a jejich retenčními časy pro každou z látek v negativním módu

MIX 1	Rt	Retenční okno [min]	Prekurzor m/z	Produktový ion m/z	Napětí na vstupním kuželu [V]	Kolizní energie [V]
Uracil	0,99	0,79 > 1,19	110,74	67,70	25	15
Paracetamol	1,72	1,52 > 1,92	149,79	107,23	35	15
Acebutolol	2,17	1,98 > 2,38	334,95	176,27	35	30
Maraviroc	neionizuje v negativu					
Salicylová kys.	2,97	2,77 > 3,17	136,79	92,88	25	15
Pravastatin	3,03	2,83 > 3,23	423,06	321,26	40	15
Sofosbuvir	3,22	3,03 > 3,43	528,01	286,18	30	20
Ritonavir	neionizuje v negativu					
Ibuprofen	4,71	4,51 > 4,91	204,94	161,16	25	5
Estron	4,05	3,50 > 4,50	269,19	144,90	50	35
MIX 2	Rt	Retenční okno [min]	Prekurzor m/z	Produktový ion m/z	Napětí na vstupním kuželu [V]	Kolizní energie [V]
Atenolol	neionizuje v negativu					
Kofein	neionizuje v negativu					
Tetracyklin	neionizuje v negativu					
Daclatasvir	2,38	2,18 > 2,58	737,46	706,27	40	20
Tamsulosin	neionizuje v negativu					
Atomoxetin	neionizuje v negativu					
Telmisartan	3,25	3,05 > 3,45	513,90	470,10	45	20
Indometacin	4,55	4,35 > 4,75	355,86	312,27	35	10
MIX 3	Rt	Retenční okno [min]	Prekurzor m/z	Produktový ion m/z	Napětí na vstupním kuželu [V]	Kolizní energie [V]
Tryptofan	1,77	1,57 > 1,97	202,93	116,14	35	15
Perfloxacin	neionizuje v negativu					
Rutin	2,12	1,92 > 2,32	609,01	300,36	50	40
Vardenafil	2,49	2,29 > 2,69	486,97	282,22	50	40
Hydrokortizon	neionizuje v negativu					
Pitavastatin	3,07	2,85 > 3,25	420,03	358,42	40	15
Dexametazon	neionizuje v negativu					
Atorvasatatin	4,39	4,19 > 4,59	557,15	397,33	40	30
Simeprevir	neionizuje v negativu					

5 Výsledky a diskuze

5.1. Výběr podmínek LC separace

Během proměrování standardních roztoků byl vyhodnocován vliv gradientu na kvalitu separace, tvar píků a na retenční časy látek. Dle těchto porovnávaných parametrů byl profil gradientu upraven do finální podoby. Hlavním měřítkem byla délka eluce jednotlivých látek. Pro odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti měřených sloučenin byl zvolen gradientový typ eluce. Pro separaci 28 látek byla zvolena analytická kolona Acquity BEH C 18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm). Celková doba separace byla 10 minut. V průběhu měření bylo nutné podmínky separace změnit vložení isokratického kroku na konci gradientu. Finální podrobné podmínky LC metody jsou napsány v kapitole 4.10

5.2. Výběr prekurzorových iontů

Pro každou sloučeninu byl vybrán prekurzorový ion jak v pozitivním módu, tak v negativním módu, pokud byla daná látka v obou módech ionizována. Prekurzorové ionty jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Výběr prekurzorových iontů v pozitivním a negativním módu.

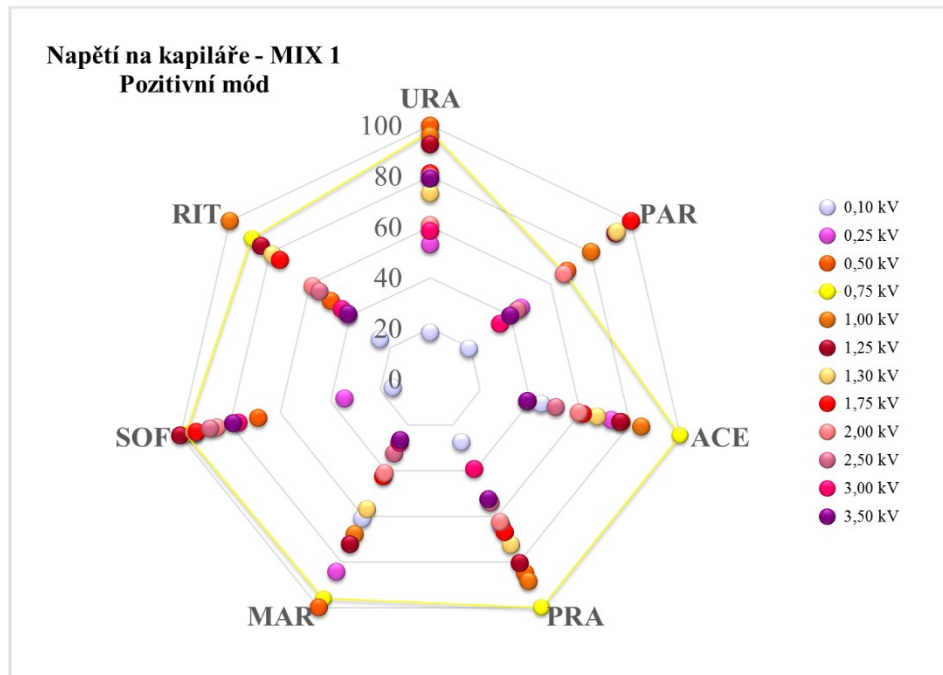
MIX 1	Pozitivní mód	Negativní mód
Uracil	$[M+H]^+ = 112,58$	$[M-H]^- = 110,74$
Paracetamol	$[M+H]^+ = 151,70$	$[M-H]^- = 149,79$
Acebutolol	$[M+H]^+ = 336,79$	$[M-H]^- = 334,95$
Maraviroc	$[M+H]^+ = 513,97$	-
Salicylová kys.	-	$[M-H]^- = 136,79$
Pravastatin	-	$[M-H]^- = 423,06$
Sofosbuvir	$[M+H]^+ = 529,80$	$[M-H]^- = 528,01$
Ritonavir	$[M+H]^+ = 721,03$	-
Ibuprofen	-	$[M-H]^- = 204,94$
Estron	$[M+H]^+ = 271,09$	$[M-H]^- = 269,19$
MIX 2	Pozitivní mód	Negativní mód
Atenolol	$[M+H]^+ = 266,76$	-
Kofein	$[M+H]^+ = 194,75$	-
Tetracyklin	$[M+H]^+ = 444,75$	-
Daclatasvir	$[M+H]^+ = 739,13$	$[M-H]^- = 737,46$
Tamsulosin	$[M+H]^+ = 408,51$	-
Atomoxetin	$[M+H]^+ = 255,78$	-
Telmisartan	$[M+H]^+ = 514,94$	$[M-H]^- = 513,90$
Indometacin	$[M+H]^+ = 357,70$	$[M-H]^- = 355,86$
MIX 3	Pozitivní mód	Negativní mód
Tryptofan	$[M+H]^+ = 204,77$	$[M-H]^- = 202,93$
Perfloxacin	$[M+H]^+ = 333,71$	-
Rutin	-	$[M-H]^- = 609,01$
Vardenafil	$[M+H]^+ = 488,85$	$[M-H]^- = 486,97$
Hydrokortizon	$[M+H]^+ = 362,80$	-
Pitavastatin	$[M+H]^+ = 421,74$	$[M-H]^- = 420,03$
Dexametazon	$[M+H]^+ = 392,79$	-
Atorvasatatin	$[M+H]^+ = 558,88$	$[M-H]^- = 557,15$
Simeprevir	$[M+H]^+ = 750,00$	-

5.3. Optimalizace parametrů iontového zdroje

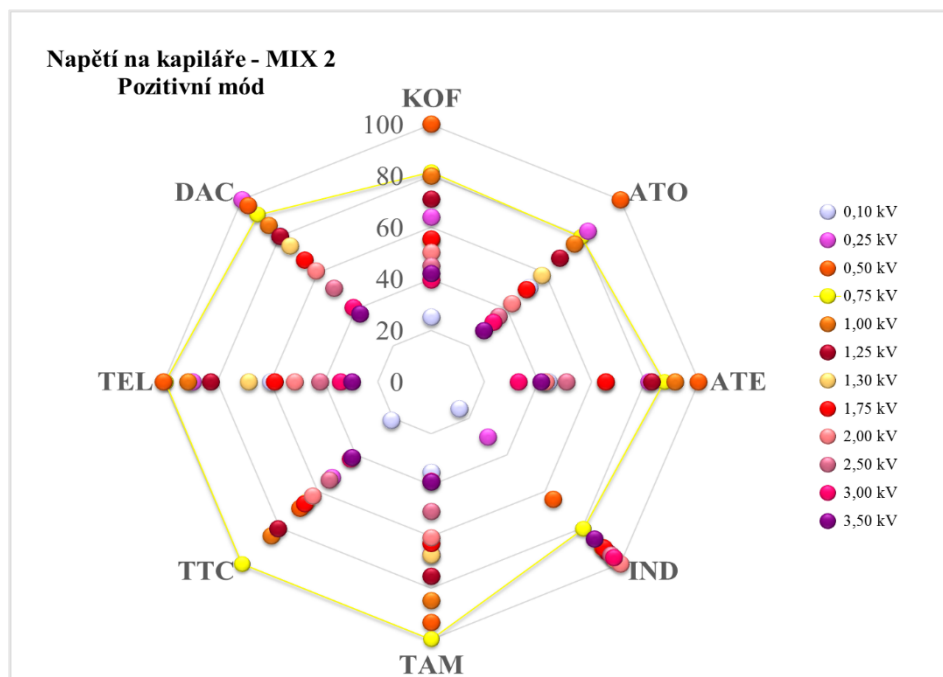
Na základě vybraných prekurzorových iontů byly vytvořeny SIM metody použité pro optimalizaci jednotlivých parametrů iontového zdroje. Optimalizace byla provedena za použití standardních roztoků o koncentraci 10^{-6} g/ml v pozitivním módu a 10^{-5} g/ml v negativním módu. Z důvodu pozdějšího zařazení estronu do studie nejsou pro něj dostupná konkrétní data následující optimalizace.

5.3.1. Napětí na kapiláře

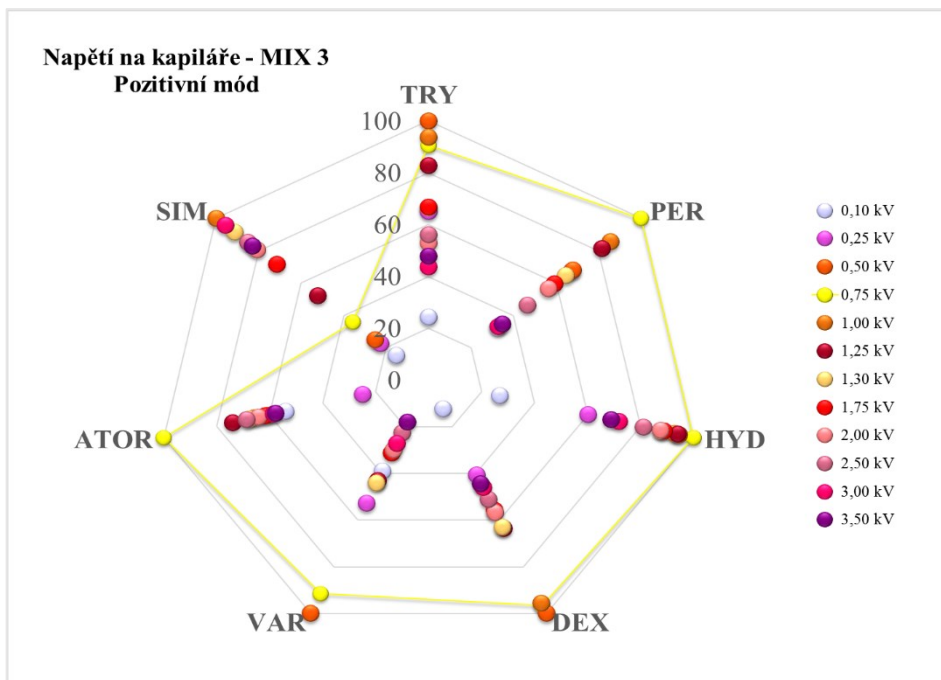
Tento parametr byl proměřován v rozsahu hodnot od 0,1 kV do 3,5 kV. Pro pozitivní mód byla vybrána hodnota 0,75 kV a pro negativní mód hodnota 2,5 kV. V grafu jsou hodnoty vyneseny v %, kdy 100 % odpovídá nejvyšší hodnotě plochy píku u dané látky v rámci celé škály hodnot napětí. Stejně je tomu i u ostatních grafů.



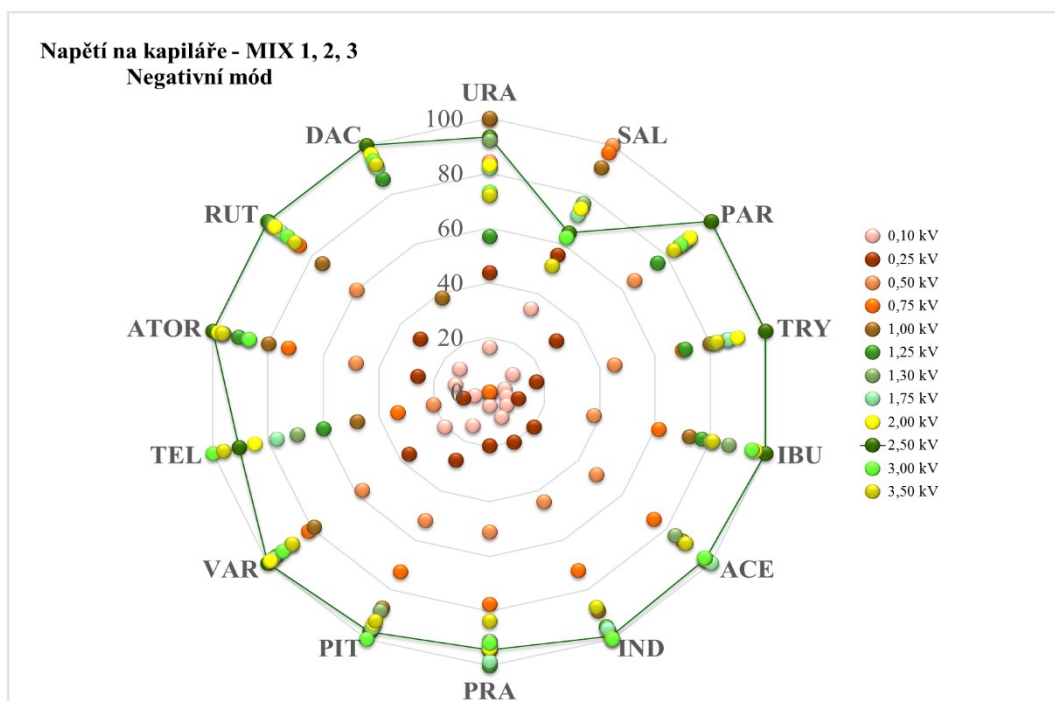
Obrázek 8: Napětí na kapiláře pro mix 1 v pozitivu



Obrázek 9: Napětí na kapiláře pro mix 2 v pozitivu



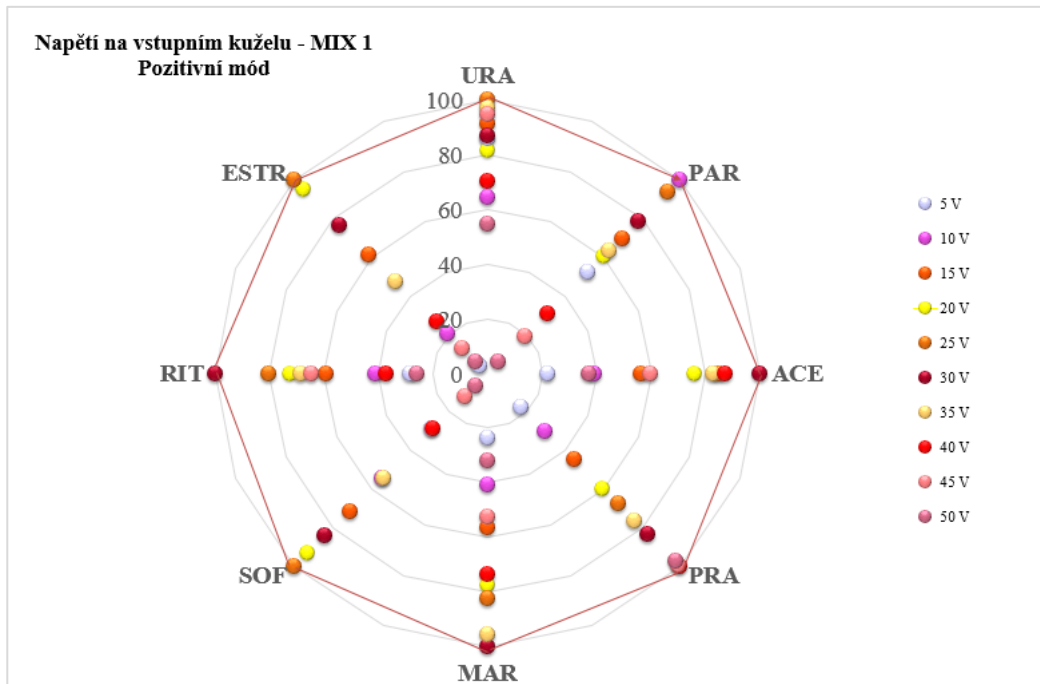
Obrázek 10: Napětí na kapiláře pro mix 3 v pozitivu



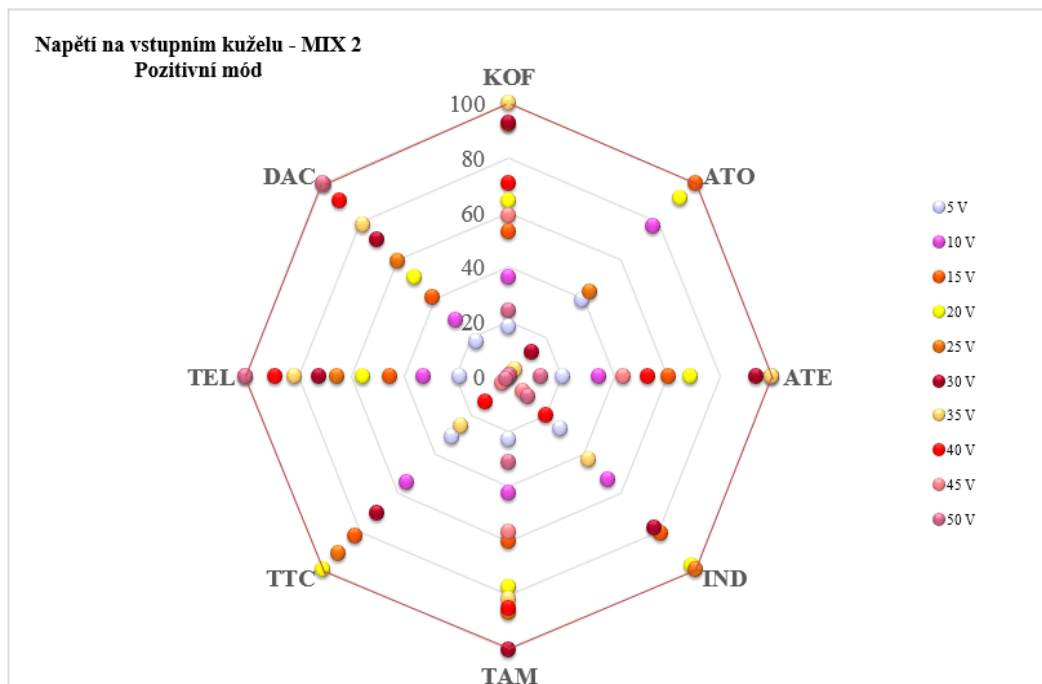
Obrázek 11: Napětí na kapiláře pro mix 1, 2, 3 v negativu

5.3.2. Napětí na vstupním kuželu

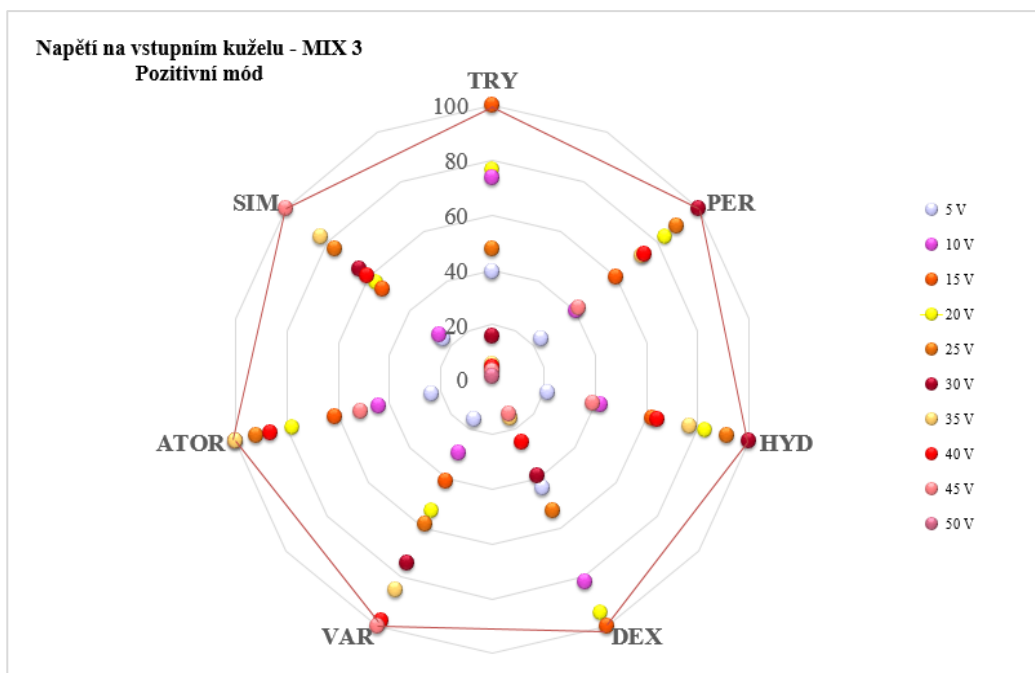
Hodnoty napětí na vstupním kuželu byly měřeny v rozmezí od 5 V do 50 V. Hodnoty tohoto typu napětí se nastavují individuálně pro každou sloučeninu, proto byla vybrána optimální hodnota pro každou sloučeninu zvlášť. Vybrané hodnoty jsou znázorněny v Tabulce 4 a 5.



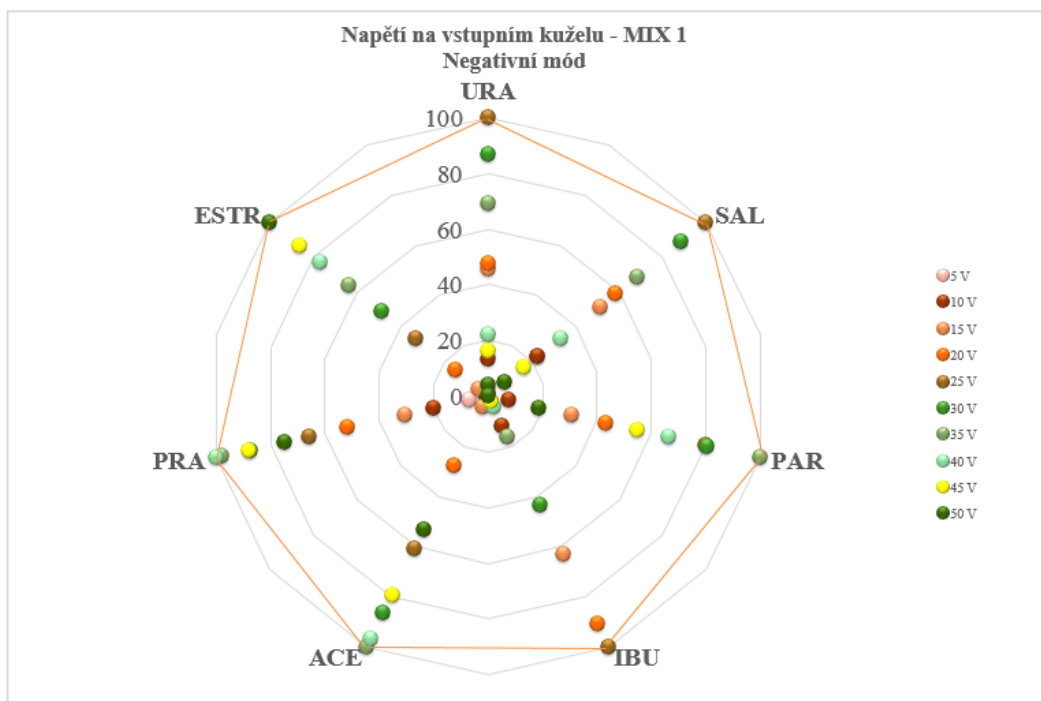
Obrázek 12: Napětí na vstupním kuželu pro mix 1 v pozitivu



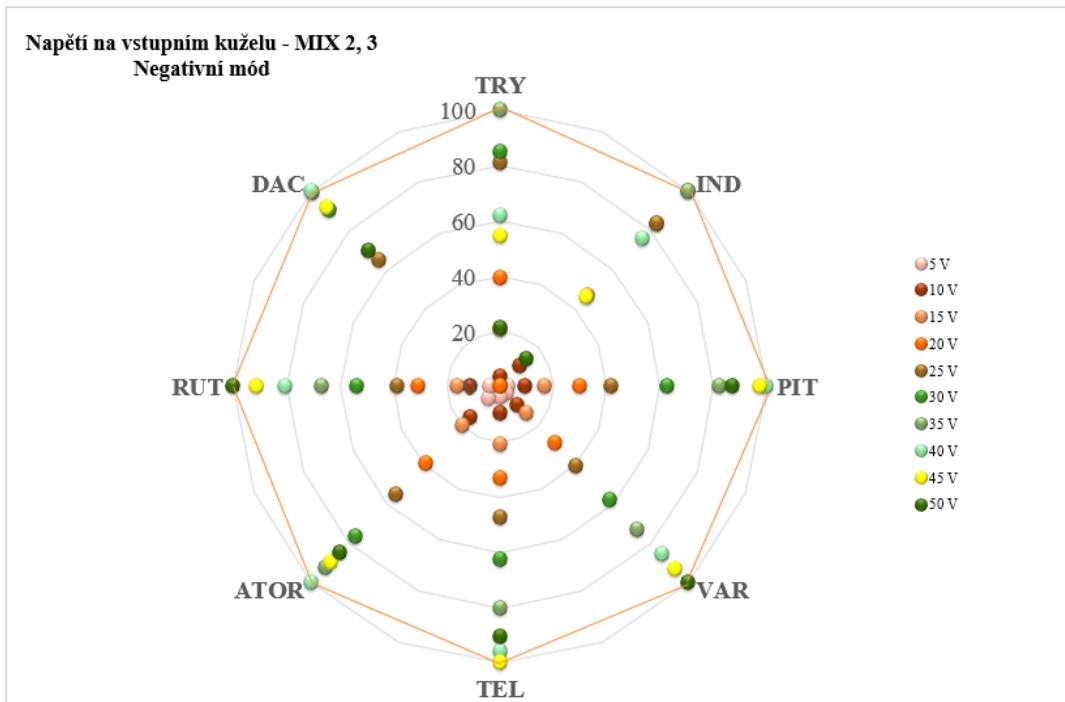
Obrázek 13: Napětí na vstupním kuželu pro mix 2 v pozitivu



Obrázek 14: Napětí na vstupním kuželu pro mix 3 v pozitivu



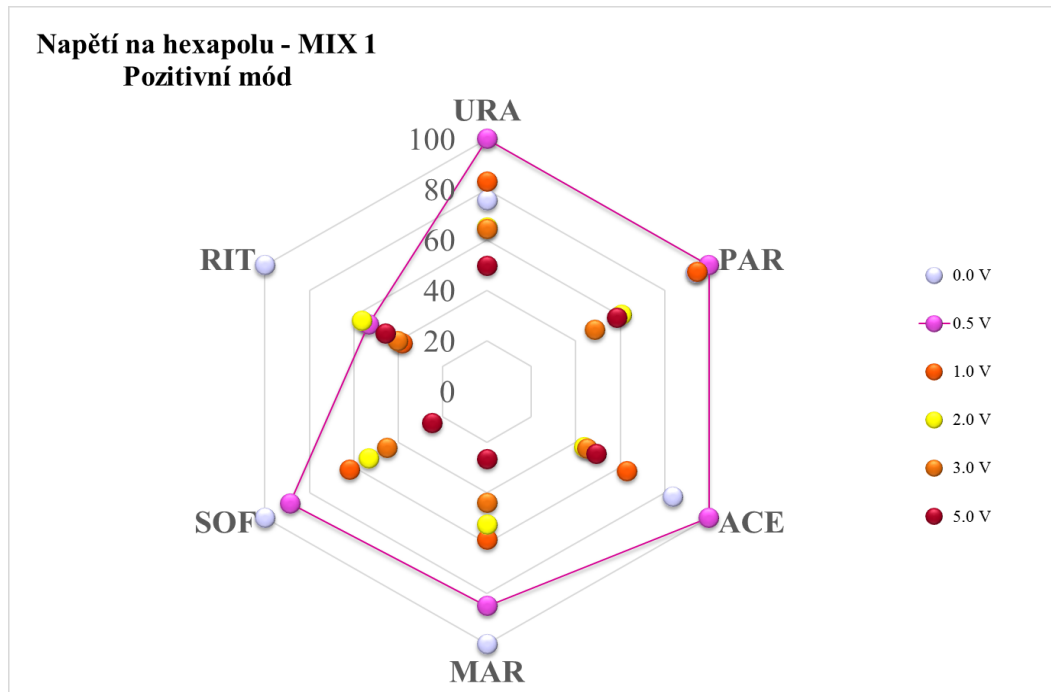
Obrázek 15: Napětí na vstupním kuželu pro mix 1 v negativu



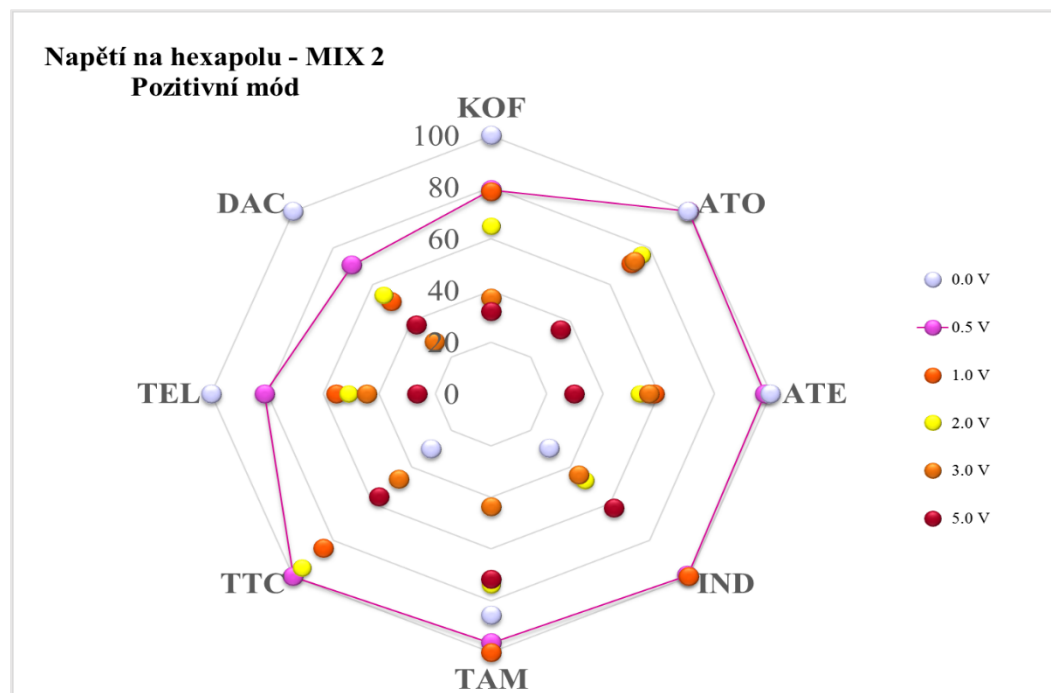
Obrázek 16: Napětí na vstupním kuželu pro mix 2, 3 v negativu

5.3.3. Napětí na hexapolu

Napětí na této části iontové optiky bylo měřeno v rozmezí od 0 V do 5 V. Pro pozitivní ionizační mód byla po vyhodnocení zvolena hodnota 0,5 V a pro mód negativní hodnota 1 V.

