

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ
ANALÝZY



**LC-HRMS analýza vybraných liečiv v biologickom
materiáli I.**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Jana Tomanová

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Vít Šesták, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktorú som vypracovala pod vedením konzultanta. Celá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 3.5.2020

.....
Jana Tomanová

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcela veľmi pekne poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce, doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za jeho rady a usmernenie pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Ďalej by som sa chcela veľmi pekne poďakovať môjmu konzultantovi, PharmDr. Vítovi Šestákovi, Ph.D. za jeho odborný dohľad a vedenie, za jeho užitočné rady a trpezlivosť, ktoré mi pomohli pri tvorbe tejto diplomovej práce. A taktiež by som chcela poďakovať všetkým pracovníkom na Úseku klinickej a forenznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové za vytvorenie príjemného prostredia a pomoc pri práci.

Táto práca bola vypracovaná za podpory projektu SVV 260 547.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Jana Tomanová

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

Konzultant: PharmDr. Vít Šesták, Ph.D.

Názov diplomovej práce: **LC-HRMS analýza vybraných liečiv v biologickom materiáli I.**

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia patrí k jedným z najrozšírenejších separačných analytických techník. Využíva sa v rôznych medicínskych, farmaceutických a priemyselných laboratóriách. Využíva rozdielne afinity látok v analyzovanej zmesi k mobilnej a stacionárnej fáze. Hmotnostná spektrometria je jedna z inštrumentálnych techník pomocou ktorých sa separujú elektricky nabité častice v plynnej fáze na základe pomeru hmotnosť/náboj. V dnešnej dobe sa kladie veľký dôraz na to, aby jednotlivé analytické metódy, ktoré sa vyvíjajú, boli aj následne zvalidované podľa príslušných medzinárodných smerníc. Validácia je proces, ktorý overuje, či je daná metóda vhodná k zamýšľanému použitiu.

V tejto diplomovej práci boli optimalizované a validované podmienky pre stanovenie warfarínu v sére pacientov pomocou hmotnostného spektrometra s lineárnou iónovou pascou LTQ XL. Pri optimalizácii metódy sa vychádzalo z už vyvinutej a validovanej metódy UHPLC-HRMS na Úseku klinickej a forenznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové. V experimentálnej časti práce bol ďalej zvolený spôsob a podmienky úpravy biologického materiálu, vybraný vhodný vnútorný štandard a overené parametre validácie ako kalibračná krivka, presnosť, precíznosť, maticové efekty, výťažnosť a stabilita.

Na úpravu séra pacientov bola zvolená technika precipitácie proteínov a ako precipitačné činidlo sa použil acetonitril. Ako vnútorný štandard bol použitý citalopram-d6. Parametre validácie vyhovovali kritériám podľa ustanovení Európskej Liekovej Agentúry (EMA).

Táto metóda bola aplikovaná na meranie warfarínu v sére u dvadsiatich pacientov a porovnaná s už validovanou metódou na Úseku klinickej a foreznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové. Napriek tomu, že pôvodná metóda vykazovala jednoznačne lepšiu presnosť aj precíznosť, spĺňala nová HPLC-LIT-MS metóda validačné kritériá podľa EMA. Výsledky meraní sa medzi jednotlivými meraniami líšili hlavne na klinicky nevýznamných subterapeutických koncentráciách. Táto metóda ukázala svoju hodnotu pre rutinné meranie warfarínu v klinickej praxi.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Jana Tomanová

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

Consultant: PharmDr. Vít Šesták, Ph.D.

Title of the Diploma Thesis: **LC-HRMS analysis of selected drugs in biological material I.**

High performance liquid chromatography is one of the most widespread separation analytical techniques. It is used in various medical, pharmaceutical and industrial laboratories. It uses different affinities of the substances in the analysed mixture to the mobile and stationary phases. Mass spectrometry is one of the instrumental techniques by which charged particles are separated in the gas phase based on the mass-to-charge ratio. Nowadays, great emphasis is placed on the fact that the individual analytical methods which are being developed are subsequently validated according to a guideline issued by national or international authorities. Validation is a process that verifies that a method is suitable for its intended use.

In this thesis, the conditions for the determination of warfarin in patient's serum by means of mass spectrometer with LTQ XL linear ion trap were optimized and validated. The optimization of the method was based on the already developed and validated UHPLC-HRMS method in Department of Clinical and Forensic Toxicology, Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové. In the experimental part, method and conditions of biological material treatment, suitable internal standard were selected. The method was validated in terms of calibration curve, accuracy, precision, matrix effects, recovery and stability.

Protein precipitation with acetonitrile was used to treat the biological material. Citalopram-d6 was used as internal standard. The validation parameters met the criteria according to the EMA provisions.

This method was applied to the measurement of serum warfarin levels in twenty patients and compared with the already validated method in Department of Clinical and Forensic Toxicology, Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University

Hospital Hradec Králové. Although the original method clearly showed better accuracy and precision, the new HPLC-LIT-MS method met the validation criteria of the European Medicines Agency (EMA). The results of the measurements differed between measurements at clinically insignificant sub-therapeutic concentrations. This method has shown its value for routine measurements of warfarin in clinical practice.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
Zoznam použitých skratiek.....	10
1 Úvod.....	12
2 Teoretická časť.....	13
2.1 HPLC.....	13
2.1.1 Kvapalinový chromatograf.....	14
2.1.2 Mobilná fáza.....	17
2.1.3 Stacionárna fáza.....	17
2.1.4 Elučné módy.....	18
2.1.5 Detektor HPLC.....	20
2.2 Hmotnostná spektrometria.....	21
2.3 Úprava vzoriek biologického materiálu.....	22
2.3.1 Proteínová precipitácia.....	23
2.3.2 Extrakcia na pevnej fáze.....	24
2.3.3 Extrakcia kvapalina/kvapalina.....	24
2.4 Validácia bioanalytickej metódy.....	25
2.4.1 Presnosť.....	26
2.4.2 Precíznosť.....	26
2.4.3 Linearita.....	26
2.4.4 Limity detekcie a kvantifikácie.....	27
2.4.5 Efektívnosť procesu.....	28
2.4.6 Selektivita.....	28
2.5 Warfarín.....	29

2.5.1	Farmakokinetika	30
3	Cieľ práce.....	32
4	Experimentálna časť	33
4.1	Použitý materiál, chemikálie, pomôcky a prístroje.....	33
4.2	Chromatografické podmienky a nastavenie hmotnostného spektrometru	34
4.3	Metodika	35
4.3.1	Príprava štandardných roztokov	35
4.3.2	Úprava biologického materiálu a výber vnútorného štandardu	36
4.3.3	UHPLC – HRMS metóda	37
4.3.4	Validácia	37
5	Výsledky a diskusia	39
5.1	Výber úpravy biologického materiálu.....	39
5.2	Výber vnútorného štandardu	42
5.3	Validácia	44
5.3.1	Kalibračná krivka.....	44
5.3.2	Selektivita	45
5.3.3	Presnosť a precíznosť	48
5.3.4	Matricové efekty a výťažnosť.....	50
5.3.5	Stabilita	51
5.3.6	Pacientské vzorky	51
6	Záver	54
7	Zoznam obrázkov, tabuliek a grafov	55
7.1	Obrázky	55
7.2	Tabuľky.....	55
7.3	Grafy	56
8	Zoznam použitej literatúry	57

Zoznam použitých skratiek

ACN – acetonitril

AUC – area under the curve, plocha pod krivkou

CYP – cytochróm P450

EMA – European Medicines Agency, Európska lieková agentúra

FDA – Food and Drug Administration, Správa potravín a liečiv

HPLC – high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

HRMS – high resolution mass spectrometry, hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením

HSA – human serum albumin, ľudský sérový albumín

INR – international normalised ratio, medzinárodný normalizovaný pomer protrombínového času voči laboratórnemu štandardu

IS – vnútorný štandard

LC – liquid chromatography, kvapalinová chromatografia

LIT – linear ion trap, lineárna iónová pasca

LLE – liquid-liquid extraction, extrakcia kvapalina-kvapalina

LOD – limit of detection, limit detekcie

LLOQ – lower limit of quantification, dolný limit kvantifikácie

LTQ XL – Linear Ion Trap Mass Spectrometer, hmotnostný spektrometer s lineárnou iónovou pascou

MeOH – metanol

MS – mass spectrometry, hmotnostná spektrometria

NP – normal phase, normálna fáza

QC – quality control, kontrola kvality

RP – reversed phase, reverzná fáza

RSD – relative standard deviation, relatívna smerodajná odchýlka

SD – standard deviation, smerodajná odchýlka

SPE – solid phase extraction, extrakcia na pevnej fáze

UHPLC – ultrahigh performance liquid chromatography, ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia

ULOQ – upper limit of quantification, horný limit kvantifikácie

UV – ultraviolet radiation, ultrafialové žiarenie

UV/VIS – ultraviolet visible radiation, ultrafialové viditeľné žiarenie

1 Úvod

Warfarín zaradujeme do skupiny liečiv nazývaných perorálne antikoagulanciá. Je to antagonistu vitamínu K a používa sa na prevenciu trombózy (krvnej zrazeniny) alebo na liečbu trombózy a tromboembolických komplikácií. Keďže má toto liečivo nízky terapeutický index a vysokú variabilitu účinku, je nutné, aby bol jeho účinok u pacientov neustále monitorovaný a podľa toho nastavená dávka u konkrétneho pacienta. Inak by mohlo dôjsť k supratherapeutickej antikoagulácii a s tým spojené riziko krvácania, alebo by nebola dosiahnutá terapeutická hladina a mohli by nastať naopak tromboembolické komplikácie. Warfarín sa bežne monitoruje pomocou medzinárodného normalizovaného pomeru protrombínového času voči laboratórnemu štandardu (INR), avšak niekedy situácia vyžaduje priame meranie koncentrácií warfarínu pre lepšie klinické zvládnutie liečby.

V súčasnosti je jednou z najpoužívanějších analytických metód vysokoúčinná kvapalinová chromatografia. Umožňuje kvantitatívne i kvalitatívne stanovenie analyzovanej látky alebo zmesi látok. Je založená na rozdielnej afinite stanovovanej látky k mobilnej alebo stacionárnej fáze. LC-MS analytická metóda zahŕňa spojenie chromatografickej separačnej metódy s detekciou pomocou hmotnostnej spektrometrie. Hmotnostná spektrometria umožňuje kvantitatívne hodnotenie analyzovanej látky a taktiež poskytuje informácie o jej chemickej štruktúre. Funguje na princípe separácie elektricky nabitých častíc v plynnej fáze na základe pomeru hmotnosť/náboj. Každá analytická metóda musí byť pred použitím validovaná, aby boli výsledky meraní spoľahlivé.

Táto diplomová práca sa venovala optimalizácii podmienok a validácii metódy pre stanovenie hladiny warfarínu v sére pacientov pomocou hmotnostného spektrometra s lineárnou iónovou pascou LTQ XL. Cieľom bolo optimalizovať využitie laboratórnej inštrumentácie a zrýchliť prácu na Úseku klinickej a forenznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové, aby bol dosiahnutý rýchly a dostatočný monitoring hladiny warfarínu u pacientov a tým pádom bola u pacientov zabezpečená účinná a bezpečná farmakoterapia warfarínom.

2 Teoretická časť

2.1 HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je dôležitá separačná metóda, ktorá využíva rozdielne afinity látok v analyzovanej zmesi k stacionárnej a mobilnej fáze. Stacionárna fáza vyplňa kolónu, je nepohyblivá a môže ju predstavovať pevná látka alebo kvapalina ukotvená na pevnom nosiči. Mobilná fáza je pohyblivá, preteká náplňou kolóny a v prípade HPLC je privádzaná do systému pomocou vysokotlakového čerpadla. Na základe rozdielnej afinity k dvom navzájom nemiešateľným fázam migrujú látky systémom rôznou rýchlosťou. Pre distribúciu látok je totiž potrebná existencia fázového rozhrania. Podstatou distribúcie je následne opakované ustáľovanie rovnováhy delenej látky medzi mobilnú a stacionárnu fázu. Pri tejto metóde dochádza teda k oddeleniu zložiek analyzovanej zmesi na kolóne, naplnenej sorbentom, v dôsledku ich rozdielne rýchlej migrácie určitým smerom. K separácii dochádza na základe interakcií delených látok so stacionárnou aj mobilnou fázou. Detekcia látok sa uskutočňuje až za kolónou vo vhodnom detektore. HPLC nám umožňuje v praxi hodnotenie kvality a kvantity separovaných zložiek [1].

HPLC teda využíva rozdielne afinity látok v analyzovanej zmesi k stacionárnej a mobilnej fáze. Delenie látok medzi dve fázy popisuje distribučná konštanta K_D , uvedená v rovnici číslo 1, kde C_S predstavuje koncentráciu separovanej látky v stacionárnej fáze [mol/l] a C_M jej koncentráciu v mobilnej fáze [mol/l].

$$\text{Rovnica 1:} \quad K_D = \frac{C_S}{C_M} [2].$$

Čím dlhšie látka zotrúva v stacionárnej fáze, tým väčšia je jej retencia a jej distribučná konštanta. Pre správne delenie jednotlivých zložiek analyzovanej zmesi je potrebné, aby sa látky svojimi distribučnými konštantami odlišovali [2].

HPLC technika bola najprv vyvinutá v usporiadaní, ktoré vychádzalo z pôvodnej stĺpcovej chromatografie vykonávanej pri atmosférickom tlaku. Pri nej bola otvorená kolóna naplnená stacionárnou fázou polárnej povahy a ako mobilná fáza slúžilo organické rozpúšťadlo. Takéto usporiadanie, dnes označované ako kvapalinová chromatografia na normálnych fázach (NP-LC), bolo určené k deleniu analytov ľahko rozpustných v nepolárnych rozpúšťadlách s miernou afinitou k polárnej stacionárnej fáze. Keďže NP-HPLC vyžaduje veľké množstvo organických rozpúšťadiel, bola z veľkej časti

nahradená HPLC reverznou fázou (RP-HPLC). Usporiadanie na obrátenej fáze zahŕňa nepolárnu stacionárnu fázu a polárnu vodnú mobilnú fázu [3].

Jednou z významných výhod metódy je nízka spotreba vzorky. V poslednej dobe sa objavuje trend v znižovaní prietokovej rýchlosti, a tým aj zníženie objemu spotrebovanej mobilnej fázy. Celý proces možno na moderných prístrojoch zautomatizovať. Jednotlivé vzorky sa postupne nastreknú na kolónu bez obsluhy človeka. Túto sekvenciu riadi počítač [4]. Chromatografický proces sa za posledných sto rokov výrazne zlepšil, čím sa dosiahla väčšia účinnosť separácie, univerzálnosť a rýchlosť.

Od začiatku 90. rokov sa HPLC stala pravdepodobne najrozšírenejšou analytickou technikou v analytických, biochemických, farmaceutických, lekárskech a mnohých ďalších priemyselných laboratóriách. Môžeme skonštatovať, že HPLC je najrozšírenejšia zo všetkých analytických separačných techník. Princípom chromatografie je rozdelenie analyzovaných látok medzi dvoma fázami, ktorými sú jedna nepohyblivá, teda stacionárna, a druhá pohyblivá, teda mobilná. Pri chromatografickej analýze dochádza k neustálemu nachádzaniu rovnovážneho stavu medzi stacionárnou a mobilnou fázou. K separácii dôjde na princípe rôznej afinity delenej látky k obom fázam. Stacionárna fáza je reprezentovaná náplňou kolóny, alebo plošnou vrstvou a mobilná fáza voľne unáša analyzovanú látku. Uvedenou technikou možno oddeliť jednotlivé zložky analyzovanej zmesi a určiť ich koncentráciu [1].

