

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra Farmaceutickej Chémie a Farmaceutickej Analýzy



**Vývoj UHPLC-MS/MS metódy na stanovenie
vybraných liečiv v biologickom materiáli**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Adam Reguli

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Hana Bavlovič Piskáčková, PhD.

Hradec Králové, 2021

„Vyhlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 19. 8. 2021

.....

Adam Reguli

Na tomto mieste by som rád poďakoval svojej školiteľke doc. PharmDr. Petre Štěrbovej, PhD. a tiež svojej konzultantke PharmDr. Hane Bavlovič Piskáčkovej, PhD. za zasvätenie do celej problematiky, trpezlivosť, cenné rady a pomoc s vypracovaním tejto práce.

Táto práca bola financovaná grantom Grantovej agentúry Univerzity Karlovej (GAUK 1550217 a 1204120 a SVV 260547).

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	8
Použité skratky.....	10
1 Úvod.....	11
2 Teoretická časť.....	12
2.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia v porovnaní s ultra-vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.....	12
2.1.1 Schéma kvapalinového chromatografu.....	12
2.1.2 Mobilná a stacionárna fáza.....	15
2.1.3 Vybrané základné chromatografické parametre.....	17
2.2 Hmotnostná spektrometria.....	18
2.2.1 Ionizácia.....	18
2.2.2 Analyzátor.....	21
2.2.3 Typy záznamov.....	24
2.3 Úprava vzoriek biologického materiálu.....	25
2.3.1 Precipitácia proteínov.....	25
2.3.2 Extrakcia na pevnú fázu (solid phase extraction, SPE).....	25
2.3.3 Extrakcia kvapalina-kvapalina (liquid-liquid extraction, LLE).....	27
2.3.4 Mikroextrakčné techniky.....	27
2.4 Kardioprotektívne látky.....	29
2.4.1 Dexrazoxan (DEX).....	30
2.4.2 Nový analóg dexrazoxanu s lepším kardioprotektívnym účinkom: 4,4'-(bután-2,3-diyl)bis(piperazín-2,6-dión) (ICRF-193).....	31
3 Cieľ práce.....	32
4 Experimentálna časť.....	33
4.1 Použitý materiál, prístroje, pomôcky a chemikálie.....	33
4.1.1 Chemikálie.....	33
4.1.2 Chromatografický materiál.....	33
4.1.3 Prístroje.....	34
4.1.4 Pomôcky.....	34
4.2 Príprava roztokov.....	34
4.2.1 Zásobné roztoky.....	34
4.2.2 Pracovné roztoky.....	35
4.2.3 Štandardné roztoky.....	35
4.3 Nastavenia MS detekcie.....	35
4.4 Vývoj chromatografickej metódy na separáciu ICRF-193 a racemátu.....	36

4.5	Vývoj metódy extrakcie na pevnú fázu pre ICRF-193 a jeho metabolit	36
4.5.1	Chromatografické podmienky a vnútorné štandardy	36
4.5.2	SPE extrakcie	37
5	Výsledky a diskusia	39
5.1	Vývoj chromatografickej metódy na separáciu ICRF-193 a racemátu a analýza vzorky racemátu.....	39
5.1.1	Vývoj metódy.....	39
5.1.2	Analýza vzorky racemátu	40
5.2	SPE extrakcia ICRF-193 a ICRF-193 _{met}	41
5.2.1	SPE extrakcia ICRF-193	41
5.2.2	SPE extrakcia ICRF-193 a ICRF-193 _{met}	43
6	Záver	47
7	Použitá literatúra	48

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy

Kandidát: Adam Reguli

Konzultant: PharmDr. Hana Bavlovič Piskáčková, Ph.D.

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vývoj UHPLC-MS/MS metódy na stanovenie vybraných liečiv v biologickom materiáli