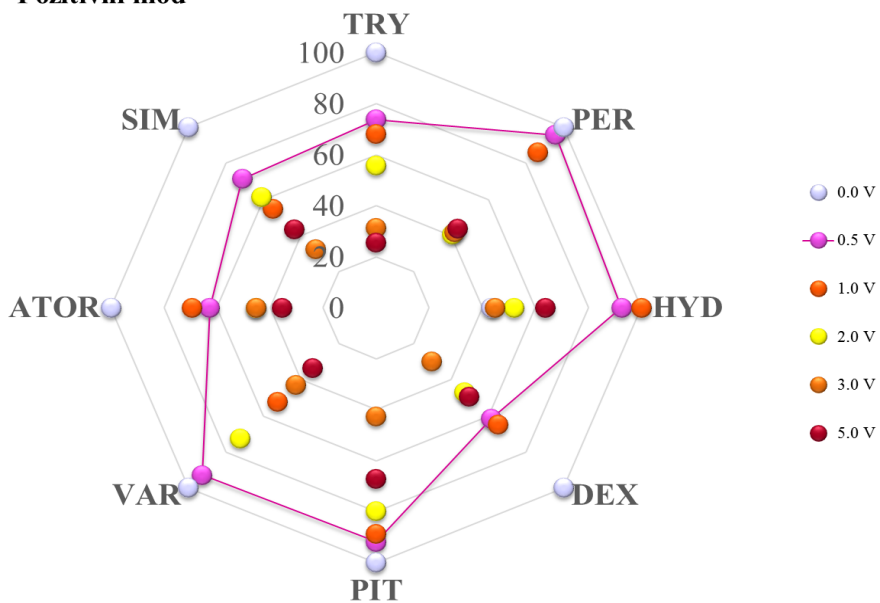


Obrázek 17: Napětí na hexapolu pro mix 1 v pozitivu



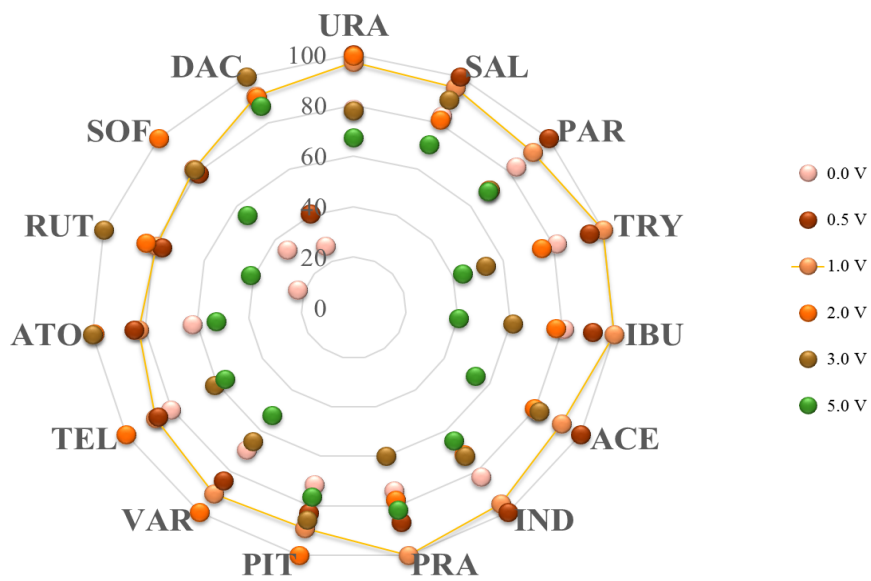
Obrázek 18: Napětí na hexapolu pro mix 2 v pozitivu

**Napětí na hexapolu - MIX 3
Pozitivní mód**



Obrázek 19: Napětí na hexapolu pro mix 3 v pozitivu

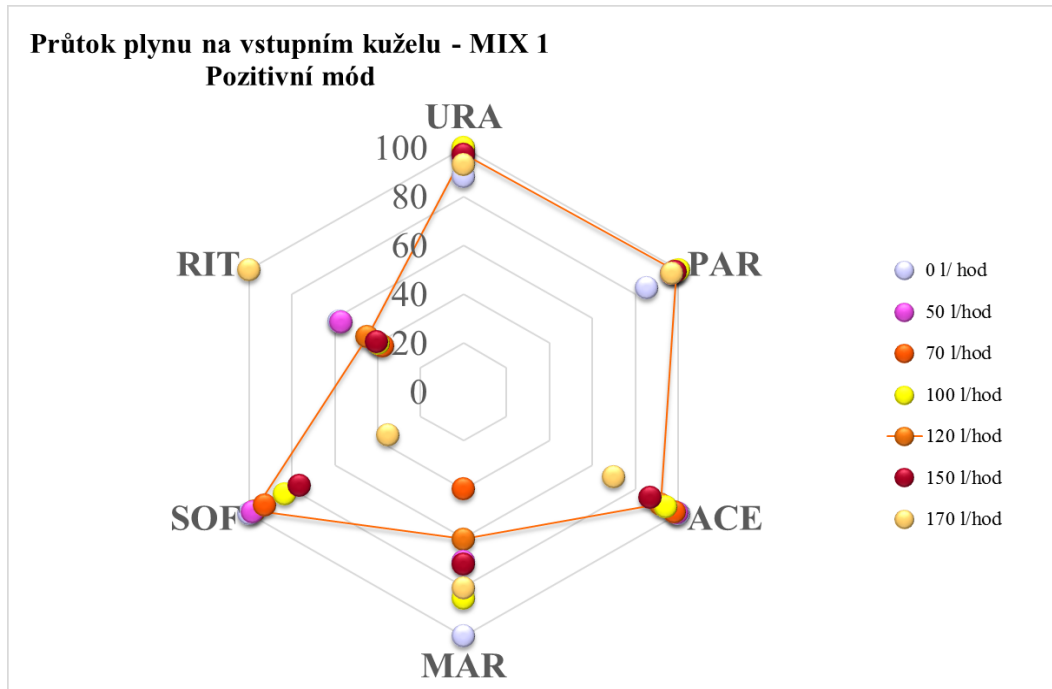
**Napětí na hexapolu - MIX 1, 2, 3
Negativní mód**



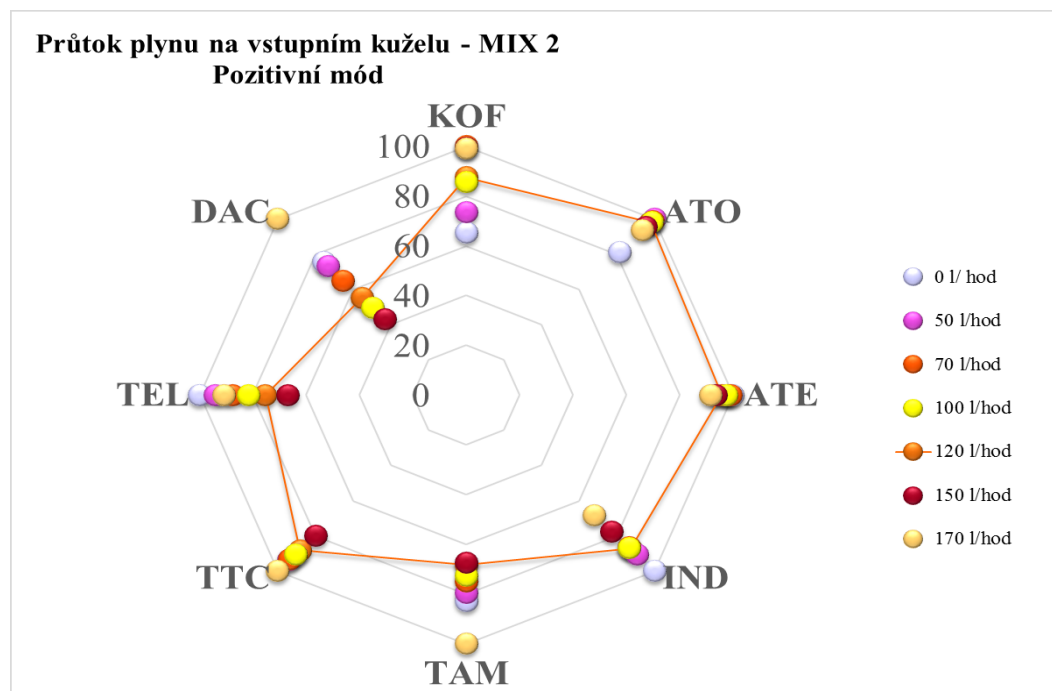
Obrázek 20: Napětí na hexapolu pro mix 1, 2, 3 v negativu

5.3.4. Průtok plynu na vstupním kuželu

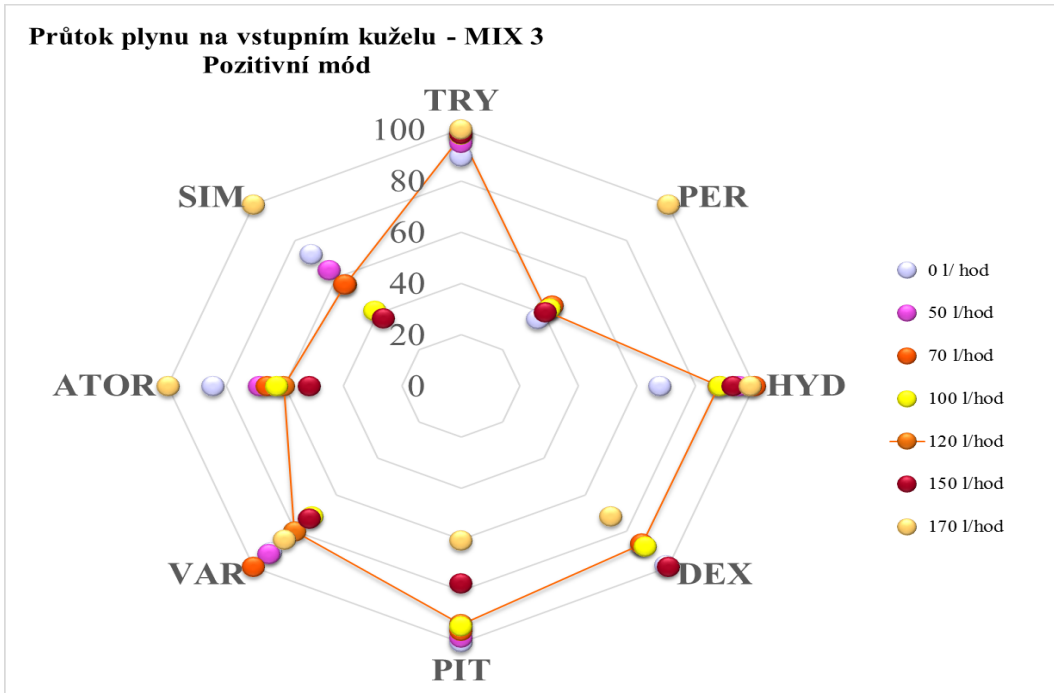
Na vstupním kuželu byl průtok plynu mapován v rozmezí 0 l/hod až 170 l/hod. Dle výsledků optimalizace byla pro oba ionizační módy vybrána hodnota 120 l/hod.



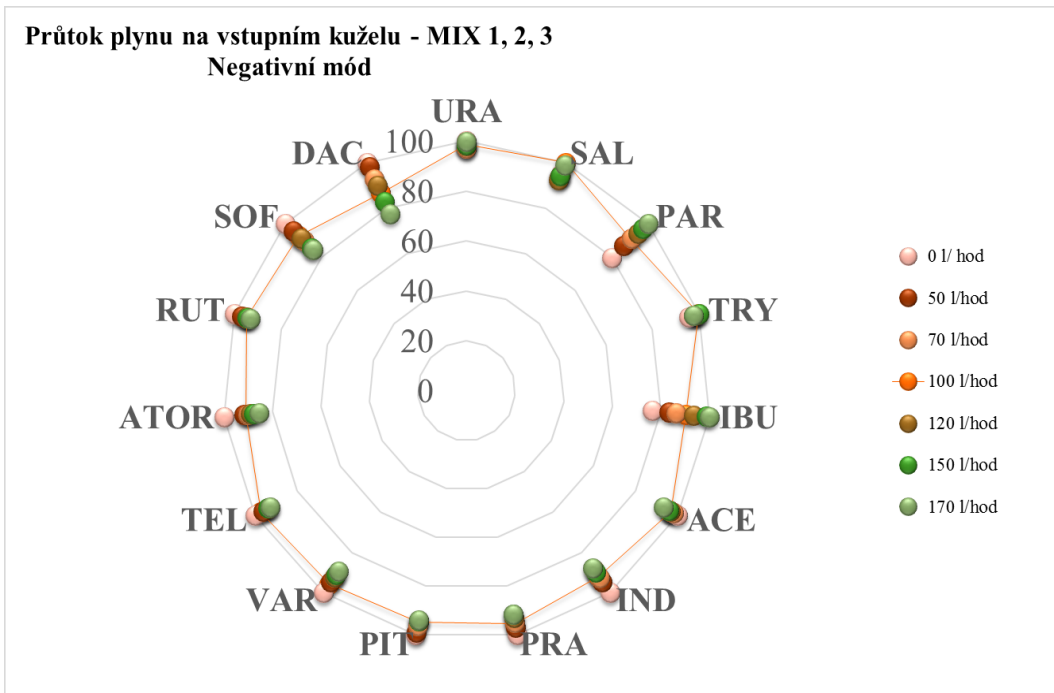
Obrázek 21: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 1 v pozitivu



Obrázek 22: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 2 v pozitivu



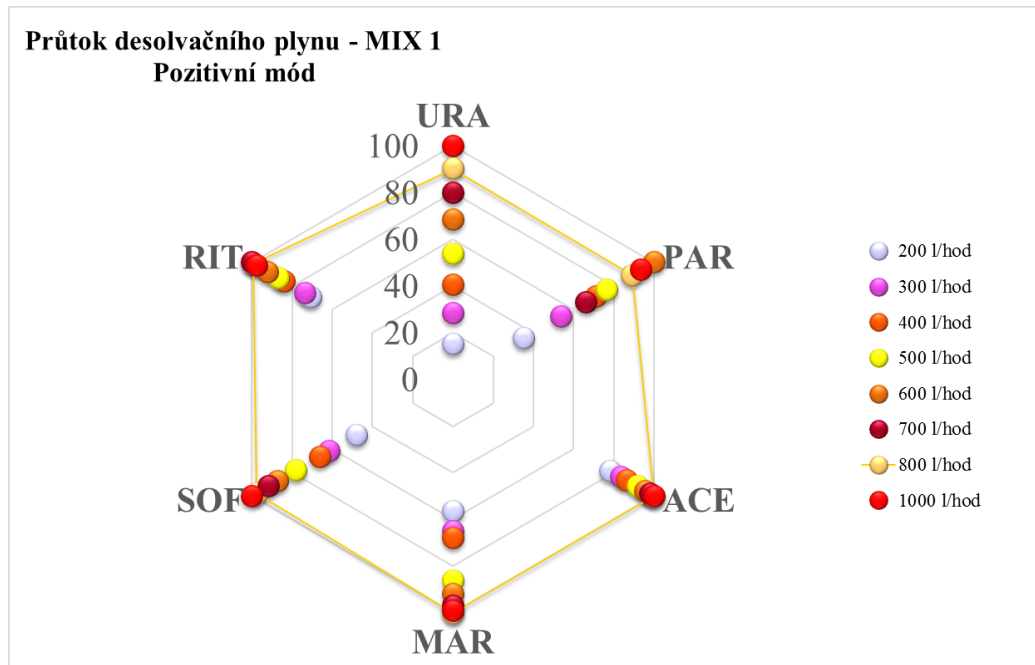
Obrázek 23: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 3 v pozitivu



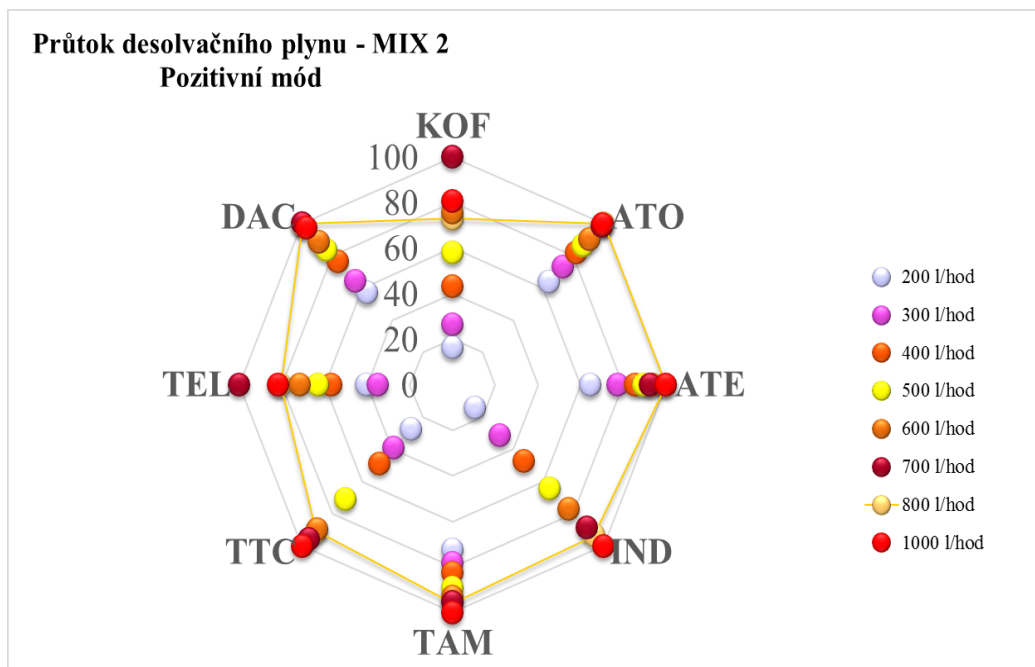
Obrázek 24: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 1, 2, 3 v negativu

5.3.5. Průtok desolvačního plynu

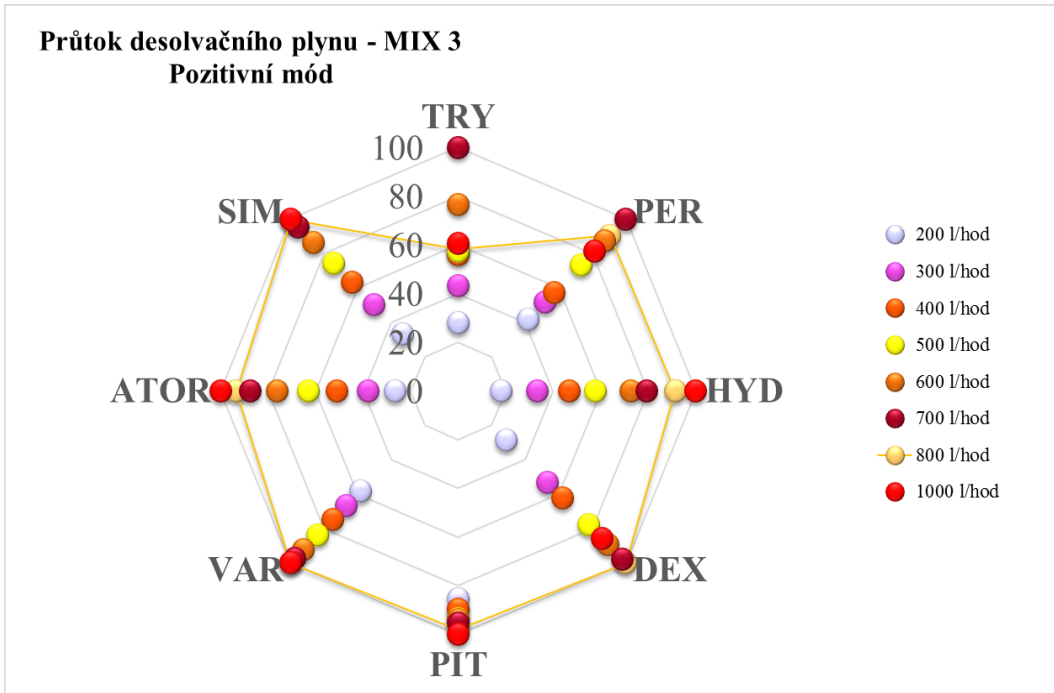
Optimalizace průtoku desolvačního plynu byla měřena v rozmezí hodnot 200 l/hod až 1000 l/hod. Jako optimální byla vybrána hodnota 800 l/hod pro pozitivní mód a hodnota 1000 l/hod pro negativní mód.



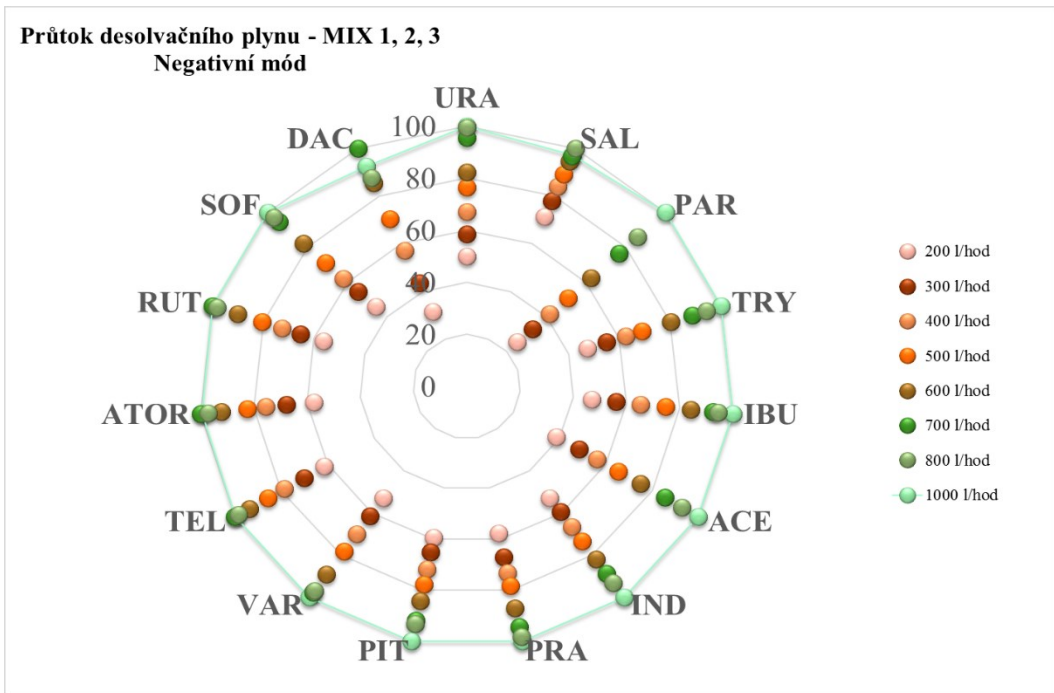
Obrázek 25: Průtok desolvačního plynu pro mix 1 v pozitivu



Obrázek 26: Průtok desolvačního plynu pro mix 2 v pozitivu



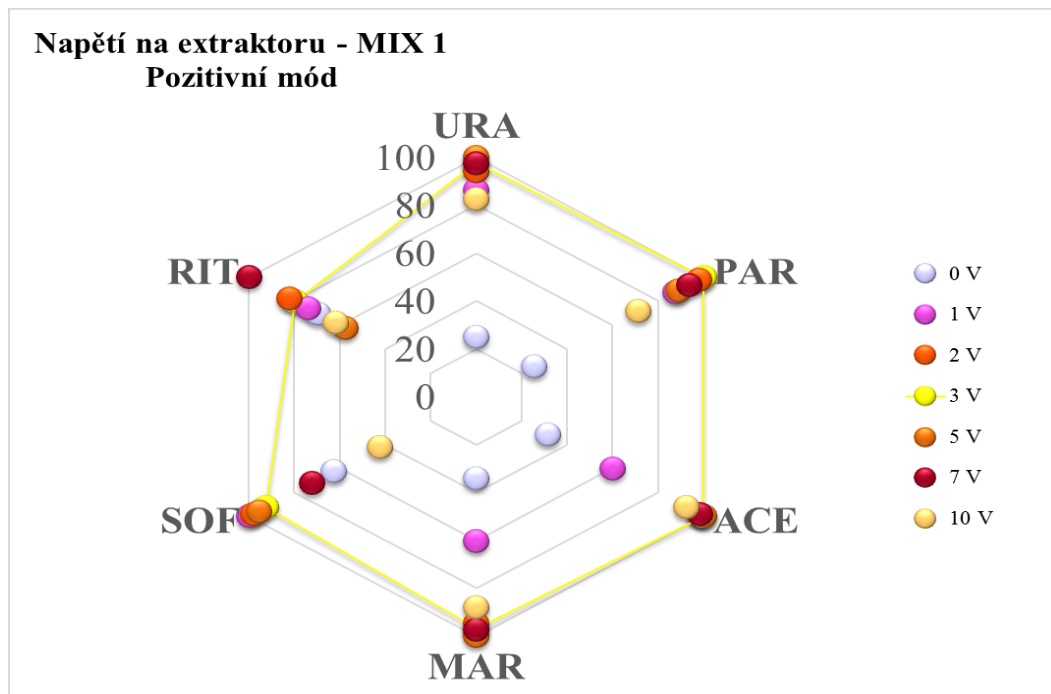
Obrázek 27: Průtok desolvačního plynu pro mix 3 v pozitivu