V oblasti liečiv je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia jednou z najčastejšie používaných analytických techník. HPLC metódy sú používané vo všetkých oblastiach modernej farmaceutickej analýzy, či už vo vývoji nových liečiv, v oblasti kontroly ich kvality, ako aj v rámci analýzy liečiv a metabolitov v biologických materiáloch. Zaradíme sem napríklad terapeutický monitoring liečiv, ako aj štúdium bioekvivalencie. Účelom HPLC analýzy akýchkoľvek liečiv je potvrdenie čistoty liečiva, poskytnutie kvantitatívnych výsledkov, ako aj sledovanie priebehu terapie ochorenia [5].

2.1.1 Kvapalinový chromatograf

Kvapalinový chromatograf predstavuje špeciálne zariadenie, skladajúce sa z rôznych častí, ktoré možno podľa potrieb obmieňať. Kvapalinový chromatograf sa teda skladá z viacerých častí. Zásobníky mobilnej fázy predstavujú najčastejšie sklenené nádoby s uzáverom z inertného plastu, do ktorého vstupujú teflónové hadičky s filtrami. Nasávaná MF je zbavovaná rozpustených plynov, ktoré môžu spôsobovať napríklad

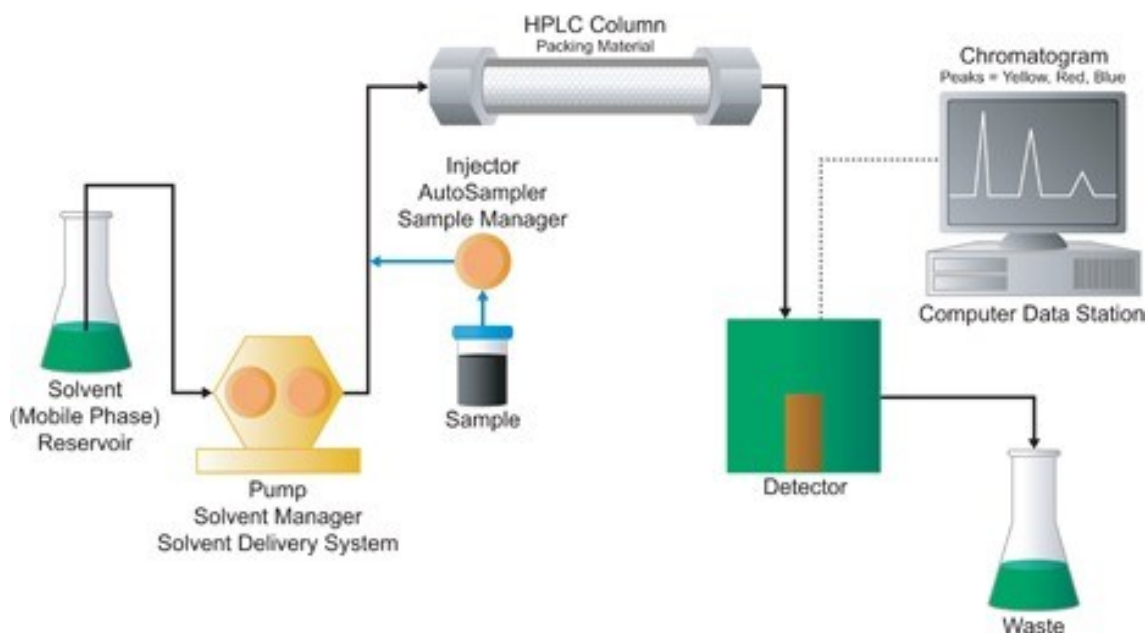
zavzdušnenie hlavy pumpy. Aktuálne sa využíva vákuový degasser, ktorý je v porovnaní s ostatnými princípmi odplynenia rýchlejší, lacnejší a efektívnejší. Stabilný prietok MF majú na starosti vysokotlakové čerpadlá. Zatiaľ čo sa jedna časť plní, druhá vytláča kvapalinu do systému, čím sa minimalizuje kolísanie prietoku. Bezpulznému čerpaniu pomáha elektronická kontrola piestov. Redukcia pulzov je z pohľadu dnešných analýz zásadná, vzhľadom na to, že sa kladie obzvlášť dôraz na senzitivitu metódy, respektíve detekciu nízkych koncentrácií analytov, kedy aj minimálne zmeny prietoku môžu analýzu značne ovplyvniť [6].

Dávkovanie vzorky do systému je možné vykonávať manuálne prostredníctvom šesťcestného ventilu, ktorý je prepojený s dávkovacou slučkou. Proces dávkovania je v podstatnej miere automatizovaný. Automatické dávkovače, teda autosamplery, bývajú spojené so zásobníkom vzoriek v temperovanom priestore. Vzorky sú v zásobníku skladované v uzatvárateľných vialkách. Naprogramovaný systém autosamplera vyberá vialky a dávkuje vzorky do systému bez potreby obsluhy [6].

K separácii analytov dochádza na chromatografickej kolóne. Kým princíp separácie na reverzných fázach je nemenný, snaha o technické zdokonalenie kolón prebieha stále. Kolónu tvorí plášť naplnený stacionárnou fázou a ďalej koncovky s fritmi, ktoré zaisťujú zadržanie SF a spoľahlivé spojenie vstupnej a výstupnej kapiláry odolnej voči vysokému tlaku. V súčasnosti sú analytické kolóny vyrábané komerčne a dostupné v obvyklých dĺžkach 25 až 250 mm a s vnútorným priemerom 2,1-4,6 mm. Podľa náplne možno rozdeliť kolóny na:

- časticové, kedy kolónu vyplňajú častice
- monolitické, kedy kolónu vyplňa jednoliaty kus materiálu [6].

U časticových kolón sa veľkosť častíc pohybuje rádovo v mikrometroch. Použitie menších častíc prispieva k zlepšeniu účinnosti separácie. Okrem využitia menších častíc prispieva k vyššej separačnej účinnosti aj homogenita ich veľkosti a pravidelné usporiadanie v kolóne, vzhľadom na to, že sa považuje za žiadúce aby dráhy, ktoré prejdú jednotlivé molekuly analytu, boli skoro zhodné. Látky zo vzorky, ktoré sú rozdelené na kolóne ďalej putujú kapilárou do detektora, ktorý prevedie ich prítomnosť na elektrický signál. Jednotlivé typy detektorov sa líšia predovšetkým mierou analytickej citlivosti, ako aj mierou selektivity [6]. Schému HPLC prístroja znázorňuje obrázok 1.



Obrázok 1 Schéma HPLC prístroja [39].

Separácia pri HPLC môže prebiehať podľa veľkosti molekúl, náboja, či hydrofobicity. Rozlišovacia schopnosť je pri HPLC zvýšená s použitím menších častíc (silikagélovej matrice), ktoré prispievajú k zvyšovaniu efektívnej plochy separácie molekúl. Menšie častice vytvárajú väčší spätný odpor. Mobilnou fázou je najčastejšie zmes rozpúšťadiel (napr. vody, acetonitrilu, metanolu), ktorá s teplotou najviac ovplyvňuje separačný proces [7],

Vysokoúčinný kvapalinový chromatograf pracuje na princípe, kedy sú vzorky dávkané dávkovacím zariadením cez nástrekovú slučku do mobilnej fázy. Tá vnáša jednotlivé zložky vzorky na kolónu, kde dochádza k opakovanému ustáleniu rovnováhy medzi mobilnou a stacionárnou fázou a k separácii analytov podľa ich fyzikálno-chemických vlastností. Chromatogram predstavuje výsledok merania v podobe grafického záznamu. Na osi x sa znázorňuje retenčný čas. Na osi y je pri použití spektrofotometrického detektora absorbancia, v prípade fluorodenzitometrického detektora intenzita fluorescencie. Niekedy sú dané veličiny už prevedené na elektrickú charakteristiku snímaného signálu, najčastejšie je to napätie [8].

Na chromatograme sa zložky vzorky zobrazujú v podobe píkov, ktoré môžu mať rôzny tvar. Najžiadanejšia podoba píku má tvar Gaussovej krivky, teda sa jedná o pík symetrický, pričom rozoznávame taktiež chvostujúci pík, ktorý je rozmytý vzadu. V mnohých prípadoch vzniká v dôsledku veľmi dlhej cesty, ktorú musí vzorka uraziť od nástreku na kolónu k príslušnému detektoru. Tretí druh píku sa nazýva frontujúci, je

rozmytý vpredu. Vzniká, ak má rozpúšťadlo vzorky vyššiu elučnú silu, než je elučná sila predmetnej mobilnej fázy. Dôvodom pre vznik posledných dvoch typov píkov môže byť aj napríklad vysoký objemový nástrek vzorky, či znečistená kolóna [8].

Meranou veličinou sú napríklad:

- absorbanca,
- fluorescencia,
- elektrická vodivosť,
- index lomu.

2.1.2 Mobilná fáza

Pri HPLC sa využíva kvapalná mobilná fáza na oddelenie zložiek vzorky. Typ použitej mobilnej fázy môže mať veľký vplyv na retenciu. Môže podporovať alebo potlačovať ionizáciu molekúl analytu a môže tiež tieniť prístupný zvyškový silanol alebo akékoľvek iné aktívne adsorpčné centrá na povrchu adsorbentu [9]. Pri chromatografii na reverzných fázach má mobilná fáza polárny charakter. Zvyčajne sa jedná o zmes vodných roztokov kyselín / báz alebo pufrov s polárnymi organickými rozpúšťadlami ako sú alkoholy, acetonitril alebo tetrahydrofurán. S klesajúcou polaritou organických rozpúšťadiel rastie ich elučná sila. Podľa rastúcej elučnej sily možno používané organické rozpúšťadlá zoradiť nasledovne:

metanol < acetonitril < propán-2-ol < dioxán < tetrahydrofurán [9].

2.1.3 Stacionárna fáza

Stacionárnou fázou sú najčastejšie pevné častice alebo vrstvička kvapaliny, ktorá je vhodne zadržaná na pevných časticiach [2]. V reverzných fázach môžu vznikať medzi látkou a stacionárnou fázou najmä nešpecifické medzimolekulové interakcie, ktoré by mali byť slabšieho charakteru ako polárne interakcie, ktoré vznikajú medzi analytom a mobilnou fázou. Polárne interakcie analyt-mobilná fáza tak zoslabujú nešpecifické interakcie analyt-stacionárna fáza a uľahčujú návrat analytu do polárneho elučného činidla [10]. Ako náplň kolón (stacionárna fáza) sa používajú polárne nemodifikované adsorbéry (silikagél, menej často oxid hlinitý) alebo náplne s chemicky viazanými stacionárnymi fázami na silikagélovom nosiči [11]. Ak je stacionárna fáza polárnejšia ako mobilná fáza, hovoríme o systémoch s normálnymi fázami. V opačnom prípade ide o systém s reverznou fázou.

Nepolárny charakter reverznej fázy môžu zastávať rôzne funkčné skupiny naviazané na rôzne druhy nosičov (sorbentov). Doteraz najpoužívanejším nosičom je silikagél. Má poréznu amorfnú formu a je značne mechanicky odolný, čo umožňuje jeho použitie pri vysokom tlaku. Povrch silikagélu je pokrytý hydroxylovými (resp. silanolovými) skupinami, ktoré mu udeľujú polárny charakter a pre svoju reaktivitu sú využívané k väzbe rôznych ligandov. Hydrofóbnymi ligandmi môžu byť napr.:

-alkylové reťazce rôznej dĺžky C2-C30, najrozšírenejšia je C18 (oktadecylsilikagél);

- pentafluorfenyl;
- fenyl, bifenyl, alkylfenyl, nitrofenyl;
- diol a podobne [40].

2.1.4 Elučné módy

Elučná chromatografia sa môže uskutočňovať v izokratickom alebo gradientovom režime. Pri izokratickej elúcii sa zloženie mobilnej fázy udržiava konštantné počas separácie vzorky. Pri elúcii gradientom sa bude zloženie mobilnej fázy meniť počas separácie vzorky. Elučné gradienty si vyžadujú špeciálne chromatografické zariadenie, ako aj o niečo väčšiu starostlivosť zo strany operátora, ale pre mnohé separácie má dôležité výhody [12].

Izokratická elúcia znamená, že zmes mobilnej fázy je po celú dobu analýzy konštantná. Použitie gradientu znamená, že zloženie mobilnej fázy sa počas merania mení, a tak ovplyvňuje retenciu analytov. Na začiatku gradientovej elúcie má mobilná fáza menšiu elučnú silu (v reverzných fázach prevažuje vodný roztok pufru), s postupom separácie je navyšované zastúpenie zložky s vyššou elučnou silou (najčastejšie MeOH alebo ACN), ktorá ku koncu elúcie dominuje, záverom analýzy sa zloženie mobilnej fázy vracia do východiskových podmienok. Týmto spôsobom je možné efektívne meniť elučnú silu mobilnej fázy [12]. Voľba vhodného režimu gradientu je individuálna a spravidla sa optimalizuje empiricky.

Pri gradientovej elúcii sú parametre rozlíšenia aj kapacita separácie spravidla vyššie než pri izokratickej elúcii, pričom lepšie výsledky sú dosahované vďaka užším píkom a širšiemu retenčnému rozsahu [12]. Ďalšou výhodou gradientovej elúcie môže byť jej využitie pri analýze zložitých vzoriek. Mnoho reálnych vzoriek, ako sú rastlinné extrakty, vzorky telesných tekutín či rôzne environmentálne vzorky, obsahuje okrem

skúmaných látok často aj vedľajšie látky, ktoré môžu vykazovať veľmi vysokú retenciu na použitom sorbente.

Pri opakovaných izokratických separáciách by sa teda tieto zadržované látky mali tendenciu eluovať až počas nasledujúcich analýz a spôsobovať tým problémy s možnou stratou rozlíšenia, či s opakovateľnosťou merania. Pri použití iba izokratickej separácie by sa tento problém musel riešiť buď zavedením dlhých izokratických analýz alebo po každej meranej analýze zavedením iba analýzy bez nástreku pri vysokom obsahu organickej zložky. Pri použití gradientovej elúcie sa tento problém vyrieši jednoduchým nastavením vysokej koncentrácie organickej zložky na konci gradientu, pri ktorej sa spomínané zadržované vedľajšie látky vymyjú [12].

Pre popis retenčného správania látky v izokratickej elúcii sa zavádza pojem retenčný faktor k , pre ktorý platí vzťah zobrazený v rovnici 2:

$$\text{Rovnica 2:} \quad k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad [13]$$

kde V_R a t_R označujú retenčný objem, respektíve retenčný čas, a V_M a t_M je retenčný objem, respektíve retenčný čas, látky, ktorá nie je na kolóne zadržovaná.

Jedným z najdôležitejších optimalizačných kritérií býva rozlíšenie R_s , ktoré charakterizuje kvalitu separácie dvoch susedných pík, je zobrazené v rovnici 3:

$$\text{Rovnica 3:} \quad R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1+k} \right) \quad [13].$$

Parameter N v danom vzťahu predstavuje počet teoretických priehradiek a parameter α sa nazýva selektivita. Pre samotnú selektivitu potom platí rovnica 4:

$$\text{Rovnica 4:} \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad [13].$$

Daný parameter má význam ako pomer retenčných faktorov k_2 a k_1 pre dve susedné látky (k_2 je neskôr eluovaná látka, k_1 predtým eluovaná látka). Účinnosť kolóny vyjadrená ako počet teoretických priehradiek N sa získa z retenčných časov t_R a širok pík pri základni w_g , respektíve zo širok w v polovici výšky píku $w_{0,5}$ v zmysle nasledovného vzťahu zobrazeného v rovnici 5.

$$\text{Rovnica 5:} \quad N = 16 \left(\frac{t_R}{w_g} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad [2].$$

Pre zvolený rozsah rastúcich počiatkových koncentrácií organickej zložky A a zodpovedajúcej strmosti gradientu B je možné následne využiť pre určenie hodnôt rozlíšenia susedných píkov $R_{1,2}$ pomocou nižšie charakterizovaného zjednodušeného vzťahu zobrazeného v rovnici 6.

$$\text{Rovnica 6:} \quad R_{1,2} = \frac{2(t_{R2}-t_{R1})}{W_{g1}+W_{g2}} \quad [14].$$

Parametre t_{R1} a t_{R2} predstavujú elučné časy susedných píkov a W_{g1} a W_{g2} sú šírky susediacich píkov pri základni [14].