Dexrazoxan je liečivo využívané na potlačenie kardiotoxicity spôsobenej antracyklínovými chemoterapeutikami. ICRF-193 bol syntetizovaný ako nový, efektívnejší analóg dexrazoxanu. Bolo zistené, že inhibícia topoizomerázy II, ktorá je potrebná pre kardioprotektívny účinok, je sprostredkovaná *R,S* diastereoizomérom (ICRF-193), zatiaľ čo racemická zmes *R,R* a *S,S* enantiomérov je takmer bez účinku. Napriek tomu, naše *in vitro* experimenty s racemickou zmesou vykazovali určitý kardioprotektívny efekt. Cieľom tejto práce bolo 1) overiť možnú rolu kontaminácie štandardu racemickej zmesi určitým množstvom ICRF-193 a 2) vyvinúť extrakcie na pevnú fázu (SPE) pre ICRF-193 a jeho metabolit (ICRF-193_{met}) z plazmy. Na separáciu ICRF-193 a racemátu bol použitý UHPLC systém spojený s hmotnostným spektrometrom typu trojitý kvadrupól s ionizáciou elektrosprejom v pozitívnom móde, Bonus-RP kolóna (100 × 3,0 mm; 1,8 μm) a kyselina mravčia s metanolom ako mobilná fáza. Analýza ICRF-193 a ICRF-193_{met} prebiehala na kolóne Luna Omega Polar (100 × 2,1 mm; 1,6 μm) s predkolónou. Mobilná fáza bola tvorená mravčanom amónnym a acetonitrilom. Boli testované štyri typy SPE kolóniek (Discovery DSC-PH 100 mg/1 ml, Discovery DSC 18 100 mg/1 ml, Supel Select HLB 30 mg/1 ml a Hypersep Verify AX 130 mg/1 ml), rôzne premývacie (H₂O, 5% MeOH, HCOOH) a elučné činidlá (ACN, MeOH, ACN + 10% HCOOH). V racemickej zmesi bolo zistené menej ako 0,035 % ICRF-193. Nakoľko ICRF-193 je vysokoúčinná látka, kardioprotektívne účinky racemátu môžeme čiastočne pripísať práve tejto kontaminácii. SPE extrakcie boli optimalizované a najvyššia výťažnosť oboch analytov (ICRF-193 a ICRF-193_{met}) z plazmy bola dosiahnutá na kolónkach Hypersep Verify AX. Elúcia analytov ale vyžadovala silno okyslený acetonitril (10% HCOOH), ktorý viedol k supresii signálu MS detekcie. Senzitivitu súčasnej metódy sa tak podarilo zvýšiť iba 10násobne. Pri zameraní

iba na aktívnu látku ICRF-193 bola efektívnejšia SPE extrakcia s využitím HLB sorbentu (25násobne nižšie LLOQ bez zahrnutia kroku zakoncentrovania).

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Adam Reguli

Supervisor – specialist: PharmDr. Hana Bavlovič Piskáčková, Ph.D.

Supervisor: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Title of Thesis: Development of UHPLC-MS/MS method for analysis of selected drugs in a biological material

Dexrazoxane is a cardioprotective drug clinically used against anthracycline induced cardiotoxicity. ICRF-193 was synthesized as a novel, more effective analogue of dexrazoxan. It was reported that inhibition of topoisomerase II, which seems to be crucial for cardioprotective effect, is mediated by an *R,S* diastereomer (ICRF-193) while the racemic mixture of *R,R* and *S,S* enantiomers is almost ineffective. Nevertheless our *in vitro* experiments with racemic mixture showed some cardioprotective effect. The aim of this work was 1) to examine the possible role of contamination of standard of racemic mixture with the ICRF-193 and 2) to develop solid phase extraction (SPE) for ICRF-193 and its metabolite (ICRF-193_{met}) from plasma. The UHPLC coupled with a triple quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization in positive mode. Bonus-RP column (100 × 3,0 mm, 1,8 μm) and formic acid (0,25%) with methanol as a mobile phase were used for separation of different forms of ICRF-193. Analysis of ICRF-193 and ICRF-193_{met} was achieved on Luna Omega Polar column (100 × 2,1 mm; 1,6 μm) with a guard column. A mobile phase containing ammonium formate and acetonitrile were used. Four types of SPE columns (Discovery DSC-PH 100 mg/1 ml, Discovery DSC 18 100 mg/1 ml, Supel Select HLB 30 mg/1 ml, and Hypersep Verify AX 130 mg/1 ml), different types of washing solvents (H₂O, 5% MeOH, HCOOH) and elution solvents (ACN, MeOH, ACN + 10% HCOOH) were tested. Less than 0,035 % of ICRF-193 was detected in the racemic mixture. As ICRF-193 is a high potent agent, cardioprotective effect of racemic mixture can be partially caused by this contamination. The SPE procedure was optimized and the highest recovery of both, ICRF-193 and ICRF-193_{met} from plasma was achieved on Hypersep Verify AX column. Nevertheless, the elution of target analytes required strongly acidify acetonitrile (10% HCOOH), which resulted into the signal suppression. Therefore the sensitivity of the current method was

increases only 10 times. When focus only on the active compound ICRF-193, more effective SPE extraction (25 times lower LLOQ without pre-concentration step) employing HLB sorbent can be used.

Použité skratky

ANT	antracyklínové chemoterapeutiká
APCI	chemická ionizácia za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizácia za atmosférického tlaku
DEX	dexrazoxan
DMSO	dimetylsulfoxid
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
ESI	ionizácia elektrosprejom
FT-ICR	iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou
GC	plynová chromatografia
HIC	hydrofóbne interakčná chromatografia
HILIC	hydrofilne interakčná chromatografia
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
I.S.	vnútorný štandard
LC	kvapalinová chromatografia
LLE	extrakcia kvapalina-kvapalina
LLOQ	spodný limit kvantifikácie
LPME	mikroextrakcia kvapalinou
MF	mobilná fáza
MRM	selektívny záznam viacerých reakcií
MS	hmotnostná spektrometria
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
<i>m/z</i>	pomer hmotnosti a náboja
PALME	„parallel artificial liquid membrane extraction“
SF	stacionárna fáza
SIM	selektívny záznam jedného alebo viacerých iónov
SPE	extrakcia na pevnú fázu
SRM	selektívny záznam jednej reakcie
TIC	chromatogram celkového iónového prúdu
TOF	analyzátor doby letu
TOP2	topoizomeráza II
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

1 Úvod

Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (UHPLC) v spojení s hmotnostným spektrometrom (MS) je v súčasnosti jedna z najviac využívaných analytických metód v rámci bioanalýzy. Hlavným dôvodom uplatnenia tejto metódy je vysoká citlivosť a selektivita, ktorá je najmä u biologického materiálu, ako komplexnej matrice, mimoriadne dôležitá. Samotnej analýze predchádza úprava vzorky, ktorá je nevyhnutná pre odstránenie balastov z biologického materiálu.