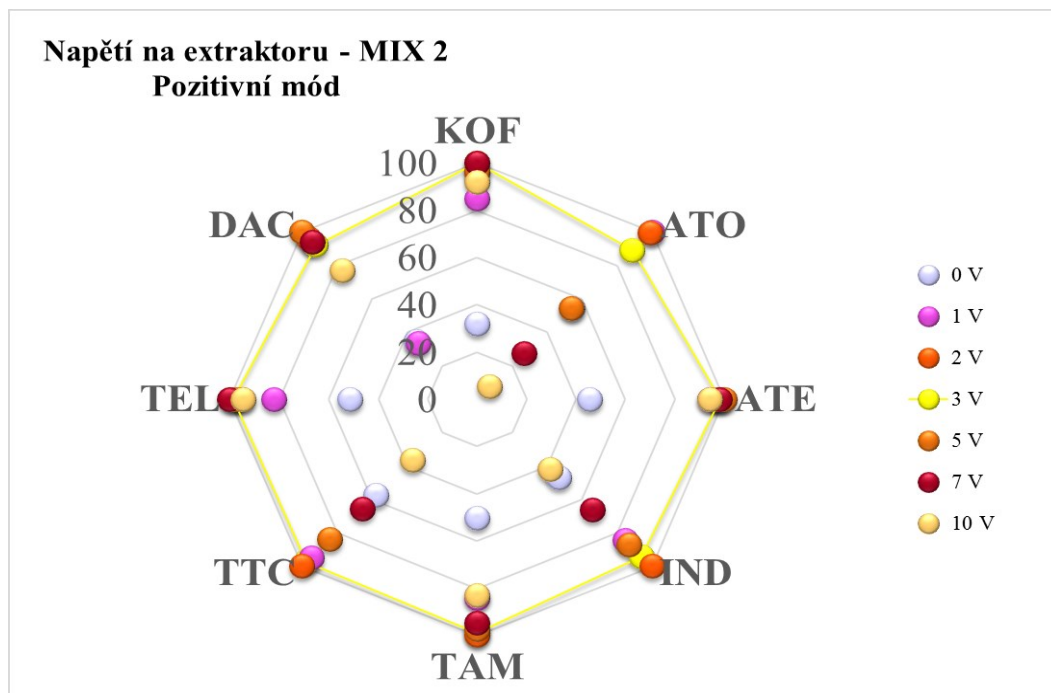
Obrázek 28: Průtok desolvačního plynu pro mix 1, 2, 3 v negativu

5.3.6. Napětí na extraktoru

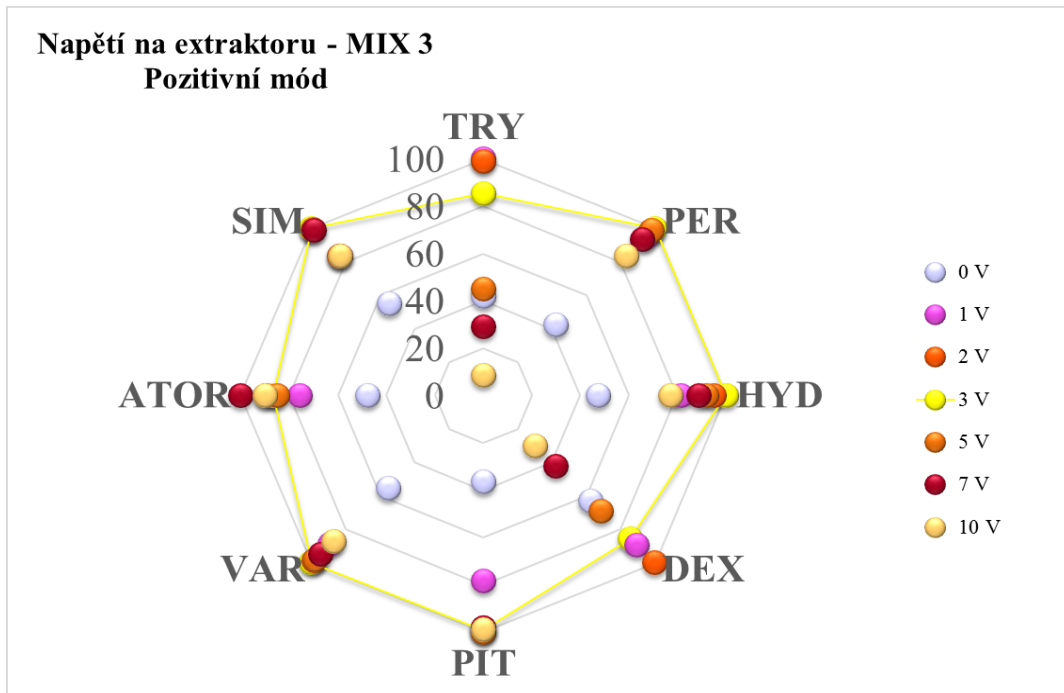
Pro optimalizaci tohoto parametru byla zvolena škála hodnot od 0 V do 10 V. Optimální hodnotou pro celé měření byla zvolena hodnota napětí 3 V pro pozitivní mód a 5 V pro negativní mód.



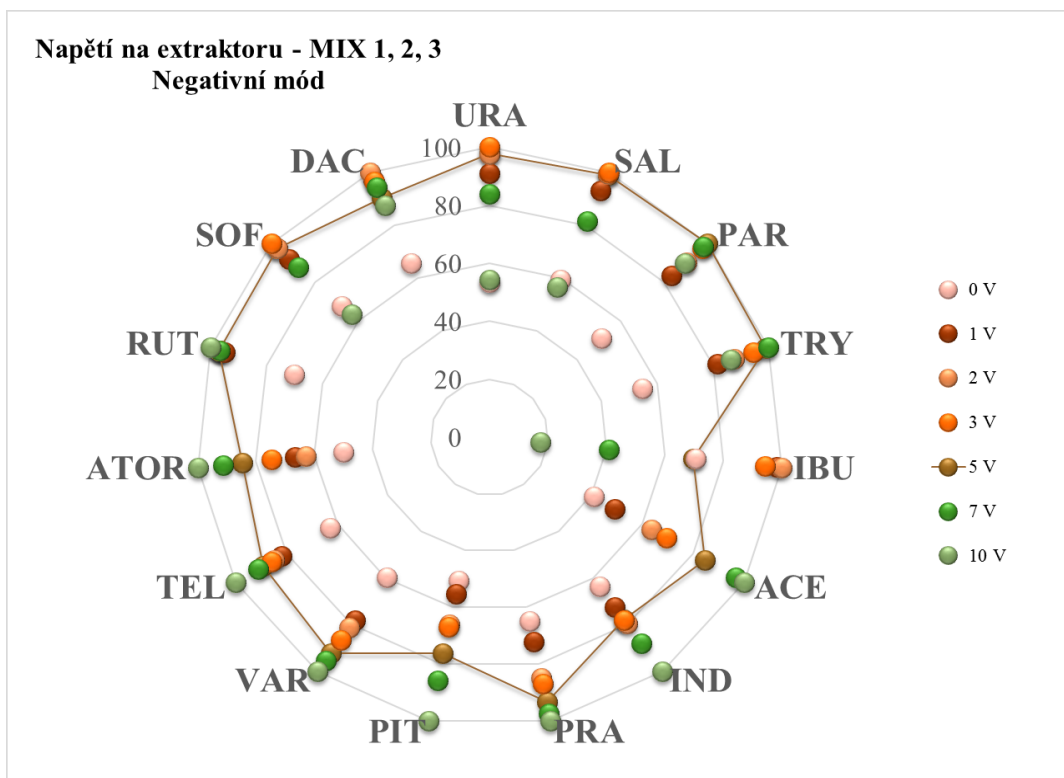
Obrázek 29: Napětí na extraktoru pro mix 1 v pozitivu



Obrázek 30: Napětí na extraktoru pro mix 2 v pozitivu



Obrázek 31: Napětí na extraktoru pro mix 3 v pozitivu



Obrázek 32: Napětí na extraktoru pro mix 1, 2, 3 v negativu

5.4. Výběr produktových iontů

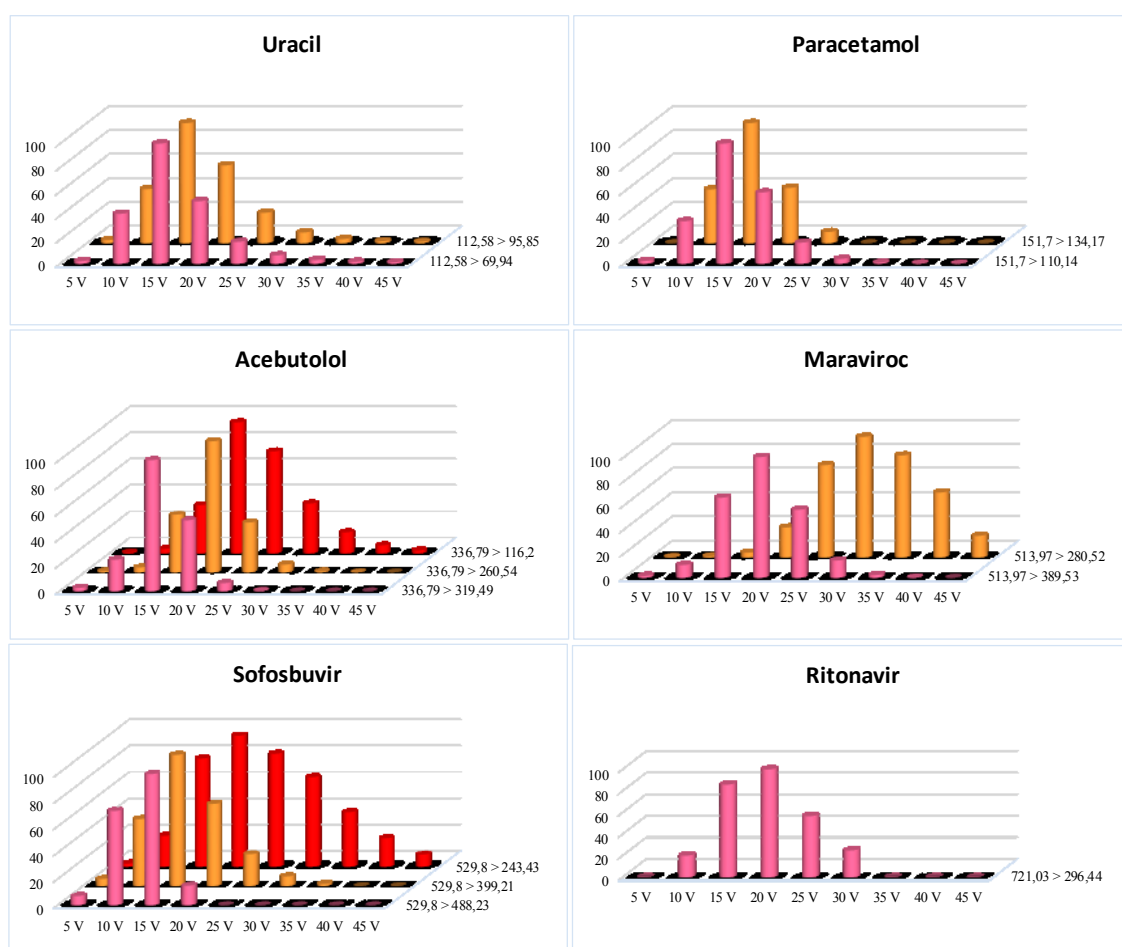
Výběr produktových iontů každé látky byl proveden z měření skenů produktových iontů, při němž byly použity již optimální hodnoty parametrů iontového zdroje. V případě, že dané látky poskytovaly více intenzivních fragmentů, byly pro každou látku vybrány maximálně tři nejintenzivnější fragmenty. Látky byly podrobeny třem hladinám kolizní energie, a to 10 V, 20 V a 30 V. Vybrané produktové ionty jsou znázorněny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Vybrané produktové ionty v pozitivním a negativním módu

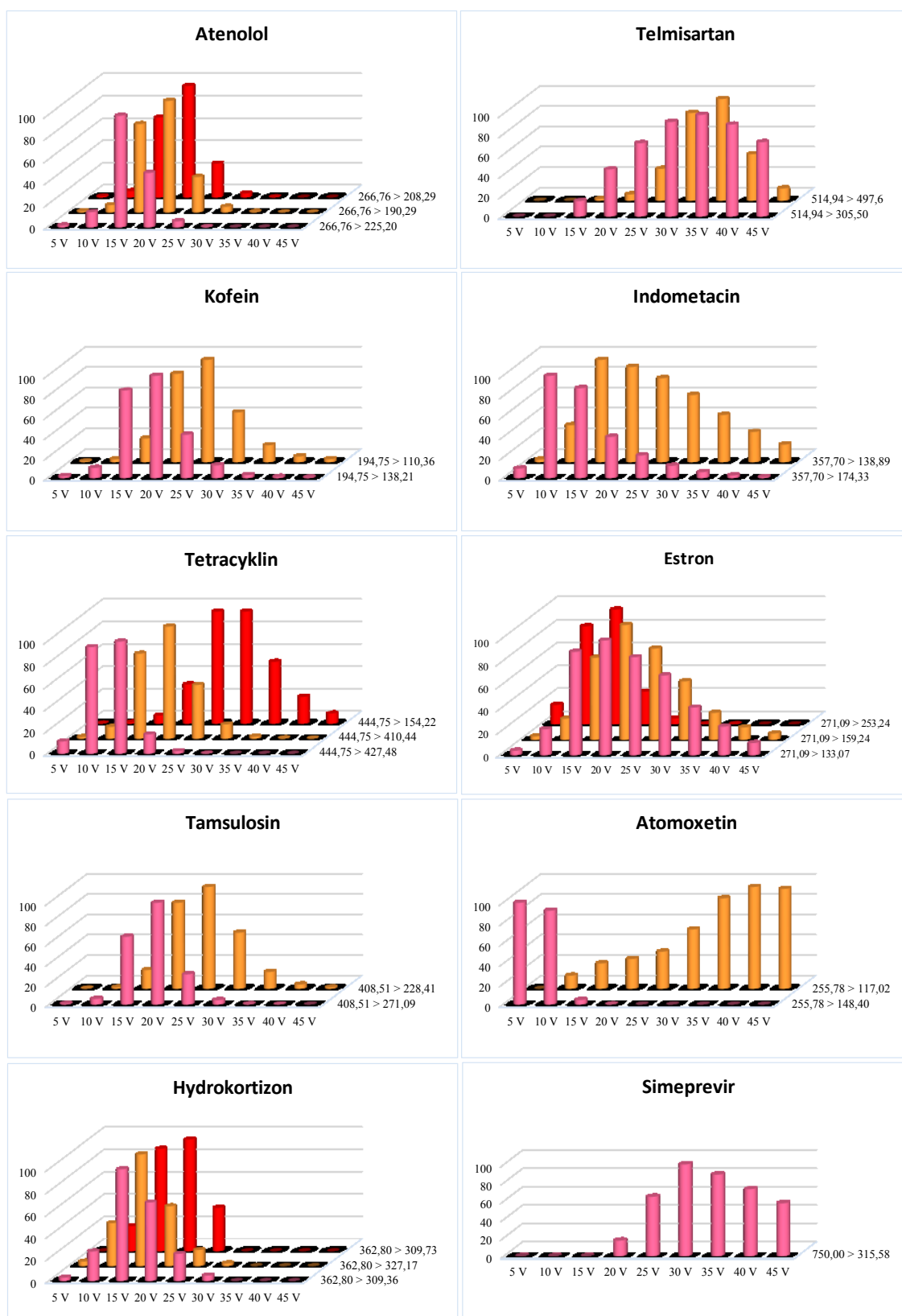
MIX 1	Produktové ionty					
	Pozitivní mód			Negativní mód		
Uracil	95,85	69,94	-	-	-	-
Paracetamol	134,17	110,14	-	107,23	-	-
Acebutolol	319,49	260,54	116,2	219,28	176,27	-
Maraviroc	389,53	280,52	-	-	-	-
Salicylová kys.	-	-	-	92,88	64,73	-
Pravastatin	-	-	-	321,26	303,13	199,36
Sofosbuvir	488,23	399,21	243,43	508,16	414,61	286,18
Ritonavir	296,44	-	-	-	-	-
Ibuprofen	-	-	-	161,16	143,18	-
Estron	253,24	159,24	133,07	253,49	183,67	144,9
MIX 2						
Atenolol	225,20	208,29	190,26	-	-	-
Kofein	138,21	110,36	-	-	-	-
Tetracyklin	427,48	410,44	154,22	-	-	-
Daclatasvir	-	-	-	706,27	674,19	496,17
Tamsulosin	271,09	228,41	-	-	-	-
Atomoxetin	148,40	117,02	-	-	-	-
Telmisartan	497,60	305,50	-	470,10	303,12	288,72
Indometacin	174,33	138,89	-	312,27	297,24	270,34
MIX 3						
Tryptofan	188,32	159,21	145,94	159,02	142,24	116,14
Perfloxacin	316,36	290,48	233,35	-	-	-
Rutin	-	-	-	300,36	151,33	-
Vardenafil	449,13	422,25	117,38	459,35	282,22	-
Hydrokortizon	327,17	309,73	309,36	-	-	-
Pitavastatin	318,05	290,27	274,32	338,30	316,00	290,40
Dexametazon	373,18	355,33	337,29	-	-	-
Atorvasatatin	466,29	440,64	422,47	521,29	453,15	397,33
Simeprevir	315,58	-	-	-	-	-

5.5. Optimalizace kolizní energie a výběr vhodného SRM přechodu

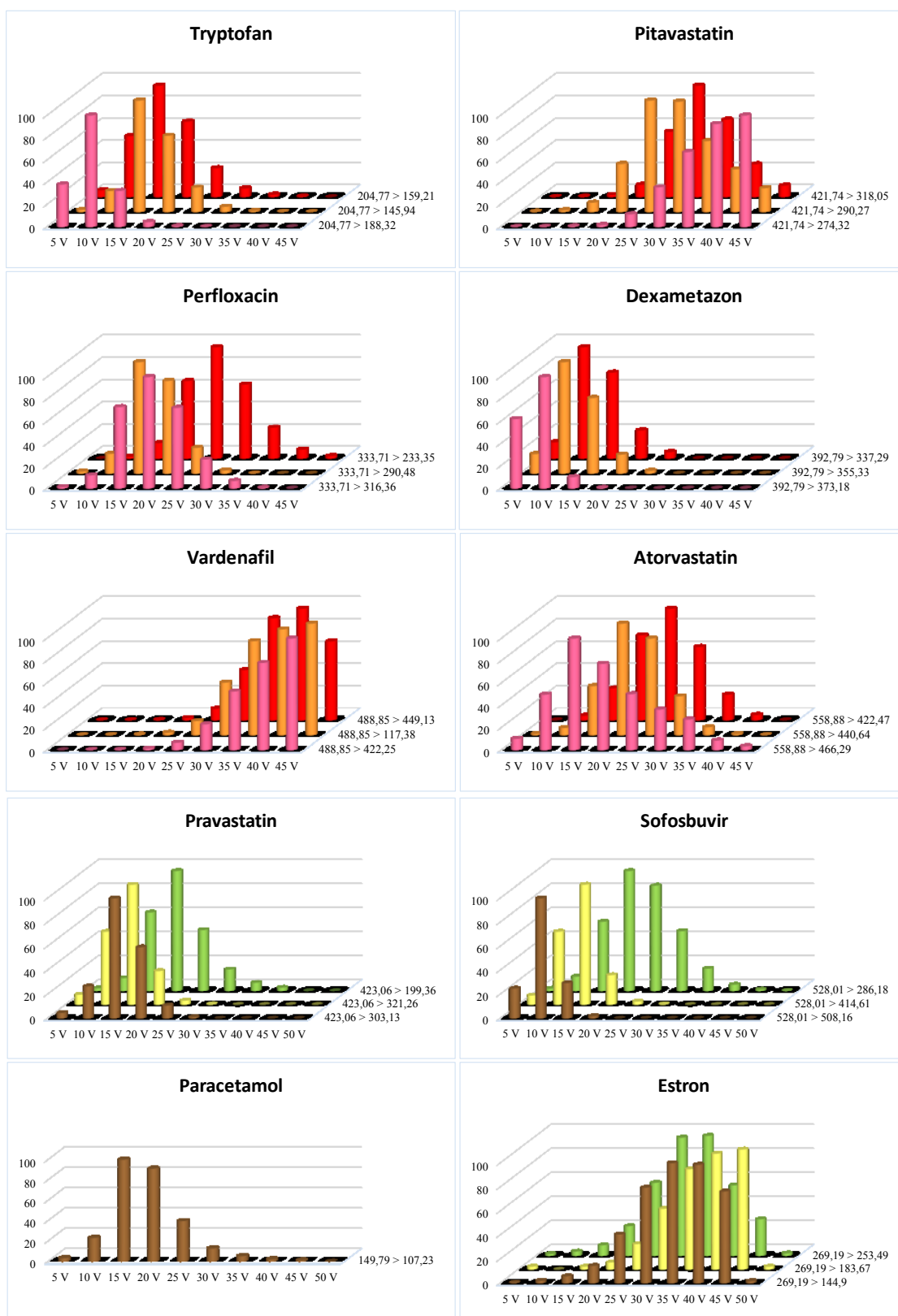
Na základě vybraných prekurzorových a produktových iontů byly pro každou látku definovány SRM přechody. Dále byla pro každý přechod optimalizována kolizní energie v rozmezí od 5 V do 50 V pro negativ a od 5 V do 45 V pro pozitiv. Výsledky pro jednotlivé látky jsou uvedeny na Obrázku 33 – Obrázek 36. Pro každou látku byl vybrán jeden SRM přechod s nejvhodnější kolizní energií. Graf pro Ibuprofen není zahrnut z důvodu malé odezvy pro tuto optimalizaci. Pro další zpracování byl vybrán pouze jeden nejintenzivnější SRM přechod u každé látky. Výsledné optimalizované hodnoty a vybrané produktové ionty jsou uvedeny v Tabulce 4 a 5.



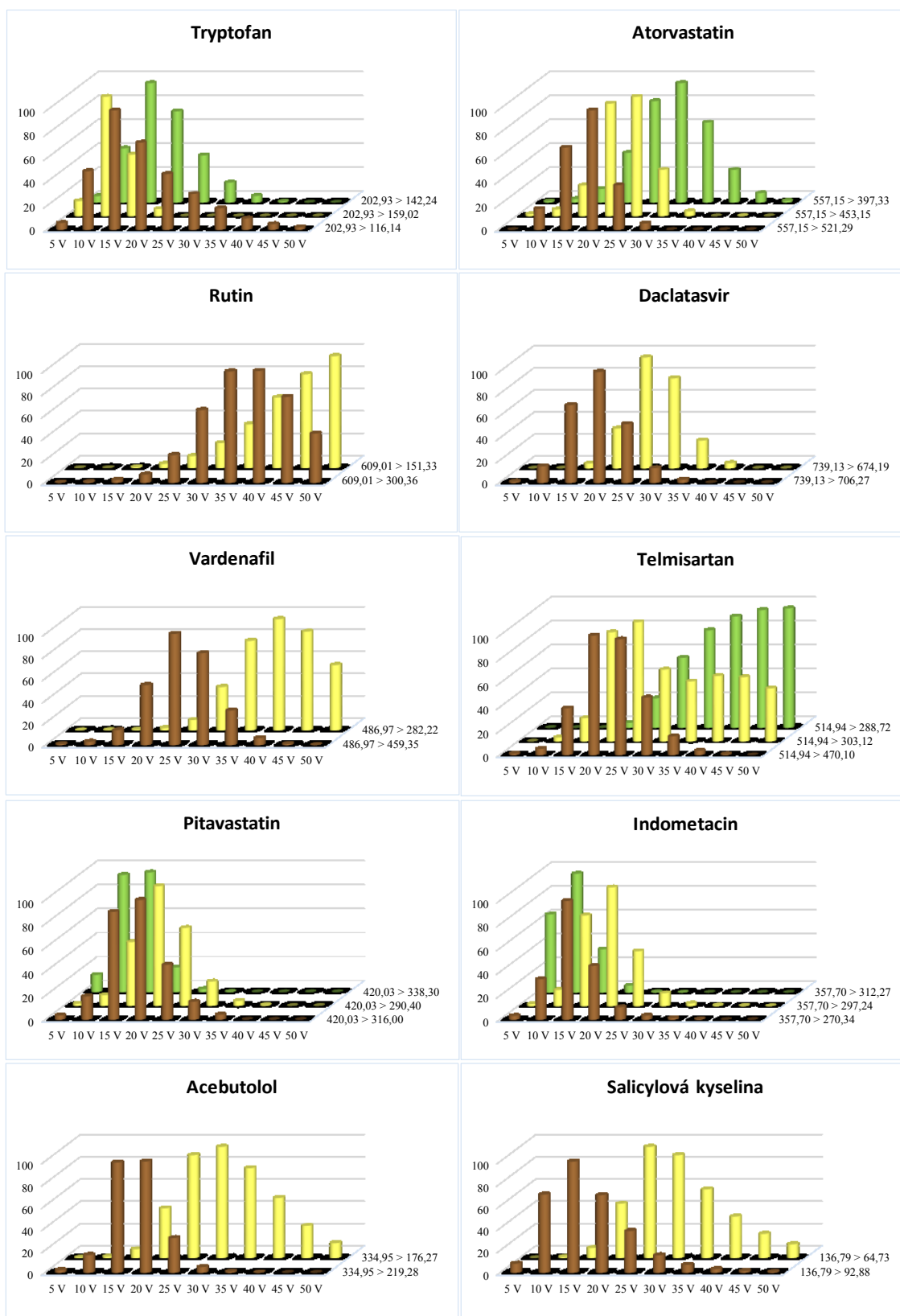
Obrázek 33: Iontové přechody pro uracil, paracetamol, acebutolol, maraviroc, sofosbuvir a ritonavir při různých kolizních energiích v pozitivním ionizačním módu



Obrázek 34: Iontové přechody pro atenolol, telmisartan, kofein, indometacin, tetracyklin, estron, tamsulosin, atomoxetin, hydrokortizon a simeprevir při různých kolizních energiích v pozitivním ionizačním módu



Obrázek 35: Iontové přechody pro pitavastatin, perfloxacin, dexametazon, vardenafil a atorvastatin při různých kolizních energiích v pozitivním ionizačním módu a pro pravastatin, sofosbuvir, paracetamol a estron v negativním ionizačním módu



Obrázek 36: Iontové přechody pro tryptofan, atorvastatin, rutin, daclatasvir, vardenafil, telmisartan, pitavastatin, indometacin, acebutolol, salicylovou kyselinu při různých kolizních energiích v negativním ionizačním módu

5.6. Stanovení matricových efektů

Vyvinutá UPLC-MS/MS metoda (podmínky viz kapitola 4.10) byla využita pro studii zabývající se vyhodnocováním matricových efektů. Pro tyto účely byly změřeny dva typy roztoků. Standardní roztoky připravené v odpovídajícím rozpouštědle (ACN:voda, 66:33) a roztoky matrice obohacené po přípravě vzorků, kdy lyofilizované sérum bylo nejdříve upraveno proteinovou precipitací a následně obohaceno jednotlivými standardními roztoky. Podrobný postup přípravy těchto roztoků je popsán v kapitole 4.5. Tímto způsobem byly připraveny roztoky o různých koncentračních hladinách 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2 ng/ml a 1 ng/ml pro všechny tři směsné roztoky.

Získaná data z měření těchto roztoků byly následně použity pro hodnocení matricových efektů pomocí metody využívající směrnici kalibrační křivky a metody post-extrakčního přídatku.

5.7. Vyhodnocení ME porovnáním směrnic kalibračních křivek

Z naměřených dat byly pro každý analyt sestrojeny 2 kalibrační křivky, standardní a matricová kalibrační křivka. K jejich vizuálnímu záznamu bylo využito nejen klasického měřítka, ale také logaritmického a reciprokého. Z daných kalibračních křivek byly získány hodnoty koeficientů determinace a směrnic kalibračních křivek, ze kterých byly následně vypočítány hodnoty matricových efektů. Tyto hodnoty jsou znázorněny v Tabulkách 8-10. Jednotlivé kalibrační křivky jsou umístěny v příloze A.

5.8. Hodnocení ME pomocí metody post-extrakčního přídatku

Z naměřených hodnot byly dle postupu zmíněného v kapitole 3.4. vypočítány hodnoty matricových efektů pro jednotlivé látky a jednotlivé koncentrační hladiny. Získané hodnoty jsou znázorněny v Tabulce 11.

Tabulka 8: Přehled koeficientů determinace (r^2) a směrnic kalibračních křivek (a) pro kalibrační křivky bez transformace os.