2.1.5 Detektor HPLC

V systéme HPLC je detektor zodpovedný za premenu fyzikálneho alebo chemického atribútu na merateľný signál. Prvé HPLC detektory boli predstavené v štyridsiatych a päťdesiatych rokoch 20. storočia. V 60. rokoch bol zavedený prvý ultrafialový detektor pre HPLC a následné zlepšenia v dizajne viedli k lepšej citlivosti a zlepšeniam, ako sú detektory s premenlivou vlnovou dĺžkou. Zatiaľ čo skutočne univerzálny HPLC detektor s úrovňou citlivosti GC/FID stále nie je dostupný, vyvinulo sa veľa rôznych typov detektorov, ktoré boli veľmi úspešné pre širokú škálu všeobecných alebo špecifických HPLC aplikácií [15]. Detektor musí byť schopný zaznamenať zmenu zloženia mobilnej fázy a tú následne premeniť na elektrický signál, ktorý je priamoúmerný sledovanej zmene.

V súčasnej dobe sú v podstate všetky typy používaných detektorov koncentračné a možno ich rozdeliť do dvoch skupín a to na:

- selektívne, ktorých signál je úmerný iba koncentrácii detekovaného komponentu v eluente,
- univerzálne, ktorých signál je úmerný celkovej vlastnosti eluentu ako celku, tj. mobilnej fáze a detekovaných komponentov.

Na detektor sú kladené určité ideálne požiadavky:

- možnosť detekcie všetkých prítomných komponentov (univerzálnosť)
- odozva detektora by mala byť okamžitá a lineárna v čo najširšom rozsahu koncentracie (široký lineárne dynamický rozsah)
- vysoká citlivosť a nízka úroveň šumu voči zmenám tlaku, prietoku mobilnej fázy a teploty
- minimálny mimokolonový príspevok k rozširovaniu elučných zón [16].

K najčastejšie využívaným detektorom v HPLC patria spektrofotometrické detektory, ktorými meriame absorbanciu elektromagnetického žiarenia jednotlivými zložkami eluátu. Pre detekciu liečiv je využívaná najmä UV oblasť spektra, oveľa menej potom viditeľná oblasť spektra. V súčasnosti sú využívané hlavne UV/VIS detektory, pri ktorých možno detegovanú vlnovú dĺžku nastavovať podľa potreby. Ďalej sú využívané DAD detektory, ktoré umožňujú hodnotenie liečiva pri niekoľkých vlnových dĺžkach súčasne. Výsledkom je tak 3D chromatogram, v ktorom je znázornené okrem závislosti absorbancie aj absorpčné spektrum separovanej látky. Spektrofotometrické detektory sú selektívne, možno ich využiť pri gradientových elúciách [16]. Základné typy a vlastnosti LC detektorov sú znázornené v tabuľke 1:

	RI	UV-VIS	IR	FLD	ECD	CONDUCT	CORONA	ELSD
typ detektoru	nedeštruktívny	nedeštruktívny	nedeštruktívny	nedeštruktívny	deštruktívny	nedeštruktívny	deštruktívny	deštruktívny
odezva	univerzálny	selektívny	selektívny	selektívny	selektívny	selektívny	selektívny	univerzálny
měřená veličina	index lomu	absorbance	absorbance	intenzita fluorescence	elektrický proud	vodivosť	elektrický proud	rozptyl světla
typická citlivosť (hmotnosť/ml)	µg	ng	µg	pg	pg	ng	ng	µg
lineárny rozsah	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ²
závislosť odezvy na prútku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotná závislosť	vysoká (10 ⁻⁴ jed. ind. lomu)	nizká	nizká	nizká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	nizká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano (částečně)

Tabuľka 1 Typy a vlastnosti detektorov [16], vybrané skratky popisujú nasledovné detektory: RI – detektor refraktometrický, UV/VIS – detektor spektrofotometrický, IR – detektor infračervený. FLD – detektor fluorimetrický, ECD – detektor elektrochemický, CONDUCT – detektor vodivostný, CORONA – Charged Aerosol Detector, ELSD - Evaporative Light Scattering Detector

2.2 Hmotnostná spektrometria

Technika hmotnostnej spektrometrie (MS) je spájaná s prívlastkami ako vysoko špecifická, veľmi citlivá, či technicky komplexná. Jej história sa datuje k začiatku

dvadsiateho storočia a objavu Josepha Johna Thomsona dokazujúceho existenciu elektrónov a pozitívneho žiarenia. Thomson spoločne s F. W. Astonom navrhli techniku merania, ktorá však pre rutinné využívanie zostala ešte niekoľko desaťročí v ústraní [17].

Hmotnostná spektrometria (MS) je analytická metóda slúžiaca na prevedenie molekúl na ióny, rozlíšenie týchto iónov podľa pomeru hmotnosti a náboja (m/z) a následnému záznamu relatívnych intenzít jednotlivých iónov. MS je radená medzi spektrálne techniky, aj keď podľa definície by tam patriť nemala, pretože spektrálne techniky merajú rozdiely energie medzi dvoma stavmi molekuly a sledujú pravdepodobnosť prechodu (IČ, UV, NMR, atď.), MS je medzi tieto techniky radená pre formálnu podobnosť získaných záznamov (hmotnostných spektier) s inými spektrami a podobné využitie (štruktúrna analýza). Táto metóda je vhodná predovšetkým pre identifikáciu neznámych zlúčenín, kvantifikáciu známych zlúčenín, objasňovanie štruktúry látok. Je to nástroj štúdia rôznych druhov látok, pričom poskytuje informácie o ich zložení, kvantitatívnych aspektoch a štruktúre a to aj z minimálneho množstva látky než obvyklé analytické techniky [17].

Hmotnostná spektrometria je teda inštrumentálna technika slúžiaca na separáciu elektricky nabitých častíc v plynnej fáze. Ióny sa produkujú v iónovom zdroji. Iónový zdroj napomáha prenosu analytov do plynnej fázy a ionizácii. Ióny plynnej fázy sa potom prenású do hmotnostného analyzátora. Elektrické signály, produkované iónovým detektorom, sa následne spracujú, aby sa vytvorilo hmotnostné spektrum. Rôzne typy bežne používaných zdrojov iónov zahŕňajú okrem iného elektrosprejovú ionizáciu a chemickú ionizáciu za atmosférického tlaku. Univerzálny iónový zdroj je vhodný pre ionizáciu analytov v jednom behu a z jedného nástreku [17].

Hmotnostné spektrá poskytujú informácie o relatívnom počte iónov pri rôznych hodnotách m/z . Detekované ióny môžu korešpondovať s adduktmi pôvodných molekúl alebo ich fragmentami. MS umožňuje priamu identifikáciu molekúl na základe pomeru hmotnosť/náboj, ako aj fragmentačných spektier.

2.3 Úprava vzoriek biologického materiálu

Voľba vhodnej techniky prípravy vzorky je závislá predovšetkým na druhu biologického materiálu, ako aj na chemickej štruktúre stanovovaných látok, a fyzikálno-chemických vlastnostiach [18]. Podmienky na uchovávanie vzoriek pred analýzou majú rovnako ako ich transport výrazný vplyv na stabilitu analytov,

resp. na výsledok vyšetrenia. Najpodstatnejší vplyv na stabilitu analytov má teplota uskladnenia vzorky, doba od odberu materiálu do vykonania analýzy a u fotolabilných látok je to expozícia svetla [19].

Pre dlhodobé skladovanie je dôležité, aby bol materiál správne uzavretý, aby bolo zabránené zahusteniu vzorky odparovaním, mikrobiálnej kontaminácii, vplyvu svetla a difúzii plynov. Pre moderné analytické metódy je podstatná predchádzajúca príprava vzorky, v rámci ktorej dochádza k izolácii a zakoncentrovaniu vybraných analytov. Takáto príprava vzoriek na analýzu je často najnáročnejším, ako aj najkritickejších krokom celej analýzy, predovšetkým v prípadoch vzoriek biologických materiálov. Na zvolenom spôsobe vykonania tejto fázy je závislý úspech celého analytického stanovenia, tak z kvalitatívneho, ako aj z kvantitatívneho hľadiska. Výber vhodnej techniky prípravy vzorky má vplyv nielen na presnosť stanovenia daného analytu, ale aj možnosť jeho určenia [19]. Variabilita vzoriek jednotlivých biologických materiálov je skutočne rozsiahla. Zaradíme sem najmä:

- krv,
- plazmu,
- sérum,
- moč,
- sliny,
- mozgovomiechový mok,
- spútum,
- stolicu a podobne [20].

Spoločnou vlastnosťou biologických materiálov je najmä vysoký obsah rôznych endogénnych látok, ktoré pôsobia rušivým spôsobom na analýzu väčšinou nízkych koncentrácií sledovaných látok a ich metabolitov, a preto je z daného dôvodu potrebné urobiť prvotne izoláciu analytov a odstrániť endogénne látky, aby došlo k zvýšeniu selektivity a citlivosti metódy stanovenia [20].

2.3.1 Proteínová precipitácia

Proteínová precipitácia sa bežne používa na odstránenie proteínov vo vzorkách. Zrážanie proteínov nastáva primárne hydrofóbnou agregáciou, zmenou pH, alebo interakciou proteínov s iónmi kovov (najčastejšie ióny zinočnaté), subtilným narušením zloženej štruktúry proteínu a vystavením viac hydrofóbného vnútra voči roztoku.

Akonáhle proteíny začnú agregovať do väčších štruktúr, množstvo vody na proteín klesne, čím sa zvýšia rozdiely hustoty medzi proteínmi a rozpustenou látkou [21].

Hlavné výhody proteínovej precipitácie sú predovšetkým:

- rýchly postup,
- minimálne vybavenie,
- jednoduchosť vývoja danej metódy [22].

Napriek tomu, že proteínová precipitácia je účinná pri odstraňovaní proteínov, nedochádza k úplnému vyčisteniu vzoriek. V supernatante zostáva komplexná zmes endogénnych a exogénnych látok, čo môže spôsobiť interferencie alebo matricové efekty pri chromatografickej a hmotnostnej spektrometrickej analýze a môže spôsobiť zníženie efektivity metódy. Nevýhodou proteínovej precipitácie je najmä:

- nízka špecifickosť pre cieľový analyt,
- strata analytu väzbou na precipitát
- nariadenie vzorky precipitačným činidlom [22].

2.3.2 Extrakcia na pevnej fáze

Extrakcia na pevnej fáze (SPE) je proces prípravy vzorky, ktorým sa zlúčeniny, ktoré sú rozpustené v kvapalnej zmesi, oddelia od iných zlúčenín v zmesi podľa ich fyzikálne-chemických vlastností prostredníctvom interakcií s pevnou fázou [25]. SPE sa najčastejšie používa na prípravu kvapalných vzoriek a extrakciu semivolatilných alebo neprchavých analytov. SPE je vynikajúce pre extrakciu vzoriek, koncentráciu a čistenie. Využíva afinitu rozpustených látok v kvapaline k sorbentu, ktorým prechádza vzorka. Výsledkom je, že požadované analyty alebo naopak nežiadúce látky vo vzorke zostanú na stacionárnej fáze. Extrakcia na pevnej fáze sa môže použiť na izoláciu požadovaných analytov zo širokej škály matric, vrátane moču, krvi, vody, nápojov, pôdy a homogenátu / hydrolyzátu živočíšneho tkaniva [23].

2.3.3 Extrakcia kvapalina/kvapalina

Extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE), tiež známa ako extrakcia rozpúšťadlom, je už dlho metódou extrakcie zlúčenín s rôznymi rozpustnosťami v dvoch nemiešateľných kvapalinách. Tieto dve kvapaliny sú typicky voda (biologická vzorka) a nemiešateľné organické rozpúšťadlo [24].

Izolácia analytu sa dosiahne rozdelením medzi organickú a vodnú fázu. Rozdeľovací pomer bude ovplyvnený výberom extrakčného rozpúšťadla, hodnotou pH vodnej fázy a pomerom objemov organickej fázy k vodnej fáze. Počiatočné podmienky extrakcie by mali byť také, aby sa analyt prednostne distribuoval do organického rozpúšťadla [24].

Nevýhodou použitia organických, s vodou nemiešateľných organických rozpúšťadiel je to, že v dôsledku ich nízkych dielektrických konštánt sú relatívne slabé pri extrakcii veľmi polárnych alebo nabitých analytov, ktoré môžu vyžadovať extrakcie pri extrémnych hodnotách pH. Viac polárne rozpúšťadlá (ako je acetonitril), ktoré poskytujú rozpustnosť pre tieto polárnejšie zlúčeniny, sú často miešateľné s vodou, a preto nemôžu byť použité pre konvenčné LLE [24].

2.4 Validácia bioanalytickej metódy

Rôzne regulačné orgány kladú osobitný dôraz na validáciu všetkých procesov používaných vo farmaceutickom priemysle [25]. V súčasnosti sa kladie dôraz na to, aby analytické metódy boli následne validované. Validácia predstavuje proces, ktorý overuje, či je metóda pre zamýšľané použitie vhodná. Pri výbere validačných parametrov je dôležité postupovať podľa príslušných medzinárodne uznávaných smerníc. Napríklad odporúčania organizácie FDA (Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry) sa zameriavajú na bioanalytické metódy, ktoré sa uplatňujú v klinickej farmakológii.

Medzi základné validačné parametre patrí:

- presnosť,
- precíznosť,
- linearita,
- selektivita,
- limity detekcie a kvantifikácie,
- výťažnosť extrakcie alebo
- robustnosť metódy [25].

Validácia analytických postupov je pre väčšinu analytických laboratórií nevyhnutnou, ale časovo náročnou činnosťou. Výsledok je však efektívny, eliminuje frustrujúce opakovania a nakoniec vedie k lepšiemu riadeniu času [25]

2.4.1 Presnosť

Presnosť charakterizuje presnosť zhody medzi priemerom nameraných hodnôt a referenčnou hodnotou. Nepriamo sa vzťahuje na systematické chyby merania. Mierou presnosti je zvyčajne bias [25].

2.4.2 Precíznosť

Precíznosť popisuje tesnosť zhody medzi nameranými hodnotami získanými opakovanými meraniami vzájomne nezávislých vzoriek za vopred špecifikovaných podmienok. K podmienkam opakovateľnosti zaraďujeme meranie rovnakého materiálu na tom istom zariadení jedným pracovníkom za použitia zhodného pracovného postupu, v rámci krátkeho časového rozmedzia.

Podmienky precíznosti zahŕňajú rovnaký merací postup, rovnaké miesto a rovnaké, či podobné objekty merania v rámci dlhšieho časovom úseku. Môžu obsahovať zmeny obsluhy, kalibrácia a ostatné. V rámci reprodukovateľnosti je následne meraný analyt vo vzorkách rovnakého biologického materiálu tou istou metódou v rôznych laboratóriách, časoch a / alebo rôznu obsluhou. Miera precíznosti je definovaná ako relatívna štandardná odchýlka pričom reflektuje mieru vplyvu náhodných chýb v rámci metódy [25].