Táto práca bola zameraná na vývoj UHPLC/MS-MS metód na analýzu ICRF-193 a jeho metabolitu. ICRF-193 je nový a efektívnejší analóg dexrazoxanu (DEX), ktorý je v súčasnosti jediným registrovaným liečivom využívaným na prevenciu kardiotoxicity spôsobenej antracyklínovými chemoterapeutikami (ANT).

Molekula ICRF-193 je symetrická a nachádzajú sa v nej dve chirálne centrá. Poskytuje teda dva diastereoizoméry (*R,S* – mezoforma a zmes *R,R* a *S,S* – racemát). Pre inhibíciu topoizomerázy II β (TOP2B) a teda pre účinok je potrebná mezoforma, racemát je takmer bez účinku [1]. Pri *in vitro* štúdií zameranej na kardioprotektivitu oboch látok však prejavoval určitý kardioprotektívny efekt aj racemát (pri koncentráciách $\geq 30 \mu\text{M}$) [2]. Bolo teda potrebné vylúčiť prítomnosť mezofomy ICRF-193 ako nečistoty v racemáte.

Pre ďalší vývoj a štúdium tohto analógu je potrebné sledovať hladiny ICRF-193 a jeho metabolitu v plazme. Z toho dôvodu je potrebná dostatočne citlivá analytická metóda, ktorá umožní sledovanie farmakokinetických parametrov. Citlivosť súčasnej metódy však nebola dostatočná a bolo ňou možné detegovať koncentrácie iba do tretej, resp. piatej hodiny od podania hydrofilného proliečiva GK-667. Z tohto dôvodu bolo potrebné zvýšiť citlivosť metódy.

2 Teoretická časť

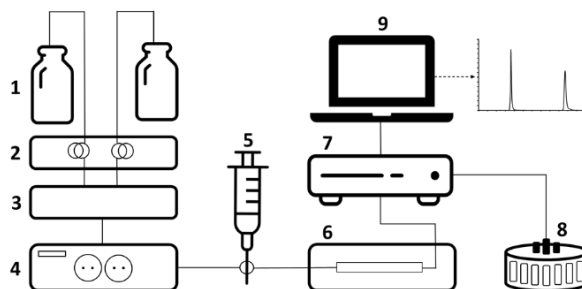
2.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia v porovnaní s ultra-vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

Kvapalinová chromatografia (liquid chromatography, LC) je separačná metóda založená na rozdielnej distribúcii analytov medzi stacionárnu a mobilnú fázu na základe rozdielnej afinity k jednotlivým fázam systému [3]. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high performance liquid chromatography, HPLC) je metóda, ktorá využíva časticové kolóny o rozmeroch 2 – 5 μm alebo monolytické kolóny a umožňuje kontinuálny prietok mobilnej fázy, pričom spätné tlaky systému dosahujú hodnôt do 400 bar [4][5]. Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC) umožňuje analýzu pri použití častíc menších ako 2 μm . Ide o systém odolnejší voči vysokým spätným tlakom. Zároveň sa zlepšila účinnosť a došlo k zrýchleniu analýzy [3].

2.1.1 Schéma kvapalinového chromatografu

Vo všeobecnosti sa kvapalinový chromatograf skladá zo zásobníkov mobilnej fázy, odplyňovača, vysokotlakových čerpadiel, autosampléru, chromatografickej kolóny uloženej v termostate a detektoru. Systém je napojený na počítač vybavený vhodným softwarom (obr. 1).

Na UHPLC systémy sú kladené vyššie nároky nakoľko musia byť schopné pracovať za vyšších tlakov. Okrem robustného čerpadla sú dôležité minimálne mimokolónové priestory, rýchle dávkovacie cykly, presné dávkovanie malých objemov, vysoká frekvencia zberu dát a dôraz je kladený tiež na kolóny, ktoré musia byť odolné voči vyšším tlakom [6].



Obr. 1: Schéma HPLC: 1 – zásobníky mobilných fáz, 2 – odplyňovač (degasser), 3 – zmiešavač, 4 – vysokotlakové čerpadlo, 5 – dávkovač vzorky, 6 – kolóna, 7 – detektor, 8 – zberač frakcií, 9 – dátová stanica (upravené podľa [6]).