	POZITIVNÍ MÓD					NEGATIVNÍ MÓD				
	STANDARDNÍ kal.		MATRICOVÁ kal.		ME [%]	STANDARDNÍ kal.		MATRICOVÁ kal.		ME [%]
	r^2	a	r^2	a		r^2	a	r^2	a	
MIX 1										
PAR	0,9998	24,603	0,9999	21,738	-11,6					
ACE	0,9983	133,660	0,9971	129,850	-2,9	0,9991	5,513	0,9995	4,696	-14,8
MAR	0,9998	214,270	0,9998	225,300	5,1					
SAL						0,9997	17,073	0,9999	16,502	-3,3
PRA						0,9992	4,168	0,9994	3,942	-5,4
SOF	0,9996	56,259	1,0000	60,270	7,1	0,9996	10,375	0,9998	9,768	-5,9
RIT	0,9999	81,000	0,9999	90,000	11,1					
IBU						0,9967	3,490	0,9979	3,290	-5,7
ESTR	0,9989	2,092	0,9998	2,185	4,4					
MIX 2										
ATE	0,9993	37,161	0,9996	37,771	1,6					
KOF	1,0000	104,520	0,9996	100,950	-3,4					
TTC	0,9990	31,879	0,9996	33,379	4,7					
DAC	0,9997	5,540	1,0000	6,007	8,4	0,9996	2,838	0,9999	2,815	-0,8
TAM	0,9999	596,000	0,9994	563,130	-5,5					
ATO	0,9996	3,007	0,9999	3,291	9,4					
TEL	0,9996	66,718	0,9996	97,886	46,7	0,9999	2,468	1,0000	2,416	-2,1
IND	0,9999	55,183	0,9998	55,351	0,3	0,9995	7,951	0,9997	8,079	1,6
MIX 3										
TRY	1,0000	113,450	0,9073	118,720	4,6	0,9996	0,594	0,9327	0,676	13,8
PER	0,9992	89,230	0,9992	89,543	0,4					
RUT						0,9993	8,332	0,9998	8,489	1,9
VAR	0,9998	40,229	0,9997	53,616	33,3	0,9982	21,185	0,9984	18,829	-11,1
HYD	0,9980	2,527	0,9985	2,631	4,1					
PIT	0,9993	165,200	0,9996	163,740	-0,9	0,9999	3,086	1,0000	3,105	0,6
DEX	0,9982	8,484	0,9993	9,102	7,3					
ATOR	0,9999	112,480	0,9998	121,520	8,0	0,9999	19,202	1,0000	19,730	2,7
SIM	0,9982	445,970	0,9999	441,630	-1,0					

Tabulka 9: Přehled koeficientů determinace (r^2) a směrnic kalibračních křivek (a) pro kalibrační křivky s logaritmicou transformací os.

	POZITIVNÍ MÓD					NEGATIVNÍ MÓD				
	STANDARDNÍ kal.		MATRICOVÁ kal.		ME [%]	STANDARDNÍ kal.		MATRICOVÁ kal.		ME [%]
	r^2	a	r^2	a		r^2	a	r^2	a	
MIX 1										
PAR	0,9997	1,003	0,9992	0,999	-0,4					
ACE	0,9995	0,946	0,9988	0,937	-1,0	0,9996	1,017	0,9995	1,035	1,8
MAR	0,9992	1,012	0,9996	1,023	1,1					
SAL						0,9992	1,049	0,9974	0,925	-11,8
PRA						0,9993	1,047	0,9986	1,059	1,1
SOF	0,9994	1,007	0,9999	1,015	0,8	0,9998	1,054	0,9999	1,036	-1,7
RIT	0,9995	1,033	0,9996	1,032	-0,1					
IBU						0,9979	1,241	0,9858	0,973	-21,6
ESTR	0,9970	1,036	0,9977	0,921	-11,1					
MIX 2										
ATE	0,9980	1,026	0,9986	1,021	-0,5					
KOF	0,9995	1,038	0,9640	0,597	-42,5					
TTC	0,9990	1,214	0,9990	1,109	-8,6					
DAC	0,9991	1,092	0,9987	1,067	-2,3	0,9948	1,132	0,9948	1,132	-4,1
TAM	0,9998	0,985	0,9982	0,985	0,1					
ATO	0,9962	1,041	0,9977	1,025	-1,5					
TEL	0,9998	1,085	0,9992	1,108	2,1	0,9973	1,123	0,9973	1,123	-1,2
IND	0,9998	1,054	0,9995	1,066	1,1	0,9996	1,037	0,9996	1,037	-2,2
MIX 3										
TRY	0,9994	1,033	0,9275	0,131	-87,3	0,9971	0,961	0,7780	0,118	-87,7
PER	0,9996	0,973	0,9995	0,977	0,4					
RUT						0,9892	1,604	0,9993	1,044	-34,9
VAR	0,9997	0,985	0,9997	1,000	1,5	0,9998	0,942	0,9994	0,965	2,4
HYD	0,9951	1,012	0,9912	0,735	-27,4					
PIT	0,9996	0,971	0,9996	0,975	0,4	0,9998	1,028	0,9997	1,028	0,0
DEX	0,9991	0,930	0,9998	0,917	-1,4					
ATOR	1,0000	1,028	1,0000	1,024	-0,4	0,9999	1,023	0,9995	1,038	1,5
SIM	0,9993	1,008	0,9998	0,984	-2,4					

Tabulka 10: Přehled koeficientů determinace (r^2) a směrnic kalibračních křivek (a) pro kalibrační křivky s reciprokou transformací os.

	POZITIVNÍ MÓD					NEGATIVNÍ MÓD				
	STANDARDNÍ kal.		MATRICOVÁ kal.		ME [%]	STANDARDNÍ kal.		MATRICOVÁ kal.		ME [%]
	r^2	a	r^2	a		r^2	a	r^2	a	
MIX 1										
PAR	0,9995	0,040	0,9952	0,044	8,5					
ACE	1,0000	0,006	0,9981	0,005	-5,3	0,9987	0,209	0,9983	0,263	25,9
MAR	0,9974	0,005	0,9988	0,005	-4,0					
SAL						0,9960	0,071	0,9868	0,042	-41,2
PRA						0,9997	0,299	0,9987	0,335	12,2
SOF	0,9986	0,018	1,0000	0,018	-4,4	0,9972	0,128	0,9999	0,121	-4,9
RIT	0,9989	0,014	0,9999	0,013	-9,1					
IBU						0,9686	0,982	0,9895	0,277	-71,8
ESTR	0,9996	0,543	0,9964	0,319	-41,3					
MIX 2										
ATE	0,9997	0,029	0,9940	0,028	-4,5					
KOF	0,9998	0,011	0,9480	0,002	-80,2					
TTC	0,9964	0,082	0,9993	0,048	-41,6					
DAC	0,9975	0,265	0,9964	0,227	-14,5	0,9996	2,838	0,9791	0,477	-21,1
TAM	1,0000	0,002	0,9996	0,002	0,0					
ATO	0,9995	0,326	0,9915	0,319	-2,1					
TEL	0,9990	0,019	0,9998	0,014	-27,4	0,9999	2,468	0,9872	0,706	-1,3
IND	0,9999	0,023	0,9995	0,024	3,5	0,9995	7,951	0,9895	0,127	-14,7
MIX 3										
TRY	0,9993	0,012	0,6394	0,000	-99,8	0,9996	0,594	0,3741	0,003	-99,8
PER	1,0000	0,010	1,0000	0,000	1,0					
RUT						0,9993	8,332	0,9982	0,150	-83,1
VAR	0,9987	0,024	1,0000	0,018	-22,1	0,9982	21,185	0,9983	0,046	18,7
HYD	0,9911	0,417	0,9813	0,107	-74,2					
PIT	0,9999	0,005	0,9998	0,005	1,9	0,9999	3,086	0,9979	0,374	3,4
DEX	0,9992	0,084	0,9958	0,072	-14,3					
ATOR	0,9996	0,010	1,0000	0,009	-8,0	0,9999	19,202	0,9991	0,059	2,4
SIM	0,9999	0,002	0,9997	0,002	-4,3					

Tabulka 11: Hodnoty maticových efektů získané post-extrakční metodou v pozitivním a negativním módu

	POZITIVNÍ MÓD							NEGATIVNÍ MÓD						
Konc. [ng/ml]	500	100	50	10	5	2	1	500	100	50	10	5	2	1
MIX 1														
PAR	-11,6	-12,0	-9,4	-14,9	-7,1									
ACE	-2,7	1,9	5,6	-2,8	6,1	6,3	15,1	-14,8	-11,1	-12,5	-18,8	-20,3		
MAR		5,0	5,1	0,1	3,2	7,8	3,5							
SAL								-2,4	4,6	10,9	51,0	67,3	347,2	
PRA								-5,1	-2,0	1,9	-10,1			
SOF	7,0	-0,3	1,4	-2,9	5,6	14,4		-5,8	-1,1	-4,0	-3,8	5,8	-36,2	-23,4
RIT	10,8	11,6	10,6	7,1	14,6	25,1	19,2							
IBU								-4,8	13,5	-0,1	90,5	255,4		
ESTR	4,9	-1,0	12,0	63,5										
MIX 2														
URA	-85,9	-88,9												
ATE	1,6	-0,7	-1,7	-0,8	5,1	-1,6	7,9							
KOF	3,0	28,7	68,5	333,1										
TTC	5,5	12,8	32,9	48,5	71,8									
DAC	9,2	22,7	26,2	41,5	14,6			-0,9	3,6	-11,4	5,7	28,5		
TAM	-0,3	7,3	8,7	-0,5	0									
ATO	9,1	2,9	3,9	-11,3	34,6									
TEL		45,7	51,3	38,6	39,9	28,7	49,1	-2,0	1,8	-4,3	9,1	0,5		
IND	0,3	-0,5	-0,2	-6,0	-3,0	3,3	9,1	1,6	5,6	-2,5	3,0	18,3		
MIX 3														
TRY	141,3	841,5	1357,2	7523,9	15112,8			167,4	989,8	1646,8				
PER	0,4	0,7	0,8	-2,1	-0,6	31,5	56,3							
RUT								-100	14,1	11,4	177,5	507,1		
VAR	33,1	36,8	24,7	20,5	29,7	40,2	29,7	-11,5	-11,8	-19,1	-15,2	-28,9	-14,9	
HYD	6,5	14,0	11,2	143,1	268,1									
PIT	-0,9	-3,5	-1,8	-2,3	-3,4	-10,0	3,5	0,7	3,0	0,5	10,1	-4,6	13,9	
DEX	6,9	0,3	0,6	-0,9	18,5									
ATOR	8,0	4,9	6,5	5,3	11,0	15,0	26,2	2,7	4,4	4,5	-3,1	-1,9	6,6	7,8
SIM		-1,8	6,9	9,1	6,8	-19,6	4,7							

5.9. Porovnání dvou metod vyhodnocení ME

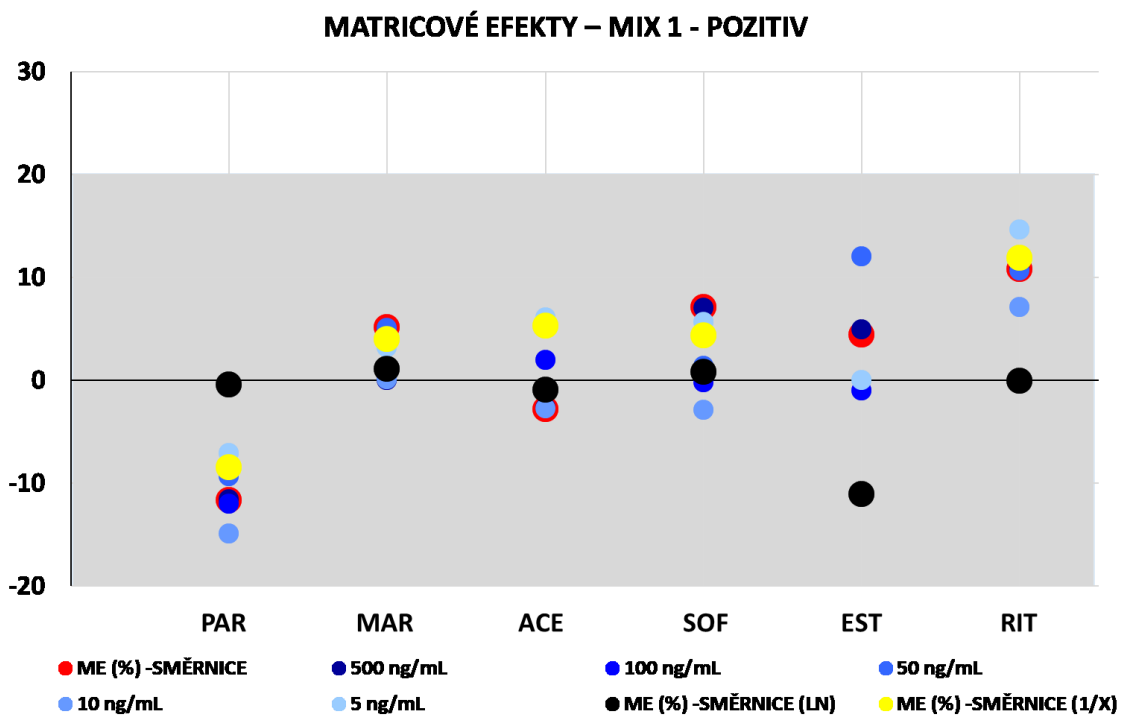
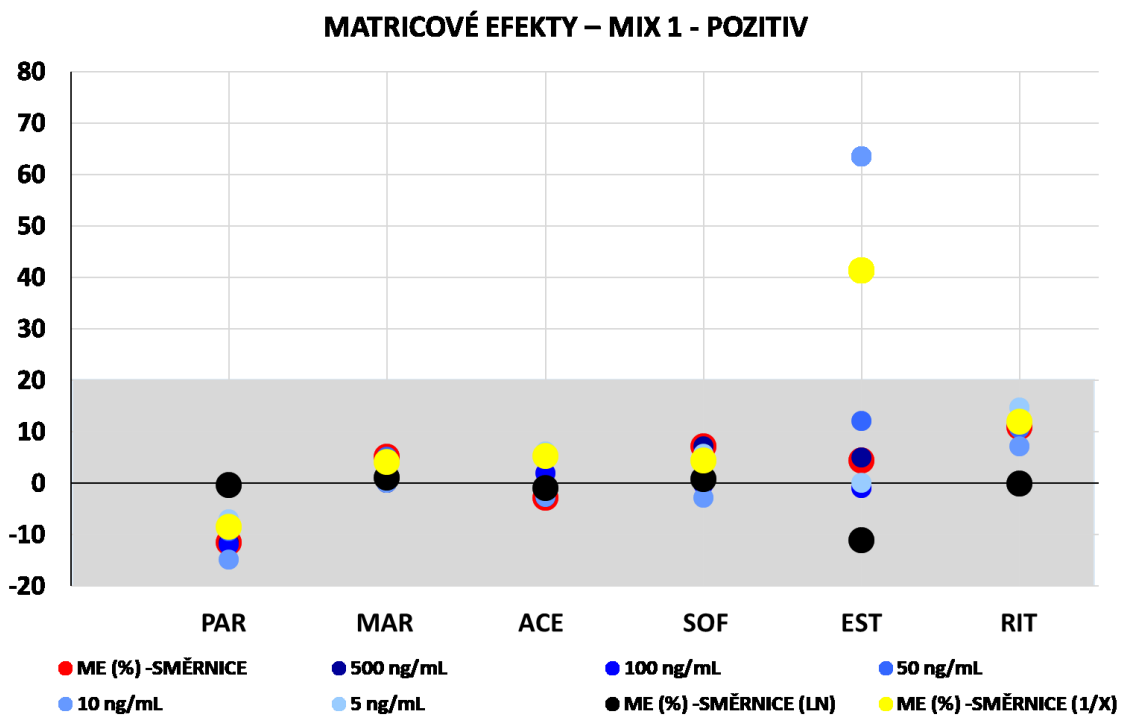
Pro porovnání obou metod vyhodnocení byly sestrojeny kalibrační křivky v rozsahu 5 – 500 ng/ml a zároveň tyto koncentrační hladiny byly použity pro porovnání pomocí druhé metody. Koncentrační hladiny 1 ng/ml a 2 ng/ml pro porovnání nebyly použity, protože pro většinu látek neposkytovaly dostatečnou citlivost. Hodnoty matricových efektů jsou pro jejich porovnání společně znázorněny v následujících grafech (Obrázek 37 – 40). Grafy jsou rozděleny zvlášť podle jednotlivých směsných roztoků (mix 1 – 3) a zvlášť pro negativní a pozitivní mód.

V případě vyhodnocení na jednotlivých koncentračních hladinách nebyl splněn požadavek $ME \leq 20 \%$ pro 9 látek v pozitivním módu a pro 4 látky v negativním módu. Nejvyšší matricové efekty byly prokázány pro tryptofan, dosahovaly až 16000 %. Příčinou tohoto efektu byla pravděpodobně koeluuující látka matrice se stejným SRM přechodem. Určil byl z grafického znázornění vyřazen z důvodu možnosti kvantifikace pouze na dvou koncentračních hladinách, kdy hodnoty matricových efektů dosahovaly okolo -80 %. Další sloučeniny, které poskytovaly vysoké matricové efekty v pozitivním módu byly kofein (až 330 %), tetracyklin (až 70 %), estron (až 60 %), telmisartan (až 50 %), hydrokortizon (až 360 %), vardenafil (až 30 %), daclatasvir (až 50 %) a atomoxetin (30 %) a v negativním módu rutin (až 500 %), ibuprofen (až 250 %), salicylová kyselina (až 50 %) a daclatasvir (až 30 %). U většiny látek je trend zvyšujících se hodnot matricových efektů se snižující se koncentrací látek, výjimkou jsou vardenafil a telmisartan jejichž hodnoty ME jsou okolo 30 a 50 % v celém rozsahu koncentrací.

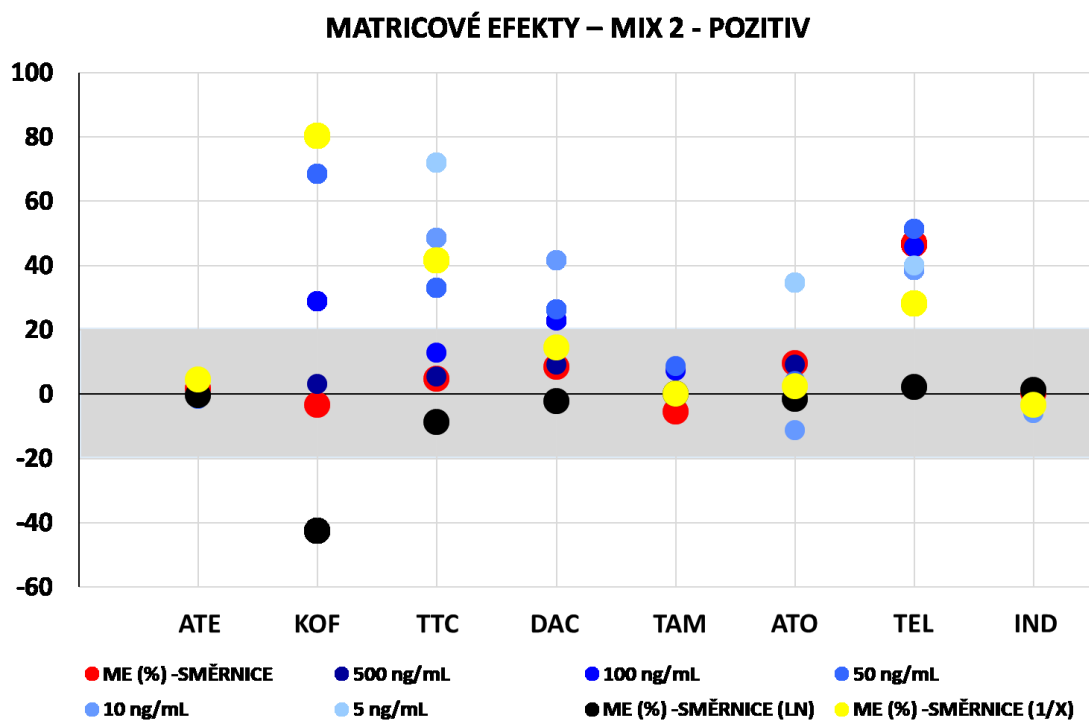
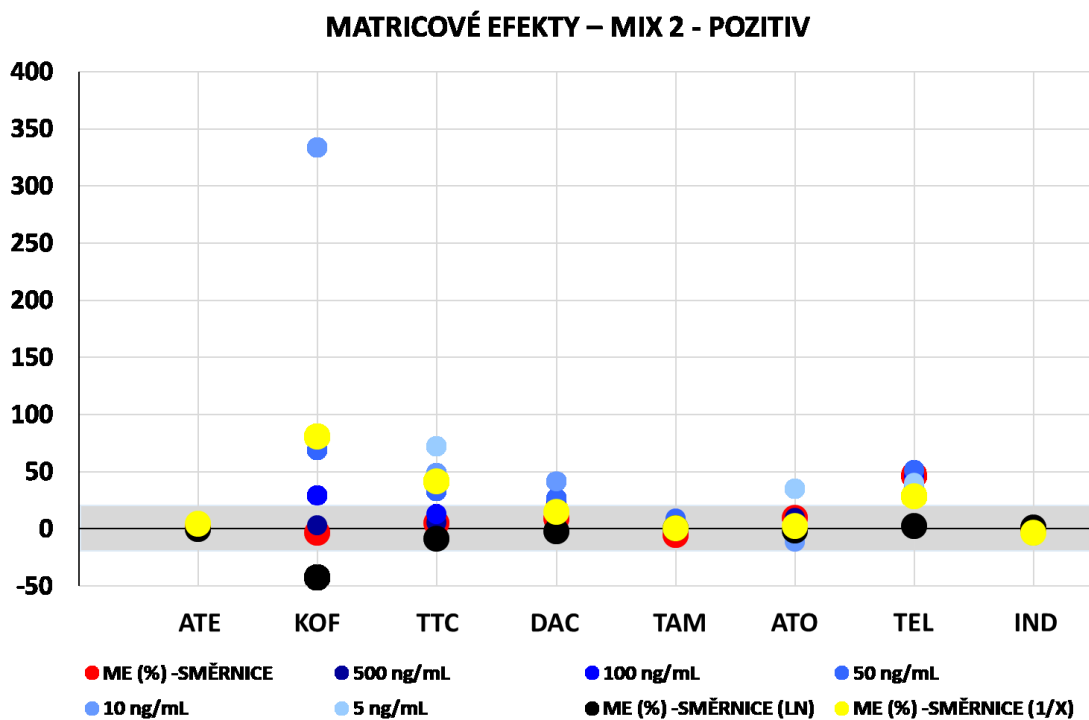
V případě metody využívající směrnice kalibračních křivek v klasickém uspořádání tedy bez transformace os byly získané výsledky zcela odlišné. Kromě dvou látek v pozitivním módu (vardenafil a telmisartan) byly matricové efekty $\leq 20 \%$. Hlavní příčinou těchto výsledků je pravděpodobně nerovnoměrný vliv jednotlivých koncentračních hladin na směrnici kalibrační křivky, a tedy nepravidelné rozmístění koncentrací na ose x. Směrnice kalibrační křivky je velmi výrazně ovlivněna hodnotami pro nejvyšší koncentrační hladinu, jejichž ME jsou ve většině případů nízké (kromě telmisartanu a vardenafilu).

Z tohoto důvodu byly tedy použity ještě transformace kalibračních křivek, které by mohly vyrovnat vliv těchto hodnot na směrnici kalibračních křivek. V případě logaritmické transformace os byly ME větší než 20 % pro 3 látky (kofein, hydrokortizon

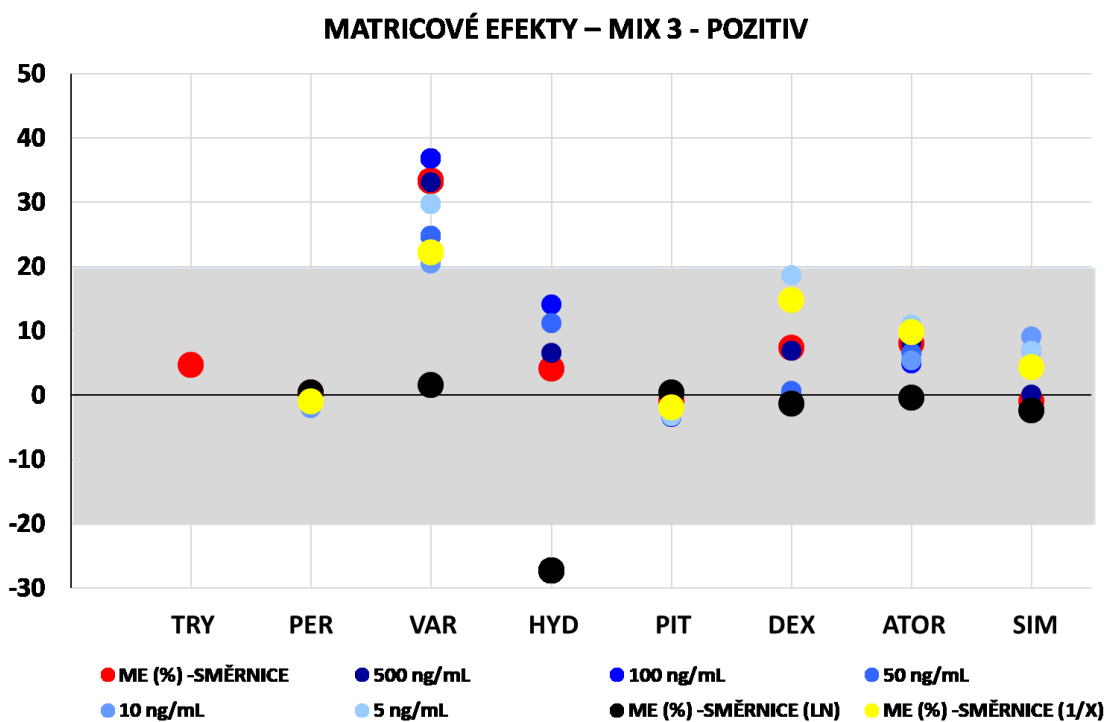
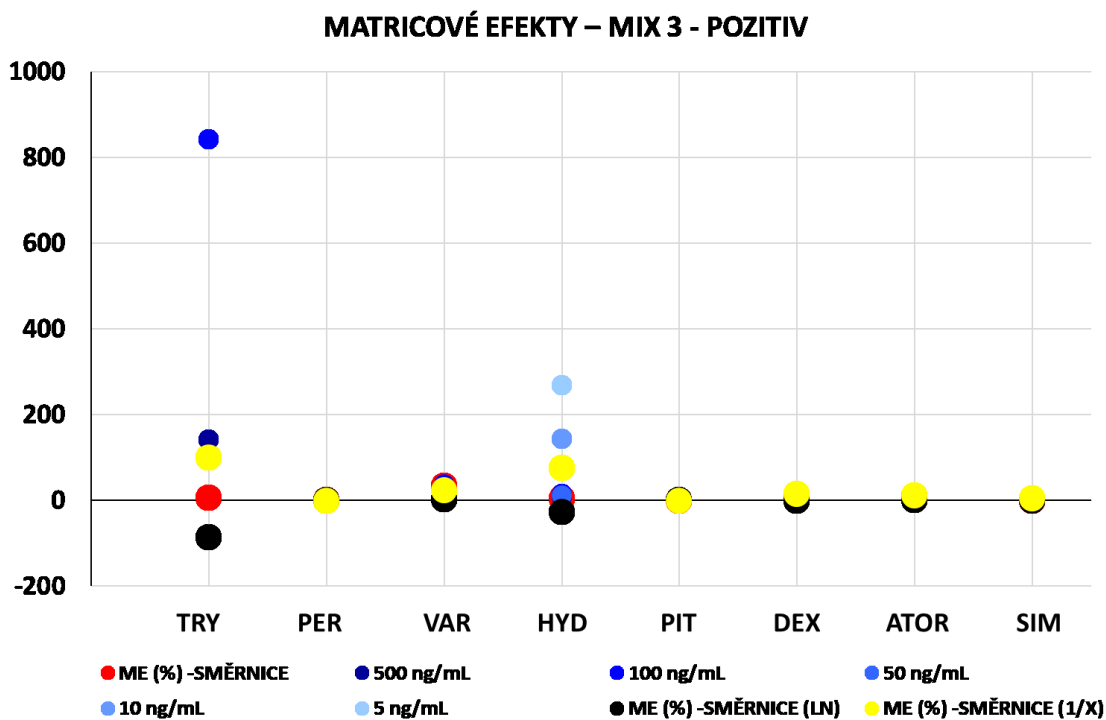
a tryptofan) v pozitivním módu a 2 látky (rutin a ibuprofen) v negativním módu. V tomto případě by bylo možné pravděpodobně dosáhnout více odpovídajících výsledků v případě vhodnější volby koncentračních hladin (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 a 512 ng/ml). Nejvíce odpovídajících výsledků bylo dosaženo při využití reciproké transformace os, kdy 7 látek mělo ME větší než 20 % v pozitivním módu a 3 látky v negativním módu. Z těchto výsledků plyne, že kromě dvou látek (daclatasvir a atorvastatin) jsou výsledky odpovídající výsledkům získaným metodou post-extrakčního přídatku.