V zmysle odporúčaní FDA z roku 2018 by mali byť v rámci hodnotenia daných parametrov vykonané 3 časovo nezávislé merania, v rámci ktorých by bolo analyzovaných aspoň 5 replikátov vzoriek obsahujúcich známe množstvá analytu v rozsahu 4 koncentračných hladín. Hodnoty bias a RSD v rámci daných meraní by nemali presiahnuť 15%, výnimkou je LLOQ, v prípade ktorého, by hodnoty nemali prekročiť 20%.

2.4.3 Linearita

Linearita je chápaná ako závislosť medzi dvoma náhodnými premennými, tj. odozvou inštrumentácie (analytickým signálom) a koncentráciou analytu. Korelačný koeficient závisí na rozložení bodov na priamke a preto sa môžu používať ďalšie testy, ktoré ďaleko viac vypovedajú o linearite [26]. Linearita teda vyjadruje schopnosť metódy poskytnúť v rozsahu prijateľnú lineárnu závislosť medzi odozvou detektora a koncentráciou analytu vo vzorke. Daná lineárna závislosť je popísaná napr. rovnicou kalibračnej krivky. Tesnosť vzájomnej závislosti dvoch náhodných premenných

charakterizuje korelačný koeficient (R). Korelačný koeficient často slúži na posúdenie linearity, väčšinou platí podmienka $R > 0,9990$. Kalibračná krivka by mala zahŕňať aspoň 6 kalibračných bodov pokrývajúcich očakávaný koncentračný rozsah, vrátane dolného limitu kvantifikácie (LLOQ). Súčasne s kalibrátormi by sa mala analyzovať aj vzorka matrice (blank) a vzorka matrice s prídavkom IS (nulový kalibrátor) [2].

Linearita kalibračného grafu úzko súvisí s výberom kalibračného modelu a pracovného rozsahu. Medzi faktory ovplyvňujúce linearitu zaraďujeme:

Po prvé, zdroj iónov sa správa lineárne iba vtedy, ak je ionizačná účinnosť analytu nezávislá od jeho koncentrácie. Pretože ionizačná účinnosť analytu a jeho správanie pri rôznych koncentráciách závisí od použitého zdroja iónov, lineárne rozsahy sa medzi rôznymi zdrojmi iónov líšia. V zdroji ESI lineárna závislosť zvyčajne trvá pri nižších koncentráciách, ale pri vyšších koncentráciách sa nadmerný náboj na povrchu kvapiek obmedzuje a linearita sa stráca. Spolu-eluujuce zlúčeniny môžu tiež ovplyvňovať ionizačný proces (tzv. matricový efekt) a viesť k zníženiu alebo strate linearity. Preto je najdôležitejšie skúmať linearitu v prítomnosti matricových zlúčenín.

Po druhé, počas prenosu iónov zo zdroja iónov do analyzátoru musí byť počet úspešne transportovaných iónov úmerný počtu iónov vytvorených v zdroji.

Po tretie, linearita iónového signálu závisí od konštrukcie analyzátoru a od linearity signálu detektora. Na zobrazenie lineárneho správania musí byť prenos nezávislý od koncentrácie [27].

2.4.4 Limity detekcie a kvantifikácie

Limit detekcie (LOD) zodpovedá koncentrácii, pre ktorú je daná odozva detektora štatisticky odlišná od šumu. V zásade sa jedná o odozvu, kedy výška píku analytu trojnásobne prevyšuje priemernú hodnotu šumu základnej línie slepej vzorky. Dolný limit kvantifikácie (LLOQ) predstavuje najnižšiu koncentráciu analytu, ktorú je možné stanoviť s dostatočnou presnosťou a precíznosťou. Odozva LLOQ by mala byť aspoň päťkrát vyššia ako spomínaná hodnota šumu. Horná miera kvantifikácie (ULOQ) je pre chromatografické testy rutinne definovaná ako najvyššia „prijateľná“ koncentrácia použitá v kalibračnej krivke. Odpovedá najvyššej koncentrácii, kedy stanovenie vyhovuje požiadavkam na presnosť a precíznosť [28].

2.4.5 Efektívnosť procesu

K posúdeniu účinnosti extrakčnej techniky možno využiť napríklad nasledujúci vzorec, ktorý zobrazuje rovnica 7:

$$\text{Rovnica 7:} \quad \text{Výt'aznosť} = \frac{\text{extrahovaná vzorka}}{\text{neextrahovaný roztok}} \cdot 100 \text{ [28].}$$

Matricové efekty majú veľký význam pri stanovovaní liečiv a ich metabolitov za použitia HPLC-MS. Matricové efekty možno definovať ako zmeny účinnosti ionizácie spôsobené prítomnosťou látky vychádzajúcou z kolóny spolu s analyzovanou látkou. Vznikajú ako výsledok pôsobenia medzi tuhými zložkami matrice a analytom. Mechanizmov, ktoré spôsobujú matricové efekty, je veľa, a nie všetky sú úplne objasnené [28].

V kvantitatívnej metóde je porovnávaná plocha píku cieľového analytu pridaného post-extrakčne k biologickej matrici (A) s plochou píku cieľového analytu v štandardnom roztoku (B). Vzťah pre výpočet matricových efektov zobrazuje rovnica 8.

$$\text{Rovnica 8:} \quad \text{ME} = \frac{A}{B} \times 100 \text{ [28].}$$

„Hodnota ME (%) > 100 indikuje zosilnenie ionizácie, zatiaľ čo ME (%) < 100 potlačenie ionizácie. Ďalej je možné hodnotiť účinnosť celého procesu (Process Efficiency - PE)“ [37].

2.4.6 Selektívnosť

Selektívnosť je schopnosť bioanalytickej metódy diferencovať a kvantifikovať analyt v prítomnosti iných zložiek vo vzorke. Na vyhodnotenie selektivity metódy je potrebné analyzovať minimálne 6 vzoriek získaných z rôznych zdrojov. Najjednoduchším testom selektivity metódy je analýza prázdnej biologickej matrice (blanku) a dokázanie neprítomnosti interferencií v retenčných časoch hodnotených analytov [28].

2.5 Warfarín

Warfarín (*3-(α -acetylbenzyl)-4-hydroxykumarín*) je široko používaný perorálny antikoagulant. Tento liek má asymetrický atóm uhlíka a existuje v dvoch enantiomérnych formách, R- a S-warfaríne. Klinická forma liečiva je racemát, ale S forma je účinnejšia. U pacientov s hlbokou žilovou trombózou alebo fibriláciou predsiení existuje zvýšené riziko tvorby trombov v dôsledku zníženého pohybu krvi [29]. Tromby spôsobené venóznou trombózou môžu putovať do pľúc a spôsobiť pľúcnu embóliu a blokovat' cirkuláciu do časti pľúcneho tkaniva. Tromby, ktoré sa tvoria v srdci, môžu cestovať do mozgu a spôsobiť ischemické mozgové príhody. Prevencia týchto príhod je primárnym cieľom liečby warfarínom [30].

Warfarín je antagonist vitamínu K, ktorý inhibuje jeho aktiváciu epoxidovou reductázou. Karboxylácia faktorov, ktorú sprostredkováva aktivovaný vitamín K, indukuje konformačnú zmenu umožňujúcu faktorom viazať Ca^{2+} na fosfolipidové povrchy. Nekarboxylované faktory VII, IX, X, trombín a antikoagulačné proteíny C a S sú biologicky inaktívne [31].

Warfarín sa viaže na podjednotku 1 komplexu epoxid reductázy vitamínu K a ireverzibilne inhibuje enzým, čím zastavuje recykláciu vitamínu K, tým že bráni premene epoxidu vitamínu K na vitamín K_1 . Tento proces krátkodobo vytvára hyperkoagulačný stav, pretože proteíny C a S sa rozkladajú najskôr s polčasmi 8 a 24 hodín, s výnimkou faktora VII, ktorý má polčas rozpadu 6 hodín. Faktory IX, X a nakoniec trombín, neskôr degraduje s polčasmi 24, 36 a 50 hodín, čo má za následok dominantný antikoagulačný účinok [30].

Aby sa tento antikoagulačný účinok zvrátil, musí sa dodávať vitamín K, buď exogénne alebo odstránením inhibície vitamínu K epoxid reductázy, a času, ktorý je potrebný na dosiahnutie tohto účinku. Vitamín K_2 , funkčne identický s vitamínom K_1 , je syntetizovaný črevnými baktériami, čo vedie k interakciám s antibiotikami.

Terapeutický účinok warfarínu a iných kumarínových antikoagulancií sa zvyčajne monitoroval z protrombínových časov. Okrem toho sú občas potrebné testy warfarínu v plazme na kontrolu compliance pacienta na liečbu, na kvantifikáciu skrytého antikoagulačného požitia, na monitorovanie rezistencie na warfarín a na štúdium interakcií warfarínu s inými liečivami [32].

Liečba warfarínom je obtiažna vzhľadom na významnú intra a interindividuálnu variabilitu, nízky terapeutický index a vysoko variabilnú farmakokinetiku. Požiadavky na dávku warfarínu sa značne líšia medzi jednotlivcami a tiež u tej istej osoby v rôznych časových rozpätiach kvôli širokému spektru faktorov, ako je vek, pohlavie, hmotnosť, etnická príslušnosť, genetické faktory, príjem potravy, súbežné ochorenia a iné liečivá. Neadekvátne antikoagulačné dávkovanie môže viesť k značnej morbidite a mortalite v dôsledku zlyhania prevencie tromboembolizmu resp. komplikácií krvácania. Strach z komplikácií často spôsobuje, že lekári sa vyhýbajú predpisovaniu warfarínu pacientom, u ktorých je pravdepodobné, že budú mať prospech z takejto liečby. Warfarín sa rutinne monitoruje hodnotením jeho farmakologických účinkov. Ak však pacient s INR nereaguje na zvyšujúcu sa dávku warfarínu, vyžaduje si to priame meranie koncentrácií warfarínu pre lepšie klinické zvládnutie liečby [33].

2.5.1 Farmakokinetika

Warfarín sa rýchlo vstrebáva z gastrointestinálneho traktu s takmer 100% biologickou dostupnosťou a podobnými distribučnými objemami oboch enantiomérov. Liečivo sa značne viaže na plazmatické proteíny, hlavne na ľudský sérový albumín (HSA) a farmakologický účinok má len neviazaná frakcia warfarínu [33].

Na HSA proteíne je k dispozícii niekoľko miest pre interakciu ligandu a väzbu. Warfarín sa viaže na oblasť, ktorá je známa ako väzbové miesto azapropazónu. Predchádzajúce štúdie navrhli dvojkrokový väzbový model, kde prvý krok je rýchly a druhý je uľahčený konformačnou zmenou proteínu za vzniku stabilného komplexu HSA-warfarínu. Izomér (R) sa viaže na HSA s vyššou afinitou ako (S)-enantiomér. Obidva enantioméry sa tiež líšia vo svojich clearance. V rovnovážnom stave je plazmatická hladina (R)-warfarínu 1,5-krát vyššia ako hladina (S)-enantioméru, ako preukázali Osman a kol. u 141 stabilných antikoagulovaných pacientov

Plazmatické polčasy (S) - a (R) warfarínu sa odhadujú na 29 a 45 hodín. Warfarín podlieha stereoselektívnemu a regioselektívnemu metabolizmu v pečeni enzýmami cytochrómu P450 (CYP) na neaktívne metabolity, ktoré sa vylučujú močom a stolicou. Polčas warfarínu sa pohybuje od 20 do 60 hod. Hlavný (S)-warfarín metabolizujúci enzým bol pôvodne označovaný ako vysokoafinitná (S)-warfarín 7-hydroxyláza, ale bol identifikovaný ako CYP2C9 (cytochróm P450, rodina 2, podrodina C, polypeptid 9).

Tento enzým je regioselektívny hlavne pre uhlík 7 (S)-warfarínu, čím vzniká 7-hydroxywarfarín a v menšej miere pre 6-hydroxywarfarín. Metabolizmus (R)-warfarínu je však zložitejší a je stále predmetom diskusie. Predpokladá sa, že CYP1A2 je stereoselektívny na tvorbu 6-, 7- a 8-hydroxy (R)-warfarínu, s regioselektivitou v polohe 6. Predpokladá sa však, že CYP3A4, CYP2C8, CYP2C18 a CYP2C19 sú tiež zapojené do biokonverzie (R)-warfarínu. Warfarín sa ďalej spracováva vo fáze II metabolizmu. U potkanov sa zdá, že glukuronidácia je prevládajúcou cestou pre 4'-hydroxywarfarín, zatiaľ čo 6-hydroxywarfarín sa nachádza hlavne ako sulfátové konjugáty [34].

3 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce bolo optimalizovať podmienky chromatografického systému u HPLC-MS s hmotnostným spektrometrom s lineárnou iónovou pascou LTQ XL, zvoliť vhodnú úpravu biologického materiálu, vybrať vhodný vnútorný štandard a overiť vybrané validačné parametre pre analýzu warfarínu zo séra pacientov. Následne bolo cieľom porovnať túto zvalidovanú metódu s už vyvinutou metódou UHPLC–HRMS na Úseku klinickej a forenznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové.

Dôvodom optimalizácie bolo využitie laboratórnej inštrumentácie a zrýchlenie práce na Úseku klinickej a forenznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové. Doteraz sa hladina warfarínu v sére merala len už vyvinutou metódou UHPLC-HRMS.

4 Experimentálna časť

4.1 Použitý materiál, chemikálie, pomôcky a prístroje

- LC-MS Acetonitril, LC-MS Metanol, LC-MS Isopropanol, zásobný roztok warfarínu v metanole (1 mg/ml), zásobný roztok citalopramu-d6, zolpidemu-d6, rezerpínu, trazodónu-d6, venlafaxínu-d6, qetiapínu-d8 a olanzapínu-d8 (každý 100 µg/ml v metanole) (Merck, Darmstadt, Nemecko)
- Sérum (Transfúzne oddelenie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, Česká republika)
- Ultračistá voda (pripravená pomocou systému Milli-Q, Millipore, Merck, Darmstadt, Nemecko)
- Automatické pipety a plastové špičky (Thermo Fischer Scientific Inc., Vantaa, Finsko)
- Sklenené kadičky
- Plastové mikroskúmavky 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemecko)
- Vortex
- Centrifúga (typ 1-14K, Sigma, Osterodeam Harz, Nemecko)
- Vialky
- UHPLC-Orbitrap-MS (kvapalinový chromatograf Ultimate 3000 RS čerpadlo Dionex (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) vybavené odplyňovačom, kvartérnym čerpadlom, chladeným autosamplerom, termostatovaným kolónovým priestorom, spojený s hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením (Orbitrap® Q-ExactiveFocus, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)
- HPLC-LIT-MS (kvapalinový chromatograf, ktorý pozostával z binárnej pumpy Rheos 2200 (Flux Instruments, Basel, Švajčiarsko) a autosampleru, termostatovaného kolónového priestoru (PAL systém od CTC Analytics, Zwingen, Švajčiarsko), pripojený k hmotnostnému spektrometru s lineárnou iónovou pastvou (LTQ XL, Thermo Fisher Scientific Corp., San Jose, USA)

4.2 Chromatografické podmienky a nastavenie hmotnostného spektrometru

Zloženie mobilnej fázy bolo nasledovné :

A) 0,1 % kyselina mravčia vo vode

B) 0,1 % kyselina mravčia v ACN/MeOH v pomere 50/50 (V/V)

Pre chromatografiu bol zvolený gradientový elučný program nasledovne:

- 0 až 0,3 minúty (95% A)
- 0,3 až 4 minúta (95 → 5% A)
- 4 až 5,5 minúta (5% A)
- 5,51 minúta (95% A)
- 5,51 až 7,0 minúta (95 % A)

Prietok bol 0,50 ml/min.