Zásobníky mobilnej fázy

Jedná sa o nádoby, z ktorých je mobilná fáza čerpaná cez filtre do HPLC systému. Úlohou filtrov je zachytiť suspendované častice, ktoré by mohli upchať kolónu. Zásobníky mobilnej fázy musia byť vhodne uzavreté tak, aby bolo možné čerpanie mobilnej fázy a zároveň aby nedochádzalo k úniku pár do okolia a k znečisteniu mobilnej fázy prachom alebo mikroorganizmami [6]. Pri izokraticej elúcii je možné použiť jednu zásobnú nádobu s už namiešanou mobilnou fázou. V prípade online izokraticej elúcie alebo gradientovej elúcie sa využíva viac zásobných nádob a k zmiešaniu dochádza až v chromatografickom systéme [5].

Odplyňovač

Mobilnú fázu je pred zavedením na kolónu potrebné zbaviť prítomných plynov. Bublinky plynu by v chromatografickom systéme mohli spôsobiť kolísanie tlakov, nestabilitu základnej línie (najmä pri použití optických detektorov – UV, fluorescenčný, refraktometrický [7]), negatívne ovplyvniť opakovateľnosť analýzy a tiež znížiť citlivosť detekcie.

Odplyniť mobilnú fázu je možné dvoma spôsobmi – prebublávaním hélíom alebo vákuovým odplyňovačom (degasserom). Druhý spôsob je účinnejší a lacnejší a preto je v súčasnej dobe preferovaný. Mobilná fáza prechádza polopriepustnou kapilárou umiestnenou vo vákuovej komore. Rozdielne tlaky v okolí a vnútri kapiláry zabezpečujú kontinuálne odplynenie za použitia vákuovej pumpy [6].

Vysokotlakové čerpadlá

Úlohou čerpadiel je zabezpečiť konštantný bezpulzný prietok mobilnej fázy chromatografickým systémom. Pri HPLC analýze sa prietok mobilnej fázy pohybuje v rozmedzí 0,1 – 10 ml/min a tlaky dosahujú hodnoty do 400 bar. V posledných dvoch desaťročiach došlo v dôsledku rozvoja UHPLC analýz k výraznému zvýšeniu výkonu, spoľahlivosti a odolnosti púmp voči vyšším tlakom. Pri UHPLC analýzach je prietok mobilnej fázy v rozmedzí 0,01 – 2 ml/min a tlaky v systéme dosahujú hodnôt do 1000 až 1300 bar [3][4].

Vysokotlakové čerpadlá vytlačujú mobilnú fázu zo zásobníku piestom alebo membránou. Môžu byť rozdelené do dvoch skupín:

- Pumpy pracujúce pri konštantnom tlaku – na vytlačenie mobilnej fázy sa využíva tlak plynu/hydraulickej kvapaliny na piest. Nevýhodou je zmena objemového prietoku mobilnej fázy pri zmene odporu kolóny.
- Pumpy pracujúce pri konštantnom objemovom prietoku – pohyb piestu zabezpečuje mechanický pohon [6].

V začiatkoch HPLC analýz boli často využívané čerpadlá injekčného typu, ktoré umožňovali konštantný bezpulzný prietok. Medzi nevýhody však patrí limitovaný objem mobilnej fázy, daný objemom pracovného valca, a tiež čas potrebný k dosiahnutiu stabilného prietoku mobilnej fázy [4][6].

V piestových čerpadlách je piest poháňaný elektromotorom. Mobilnú fázu nasáva zo zásobnej nádoby cez sací ventil do pracovného priestoru valca a následne ju tlačí cez výtlačný ventil ďalej do systému. Ide o kompaktné čerpadlá umožňujúce kontinuálny prietok mobilnej fázy. Nevýhodou je pulzná charakteristika tlaku, ktorú je však možné potlačiť zaradením ďalšej hlavy, ktorej piest pracuje v opačnej fáze – dvojpiestové čerpadlá [4].

Dávkovače vzorky

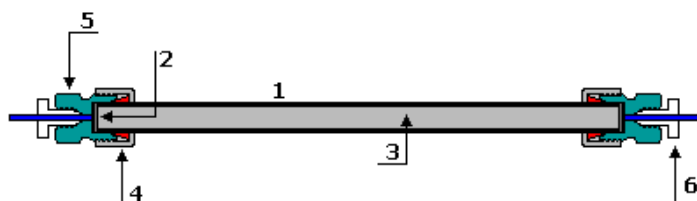
Pri práci s HPLC a UHPLC systémami musí byť možné nastrekovať presne známe množstvo vzorky do prúdiacej mobilnej fázy, ktorá je zároveň pod tlakom. V minulosti sa bežne využívalo manuálne vstrekovanie vzorky pomocou striekačky. V súčasnosti má však prednosť automatický dávkovač (tzv. autosamplér), ktorý umožňuje presné, správne a automatické nastrekovanie vzoriek pomocou šesťcestného ventilu a dávkovacej slučky. Objem nastrekutej vzorky je limitovaný veľkosťou dávkovacej slučky. Vďaka automatickému dávkovaču je možná plne automatická analýza stoviek vzoriek denne [5].