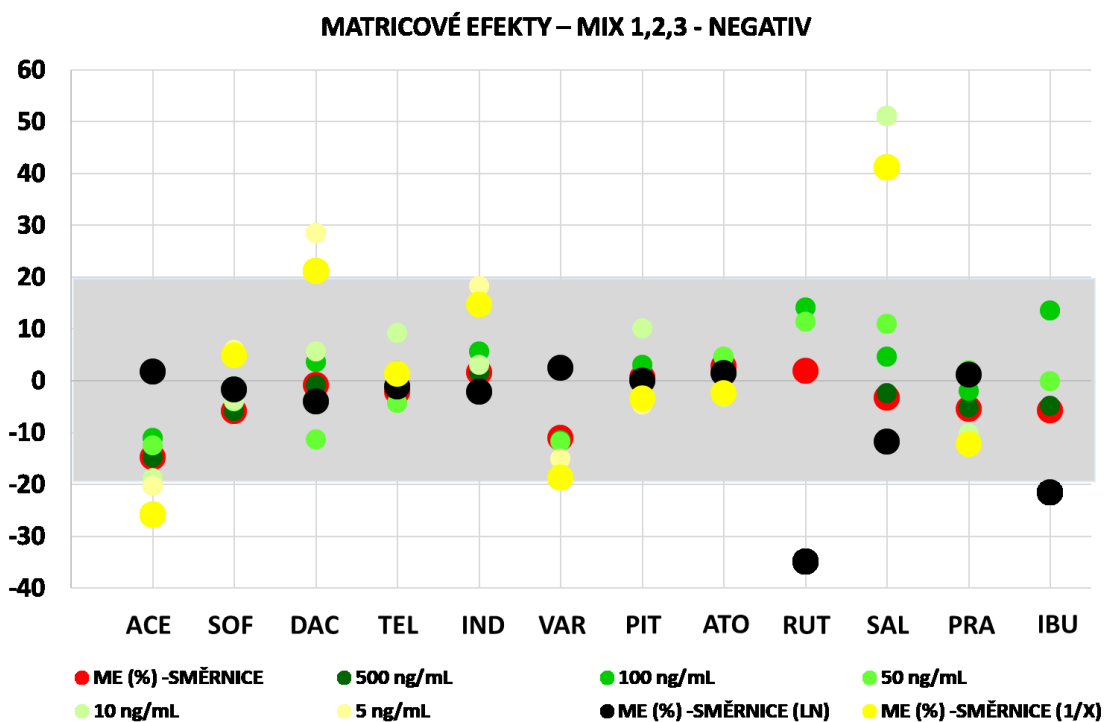
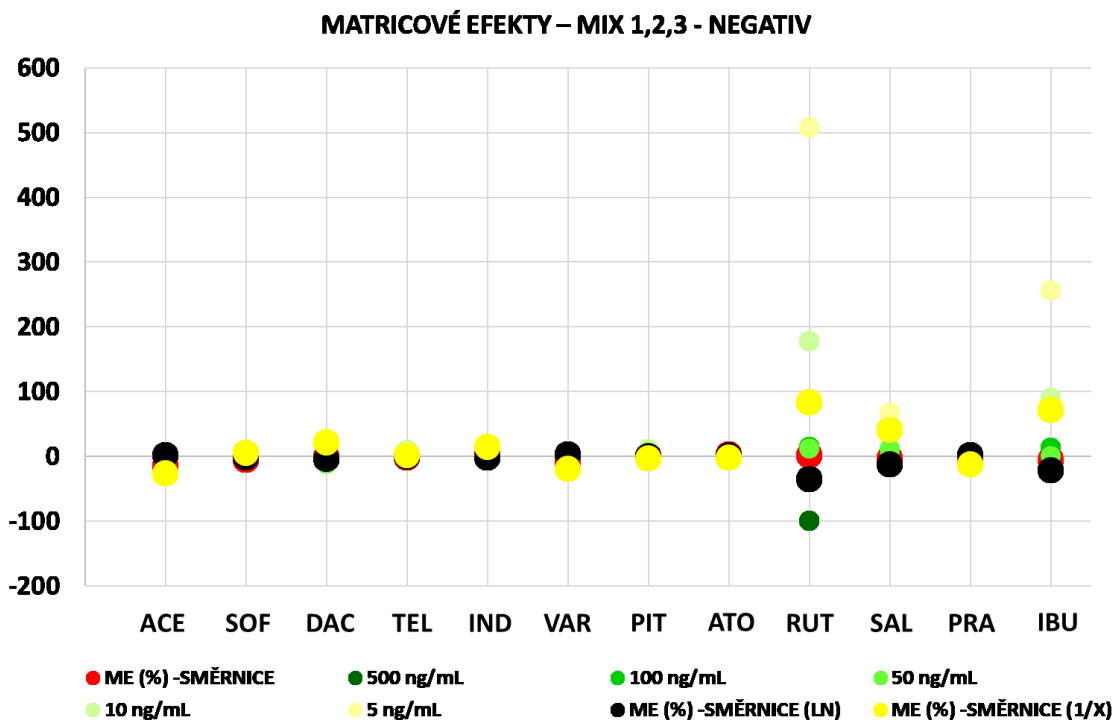
Obrázek 37: Porovnání hodnot matricových efektů získaných pomocí metody směrnice kalibračních křivek a metody post-extrakčního přidavku pro mix 1 v pozitivním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y).



Obrázek 38: Porovnání hodnot maticových efektů získaných pomocí metody směrnice kalibračních křivek a metody post-extrakčního přidavku pro mix 2 v pozitivním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y)



Obrázek 39: Porovnání hodnot matricových efektů získaných pomocí metody směrnice kalibračních křivek a metody post-extrakčního přidavku pro mix 3 v pozitivním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y).



Obrázek 40: Porovnání hodnot maticových efektů získaných pomocí metody směrnice kalibračních křivek a metody post-extrakčního přidavku pro mix 1, 2, 3 v negativním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y).

6 Závěr

V rámci diplomové práce byla vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení 28 látek. Byly zvoleny obvyklé podmínky UHPLC separace na reverzní fázi, tedy 0,1% kyselina mravenčí v kombinaci s acetonitrilem jako mobilní fáze s využitím gradientové eluce. Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie byla provedena v SRM módu. Vhodné podmínky ESI ionizace a vhodné SRM přechody společně s optimální kolizní energií byly zvoleny na základě podrobné optimalizace. Jako matrice bylo zvoleno lyofilizované sérum a jako technika úpravy vzorku proteinová precipitace.

Vyvinutá metoda byla použita k měření roztoků standardů a roztoků obohaceného lyofilizovaného séra s cílem určit matricové efekty. K jejich vyhodnocení byly použity dvě základní metody umožňující jejich kvantifikaci: metoda využívající porovnání směrníc kalibračních křivek a metoda post-extrakčního přídatku. Shrnutí je znázorněné v Tabulce 12. Na základě získaných výsledků matricových efektů oběma metodami vyhodnocení lze konstatovat, že nebylo dosaženo porovnatelných výsledků. Zatímco metoda post-extrakčního přídatku vede k jednoznačným a správným výsledkům, metoda využívající směrníc kalibračních křivek poskytuje často variabilní a zkreslené hodnoty. Hodnoty směrníc a s tím související hodnoty matricových efektů jsou vysoce závislé na rozložení koncentračních hladin v kalibračním rozsahu a zároveň na použité transformaci os kalibračních křivek. V případě sestrojení kalibračních křivek bez jakékoli transformace os bylo dosaženo velmi nízkých matricových efektů, nicméně tyto hodnoty byly falešné a nesprávné. Jelikož kalibrační rozsah je relativně široký, není možné dosáhnout pravidelného rozmístění bodů, a tudíž jsou výsledky velmi významně ovlivněny vysokými koncentračními hladinami. V případě využití logaritmické transformace os bylo dosaženo správnějších výsledků, nicméně je třeba brát v úvahu pravidelné rozmístění bodu na ose x, a proto velmi pečlivě volit koncentrační hladiny. V tomto případě by pravděpodobně bylo vhodné využít hladiny násobku dvou, tedy (2, 4, 8, 16, ..., 512 ng/ml). Nejsprávnějších a nejvíce odpovídajících výsledků bylo dosaženo pomocí reciproké transformace, kdy jednotlivé hodnoty matricových efektů nejvíce odpovídaly metodě post-extrakčního přídatku (Tabulka 12).

Závěrem by mohlo být doporučení používat metodu post-extrakčního přídatku pro vyhodnocení matricových efektů a pouze v případě, že daná metoda nelze použít, aplikovat metodu porovnání směrníc. Ačkoli její přesné provedení není v žádných

směrnících přesně definováno, pro získání relevantních výsledků je třeba dbát na správný výběr kalibračních koncentračních hladin a zároveň vhodně zvolit transformaci os při sestrojování kalibračních křivek.

Tabulka 12: Souhrn výsledků matricových efektů získaných pomocí obou metod. Zeleně zbarvené pole znázorňuje splnění požadavku ME menší než 20 %, červeně zbarvené pole nesplnění tohoto požadavku.

	Pozitivní mód				Negativní mód			
	METODA 1	METODA 2			METODA 1	METODA 2		
	souhrn	bez	ln	1/x	souhrn	bez	ln	1/x
MIX 1								
PAR								
ACE								
MAR								
SAL								
PRA								
SOF								
RIT								
IBU								
ESTR								
MIX 2								
ATE								
KOF								
TTC								
DAC								
TAM								
ATO								
TEL								
IND								
MIX 3								
TRY								
PER								
RUT								
VAR								
HYD								
PIT								
DEX								
ATOR								
SIM								

7 Seznam použité literatury

- [1] V. G. ZAIKIN. Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 66 (2011) 1205 - 1209
- [2] R. KOSTIANEN, T. KOTIAHO, T. KUURANNE, S. AURIOLA. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal of Mass Spectrometry* 38 (2003) 357 - 372
- [3] H. KOČOVÁ VLČKOVÁ. Ionizační techniky za atmosférického tlaku. [přednáška]. Hradec Králové: Hmotnostní spektrometrie, 20. 10. 2017
- [4] C. S. HO, C. W. K. LAM, M. H. M. CHAN, et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The Clinical Biochemist Reviews* 24 (2003) 3 – 12
- [5] S. BANERJEE, S. MAZUMDAR. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Internal Journal of Analytical Chemistry* (2012) 1 - 40
- [6] H. STAHNKE, S. KITTLAUS, G. KEMPE, CH. HEMMERLING, L. ALDER. The influence of electrospray ion source design on matrix effects. *Journal of Mass Spectrometry* 47 (2012) 875 – 884
- [7] W. C. Byrdwell. Mass Spectrometry for Analysis of Lipids. *Lipids* 36 (2001) 327 – 346
- [8] B. A. THOMSON. Atmospheric Pressure Ionization and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry – Together at Last. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. (1998) 187 – 193
- [9] C. F. POOLE. Spectroscopic Detectors for Identification and Quantification. *The Essence of Chromatography* (2003) 719 – 792
- [10] Waters Corporation, Atmospheric Pressure Ionization Sources: Their Use and Applicability. (2017)
- [11] T. J. KAUPPILA, T. KOTIAHO, R. KOSTIAINEN, A. P. BRUINS. Negative Ion-Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, (2004) 203 – 211
- [12] P. J. TAYLOR. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328 – 334

- [13] H. MEI, Y. HSIEH, C. NARDO, X. XU, et al. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Communication in Mass spectrometry* 17 (2003) 97-103
- [14] L. NOVÁKOVÁ. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A* 1292 (2013) 25 - 37
- [15] A. VAN EECKHAUT, K. LANCKMANS, S. SARRE, I. SMOLDERS, et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 2198 - 2207
- [16] A. CAPIELLO, G. FAMIGLINI, P. PALMA, H. TRUFELLI. Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 33 (2010) 1067 - 1081
- [17] B. K. MATUSZEWSKI, M. L. CONSTANZER, C. M. CHAVEZ-ENG. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3019 – 3030
- [18] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. *Guidance, Compliance, & Regulatory Information – Drugs* (2018) Dostupné z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> [23.12.2018]
- [19] J. SMERAGLIA, S. F. BALDREY, D. WATSON. Matrix Effects and Selectivity Issues in LC-MS-MS. *Chromatographia* (Suppl 1) 55 (2002) S95 - S99
- [20] A. K. HEWAVITHARANA, S. K. TAN, P. N. SHAW. Strategies for the Detection and Elimination of Matrix Effects in Quantitative LC-MS Analysis. *LCGC North America* volume 32 number 1 (2014) 54 - 64
- [21] R. DAMS, M. A. HUESTIS, W. E. LAMBERT, C. M. MURPHY. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 14 (2003) 1290 – 1294
- [22] A. PERIAT, I. KOHLER, A. THOMAS, R. NICOLI, et al. Systematic evaluation of matrix effects in hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1439 (2016) 42 - 53

- [23] V. DESFONTAINE, F. CAPETTI, R. NICOLI, T. KUURANNE, et al. Systematic evaluation of matrix effects in supercritical fluid chromatography versus liquid chromatography coupled to mass spectrometry for biological samples. *Journal of Chromatography B* 1079 (2018) 56 – 61
- [24] O. A. ISMAIEL, T. ZHANG, R. G. JENKINS, H. T. KARNES. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 878 (2010) 3303 - 3316
- [25] N. FANG, S. YU, M. JJ RONIS, T. M BADGER. Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. *Experimental Biology and Medicine* 240 (2015) 488 - 497
- [26] E. KLAPKOVÁ, R. UŘINOVSÁ, R. PRŮŠA. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klinická biochemie a metabolismus* 19 (40) (2011) 5 - 8
- [27] T. BENIJTS, R. DAMS, W. LAMBERT, A. DE LEENHEER. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *Journal of Chromatography A* 1029 (2004) 153 - 159
- [28] N. B. CECH, C. G. ENKE. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* 20 (2001) 362 - 387
- [29] J. PENG, F. TANG, R. ZHOU, X. XIE, et al. New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 6 (2016) 540 – 551
- [30] P. L. KOLE, G. VENKATESH, J. KOTTECHA, R. SHESHALA. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography* 25 (2011) 199 – 217
- [31] L. SILVESTRO, I. TARCOMNICU, S. R. SAVU. Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods - Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects. In: COELHO A. V., FRANCO C. F. *Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization*. Rijeka: InTech Publisher, 2013. 3 – 37

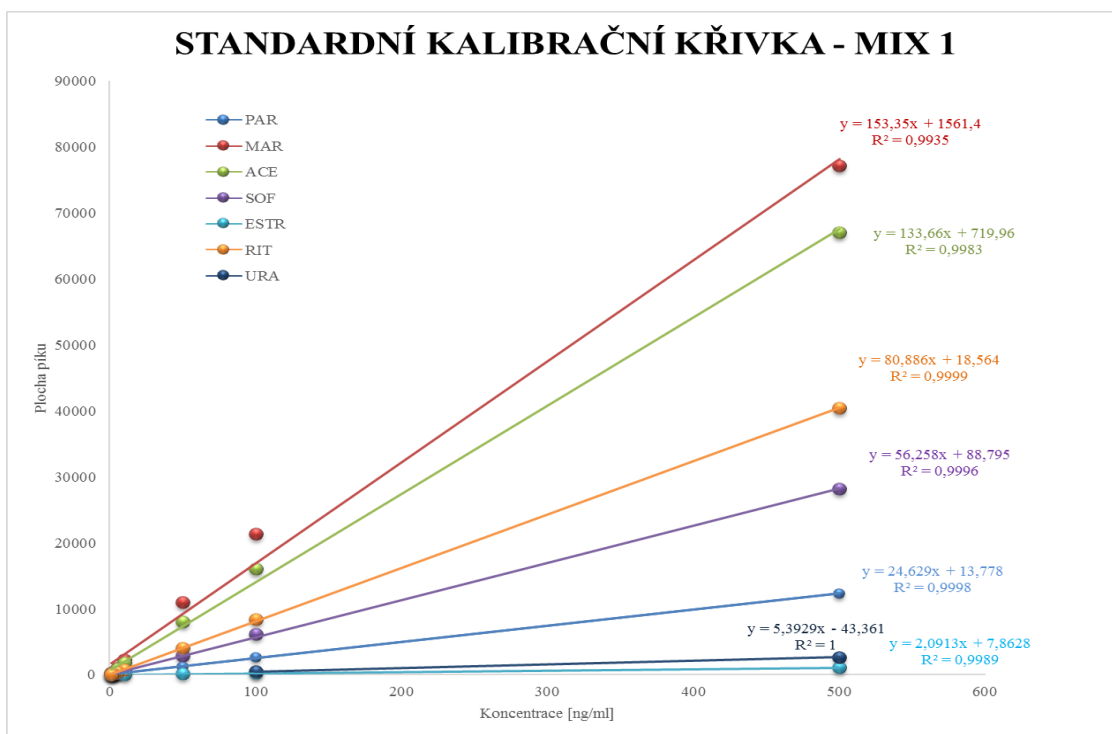
- [32] P. PANUWET, R. E. HUNTER Jr., P. E. D'SOUZA, X. CHEN, et al. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46 (2016) 93 - 105
- [33] J. PENG, F. TANG, R. ZHOU, X. XIE, et al., New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2016) 540 - 551
- [34] E. CHAMBERS, D. WAGROWSKI-DIEHL, Z. LU, J. MAZZEO, et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B* 852 (2007) 22 – 34
- [35] V. DESFONTAINE, F. CAPETTI, R. NICOLI, T. KUURANNE, et al. Systematic evaluation of matrix effects in supercritical fluid chromatography versus liquid chromatography coupled to mass spectrometry for biological samples. *Journal of Chromatography B* 1079 (2018) 56 – 61
- [36] L. SILVESTRO, I. TARCOMNICU, S. R. SAVU. Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods - Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects. In: COELHO A. V., FRANCO C. F. *Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization*. Rijeka: InTech Publisher, 2013. 3 - 37
- [37] A. K. HEWAVITHARANA. Matrix matching in liquid chromatography-mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards-Is it necessary? *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 359 - 361
- [38] P. PANUWET, R. E. HUNTER Jr., P. E. D'SOUZA, X. CHEN, et al. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46 (2016) 93 - 105
- [39] H. TRUFELLI, P. PALMA, G. FAMIGLINI, A. CAPPIELLO. An Overview of matrix effects in liquid chromatography – mass spectrometry. *Mass Spectrometry reviews* 30 (2011) 491 – 509
- [40] F. GOSETTI, E. MAZZUCCO, D. ZAMPIERI, M. C. GENNARO. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3929 – 3937

- [41] European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on Bioanalytical Method Validation. *Quality guidelines* (2011) Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation> [23.12.2018]

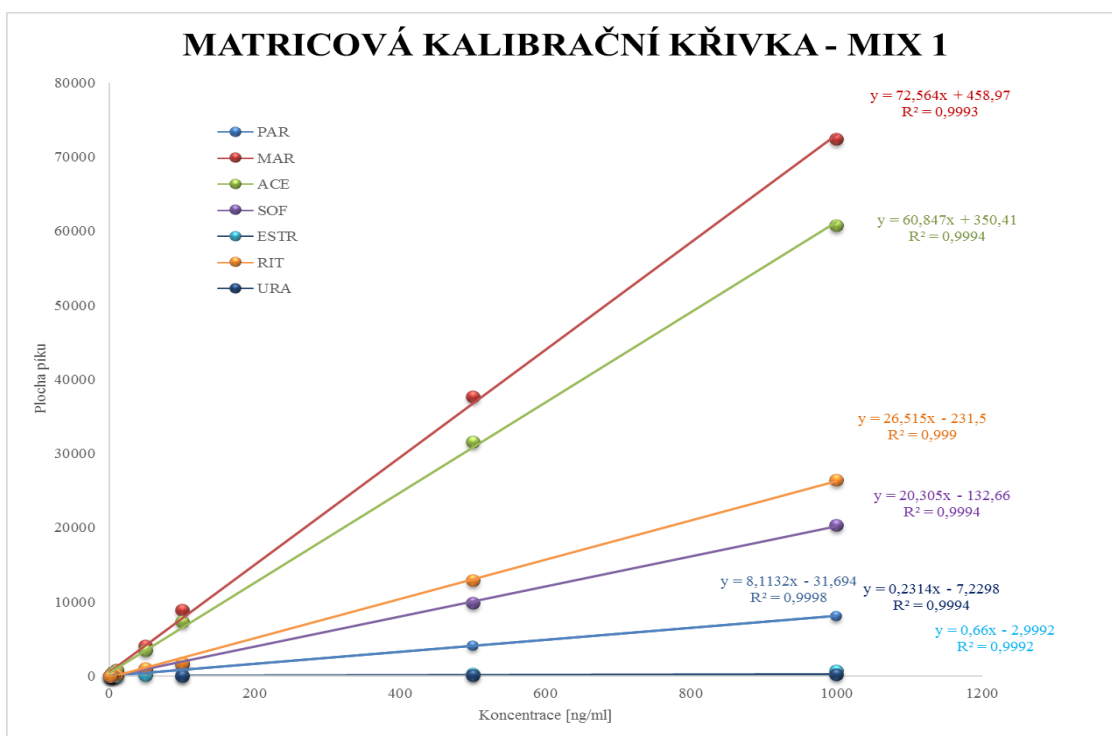
8 Přílohy

Příloha A: Kalibrační křivky	66
------------------------------------	----

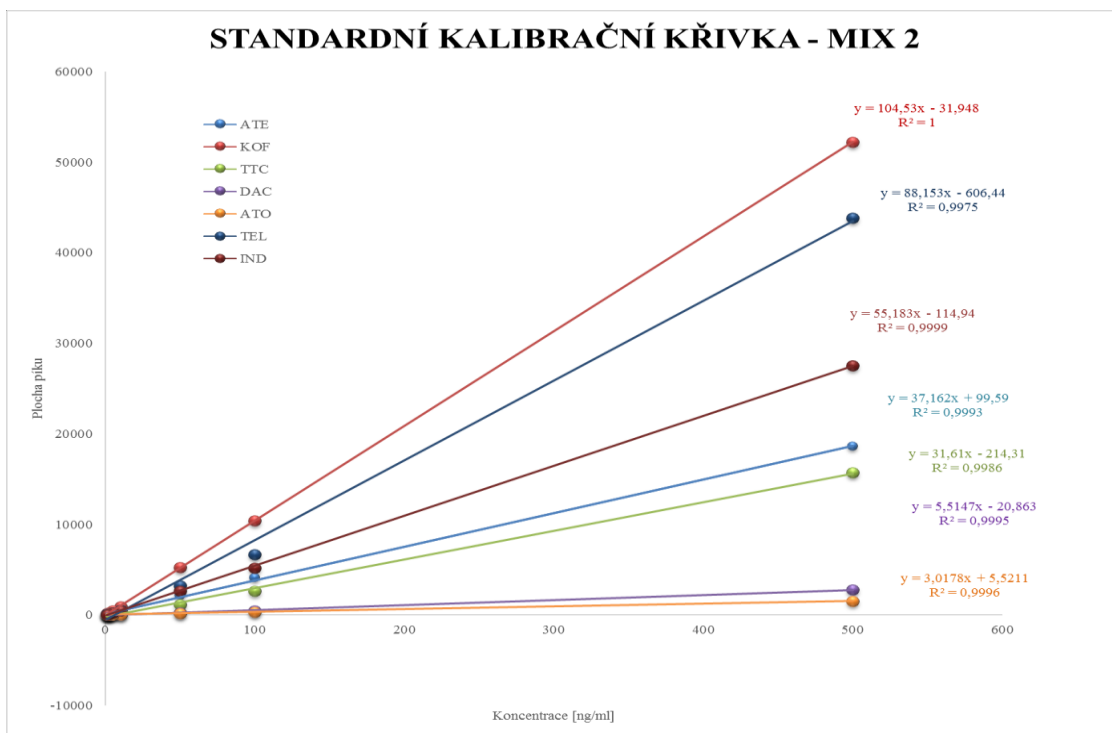
Příloha A: Kalibrační křivky



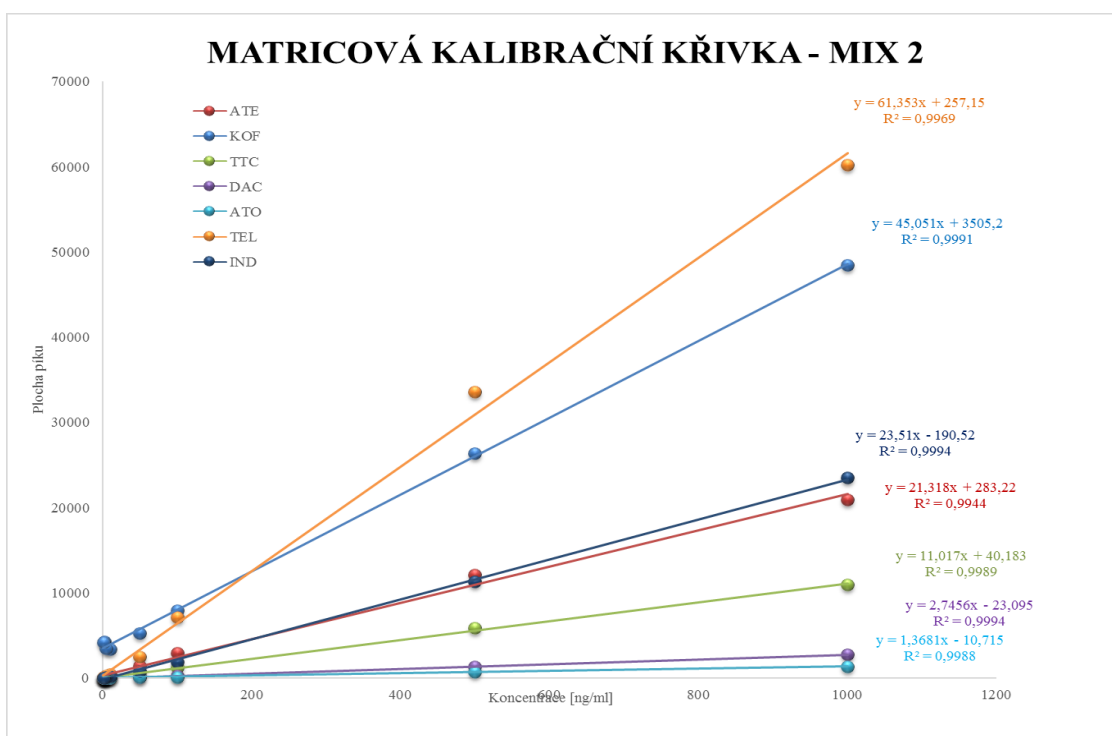
Standardní kalibrační křivka pro mix 1 v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



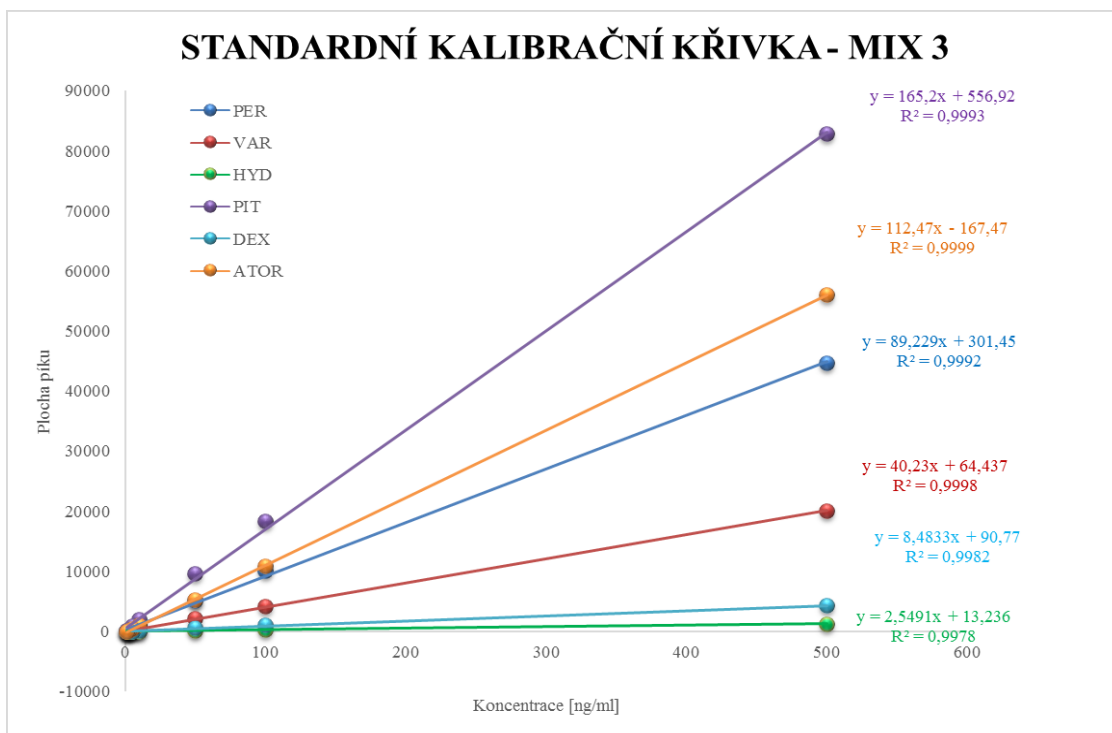
Matricová kalibrační křivka pro mix 1 v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