Celková doba analýzy bola 7,0 minút.

Na hmotnostne spektrometrickú detekciu sa použil LTQ XL vybavený zdrojom elektrosprejovej ionizácie (ESI) prevádzkovaným v pozitívnom iónovom režime. Detekcia bola uskutočnená v režime MS/MS CID (kolíziou indukovaná disociácia).

Optimalizácia experimentálnych podmienok MS/MS sa uskutočňovala najprv infúziou a potom injekciou štandardného roztoku warfarínu. Po optimalizácii boli parametre zdroja nastavené nasledovne:

- kapilárne napätie 30,5 V;
- trubicová šošovka 95,0 V;
- prietok sheathgas 28,0 arb;
- teplota kapiláry 295 ° C a napätie na elektrospreji ± 3,5 kV;
- normalizovaná energia zrážky 28,0% pre warfarín a 30,0% pre IS.

Na kvantitatívne vyhodnotenie sa použil prechod m/z 309,2 → 163,0 (warfarín) a m/z 331,1 → 262,2 (IS). Dáta boli spracované pomocou softvéru Thermo Fisher Xcalibur (verzia 3.1.66.10/15.1.2015)

4.3 Metodika

4.3.1 Príprava štandardných roztokov

4.3.1.1 Kalibračné roztoky

Bola pripravená rada deviatich kalibračných roztokov. Zo zásobného roztoku warfarínu o koncentrácii 1 000 µg/ml bol pripravený kalibračný roztok číslo 9 odobraním 45 µl zásobného roztoku warfarínu a doplnením acetonitrilu na objem 750 µl, aby koncentrácia tohto roztoku bola 60 µg/ml. Následne boli pripravené aj ďalšie štandardné roztoky odobratím 345 µl vždy predchádzajúceho štandardného roztoku a doplnením acetonitrilu na objem 500 µl. Z týchto kalibračných roztokov boli pripravené kalibračné vzorky pridaním 5 µl kalibračného roztoku do 20 µl blankového séra. Koncentrácie jednotlivých kalibračných roztokov ako aj ich výsledné koncentrácie v sére sú uvedené v tabuľke číslo 2.

Kalibračný roztok	Koncentrácia kalibračného roztoku	Výsledná koncentrácia v sére
	[µg/ml]	[µg/ml]
1	3,070	0,768
2	4,452	1,113
3	6,456	1,614
4	9,361	2,340
5	13,573	3,393
6	19,681	4,920
7	28,537	7,134
8	41,379	10,345
9	60,000	15,000

Tabuľka 2 Koncentrácie warfarínu jednotlivých kalibračných roztokov

4.3.1.2 QC roztoky

QC roztoky boli pripravované na objem 400 µl.

QCC roztok bol pripravený z kalibračného roztoku číslo 9 a to odobratím 259 µl kalibračného roztoku číslo 9 a doplnením acetonitrilu na požadovaný objem 400 µl. Z tohto pripraveného roztoku bol následne pripravený roztok QCB a to odobratím 160 µl

roztoku QCC a doplnením acetonitrilu na požadovaný objem 400 μ l. Roztok QCA bol pripravený odobratím 197 μ l roztoku QCB a doplnením acetonitrilu na požadovaný objem 400 μ l. Z týchto QC roztokov boli pripravené QC vzorky pridaním 5 μ l jednotlivých QC roztokov do 20 μ l blankového séra. Koncentrácie jednotlivých QC roztokov ako aj výsledné koncentrácie v QC vzorkách sú uvedené v tabuľke číslo 3.

	Koncentrácia QC roztoku	Koncentrácia QC vzorky
	[μ g/ml]	[μ g/ml]
QCA	7,676	1,919
QCB	15,552	3,888
QCC	38,880	9,720

Tabuľka 3 Koncentrácie jednotlivých QC roztokov a QC vzoriek

Ako roztok na spodnom limite kvantifikácie (LLOQ) bol použitý kalibračný roztok číslo 1 o koncentrácii warfarínu 0,768 μ g/ml v sére.

4.3.1.3 Roztok vnútorného štandardu

Zmesný zásobný roztok vnútorného štandardu bol pripravený zmiešaním 5 μ l citalopramu-d6 o koncentrácii 100 μ g/ml, 4 μ l klonazepamu-d4 o koncentrácii 100 μ g/ml, 4 μ l olanzapínu-d8 o koncentrácii 100 μ g/ml, 20 μ l quetiapínu-d8 o koncentrácii 100 μ g/ml, 8 μ l rezerpínu o koncentrácii 100 μ g/ml, 50 μ l trazodónu-d6 o koncentrácii 100 μ g/ml, 20 μ l venlafaxínu-d6 o koncentrácii 100 μ g/ml a 10 μ l zolpidému-d6 o koncentrácii 100 μ g/ml a doplnením acetonitrilu do objemu 500 μ l.

Odobratím 0,125 ml z tohto zásobného roztoku vnútorného štandardu a doplnením 9,875 ml acetonitrilu bol pripravený roztok acetonitrilu s vnútorným štandardom o objeme 10 ml.

4.3.2 Úprava biologického materiálu a výber vnútorného štandardu

Ako biologický materiál bolo použité sérum. Vzorka sa upravovala precipitáciou proteínov pomocou organického činidla. Bol skúšaný acetonitril, metanol a isopropanol.

Ku 20 μ l séra bolo pridaných 5 μ l kalibračného roztoku a nakoniec 400 μ l roztoku organického rozpúšťadla s vnútorným štandardom. Následne bola každá vzorka 5 minút

premiešavaná na vortexe. Precipitát bol odstredený pomocou centrifúgy (10 minút pri 12,074 g). Následne bolo 300 μ l supernatantu prenesených do vialiek a meraných pomocou LC–MS/MS. Takto bola pripravená a meraná celá kalibračná rada s deviatimi nenulovými kalibrátormi, ktoré boli pripravované a merané v duplikáte.

Vnútorňý štandard bol vybraný na základe indexu determinácie kalibračnej krivky.

4.3.3 UHPLC–HRMS metóda

Pre analýzu warfarínu bola pred časom na Úseku klinickej a forenznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové vyvinutá metóda na UHPLC–HRMS. Po precipitácii acetonitrilovým roztokom rezerpínu (vnútorňý štandard) boli vzorky 5 minút premiešavané na vortexe. Precipitát bol odstredený pomocou centrifúgy (10 minút pri 12,074 g). Následne bolo 300 μ l supernatantu prenesených do vialiek a meraných.

Metóda spĺňala požadované validačné kritériá. Chromatografická separácia sa uskutočňovala na Luna Omega 1,6 μ m Polar C18, 50 x 2,1 mm ID (Phenomenex, Torrance, CA, USA), chránenom predkolónou Security Guard Ultra C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA)).

4.3.4 Validácia

Metóda bola validovaná v zhode so smernicou EMA o validácii bioanalytických metód čo sa týka: kalibračnej krivky, precíznosti, presnosti, výťažnosti, matricových efektov a stability [35].

4.3.4.1 Kalibračná krivka

Pre kalibračnú závislosť bola použitá rada vzoriek séra so známym obsahom analytu. Hodnotená bola ako závislosť pomeru odozvy analytu a vnútorného štandardu na koncentrácii. Kalibrácia bola meraná v duplikáte v troch rôznych dňoch (celkom n=6). Ako hlavné kritérium bol zvolený index determinácie a presnosť merania po spätnom prepočte.

4.3.4.2 Presnosť a precíznosť

Presnosť a precíznosť boli hodnotené na štyroch koncentračných úrovniach (LLOQ, nízkej, strednej a vysokej). Nízka koncentrácia (QCA) bola trojnásobkom LLOQ. Vzorky boli merané po piatich v každej koncentrácii (n=5).

Hodnotená bola presnosť a precíznosť v rámci jedného dňa ale aj v rámci troch dní (intra-day, inter-day).

4.3.4.3 Matricové efekty

Matricové efekty boli hodnotené porovnaním blankových extraktov s 20 μ l séra, do ktorých bolo pridané po extrakcii 2,5 μ l vždy príslušného QC roztoku a 2,5 μ l vnútorného štandardu so vzorkami obsahujúcimi namiesto séra 20 μ l ultračistej vody. Precipitácia proteínov bola prevedená pridaním 400 μ l acetonitrilu.

Boli pripravené, merané a hodnotené vzorky na troch koncentračných úrovniach (nízkej, strednej, vysokej) vid' tabuľka číslo 3 a to vždy v triplikáte.

4.3.4.4 Výťažnosť

Výťažnosť bola hodnotená porovnaním QC vzoriek upravených pomocou precipitácie proteínov pridaním 400 μ l ACN s IS s blankovými extraktmi obsahujúcich 20 μ l séra a 400 μ l acetonitrilu, do ktorých bolo pridané po extrakcii 2,5 μ l vždy príslušného QC roztoku a 2,5 μ l vnútorného štandardu.

Boli pripravené, merané a hodnotené vzorky na troch koncentračných úrovniach (nízkej, strednej, vysokej) vid' tabuľka číslo 3 a to vždy v triplikáte.

4.3.4.5 Stabilita

QC roztoky boli pripravené už v prvej sekvencii podľa postupu uvedeného v kapitole 4.3.1.2.

Na zistenie stability po opakovanom rozmrazení a zmrazení boli pripravené 3 vzorky QCB a 3 vzorky QCC. Ku 20 μ l séra bolo pridaných 5 μ l QC roztoku. Takto pripravené roztoky boli na 24 hodín vložené do mrazničky pri -20°C . Následne boli vzorky rozmrazené pri izbovej teplote a opäť zamrazené. Tento cyklus prebehol 3x. Potom bola prevedená úprava precipitáciou proteínov (vid' kapitola 4.3.2).

Na zistenie stability pri laboratórnej teplote boli pripravené opäť 3 vzorky QCB a 3 vzorky QCC. Ku 20 μ l séra bolo pridaných 5 μ l QCB roztoku pre QCB vzorku a 5 μ l QCC roztoku pre QCC vzorku. Takto pripravené vzorky boli ponechané na pracovnom stole 2,5 hodiny a následne bola prevedená precipitácia proteínov podľa postupu v kapitole 4.3.2.

Na zistenie stability v autosampleri boli pripravené 3 vzorky QCB a QCC podľa postupu v kapitole 4.3.1.2 a upravené precipitáciou proteínov podľa postupu v kapitole

4.3.2. Vzorky boli po prvom meraní opakovane nastrieknuté na kolónu a znova zmerané po 24 hodinách státi v autosampleri pri teplote 9°C.

Hodnotenie bolo prevedené ako zmena koncentrácie oproti pôvodnej hodnote.

4.3.4.6 *Príprava patientských vzoriek*

Pacientské vzorky boli pripravené odobratím séra od 20 pacientov. Každá vzorka bola upravená precipitáciou proteínov. Ku 20 µl séra bolo pridaných 400 µl roztoku acetonitrilu s vnútorným štandardom. Vzorky boli miešané 5 minút na vortexe a následne vložené do centrifúgy na 10 minút pri 12,074 g. Po vybratí z centrifúgy bolo odobraných 300 µl, prenesených do vialiek a následne analyzovaných.

Takto pripravené vzorky boli merané na prístroji LTQ a taktiež na prístroji ORBITRAP pre porovnanie.

5 Výsledky a diskusia

5.1 Výber úpravy biologického materiálu

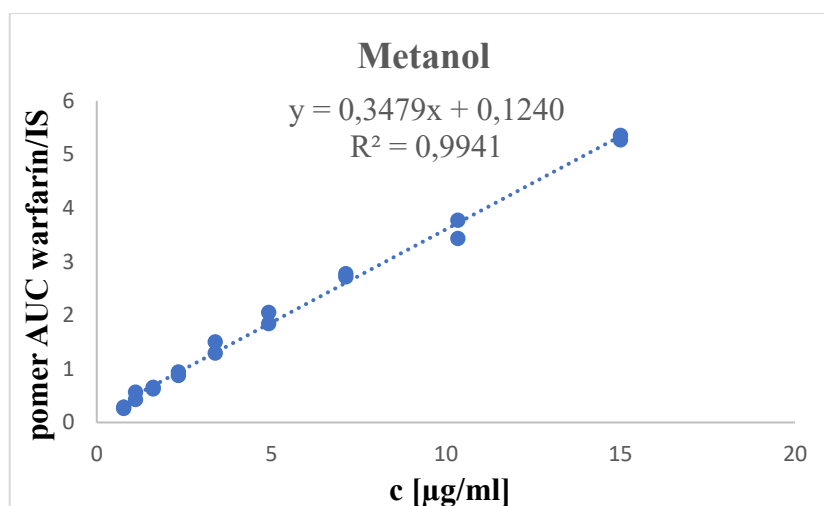
Na úpravu biologického materiálu bol zvolený postup precipitácie proteínov. Boli skúšané tri organické činidlá – metanol, isopropranol a acetonitril. U každého činidla bola premeraná a vyhodnotená kalibračná rada a vyneseny graf lineárnej závislosti pomeru plochy pík warfarínu k vnútornému štandardu a koncentrácie vid' graf číslo 1, 2 a 3. V tabuľke číslo 4 sú uvedené výsledky popisujúce smernicu priamky, úsek priamky a index determinácie pre všetky tri skúšané organické činidlá.

Najlepší index determinácie, dostatočná citlivosť a relatívne dobrá (aj keď hodnotená len z dvoch vzoriek) opakovateľnosť boli u acetonitrilu, ktorý sme zvolili za najvhodnejší a pracovali ďalej už len s ním.

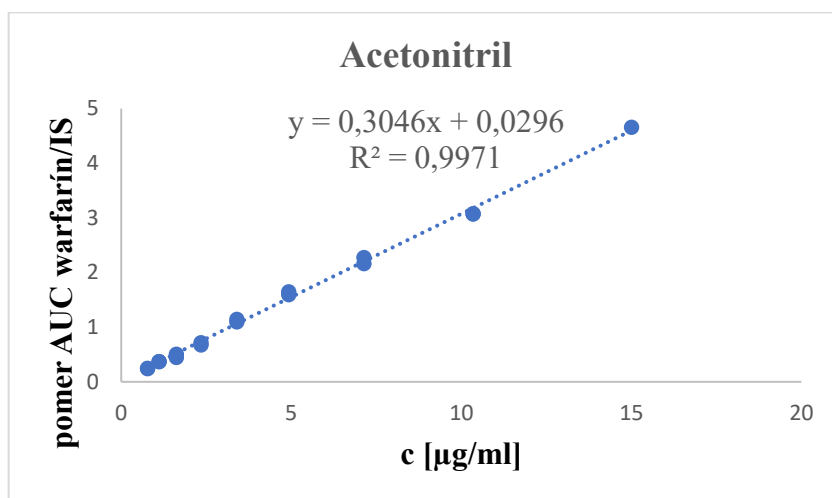
Acetonitril bol použitý ako precipitačné činidlo aj u metódy, ktorá bola vyvinutá pre UHPLC–HRMS.