Kolóna

Na kolóne (obr. 2) dochádza k separácii analytov a teda ide o najdôležitejšiu súčasť chromatografického systému. Plášť chromatografických kolón je vyrábaný z nerezovej ocele, ktorá je vysoko odolná voči korózii. Napriek tomu môžu niektoré mobilné fázy (napr. dichlórmetán alebo acetonitril) vylúhovať určité množstvo železa a preto musí byť vnútorný povrch kolóny chemicky odolný a dokonale hladký [6].

Dĺžka kolóny sa pohybuje v rozmedzí 10 až 250 mm a vnútorný priemer od 2,1 do 5 mm. Naplnené sú stacionárnou fázou, ktorou môžu byť častice o veľkosti 1,5 až 5 μm alebo monolity. UHPLC kolóny sú v porovnaní s HPLC kolónami kratšie (do

150 mm), ich vnútorný priemer je väčšinou 2,1 mm a častice stacionárnej fázy sú menšie ako 2 μm [2][3].



Obr. 2: HPLC kolóna: 1 – kovový plášť, 2 – porézna kovová fritá, 3 – stacionárna fáza, 4 – ochranný krúžok, 5 – koncová hlavica, 6 – kapilára so skrutkou [8].

Detektory

Detektor je zariadenie, ktorého úlohou je zaznamenávať chemické alebo fyzikálne vlastnosti analytu a prevádzať ich na elektrickú energiu. Nachádza sa priamo za kolónou a preteká ním mobilná fáza spolu s analytmi. Po detekcii je mobilná fáza odvádzaná do odpadu, zásobníku alebo na ďalší detektor a záznam je zobrazený v chromatografickom softvare a uložený do počítača. Ideálny detektor by mal byť vysoko citlivý, univerzálny, špecifický, nedeštruktívny, nezávislý na zmene teploty/prietoku/zloženia mobilnej fázy, mal by mať nulový príspevok k mimokolónovému rozmývaniu elučných zón, široký lineárny dynamický rozsah a mal by byť schopný poskytovať kvalitatívne informácie pre detegované píky. Neexistuje však detektor, ktorý by disponoval všetkými spomínanými vlastnosťami súčasne [5].

Medzi detektory využívané pri kvapalinovej chromatografii patria napríklad detektory UV-Vis, fluorescenčné, elektrochemické, vodivostné, chemiluminiscenčné, refraktometrické, univerzálne detektory na báze aerosólu a v neposlednom rade hmotnostná spektrometria [6], ktorej sa budeme venovať v samostatnej kapitole.

2.1.2 Mobilná a stacionárna fáza

Stacionárna fáza (SF, náplň kolóny) a mobilná fáza (MF) určujú priebeh separácie [5]. Ich voľba úzko súvisí s voľbou separačného módu (reverzný, normálny, iónovo-výmenný, HILIC, HIC, chirálna separácia) [9].

Ideálna MF by mala mať tieto vlastnosti:

- Dobrá rozpustnosť komponentov vzorky
- Nekorozívne pôsobenie voči HPLC systému
- Vysoká čistota, nízka cena
- Nízka viskozita, nízka toxicita a nehorľavosť [3]

Voľba MF závisí na type analytu, jeho fyzikálne-chemických vlastnostiach, type detekcie, chromatografickom móde a tiež na použitej SF [9].

Základné charakteristiky SF môžeme zhrnúť nasledovne:

- Typ nosiča (plne porézne, povrchovo porézne, neporézne častice): silikagel, polymér, hybridné SF, oxidy kovov, grafit
- Naviazané skupiny: C18, C8, C4, C3, amino, kyano, fenyl...
- Veľkosť častíc: $< 2 \mu\text{m}$, $2 - 5 \mu\text{m}$
- Veľkosť pórov: $60 - 300 \text{ \AA}$
- Plocha povrchu: $100 - 500 \text{ m}^2/\text{g}$
- Densita ligandov: $2 - 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ [3]

Moderné trendy v kvapalinovej chromatografii

Snaha o urýchlenie analýz a súčasné zachovanie, prípadne zlepšenie, kvality meraní viedla v zmenšovaní častíc a teda rozvoju už spomínanej UHPLC. Súčasne ale dochádzalo k rozvoju ďalších technológií: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia pri zvýšenej teplote; využitie poréznych nečasticových SF (monolytické SF); využitie povrchovo poréznych častíc (core-shell SF); superkritická fluidná chromatografia (SFC) [6].