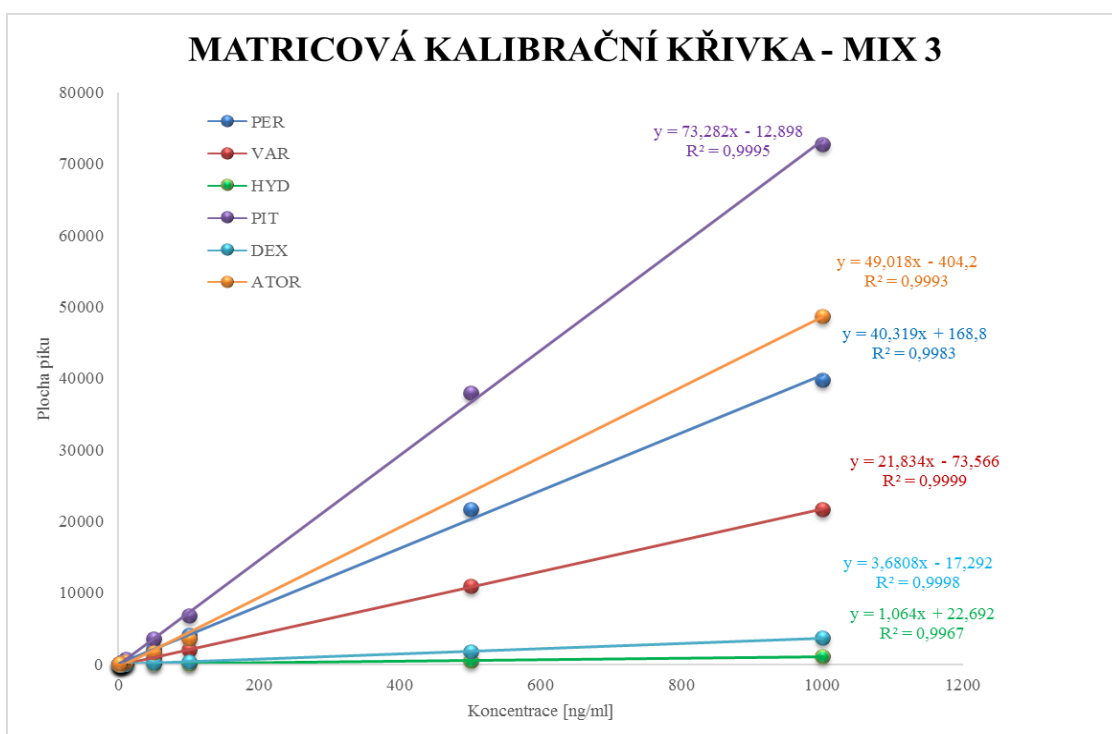
Standardní kalibrační křivka pro mix 2 v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



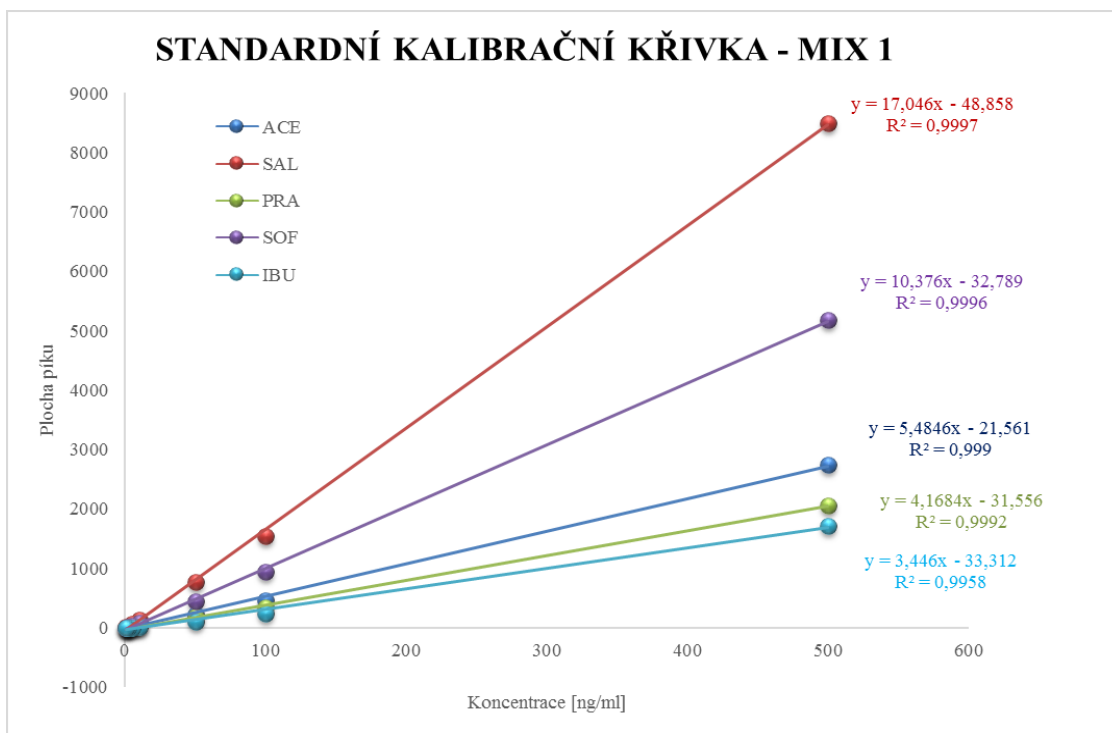
Matricová kalibrační křivka pro mix 2 v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



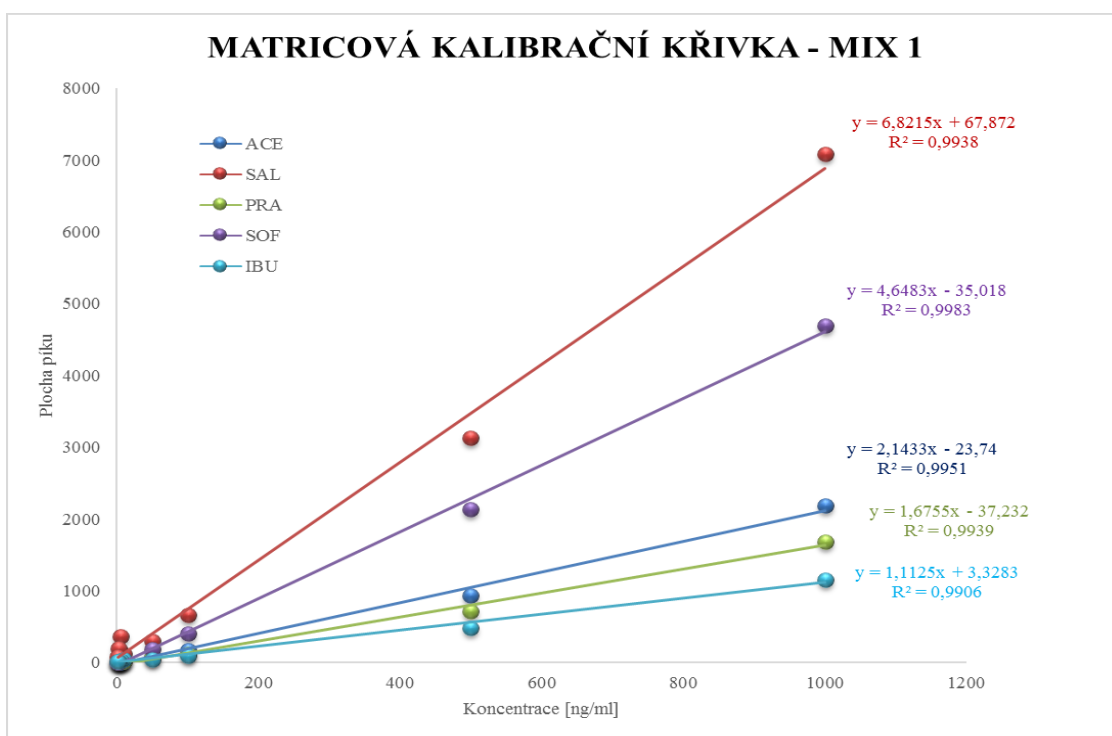
Standardní kalibrační křivka pro mix 3 v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



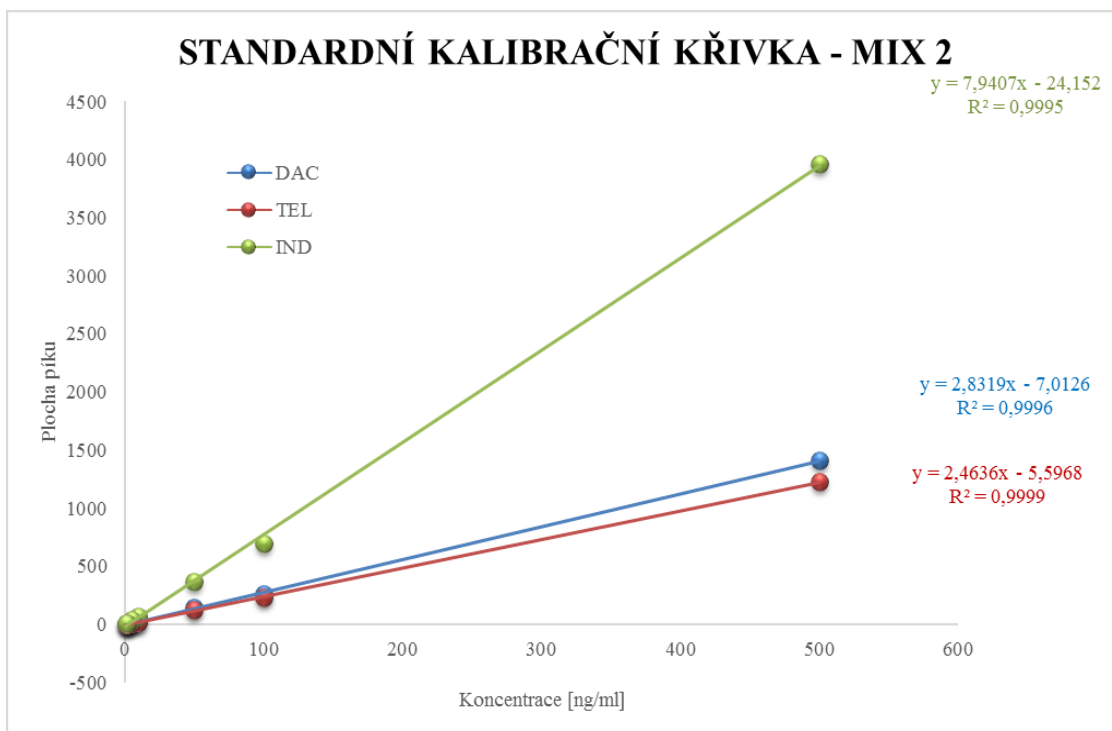
Matricová kalibrační křivka pro mix 3 v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



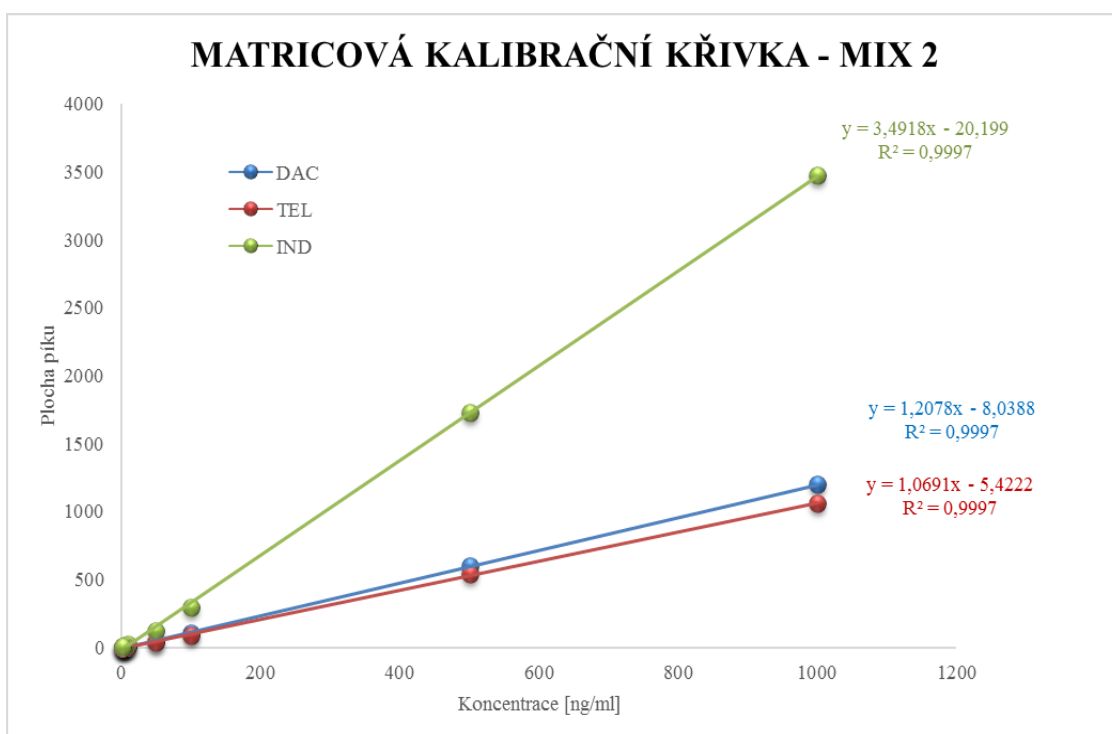
Standardní kalibrační křivka pro mix 1 v negativním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



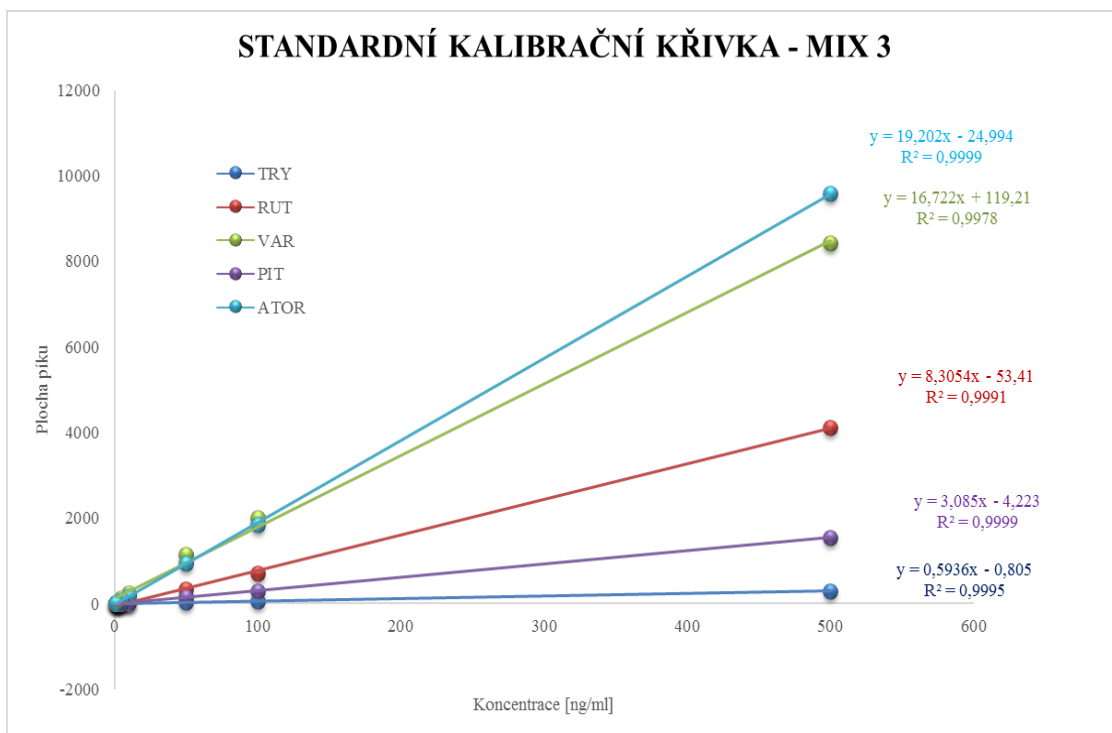
Matricová kalibrační křivka pro mix 1 v negativním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



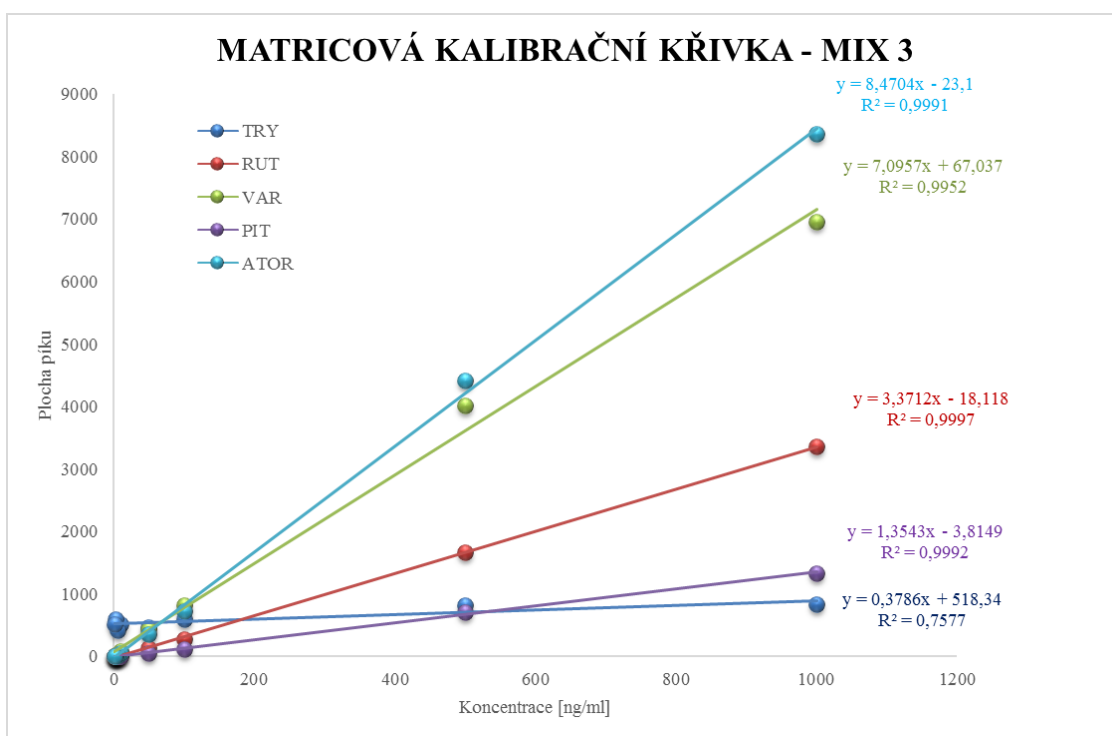
Standardní kalibrační křivka pro mix 2 v negativním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



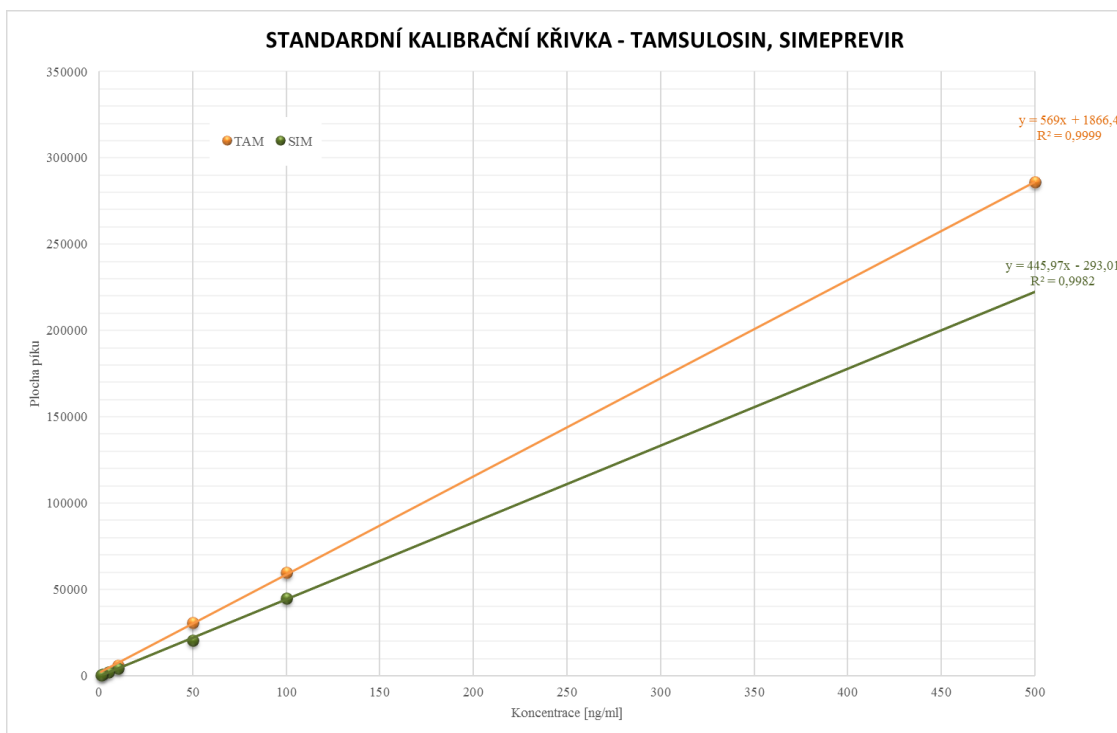
Matricová kalibrační křivka pro mix 2 v negativním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



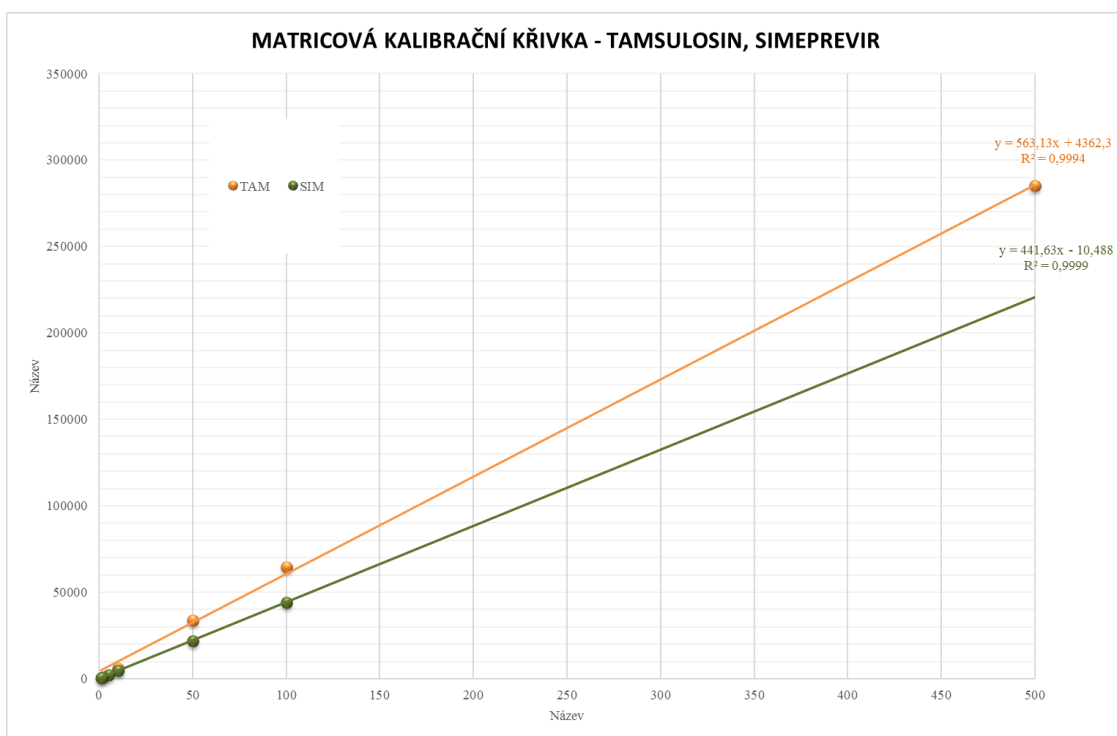
Standardní kalibrační křivka pro mix 3 v negativním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



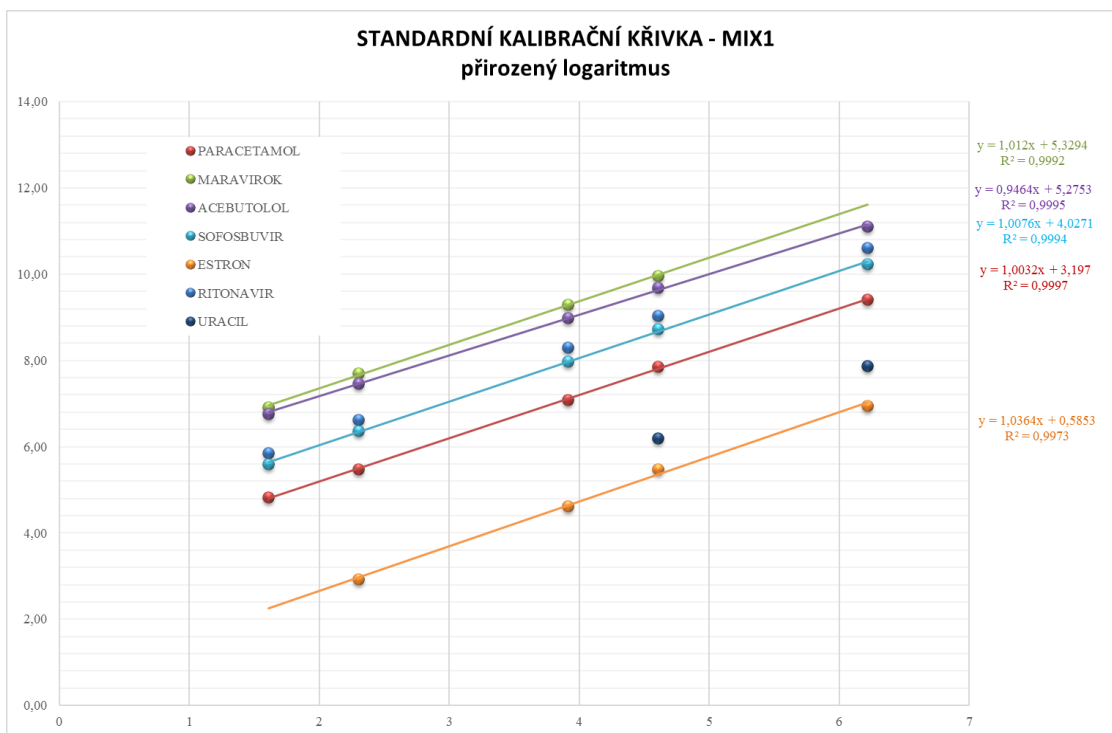
Matricová kalibrační křivka pro mix 3 v negativním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