Organické rozpúšťadlo	Smernica priamky	Úsek priamky	R ²
metanol	0,3479	0,1240	0,9941
acetonitril	0,3046	0,0296	0,9971
isopropanol	0,3288	0,1318	0,9875

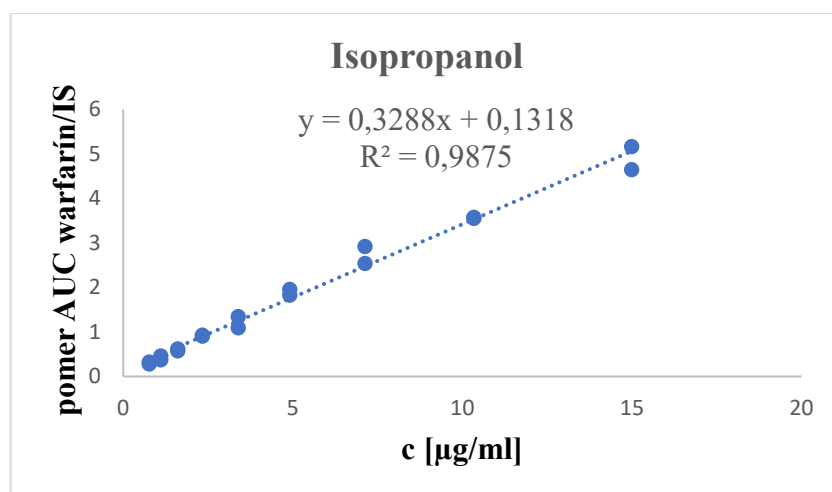
Tabuľka 4 Výsledky popisujúce smernicu priamky, úsek priamky a index determinácie u jednotlivých organických rozpúšťadiel



Graf 1 Závislosť pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 na koncentrácii za použitia metanolu



Graf 2 Závislosť pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 na koncentrácii za použitia acetonitrilu



Graf 3 Závislosť pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 na koncentrácii za použitia isopropanolu

5.2 Výber vnútorného štandardu

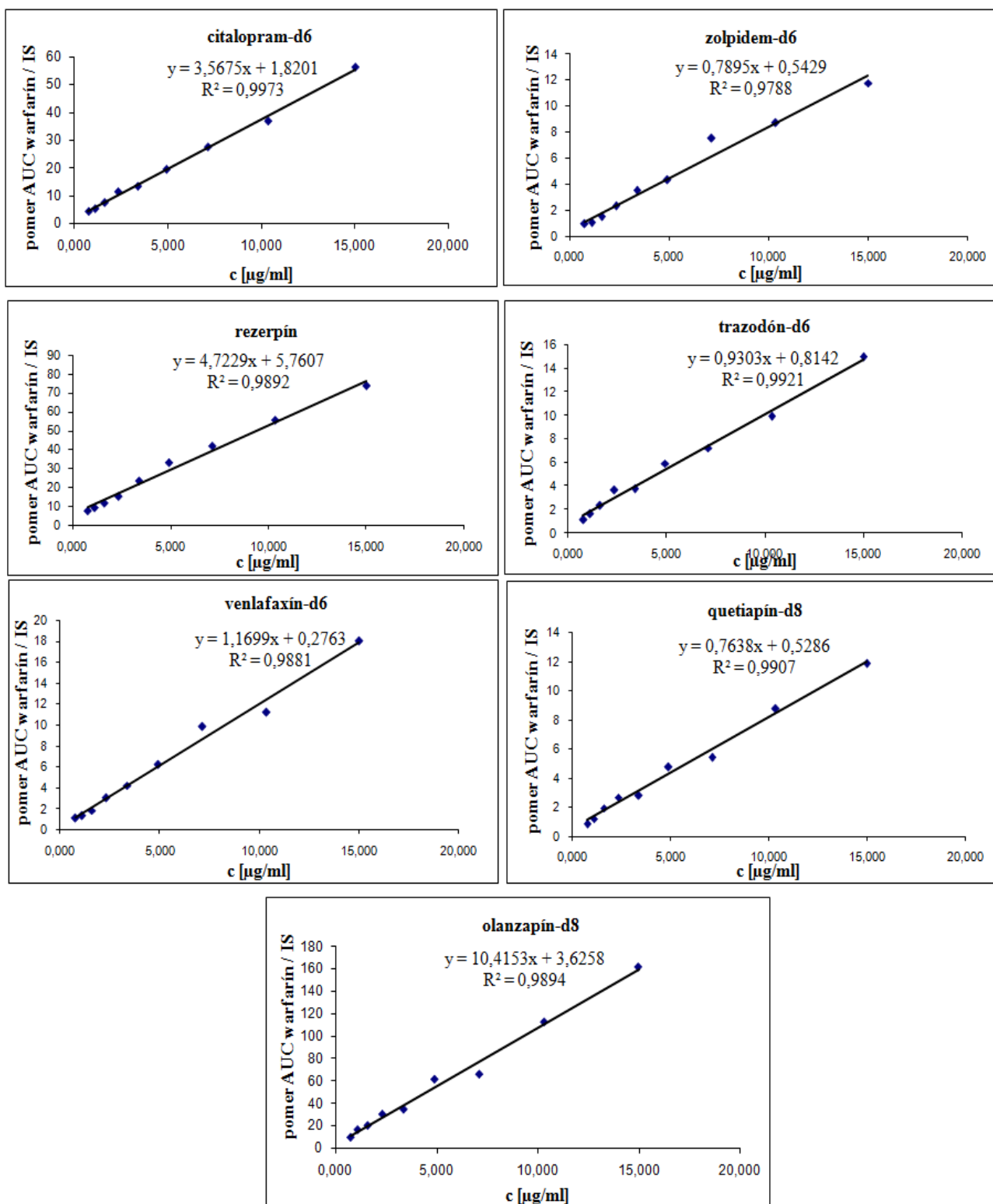
Pri výbere vnútorného štandardu bolo porovnávaných sedem látok: citalopram-d6, zolpidem-d6, rezerpín, trazodón-d6, venlafaxín-d6, qetiapín-d8 a olanzapín-d8. Z týchto látok bolo potrebné vybrať najvhodnejšiu, ktorá sa bude používať ako vnútorný štandard.

U každej látky sa hodnotila kalibračná krivka a bol zostrojený graf závislosti pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu na koncentrácii warfarínu vo vzorke, ktorá bola upravená precipitáciou proteínov pomocou acetonitrilu.

U každého grafu boli pomocou programu Excel vypočítané lineárne rovnice a určený index determinácie. Najlepší index determinácie bol vyhodnotený u citalopramu-d6. Táto látka bola preto vybraná ako vnútorný štandard. Jednotlivé výsledky indexov determinácie všetkých látok testovaných na výber vnútorného štandardu sú uvedené v tabuľke číslo 5. Grafy závislostí pomeru odozvy detektoru warfarínu a jednotlivých vnútorných štandardov na koncentrácii warfarínu sú zobrazené na obrázku číslo 2.

Názov IS	R ²
citalopram-d6	0,9973
zolpidem-d6	0,9788
rezerpín	0,9892
trazodón-d6	0,9921
venlafaxín-d6	0,9881
qetiapín-d8	0,9907
olanzapín-d8	0,9894

Tabuľka 5 Výsledky indexov determinácie u jednotlivých testovaných vnútorných štandardov



Obrázok 2 Jednotlivé grafy závislostí odoziev detektoru warfarínu a vnútorných štandardov, ktoré boli skúšané pre výber vnútorného štandardu, na koncentrácii warfarínu

5.3 Validácia

5.3.1 Kalibračná krivka

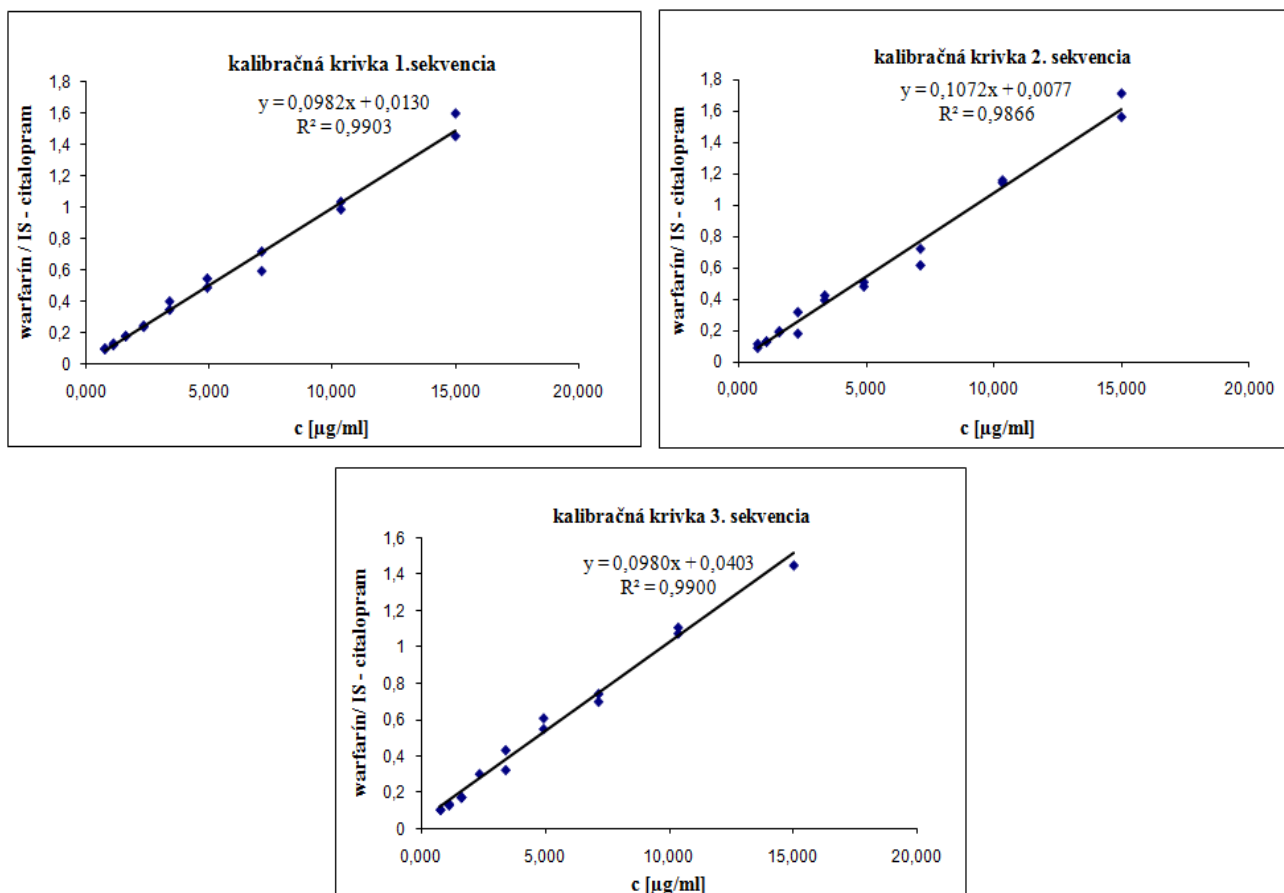
Na zostrojenie kalibračnej krivky bola pripravená kalibračná rada s deviatmi koncentračnými hladinami zahŕňajúca spodnú hladinu kvantifikácie (LLOQ) – 0,768 µg/ml až po najvyššiu hladinu kvantifikácie (ULOQ) – 15 µg/ml . Kalibračné rozmedzie koncentrácií bolo určené podľa terapeutického rozmedzia warfarínu, čo je pre terapeutickú koncentráciu 1 – 3 µg/ml a toxickú koncentráciu 10 – 12 µg/ml [38].

Kalibračná krivka bola zostrojená ako závislosť pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 na koncentrácii warfarínu vo vzorke. Takto bola zostrojená kalibračná krivka v prvý, druhý aj tretí deň. Ku každej kalibračnej krivke bola vypočítaná lineárna rovnica regresnej funkcie a vypočítaný index determinácie, úsek priamky a smernica priamky lineárnej závislosti, ktorých hodnoty môžeme vidieť v tabuľke číslo 6. Kalibračné krivky jednotlivých dní sú znázornené na obrázku číslo 3.

Pri spätnom prepočte koncentrácií, pomocou rovnice lineárnej závislosti, viac ako 75% štandardov v prvom meraní a minimálne jeden štandard na každej koncentračnej úrovni pri duplikátnom meraní, vyhovoval požiadavkam podľa smernice EMA limitu $\pm 15\%$ referenčnej hodnoty koncentrácie warfarínu vo vzorke a dolný limit kvantifikácie spĺňal požiadavok $\pm 20\%$ referenčnej hodnoty.

sekvencia	Smernica priamky	Úsek priamky	R ²
1.	0,0982	0,0130	0,9903
2.	0,1072	0,0077	0,9866
3.	0,0980	0,0403	0,9900

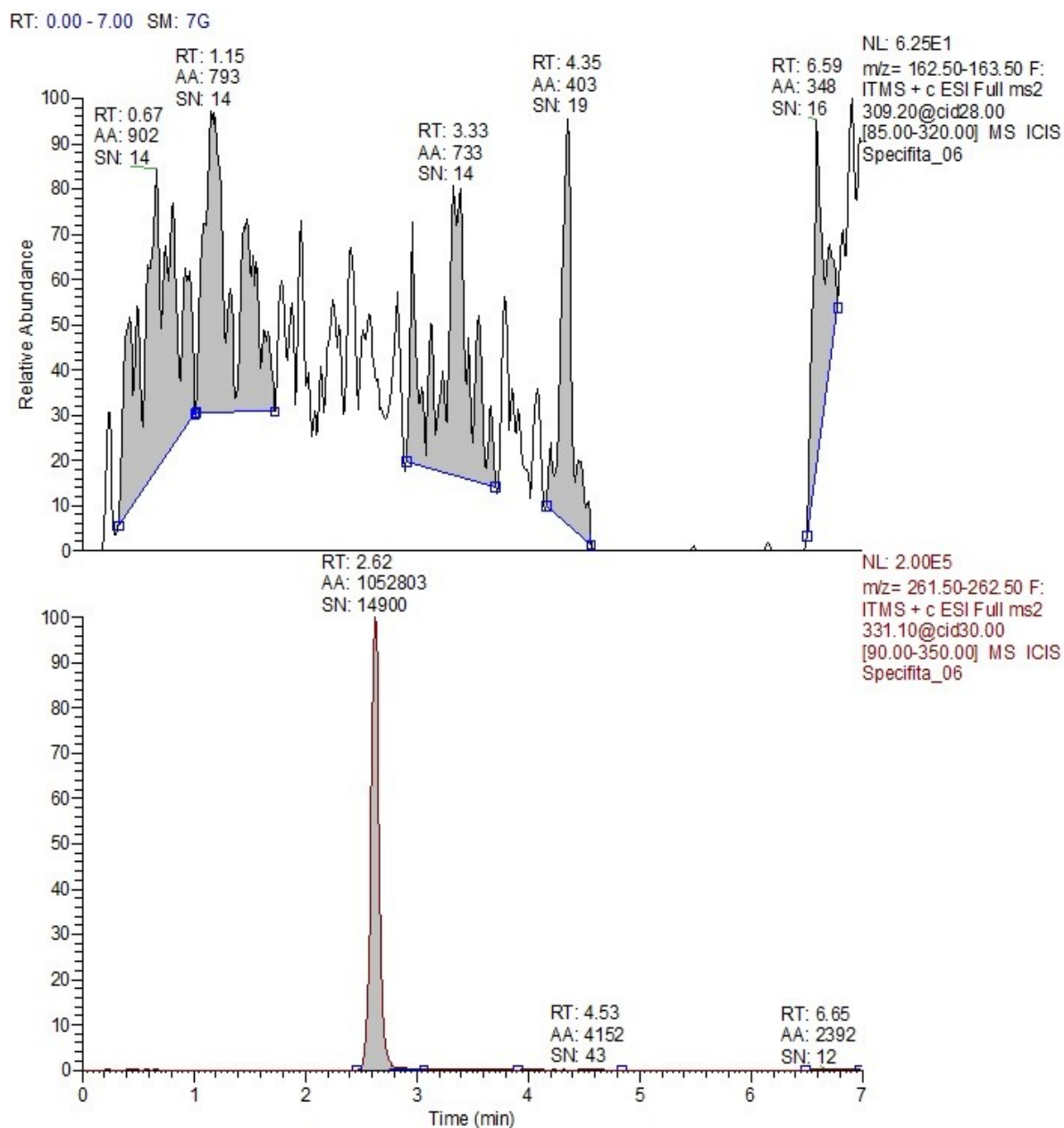
Tabuľka 6 Výsledky úseku priamky, smernice priamky a indexu determinácie v prvý, druhý a tretí deň