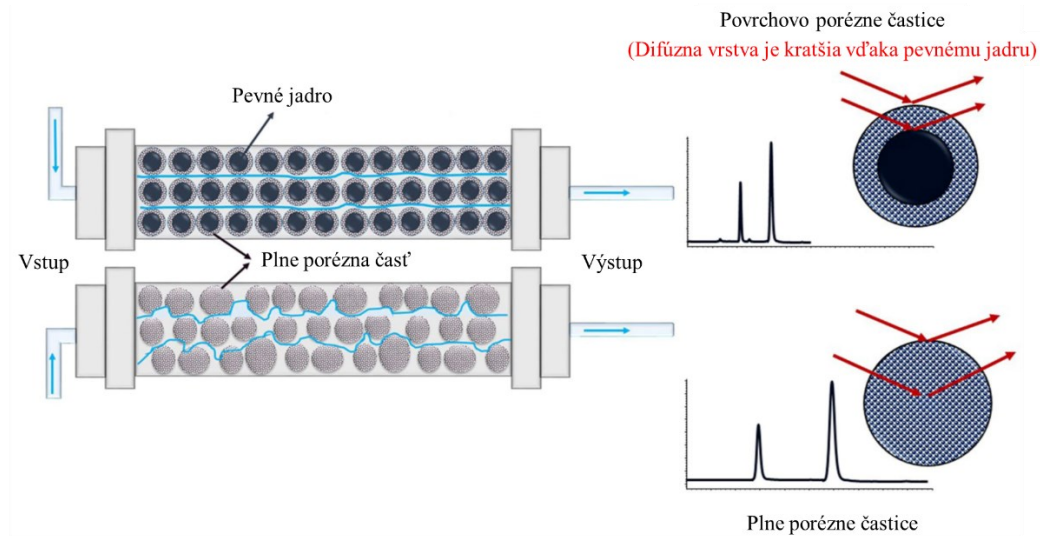
Monolytické stacionárne fázy sú tvorené jedným kusom porézneho materiálu, ktorým môže byť organický polymér, anorganická látka alebo kombinácia oboch [10]. Rozlišujeme u nich 2 typy pórov:

- Veľké póry (makropóry) – zabezpečujú rýchly tok mobilnej fázy.
- Stredne veľké póry (mezopóry) – poskytujú dostatočne veľký povrch a teda vysokú separačnú kapacitu.

Táto štruktúra umožňuje použitie vysokej prietokovej rýchlosti MF, pričom nedochádza k výraznému zvýšeniu spätného tlaku a k stratám separačnej účinnosti [6].

Povrchovo porézne častice (core-shell stacionárne fázy) sú tvorené pevným jadrom a poréznym obalom. Pre dosiahnutie rovnakej chromatografickej účinnosti ako pri plne poréznych časticach, je nutné použiť častice väčších rozmerov. To má za následok pokles spätného tlaku v systéme a je teda možné zvýšiť prietokovú rýchlosť mobilnej fázy. V porovnaní s plne poréznymi časticami rovnakého priemeru je difúzna vrstva podstatne kratšia, pretože analyt nemôže prenikať do pevného jadra. Využitím

core-shell stacionárnych fáz tak môžeme zlepšiť separáciu a znížiť čas analýzy (obr. 3) [11].



Obr. 3: Porovnanie povrchovo poréznych a plne poréznych častíc (upravené podľa [11]).

2.1.3 Vybrané základné chromatografické parametre

Na popis chromatografickej kolóny, systému a konkrétneho separačného procesu môžeme využiť nasledujúce parametre:

- **Retenčný faktor (k'):** Bezrozmerná veličina, ktorá udáva mieru retencie zlúčeniny za presne daných chromatografických podmienok.

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

V rovnici V_R predstavuje retenčný objem, V_0 objem mobilnej fázy v systéme, t_R retenčný čas a t_0 mŕtvy čas.

- **Účinnosť (N):** Ide o dôležitú charakteristiku chromatografickej kolóny. Popisuje stupeň rozptýlenia píku pri použití určitej kolóny. Vyjadruje sa ako počet teoretických poschodí (N) a vypočítame ju z nasledujúceho vzorca:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

Kde t_R je retenčný čas analytu, a w je šírka píku na základnej čiare.

- **Selektivita (α):** Je schopnosť systému rozlíšiť dva rozdielne analyty medzi sebou. Vyjadruje sa ako pomer zodpovedajúcich retenčných faktorov:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (3)$$

- **Rozlíšenie (R):** Vyjadruje mieru kvality separácie dvoch susedných pík. Zahŕňa rozptyl medzi píkami a určitú formu selektivity [12]. Vyjadruje sa ako:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h2} + w_{h1}} \quad (4)$$

Kde t_{R1} a t_{R2} sú retenčné časy analytov, w_{h1} a w_{h2} vyjadrujú šírku píku v polovičnej výške [13].

- **Faktor symetrie (A_s):** Popisuje do akej miery je tvar konkrétneho píku symetrický. Hodnota 1,0 odpovedá dokonalej symetrii píku. V prípade $A_s > 1,0$ sa jedná o chvostovanie píku a u $A_s < 1,0$ sa jedná o čelnú asymetriu píku. Na výpočet slúži nasledujúci vzorec:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (5)$$

Kde hodnota $w_{0,05}$ je šírka píku v 1/20 jeho výšky a d je vzdialenosť medzi kolmicou spustenou z vrcholu píku a vzostupnou časťou píku v 1/20 jeho výšky [13].

- **Spodný limit kvantifikácie (LLOQ):** Udáva koncentráciu analyzovanej látky pri ktorej je možná kvantifikácia. Vyjadruje sa ako 10násobok šumu základnej línie [14].