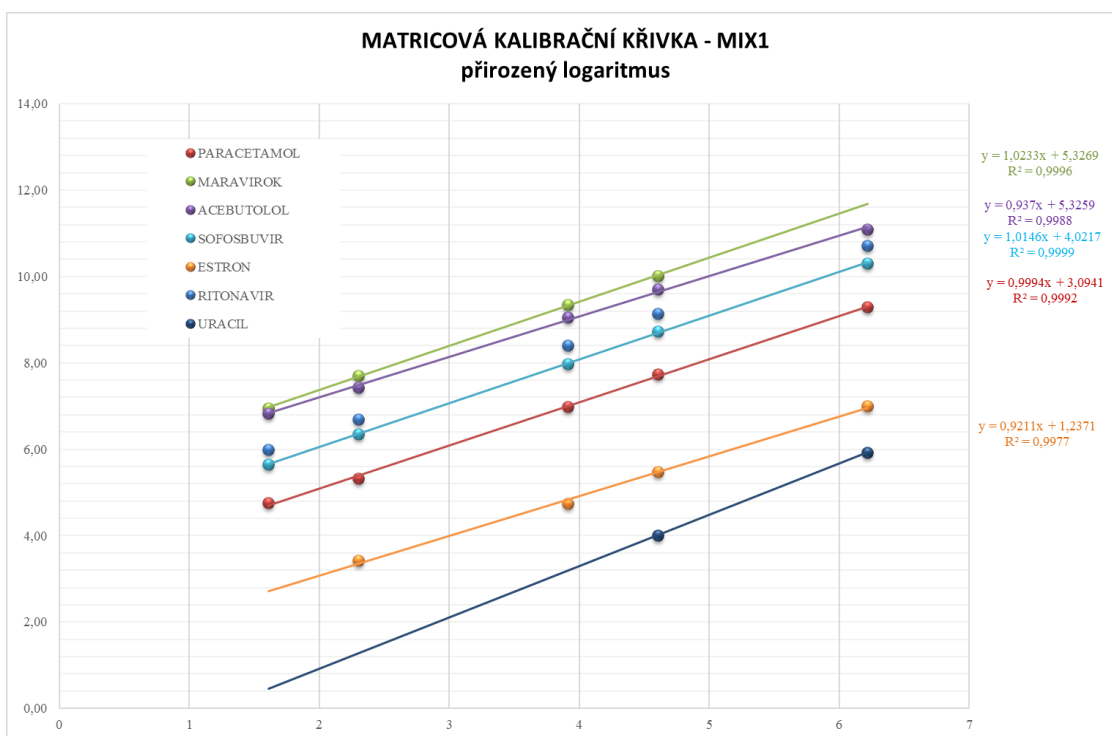
Standardní kalibrační křivka pro tamsulosin a simeprevir v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



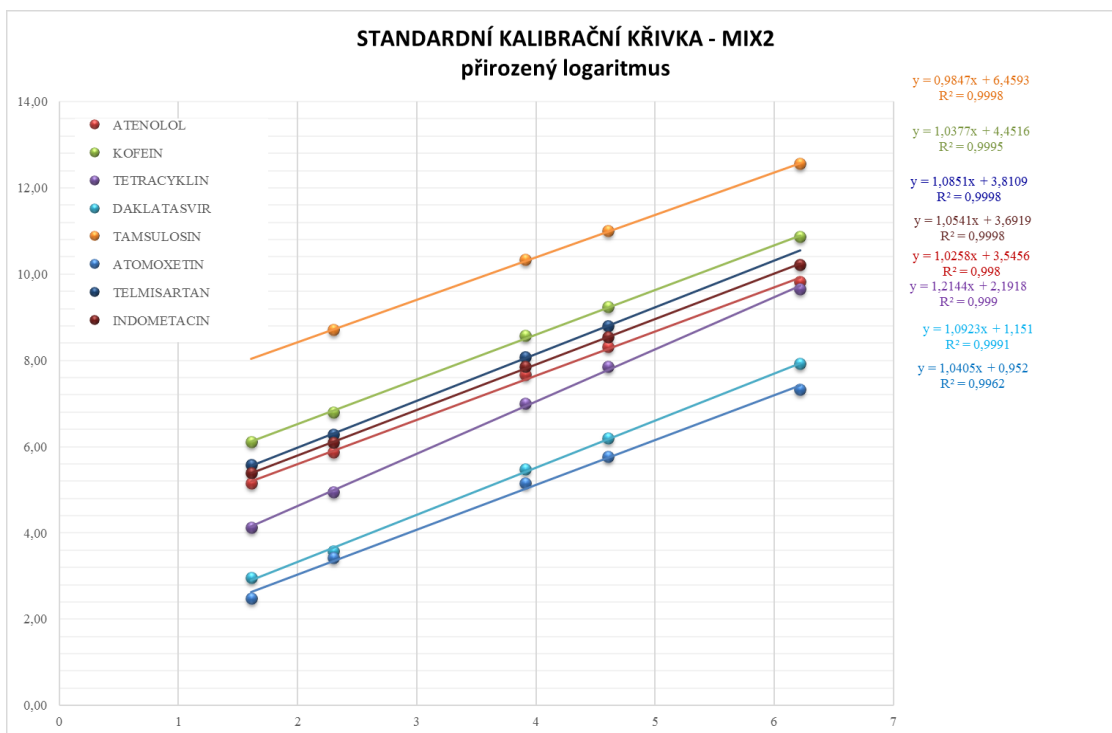
Matricová kalibrační křivka pro tamsulosin a simeprevir v pozitivním ionizačním módu s použitím normálního měřítka



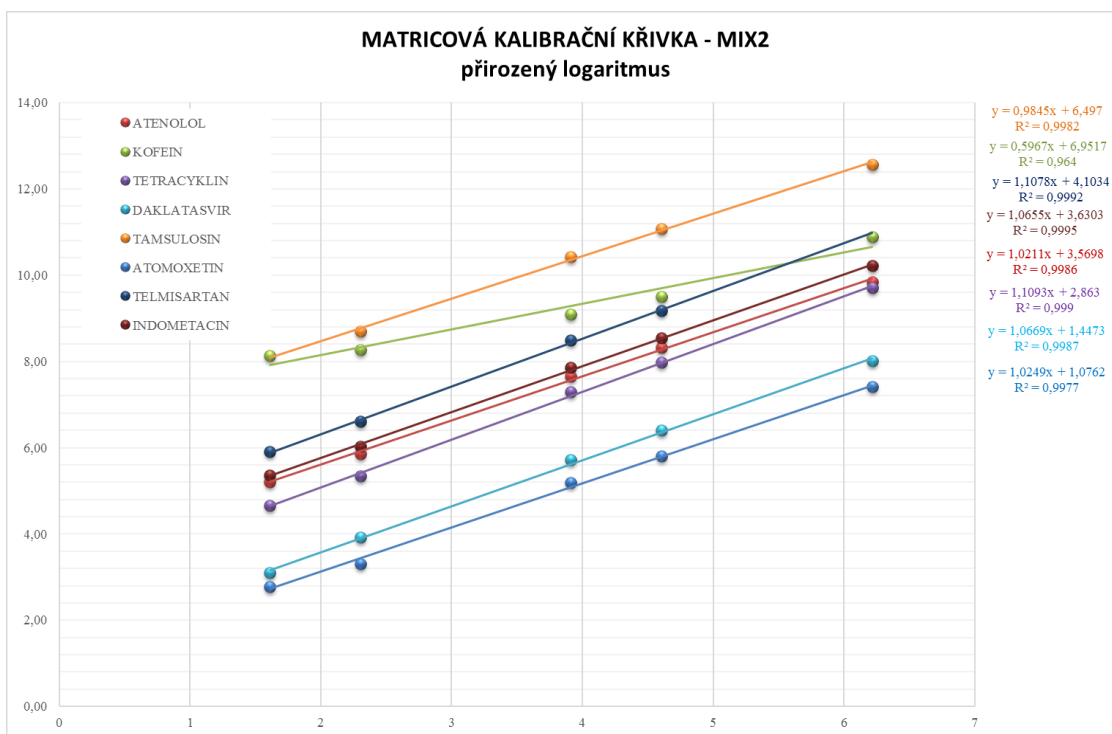
Standardní kalibrační křivka pro mix 1 v pozitivním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítka grafu



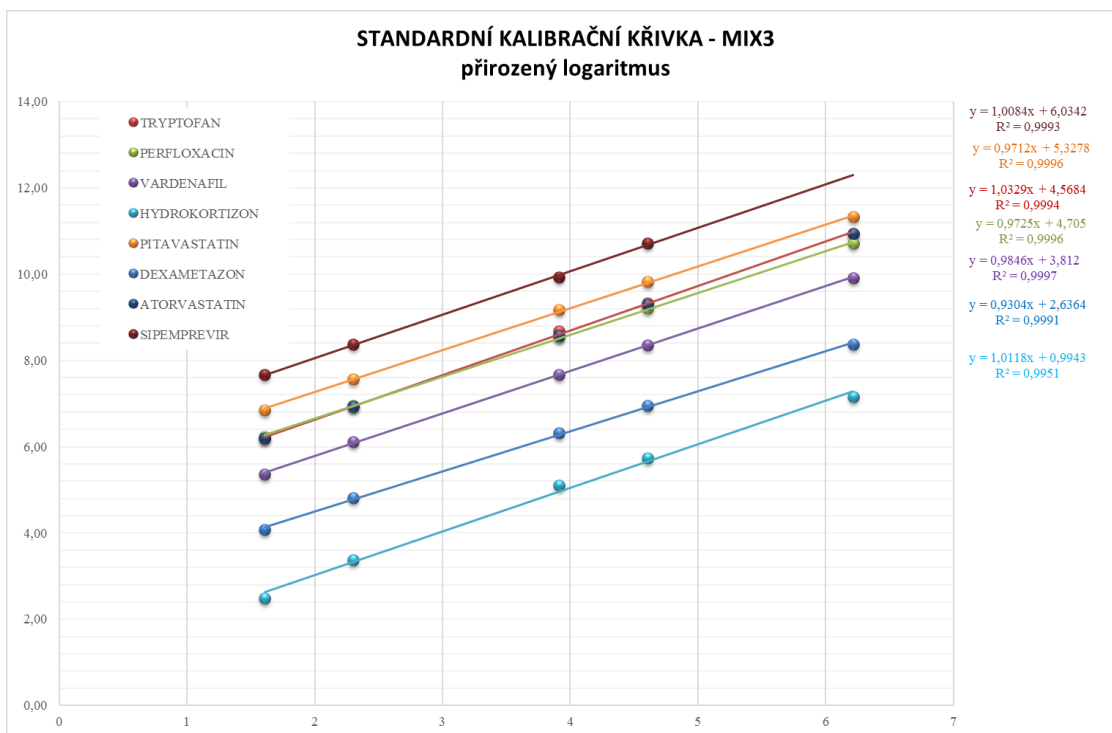
Matricová kalibrační křivka pro mix 1 v pozitivním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítka grafu



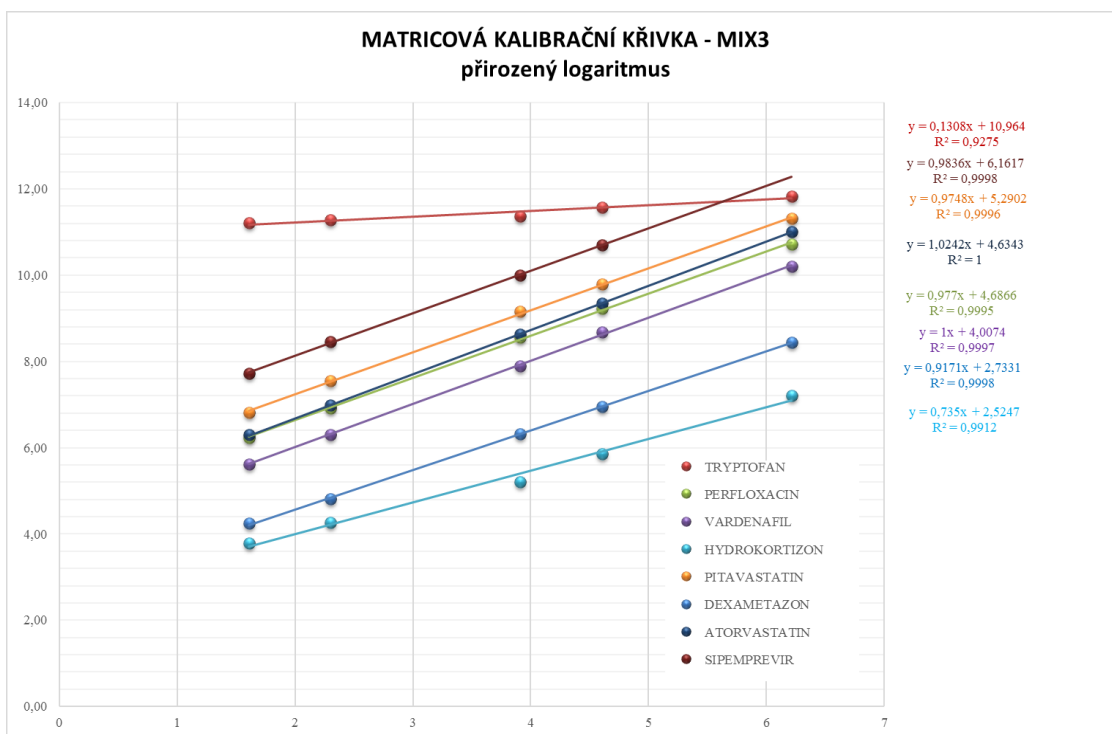
Standardní kalibrační křivka pro mix 2 v pozitivním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítka grafu



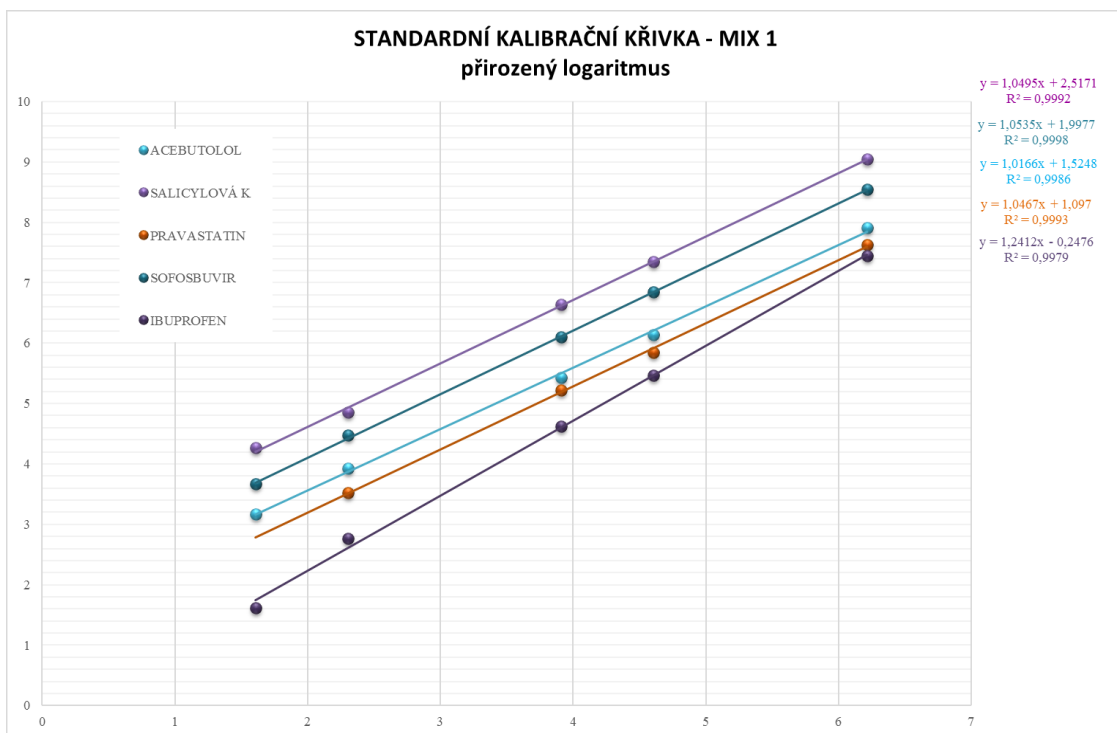
Matricová kalibrační křivka pro mix 2 v pozitivním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítka grafu



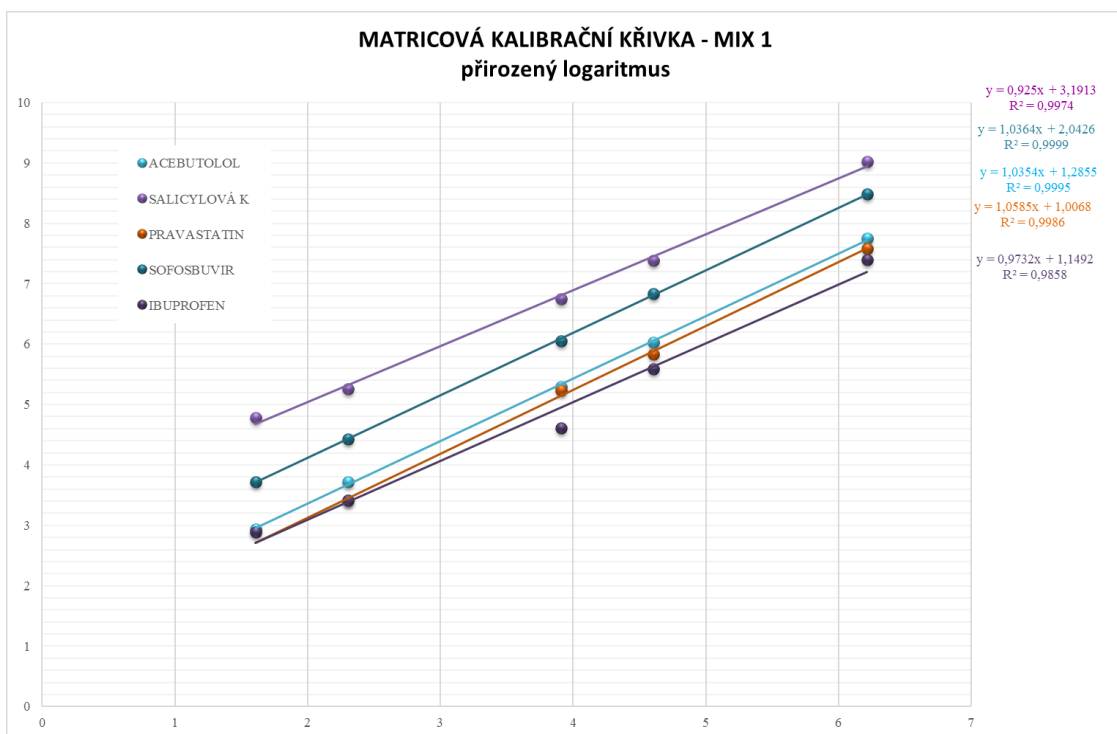
Standardní kalibrační křivka pro mix 3 v pozitivním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítko grafu



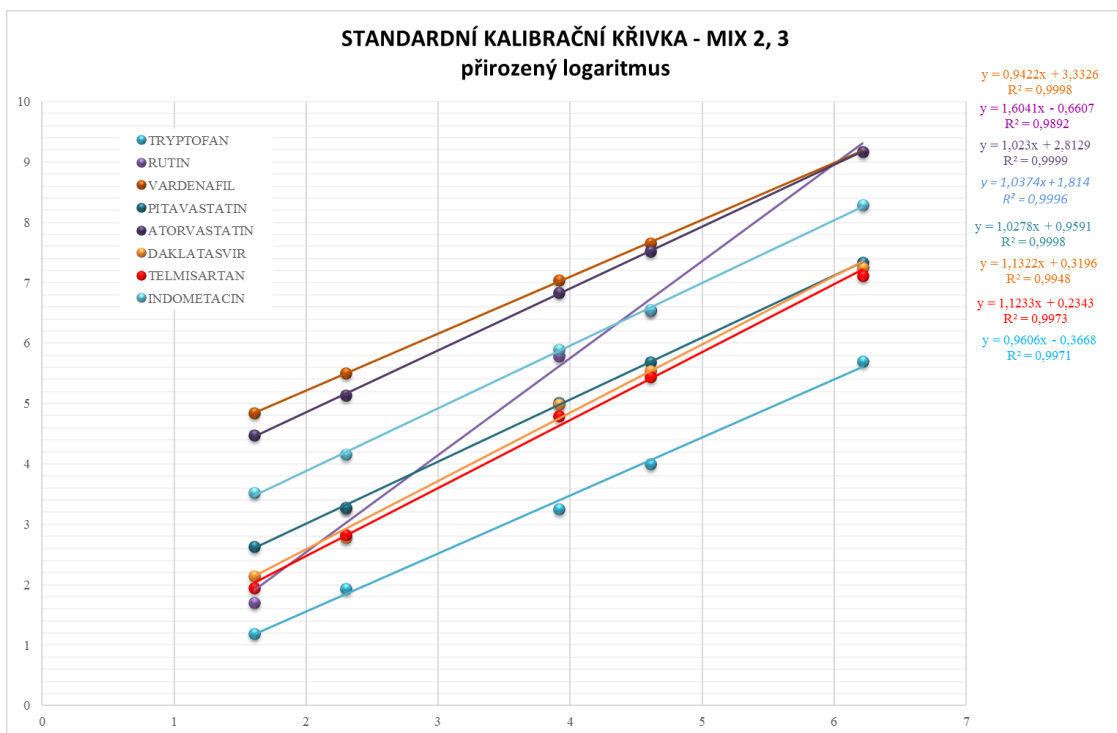
Matricová kalibrační křivka pro mix 3 v pozitivním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítko grafu



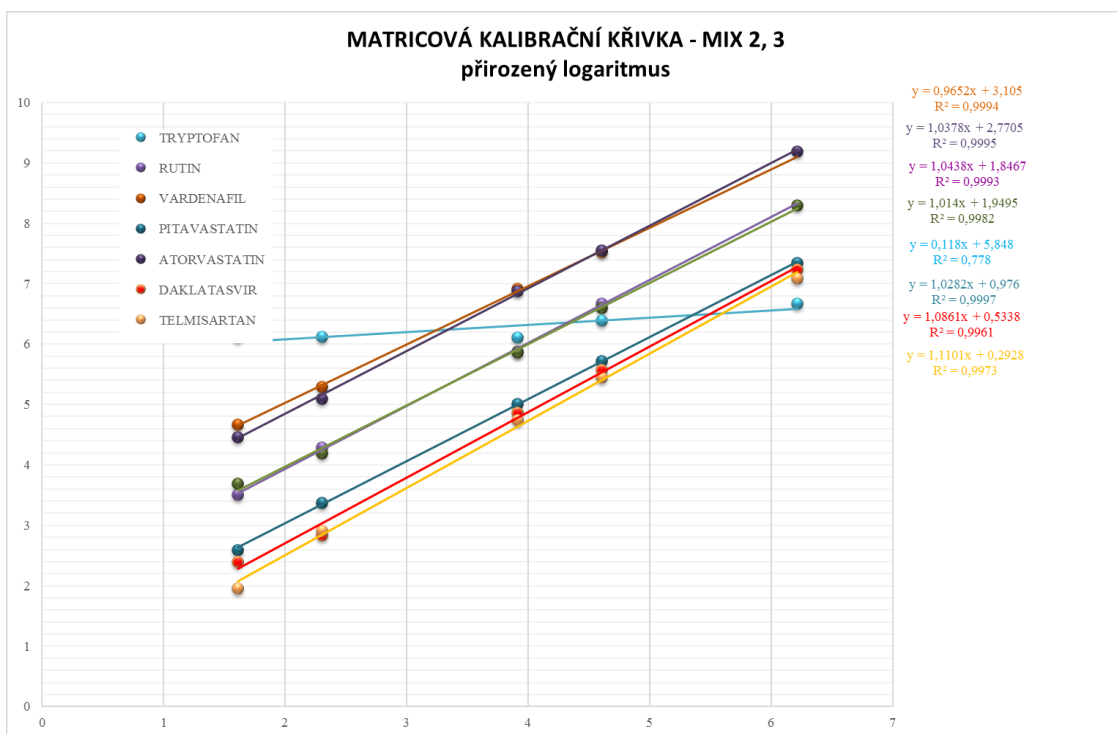
Standardní kalibrační křivka pro mix 1 v negativním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítko grafu



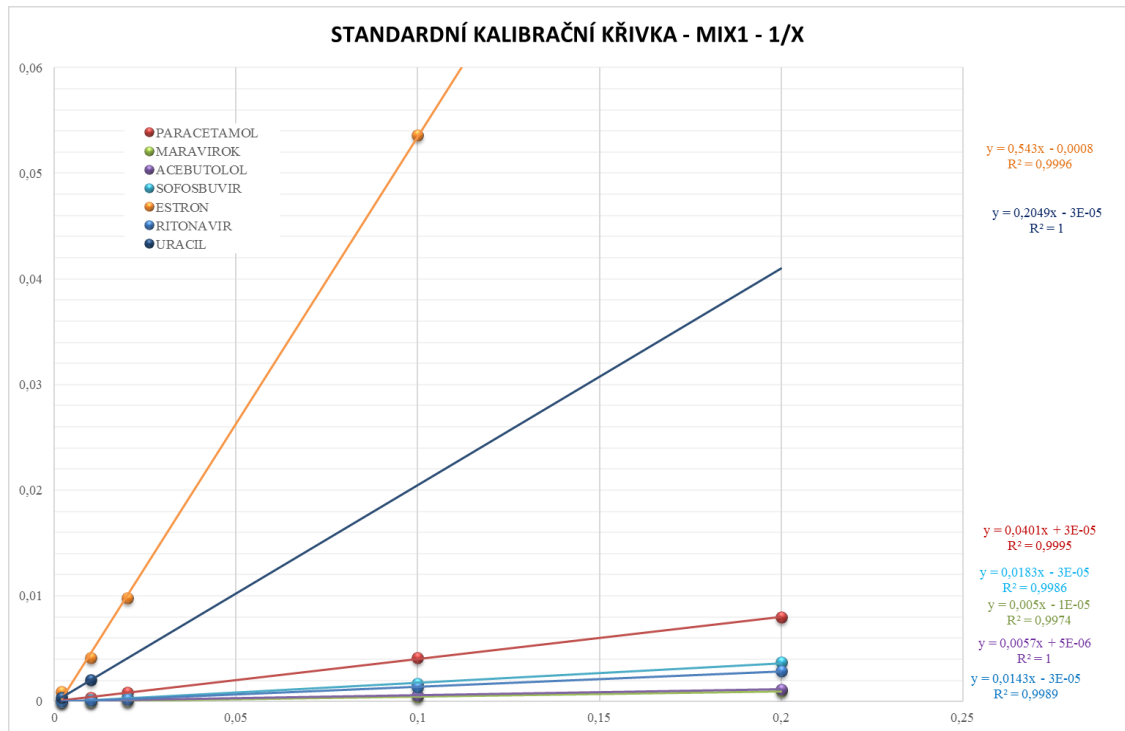
Matricová kalibrační křivka pro mix 1 v negativním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítko grafu



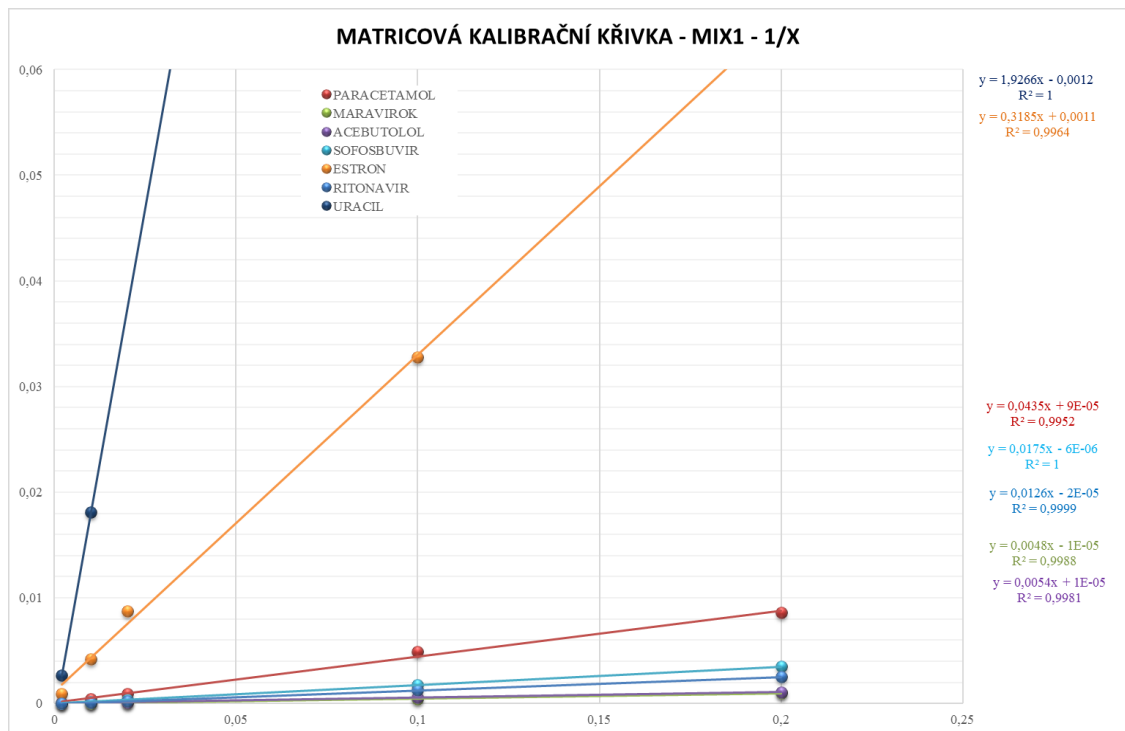
Standardní kalibrační křivka pro mix 2 a 3 v negativním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítko grafu