Obrázok 3 Grafy závislosti pomerov odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu na koncentráciách v prvý deň, druhý deň a tretí deň

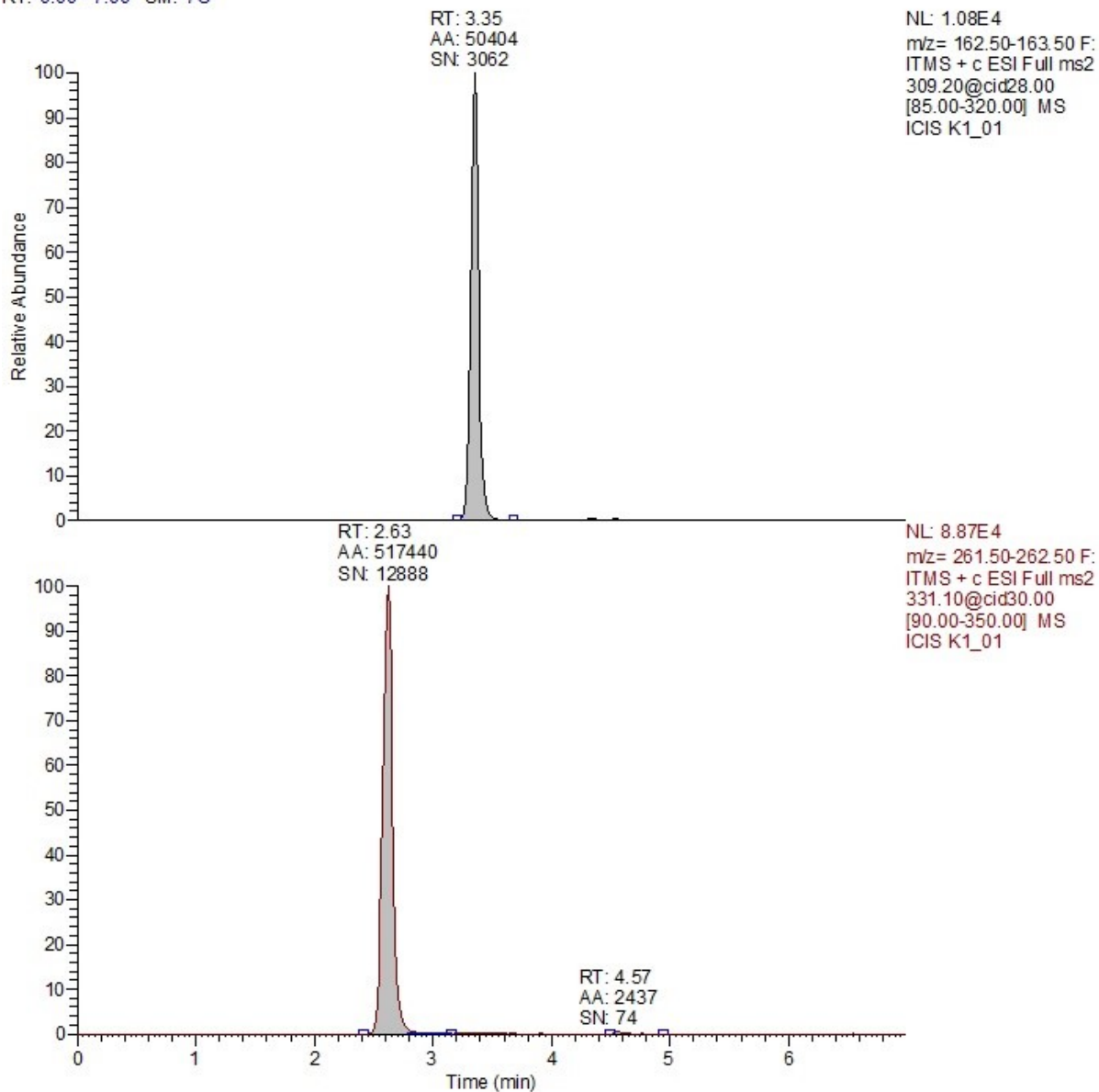
5.3.2 Selektivita

Selektivita bola hodnotená analýzou vzoriek zo šiestich individuálnych zdrojov. Ukážkové chromatogramy sú na obrázkoch 4, 5 a 6.



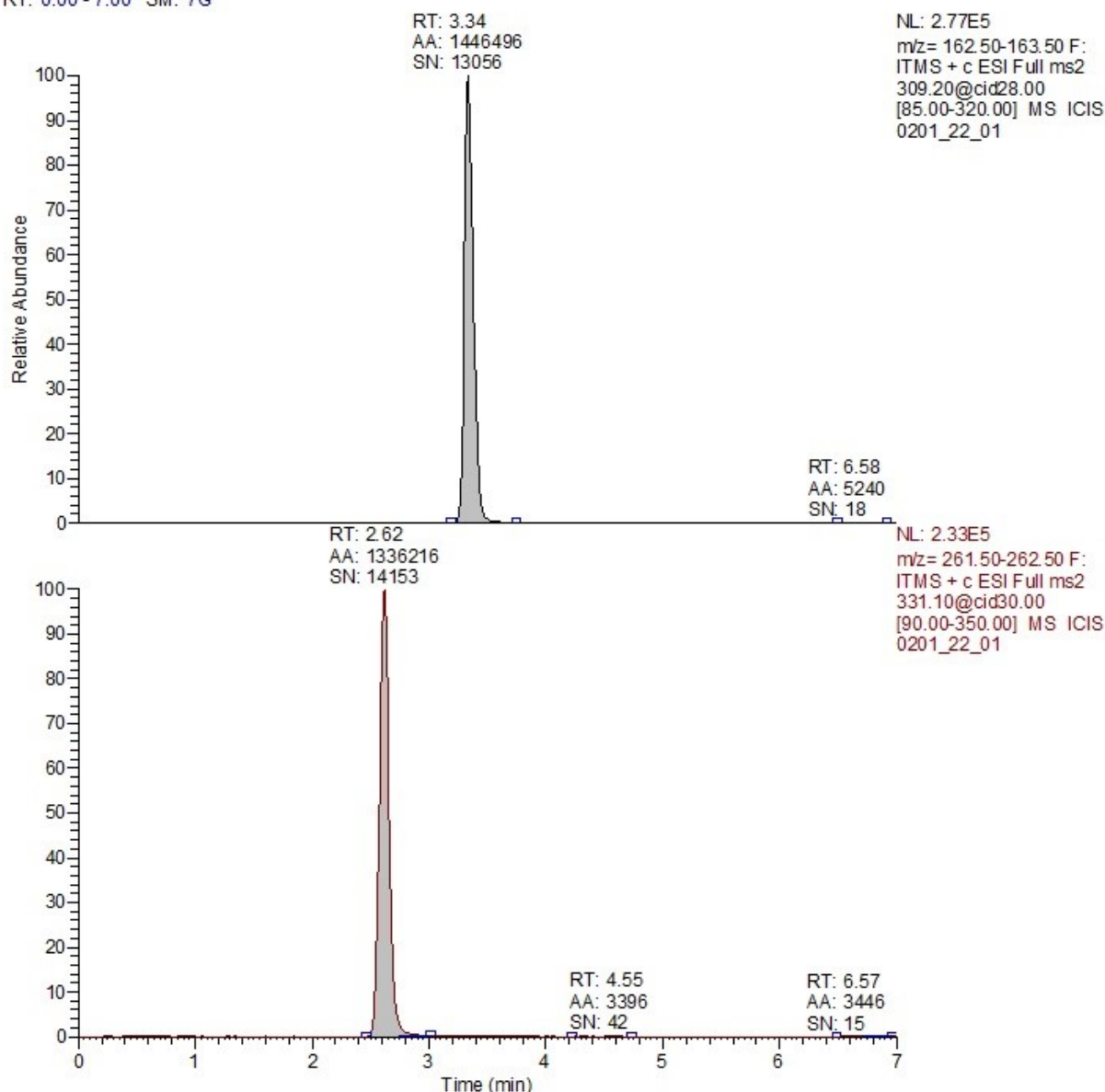
Obrázok 4 Chromatogram blankovej vzorky nulového kalibrátoru: v hornej časti rekonštruovaný iónový prúd pre warfarín (m/z 309 \rightarrow 163), v dolnej časti rekonštruovaný iónový prúd vnútorného štandardu citalopramu-d6 (m/z 331 \rightarrow 262)

RT: 0.00 - 7.00 SM: 7G



Obrázok 5 Chromatogram vzorky warfarínu pri LLOQ: v hornej časti rekonštruovaný iónový prúd pre warfarín (m/z 309 \rightarrow 163), v dolnej časti rekonštruovaný iónový prúd vnútorného štandardu citalopramu-d6 (m/z 331 \rightarrow 262)

RT: 0.00 - 7.00 SM: 7G



Obrázok 6 Chromatogram vzorky pacienta: v hornej časti rekonštruovaný iónový prúd pre warfarín (m/z 309 \rightarrow 163), v dolnej časti rekonštruovaný iónový prúd vnútorného štandardu citalopramu-d6 (m/z 331 \rightarrow 262)

5.3.3 Presnosť a precíznosť

Presnosť a precíznosť boli zisťované na základe merania piatich QC vzoriek na troch koncentračných úrovniach (vid' tabuľka číslo 3) a piatich LLOQ vzoriek. Vzorky boli hodnotené v rámci jedného dňa a taktiež v rámci troch rôznych dní.

Na zistenie precíznosti bola vypočítaná koncentrácia warfarínu v jednotlivých vzorkách, smerodatná odchýlka (SD) a relatívna smerodatná odchýlka (RSD)

v percentách. Presnosť bola vypočítaná v percentách na základe pomeru zistenej koncentrácie warfarínu a referenčnej hodnoty koncentrácie warfarínu, ktorá je uvedená v tabuľkách 7 a 8. V tabuľkách číslo 7 a 8 sú uvedené taktiež výsledky meraní.

Výsledky presnosti aj precíznosti spĺňajú požiadavky smernice EMA.

názov vzorku	referenčná koncentrácia warfarínu vo vzorke	Precíznosť		Presnosť
		zistená koncentrácia warfarínu ± SD	RSD	
	[µg/ml]	[µg/ml]	[%]	[%]
LLOQ	0,768	0,782 ± 0,04	5,31	101,83
QCA	1,919	2,061 ± 0,26	12,61	107,39
QCB	3,888	3,665 ± 0,43	11,74	94,27
QCC	9,720	9,740 ± 0,77	7,86	100,21

Tabuľka 7 Výsledky precíznosti a presnosti v rámci jedného dňa

názov vzorku	referenčná koncentrácia warfarínu vo vzorke	Precíznosť		Presnosť
		zistená koncentrácia warfarínu ± SD	RSD	
	[µg/ml]	[µg/ml]	[%]	[%]
LLOQ	0,768	0,751 ± 0,09	12,22	97,84
QCA	1,919	2,123 ± 0,28	12,97	110,64
QCB	3,888	4,070 ± 0,51	12,50	104,69
QCC	9,720	9,877 ± 1,17	11,80	101,61

Tabuľka 8 Výsledky precíznosti a presnosti v rámci troch dní

5.3.4 Matricové efekty a výťažnosť

Výťažnosť sme počítali ako pomer koncentrácie warfarínu u QC vzorky upravenej precipitáciou proteínov pridaním 400 µl ACN s IS a koncentrácie warfarínu u blankového extraktu obsahujúceho 20 µl séra a 400 µl acetonitrilu, do ktorého bolo pridané po extrakcii 2,5 µl vždy príslušného QC roztoku a 2,5 µl vnútorného štandardu.

Matricové efekty sme počítali ako pomer koncentrácie warfarínu u blankového extraktu s 20 µl séra, do ktorého bolo pridané po extrakcii 2,5 µl vždy príslušného QC roztoku a 2,5 µl vnútorného štandardu a koncentrácie warfarínu vo vzorke obsahujúcej namiesto séra 20 µl ultračistej vody.

Matricové efekty ovplyvňujú odozvu detektoru a tým pádom skresľujú výsledky analýzy. Hodnotili sa absolútne matricové efekty warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 ale taktiež celkový IS-normalizovaný matricový efekt. Boli vypočítané ako podiel zistenej koncentrácie v danej matrici (sére) a zistenej koncentrácie bez matrice.

Ak je hodnota matricových efektov 100%, matricové efekty sú neprítomné. Podľa požiadaviek smernice EMA je akceptovateľná prítomnosť $\pm 15\%$ matricových efektov. Jednotlivé hodnoty spĺňajú tento požiadavok, až na absolútny matricový efekt IS v jednej vzorke (mierne nad 15%), ktorý však už korigoval matricové efekty warfarínu (96,43). Výsledky sú uvedené v tabuľke číslo 9.

Výťažnosť je opakovateľná na troch koncentračných úrovniach. Výsledky sú uvedené v tabuľke číslo 9.

vzorka	výťažnosť	absolútny matricový efekt - warfarín	absolútny matricový efekt - citalopram-d6	IS-normalizovaný matricový efekt
	(%)	(%)	(%)	(%)
QCA	88,30	109,46	118,92	96,43
QCB	84,70	93,96	87,60	89,99
QCC	90,67	110,34	107,53	104,47

Tabuľka 9 Výsledky výťažnosti a matricových efektov

5.3.5 Stabilita

Stabilita sa hodnotí, aby sa zabezpečilo, že príprava vzorky, analýza ako aj skladovacie podmienky nijako neovplyvnia koncentráciu daného analytu.

Bola hodnotená stabilita pri rôznych skladovacích podmienkach na dvoch koncentračných úrovniach.

Prvou skúškou stability bolo prevedené opakované rozmrazenie a zmrazenie vzoriek. Pripravené vzorky boli na 24 hodín vložené do mrazničky pri -20°C a následne rozmrazené pri izbovej teplote. Tento proces bol opakovaný 3x.

Ďalšou skúškou stability bola skúška stability pri laboratórnej teplote. Pripravené vzorky boli ponechané 2,5 hodiny na pracovnom stole a až následne bola prevedená precipitácia proteínov a meranie.

Poslednou skúškou stability bola stabilita v autosampleri. Vzorky po prvom meraní boli ponechané v autosampleri na 24 hodín pri teplote 9°C a následne znova nastrieknuté na kolónu a merané.

Stabilita bola vyhodnotená ako zmena koncentrácie oproti pôvodnej hodnote. Výsledky sú uvedené v tabuľke číslo 10 a spĺňajú požiadavky smernice EMA – rozdiel oproti pôvodnej hodnote do $\pm 15\%$.

vzorka	presnosť - pred skúškou stability	presnosť - stabilita po opakovanom zmrazení a rozmrazení	presnosť - stabilita pri laboratórnej teplote	presnosť - stabilita v autosampleri
	(%)	(%)	(%)	(%)
QCB	112,66	109,78	105,14	101,42
QCC	100,21	98,28	99,65	95,08

Tabuľka 10 Výsledky stability

5.3.6 Pacientské vzorky

Po validácii boli premerané pomocou prístroja LTQ a prístroja Orbitrap a vyhodnotené vzorky od dvadsiatich pacientov. Bola vypočítaná koncentrácia warfarínu v sérach pacientov na oboch prístrojoch a koncentrácie u jednotlivých pacientov medzi

prístrojmi následne porovnané. Všetky vzorky, vrátane vzoriek meraných pomocou prístroja Orbitrap, boli pripravované rovnakým postupom.