2.2 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria (mass spectrometry, MS) je separačná metóda, ktorá rozlišuje ióny v plynnej fáze získané po ionizácii analyzovanej látky na základe pomeru hmotnosti a náboja (m/z). Hmotnostný spektrometer sa skladá z iónového zdroja, analyzátora a detektora. Získavané informácie sú jednak kvalitatívnej (molekulová hmotnosť, štruktúra), ale aj kvantitatívnej povahy. Ide pritom o mimoriadne citlivú detekciu [13].

2.2.1 Ionizácia

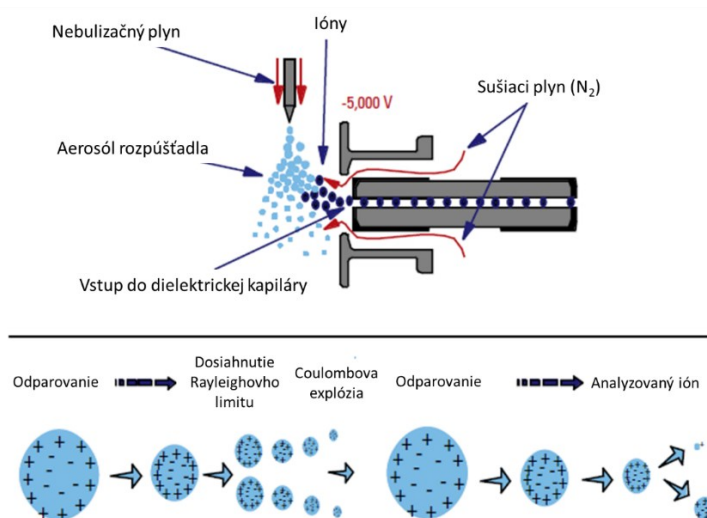
Pre umožnenie MS analýzy je potrebné, aby boli neutrálne molekuly analyzovanej vzorky prevedené na ióny. Ionizačné techniky môžeme deliť na tvrdé (dochádza k rozsiahlej fragmentácii molekuly) a mäkké (šetrné, k fragmentácii nedochádza) [15].

Voľba ionizačnej techniky závisí na prchavosti, tepelnej stabilite, molekulovej hmotnosti a polarite látky. V spojení s HPLC sú využívané najmä mäkké ionizačné techniky a medzi najpoužívanejšie patria techniky pracujúce za atmosférického tlaku:

ionizácia elektrosprejom, chemická ionizácia za atmosférického tlaku, fotoionizácia za atmosférického tlaku a v offline spojení tiež ionizácia laserom za účasti matrice [6].

Ionizácia elektrosprejom (electrospray ionization, ESI)

Tento spôsob ionizácie umožňuje analýzu veľkých aj malých molekúl, neprchavých látok a tiež termolabilných látok [16]. Roztok analytu je privedený do kapiláry, na ktorú je kladené vysoké napätie (2 – 6 kV). Za pomoci plynu (N_2), ktorý prúdi okolo kapiláry, dochádza k vzniku jemného aerosólu. Vďaka napätiu kladenému na kapiláru nesú kvapôčky tohto aerosólu na svojom povrchu náboj. Následne dochádza k odparovaniu rozpúšťadla (čomu napomáha sušiaci plyn – N_2) a znižovaniu jednotlivých kvapiek. V dôsledku toho sa zvyšuje hustota náboja na povrchu kvapiek. Po dosiahnutí bodu, kedy odpudivé sily častíc nesúcich náboj prevažujú nad príťažlivými silami molekúl rozpúšťadla dochádza k rozpadu kvapky. To sa opakuje až do úplného odparenia rozpúšťadla a uvoľnenia jednotlivých iónov analytu, ktoré postupujú ďalej do analyzátoru (obr. 4) [17].