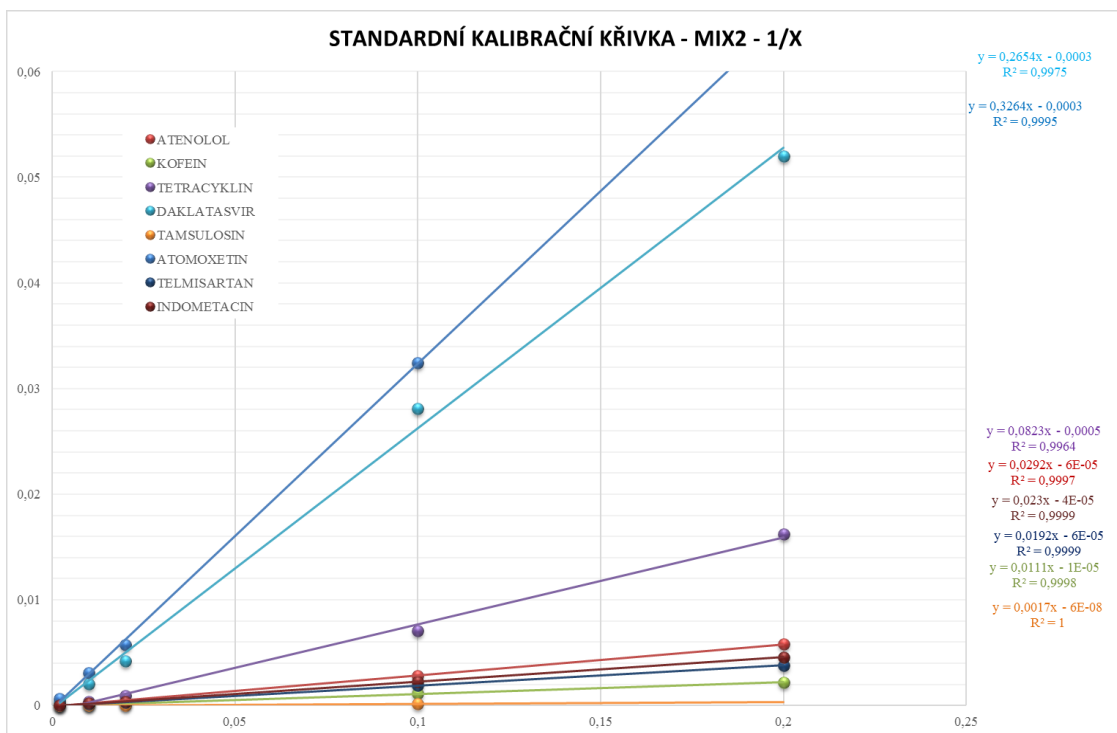
Maticová kalibrační křivka pro mix 2 a 3 v negativním ionizačním módu s použitím přirozeného logaritmu pro měřítko grafu



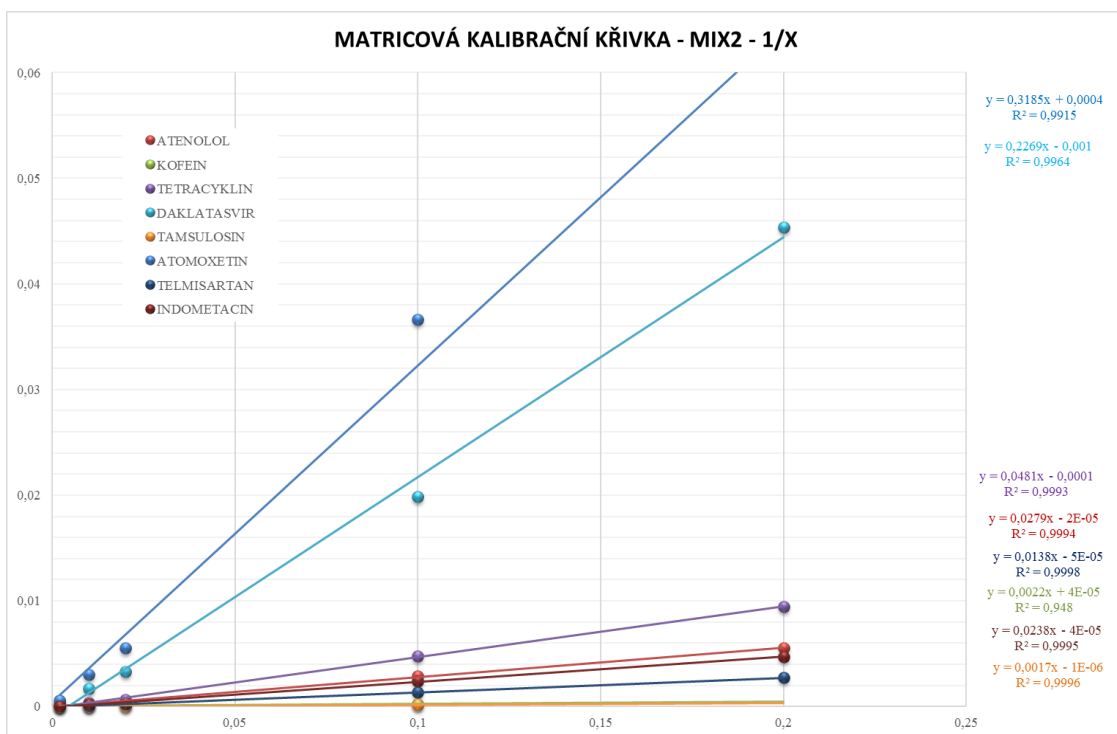
Standardní kalibrační křivka pro mix 1 v pozitivním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítka grafu



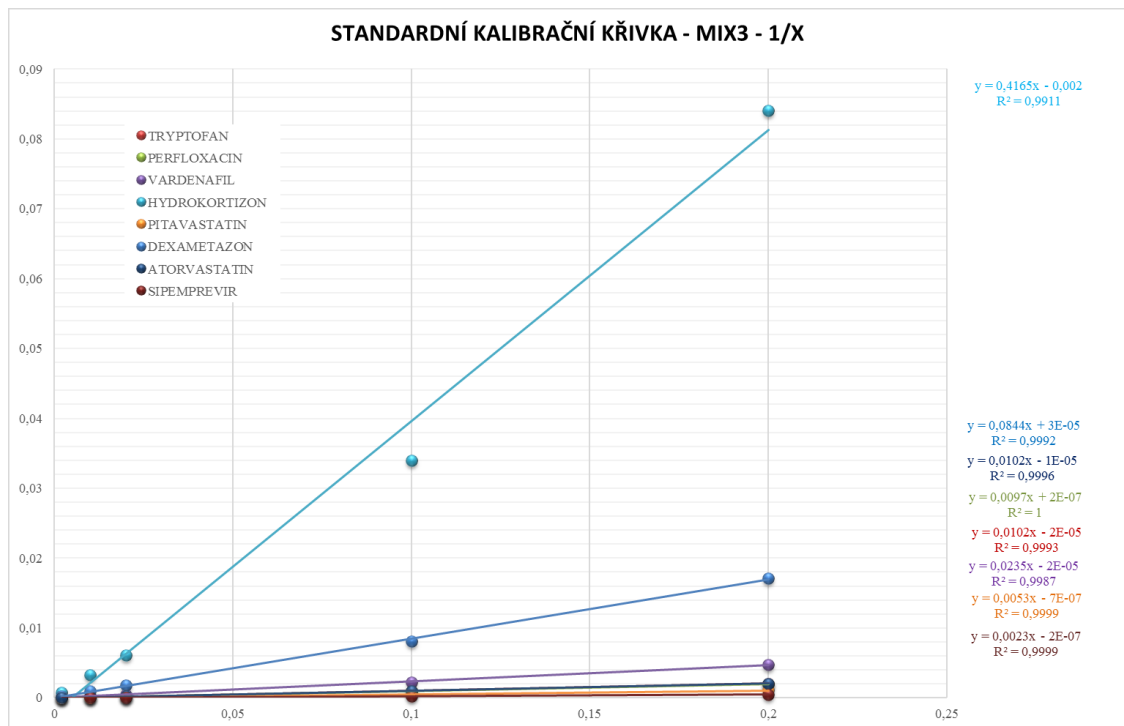
Matricová kalibrační křivka pro mix 1 v pozitivním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítka grafu



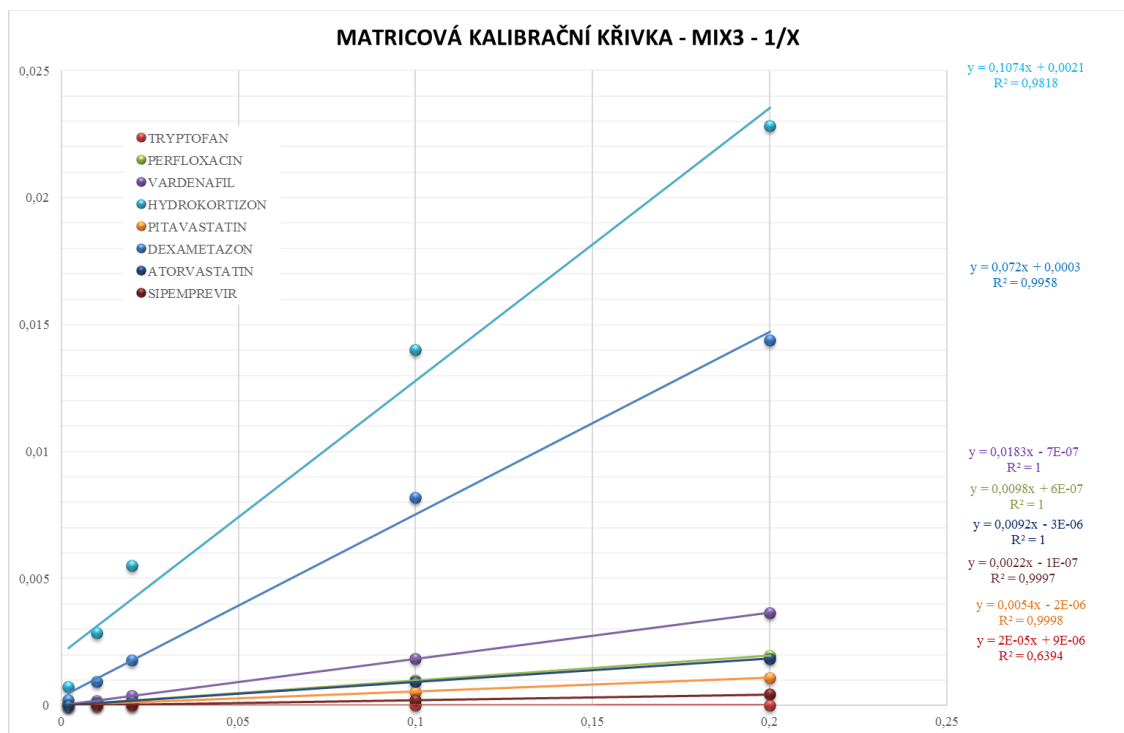
Standardní kalibrační křivka pro mix 2 v pozitivním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítka grafu



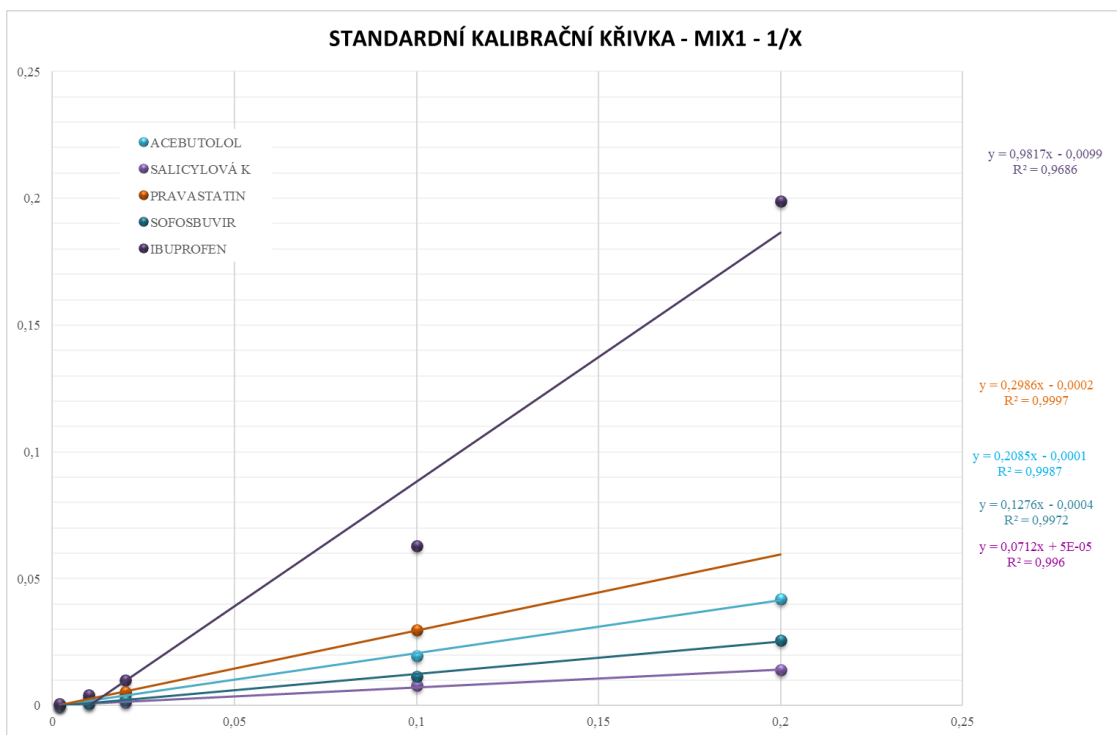
Matricová kalibrační křivka pro mix 2 v pozitivním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítka grafu



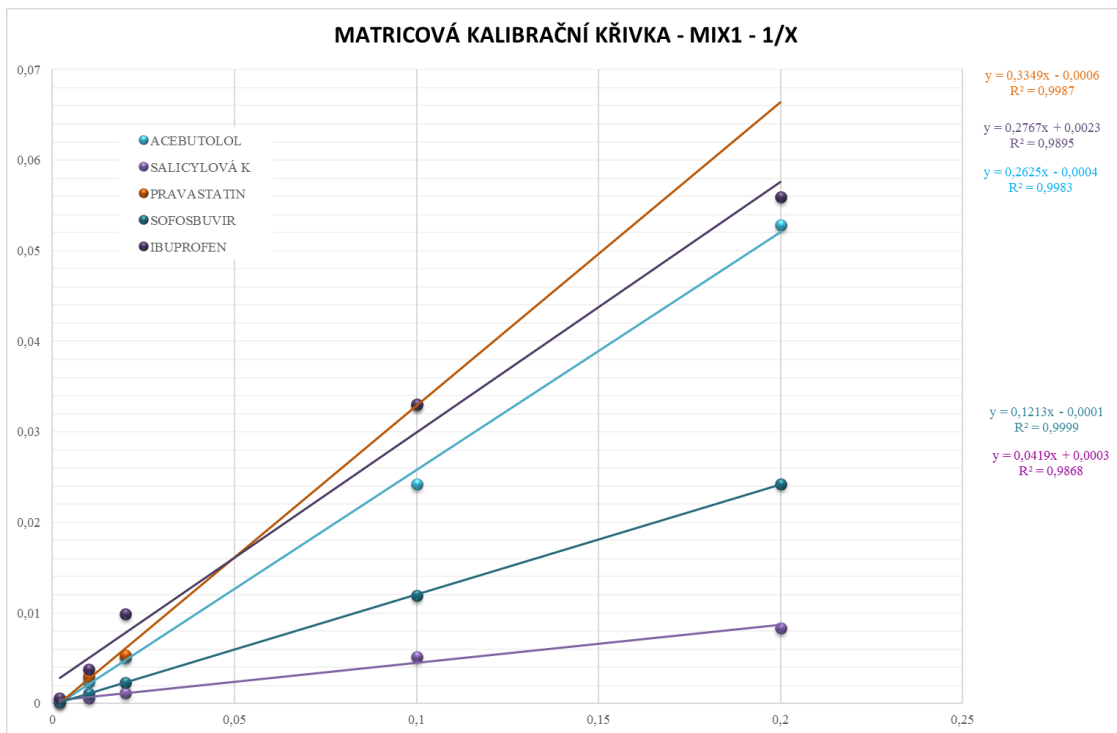
Standardní kalibrační křivka pro mix 3 v pozitivním ionizačním módu s použitím recipročních hodnot pro měřítka grafu



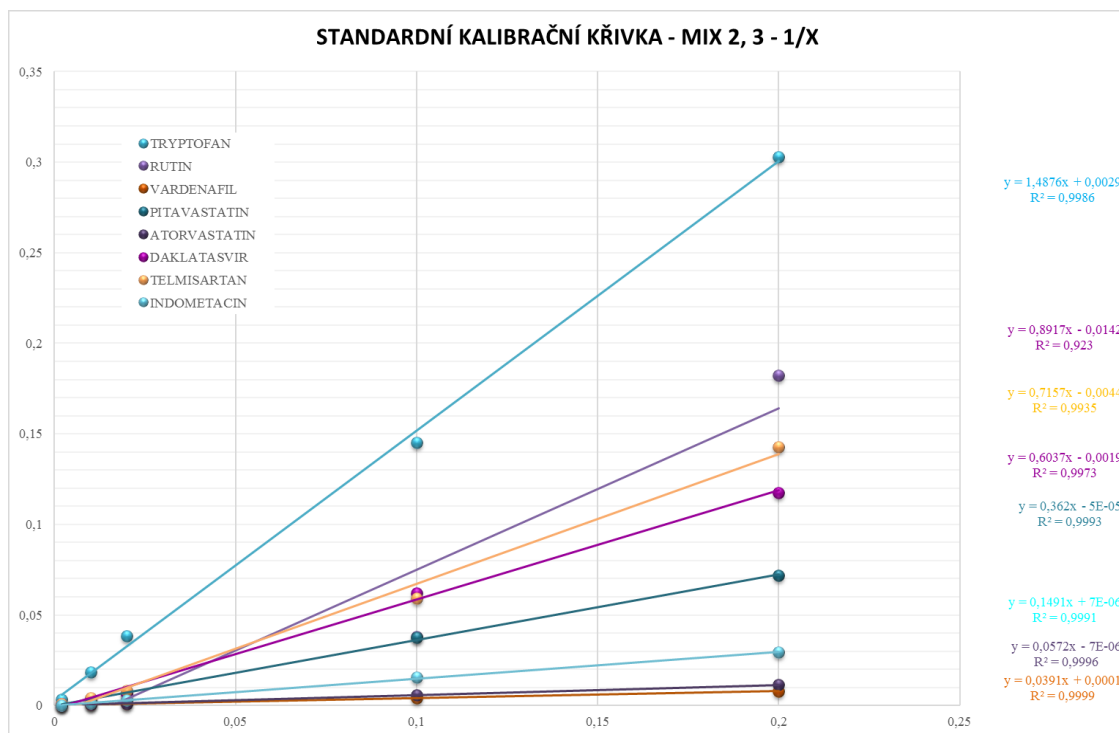
Matricová kalibrační křivka pro mix 3 v pozitivním ionizačním módu s použitím recipročních hodnot pro měřítka grafu



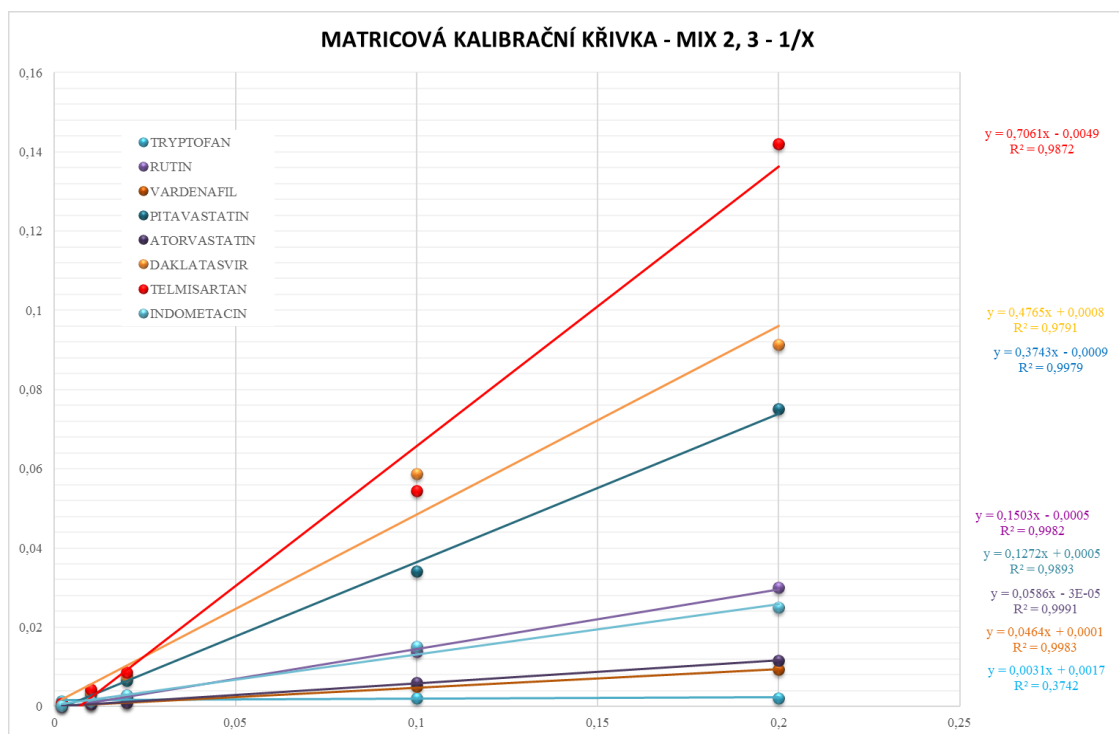
Standardní kalibrační křivka pro mix 1 v negativním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítka grafu



Matricová kalibrační křivka pro mix 1 v negativním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítka grafu



Standardní kalibrační křivka pro mix 2 a 3 v negativním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítko grafu



Matricová kalibrační křivka pro mix 2 a 3 v negativním ionizačním módu s použitím reciprokých hodnot pro měřítko grafu

Seznam obrázků

Obrázek 1: Vliv fyzikálně-chemických vlastností látek na výběr ionizační techniky (upraveno dle [3])	4
Obrázek 2: Princip ionizace elektrosprejem (upraveno dle [5]).....	5
Obrázek 3: Konstrukční typy elektrospreje (upraveno dle [6]).....	6
Obrázek 4: Princip chemické ionizace za atmosférického tlaku (upraveno dle [10])7	
Obrázek 5: Princip fotoionizace za atmosférického tlaku (upraveno dle [10]).....	8
Obrázek 6: Metoda hodnocení matricových efektů – porovnání směrníc kalibračních křivek (upraveno dle [40])	18
Obrázek 7: Metoda post-extrakčního přídavku (upraveno dle [16])	19
Obrázek 8: Napětí na kapiláře pro mix 1 v pozitivu.....	29
Obrázek 9: Napětí na kapiláře pro mix 2 v pozitivu.....	29
Obrázek 10: Napětí na kapiláře pro mix 3 v pozitivu.....	30
Obrázek 11: Napětí na kapiláře pro mix 1, 2, 3 v negativu	30
Obrázek 12: Napětí na vstupním kuželu pro mix 1 v pozitivu	31
Obrázek 13: Napětí na vstupním kuželu pro mix 2 v pozitivu	31
Obrázek 14: Napětí na vstupním kuželu pro mix 3 v pozitivu	32
Obrázek 15: Napětí na vstupním kuželu pro mix 1 v negativu	32
Obrázek 16: Napětí na vstupním kuželu pro mix 2, 3 v negativu	33
Obrázek 17: Napětí na hexapolu pro mix 1 v pozitivu.....	34
Obrázek 18: Napětí na hexapolu pro mix 2 v pozitivu.....	34
Obrázek 19: Napětí na hexapolu pro mix 3 v pozitivu.....	35
Obrázek 20: Napětí na hexapolu pro mix 1, 2, 3 v negativu	35
Obrázek 21: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 1 v pozitivu.....	36
Obrázek 22: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 2 v pozitivu.....	36
Obrázek 23: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 3 v pozitivu	37
Obrázek 24: Průtok plynu na vstupním kuželu pro mix 1, 2, 3 v negativu	37
Obrázek 25: Průtok desolvačního plynu pro mix 1 v pozitivu	38
Obrázek 26: Průtok desolvačního plynu pro mix 2 v pozitivu	38
Obrázek 27: Průtok desolvačního plynu pro mix 3 v pozitivu	39
Obrázek 28: Průtok desolvačního plynu pro mix 1, 2, 3 v negativu	39
Obrázek 29: Napětí na extraktoru pro mix 1 v pozitivu	40

Obrázek 30: Napětí na extraktoru pro mix 2 v pozitivu	40
Obrázek 31: Napětí na extraktoru pro mix 3 v pozitivu	41
Obrázek 32: Napětí na extraktoru pro mix 1, 2, 3 v negativu	41
Obrázek 33: Iontové přechody pro uracil, paracetamol, acebutolol, maraviroc, sofosbuvir a ritonavir při různých kolizních energiích v pozitivním ionizačním módu. 43	
Obrázek 34: Iontové přechody pro atenolol, telmisartan, kofein, indometacin, tetracyklin, estron, tamsulosin, atomoxetin, hydrokortizon a simeprevir při různých kolizních energiích v pozitivním ionizačním módu	44
Obrázek 35: Iontové přechody pro pitavastatin, perfloracin, dexametazon, vardenafil a atorvastatin při různých kolizních energiích v pozitivním ionizačním módu a pro pravastatin, sofosbuvir, paracetamol a estron v negativním ionizačním módu	45
Obrázek 36: Iontové přechody pro tryptofan, atorvastatin, rutin, daclatasvir, vardenafil, telmisartan, pitavastatin, indometacin, acebutolol, salicylovou kyselinu při různých kolizních energiích v negativním ionizačním módu	46
Obrázek 37: Porovnání hodnot matricových efektů získaných pomocí metody směrníc kalibračních křivek a metody post-extrakčního přídatku pro mix 1 v pozitivním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y).	54
Obrázek 38: Porovnání hodnot matricových efektů získaných pomocí metody směrníc kalibračních křivek a metody post-extrakčního přídatku pro mix 2 v pozitivním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y)	55
Obrázek 39: Porovnání hodnot matricových efektů získaných pomocí metody směrníc kalibračních křivek a metody post-extrakčního přídatku pro mix 3 v pozitivním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y).	56
Obrázek 40: Porovnání hodnot matricových efektů získaných pomocí metody směrníc kalibračních křivek a metody post-extrakčního přídatku pro mix 1, 2, 3 v negativním módu (dva grafy s různým měřítkem na ose y).	57

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam použitých sloučenin, jejich zkratky a rozpouštědla k přípravě zásobních roztoků.	22
Tabulka 2: Množství jednotlivých rozpouštědel v zásobních roztocích standardů. 23	
Tabulka 3: Číselné hodnoty neznámé x_3	24
Tabulka 4: Přehled optimalizovaných hodnot napětí na vstupním kuželu a kolizní energie spolu s prekurzorovými a produktovými ionty a jejich retenčními časy pro každou z látek v pozitivním módu	25
Tabulka 5: Přehled optimalizovaných hodnot napětí na vstupním kuželu a kolizní energie spolu s prekurzorovými a produktovými ionty a jejich retenčními časy pro každou z látek v negativním módu.....	26
Tabulka 6: Výběr prekurzorových iontů v pozitivním a negativním módu.	28
Tabulka 7: Vybrané produktové ionty v pozitivním a negativním módu.....	42
Tabulka 8: Přehled koeficientů determinace (r^2) a směrníc kalibračních křivek (a) pro kalibrační křivky bez transformace os.	48
Tabulka 9: Přehled koeficientů determinace (r^2) a směrníc kalibračních křivek (a) pro kalibrační křivky s logaritmickou transformací os.	49
Tabulka 10: Přehled koeficientů determinace (r^2) a směrníc kalibračních křivek (a) pro kalibrační křivky s reciprokou transformací os.	50
Tabulka 11: Hodnoty maticových efektů získané post-extrakční metodou v pozitivním a negativním módu	51
Tabulka 12: Souhrn výsledků maticových efektů získaných pomocí obou metod. Zeleně zbarvené pole znázorňuje splnění požadavku ME menší než 20 %, červeně zbarvené pole nesplnění tohoto požadavku.	59

Seznam zkratek

LC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (coupling of high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry)
SRM	monitorování vybrané reakce (selected reaction monitoring)
API	ionizační techniky za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionization)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
FDA	The Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
RP	reverzní fáze (reversed phase)
PP	proteinová precipitace (protein precipitation)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction)
SPE	extrakce na tuhé fázi (solid-phase extraction)
PP-SPE	spojení proteinové precipitace a extrakce na tuhé fázi
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)

RPLC-MS	spojení chromatografie na reverzní fázi a hmotnostní spektrometrie (coupling of reverse phased HPLC and mass spektrometry)
SFC-MS	spojení superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie (coupling of supercritical fluid chromatography and mass spectrometry)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction chromatography)
SIL-IS	izotopicky značený vnitřní standard (stable isotopically labeled internal standard)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
LLOQ	dolní limit kvantifikace (lower limit of quantification)