Výsledky zistených koncentrácií sú uvedené v tabuľke číslo 11. Porovnanie metód merania warfarínu v sére pacientov pomocou Orbitrapu a LTQ je uvedené v grafe číslo 4.

Koncentrácie warfarínu merané pomocou LTQ a Orbitrapu sa medzi sebou líšili, čo môže byť spôsobené tým, že LTQ je menej citlivejší a presnejší ako novší Orbitrap.

Analyzátory typu iónovej pasty sú vzhľadom ku svojej nízkej kapacite menej vhodné pre kvantitatívnu analýzu v porovnaní s Orbitrapom [36]. Zároveň z náklonu priamky na grafe č. 4 vyplýva, že prístroj LTQ meria v porovnaní s Orbitrapom nižšie hladiny warfarínu s negatívnou systematickou odchýlkou.

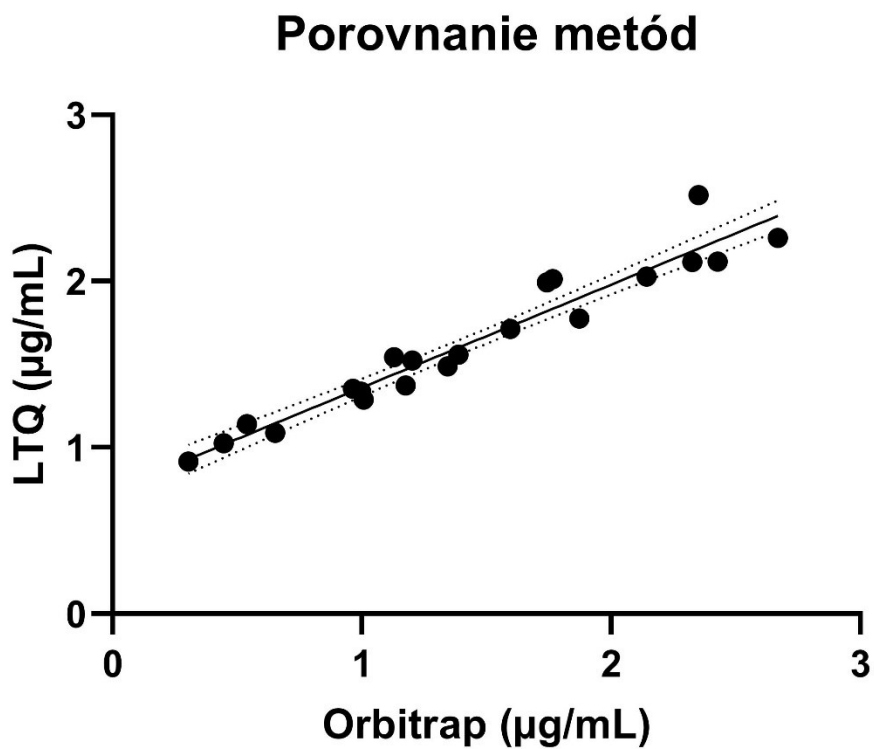
Ako bolo uvedené v kapitole 5.3.1, kalibračné rozmedzie koncentrácií warfarínu (0,768 – 15 µg/ml) bolo určené podľa terapeutického rozmedzia, čo je 1 – 3 µg/ml a toxického rozmedzia, čo je 10 – 12 µg/ml. Validácia ukazuje, že výsledky v rámci kalibračného rozmedzia sú pravdivé.

Pri porovnaní metód boli najväčšie odchýlky medzi jednotlivými metódami zistené u najnižších koncentrácií, ktoré sú pod kalibračným rozmedzím. Koncentrácie vo vyšších koncentračných hladinách sa už takmer zhodujú.

pacient	c [µg/ml]	
	LTQ	ORBITRAP
1	0,304	0,915
2	0,446	1,026
3	0,539	1,142
4	0,653	1,090
5	0,963	1,354
6	0,997	1,335
7	1,007	1,288
8	1,130	1,543
9	1,177	1,374
10	1,203	1,525
11	1,345	1,489

12	1,388	1,559
13	1,596	1,713
14	1,743	1,994
15	1,765	2,014
16	1,873	1,775
17	2,142	2,029
18	2,326	2,115
19	2,351	2,519
20	2,427	2,118

Tabuľka 11 Výsledky koncentrácií warfarínu v sére u pacientov



Graf 4 Závislosť koncentrácií meraných na LTQ a Orbitrapu

6 Záver

V experimentálnej časti tejto diplomovej práce boli nastavené podmienky chromatografického systému u HPLC-LIT-MS s hmotnostným spektrometrom LTQ XL pre meranie hladiny warfarínu v sére pacientov v rozmedzí od 0,768 µg/ml do 15 µg/ml.

Ako metóda úpravy biologického materiálu bola zvolená precipitácia proteínov acetonitrilom na základe najlepšieho indexu determinácie. Ako najvhodnejší vnútorný štandard bol zvolený spomedzi siedmych látok citalopram-d6.

Metóda bola validovaná podľa smernice EMA na základe vybraných parametrov validácie - kalibračná krivka, precíznosť, presnosť, matricové efekty, výťažnosť, a stabilita. Všetky vybrané parametre splňali požiadavky pre validáciu metódy.

Po validácii bola metóda použitá aj na meranie hladiny warfarínu v sére u dvadsiatich vybraných pacientov. Vzorky tých istých pacientov boli následne merané aj pomocou validovanej metódy UHPLC-HRMS na Úseku klinickej a forenznej toxikológie Ústavu klinickej biochémie a diagnostiky Fakultnej nemocnice Hradec Králové a výsledky boli porovnané.

Novo vyvinutá metóda vykazuje negatívnu systematickú odchýlku pri nižších koncentráciách. Pre porovnanie pravdivosti meraní by bolo vhodné porovnať s certifikovanou matričnou vzorkou alebo pomocou mezilaboratórneho porovnania. Vzhľadom k tomu, že táto metóda má pomôcť odhaľovať predovšetkým rezistenciu na warfarín, respektíve non-compliance pacientov, je možné novú metódu použiť pre tento účel.

7 Zoznam obrázkov, tabuliek a grafov

7.1 Obrázky

<i>Obrázok 1 Schéma HPLC prístroja [39].</i>	16
<i>Obrázok 2 Jednotlivé grafy závislostí odoziev detektoru warfarínu a vnútorných štandardov, ktoré boli skúšané pre výber vnútorného štandardu, na koncentrácii warfarínu</i>	43
<i>Obrázok 3 Grafy závislostí pomerov odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu na koncentráciách v prvý deň, druhý deň a tretí deň.</i>	45
<i>Obrázok 4 Chromatogram blankovej vzorky nulového kalibrátoru: v hornej časti rekonštruovaný iónový prúd pre warfarín (m/z 309 \rightarrow 163), v dolnej časti rekonštruovaný iónový prúd vnútorného štandardu citalopramu-d6 (m/z 331 \rightarrow 262).</i>	46
<i>Obrázok 5 Chromatogram vzorky warfarínu pri LLOQ: v hornej časti rekonštruovaný iónový prúd pre warfarín (m/z 309 \rightarrow 163), v dolnej časti rekonštruovaný iónový prúd vnútorného štandardu citalopramu-d6 (m/z 331 \rightarrow 262).</i>	47
<i>Obrázok 6 Chromatogram vzorky pacienta: v hornej časti rekonštruovaný iónový prúd pre warfarín (m/z 309 \rightarrow 163), v dolnej časti rekonštruovaný iónový prúd vnútorného štandardu citalopramu-d6 (m/z 331 \rightarrow 262)</i>	48

7.2 Tabuľky

<i>Tabuľka 1 Typy a vlastnosti detektorov [16] , vybrané skratky popisujú nasledovné detektory: RI – detektor refraktometrický, UV/VIS – detektor spektrofotometrický, IR – detektor infračervený. FLD – detektor fluorimetrický, ECD – detektor elektrochemický, CONDUCT – detektor vodivostný, CORONA – Charged Aerosol Detector, ELSD - Evaporative Light Scattering Detector</i>	21
<i>Tabuľka 2 Koncentrácie warfarínu jednotlivých kalibračných roztokov</i>	35
<i>Tabuľka 3 Koncentrácie jednotlivých QC roztokov a QC vzoriek</i>	36
<i>Tabuľka 4 Výsledky popisujúce smernicu priamky, úsek priamky a index determinácie u jednotlivých organických ropúšťadiel.</i>	40
<i>Tabuľka 5 Výsledky indexov determinácie u jednotlivých testovaných vnútorných štandardov</i>	42

<i>Tabuľka 6 Výsledky úseku priamky, smernice priamky a indexu determinácie v prvý, druhý a tretí deň.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabuľka 7 Výsledky precíznosti a presnosti v rámci jedného dňa.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabuľka 8 Výsledky precíznosti a presnosti v rámci troch dní.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabuľka 9 Výsledky výťažnosti a maticových efektov.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabuľka 10 Výsledky stability.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabuľka 11 Výsledky koncentrácií warfarínu v sére u pacientov.....</i>	<i>53</i>

7.3 Grafy

<i>Graf 1 Závislosť pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 na koncentrácii za použitia metanolu.....</i>	<i>40</i>
<i>Graf 2 Závislosť pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 na koncentrácii za použitia acetonitrilu.....</i>	<i>41</i>
<i>Graf 3 Závislosť pomeru odozvy detektoru warfarínu a vnútorného štandardu citalopramu-d6 na koncentrácii za použitia isopropanolu.....</i>	<i>41</i>
<i>Graf 4 Závislosť koncentrácií meraných na LTQ a Orbitrapu.....</i>	<i>53</i>

8 Zoznam použitej literatúry

1. ZÝKA, J.; et al. Analytická příručka Díl I., 4.upr.vyd.; STNL, Praha. 1988. ISBN 04-612-79.
2. NOVÁKOVÁ L. DOUŠA M. a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Europrint a.s., Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
3. DUNNIVANT, J. W. G. Gas chromatography, Liquid Chromatography, Capillary electrophoresis-mass spectrometry Whitman College, Chemistry Department, 2011.
4. LOCATELLI M, GOVERNATORI L, CARLUCCI G, GENOVESE S, MOLLICA A, EPIFANO F. Recent application of analytical methods to phase I and phase II drugs development, Biomed. Chromatogr. 26, s. 283–300, 2012.
5. NIKOLIN, B. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses, Bosn. Journal Basic Med Sc, pp. 4(2):5-9, 2004.
6. CVAČKA, J. Vysokoučinná kapalinová chromatografie: Instrumentace. [online]. 2020 [cit. 15. 2. 2020]. Dostupné z: http://www.muji-web.cz/vyuka/HPLC/HPLC_soubory/03_HPLC%20instrumentace.pdf
7. BIOPEdia. Molekulárna Biológia. HPLC. [online]. 2020, [cit. 15. 2. 2020], Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/hplc>.
8. NOVÁKOVÁ L. Separační metody v analytické chemii, Hradec Králové, 2017, ISBN: 978-0-12-805392-8.
9. MEYER, V. Practical High Performance Liquid Chromatography, Fifth Edition, John Willey and sons, ltd., 2010, ISBN:9780470688427.
10. KIRKLAND, H. C. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns, Journal of Chromatography, s. 691(1–2), 1995.

11. LABMET. HPLC, [online], 2020 [cit. 15. 2. 2020], Dostupné z: <https://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>.
12. DOLAN, J. S. Gradient Elution Chromatography, Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation, Liquid Chromatography, Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2018.
13. KOOLMAN, J. R. K. H. Barevný atlas biochemie, překlad 4.vydání: Grada Publishing, 2012, ISBN: 978-80-247-2977-0.
14. KROMIDAS, S. HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization, Wiley and sons, lts., 2006, ISBN: 978-3-527-31377-8.
15. SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010, 33(9-12), s.1130-1150. ISSN, 0148-3919.
16. HPLC. Detektory HPLC, [online], 2020, [cit. 15. 2, 2020]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/detectors.html>
17. GROSS, J. Mass spectrometry, Springer, 2020, s. 1-2, ISBN 978-3-319-54398-7.
18. BABJUK, J. Bioanalytika léků, Praha: Avicenum, 1990, s, 272, ISBN 80-201-0083-0.
19. RACEK, J. a kol., Klinická biochemie, 2. vyd. Praha: Galen, 2006, s. 317, ISBN 80-7262- 324-9.
20. PENG, J. a kol. New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis, Acta pharmaceutica Sinica. B vol. 6,6, 2016, s. 540-551.ISSN: 1671-4083.
21. KONG, R. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Separation science and technology, volume 6, s. 1-658, 2005. ISSN: 1900 – 1977.
22. HANSEN S. H. Bioanalysis of Pharmaceuticals. Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry, John Wiley&Sons, 2015, ISBN: 9781118716816.

23. SIMPSON, N. Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications, CRC Press, 2000, s. 76, ISBN-10: 082470021X.
24. COX, M. Introduction to solvent extraction principles and practice, New York, Marcel Dekker, Inc., s. 1–25, 2004, ISBN-10: 0824750632.
25. ERMER, J. Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, Wiley-VCH, 2014, ISBN-10: 3527335633.
26. MOOSAVI, S. Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability, Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches Intechopen, s. 13, 2017.
27. KRUVE, A. a kol. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I, Anal. Chim. Acta, 870, s. 29-44, 2015. ISSN · 0003-2670.
28. COLIN, H. Detection limits in liquid chromatography, Analytical Techniques in Environmental Chemistry, Proceedings of the Second International Congress, 1982, s. 169-177. 1982.
29. BUNN, H. W. Pathophysiology of Blood Disorders, McGraw-Hill Education, 2017, ISBN-13: 978-1259642067.
30. FAWZY, M. A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral anticoagulants used in atrial fibrillation, Drug. Metab. Toxicol, 2019. s. 381-398.
31. BRUTON, L. The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Education, 2018, ISBN:978-1-25-958473-2.
32. KELLEY, J. G. Clinical pharmacokinetics of oral anticoagulants, Clin. J. s. 1-15, 1979. ISSN 1055–6656.
33. PHARMGPB. Warfarin Pathway, Pharmacokinetics, [online]. 2020 [cit. 15. 2. 2020]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA145011113>

34. WITTKOWSKY, A. K. Warfarin and other coumarin derivatives: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and druginteractions, Semin Vacs, 2002, s. 134, 2003. ISSN 0894-0959.
35. AGENCY, E. M. Guideline on bioanalytical method validation., Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.
36. DE HOFFMAN, E. a kol. Mass pectrometry: Principles and applications, Wiley and sons, ltd, 2007, ISBN-13: 978-0471485667.
37. GOTTWALD. T. Univerzita Karlova v PrazeFarmaceutická fakulta v Hradci KrálovéKatedra analytické chemieVývoj metody pro stanovení entekaviru v biologickýchmateriálech s využitím UHPLC-MS/MS. 28 s. 2013.
38. SCHULZ, M. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and otherxenobiotics. Crit Care, 2012. ISSN: 0883-9441.
39. WATERS. HPLC detectors. [online], 2020, [cit. 15. 2, 2020]. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_AU/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_AU
40. KAZAKEVICH, Y. HPLC for Pharmaceutical Scientists, John Wiley & Sons, Inc., Journal of the American Chemical Society, 129 (28), 2007. ISSN: 8925-8926.