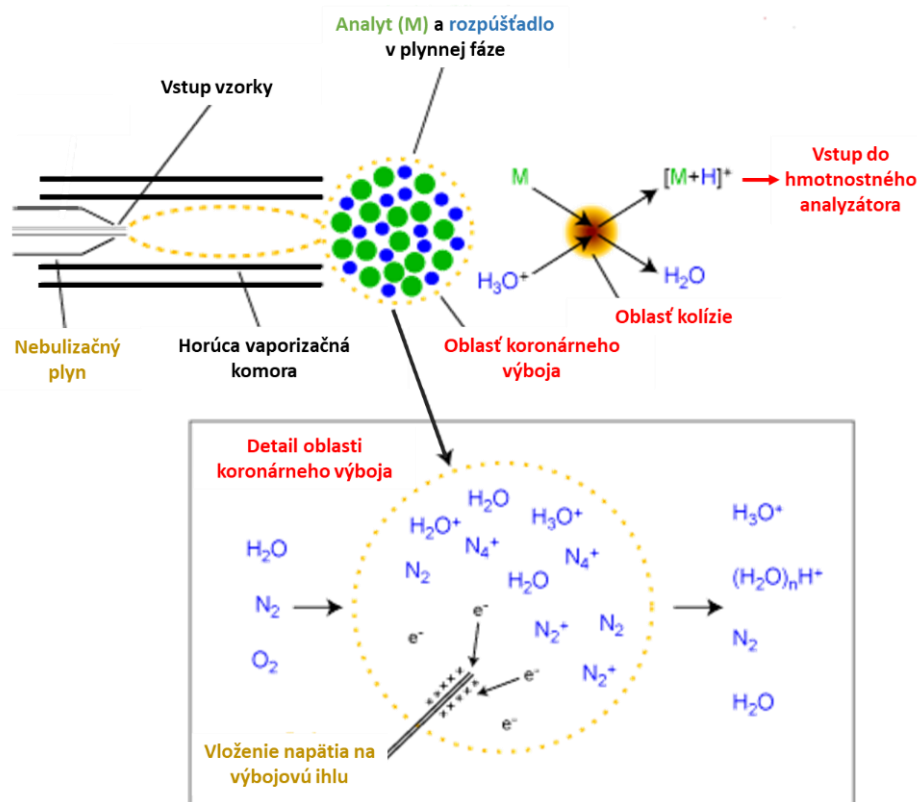


Obr. 4: Ionizácia elektrosprejom (upravené podľa [17]).

Chemická ionizácia za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)

Ide o ionizačnú techniku vhodnú najmä pre termostabilné, nízkomolekulárne zlúčeniny [18]. Spôsob tvorby aerosólu je podobný ako pri ESI, u APCI však tento dej prebieha v horúcej komore ($250 - 400\text{ }^\circ\text{C}$). Dochádza tak k rýchlej premene rozpúšťadla a analytu na plynnú fázu. V ionizačnej komore je prítomný koronárny výboj. Ten v prítomnosti reakčného plynu (N_2) umožňuje tvorbu primárnych iónov, ktoré následne

ionizujú molekuly rozpúšťadla – sekundárne ióny. Nabité molekuly rozpúšťadla ďalej ionizujú molekuly analytu a takto vzniknuté ióny postupujú do analyzátora (obr. 5) [17][18].



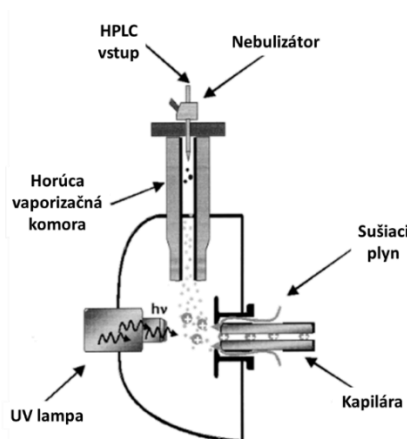
Obr. 5: APCI mechanizmus ionizácie (upravené podľa [18]).

Fotoionizácia za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization, APPI)

APPI je analogická technika k APCI s tým rozdielom, že ako zdroj ionizácie sa tu nevyužíva koronárny výboj, ale lampa produkujúca fotóny s vlnovou dĺžkou ultrafialového svetla (obr. 6) [19]. APPI možno využiť pri analýze nepolárnych a neutrálnych látok, ktoré nemožno efektívne ionizovať pomocou ESI alebo APCI [20].

Dôležitou podmienkou ionizácie je, že energia fotónov musí dosiahnuť ionizačný potenciál analyzovaných molekúl. UV lampa produkuje fotóny s energiou asi 10 eV, čo je dostačujúca energia na ionizáciu väčšiny organických zlúčenín. Bežné HPLC rozpúšťadlá majú vyšší ionizačný potenciál a teda nebudú ionizované.

V prípade, že ionizačný potenciál molekuly je vyšší ako 10 eV a molekula teda nemôže byť priamo ionizovaná pôsobením fotónov, využívajú sa prídavné činidlá - dopanty (napr. toluén, acetón), ktoré prenášajú náboj na analyzované molekuly [20].



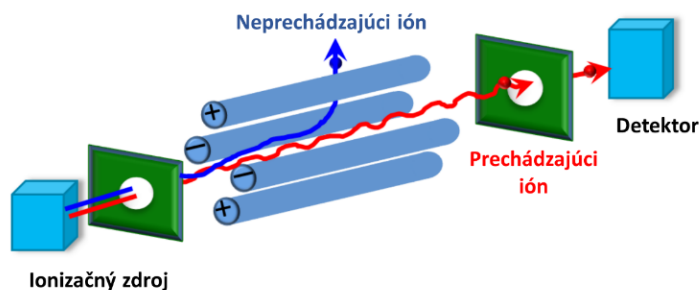
Obr. 6: APCI ionizácia (upravené podľa [21]).

2.2.2 Analyzátor

Prechod ionizovaných molekúl z iónového zdroja do analyzátoru je umožnený vďaka sústave elektromagnetických šošoviek, ktoré ióny usmerňujú. Úlohou samotného analyzátoru je rozdeliť ióny na základe pomeru m/z a zabezpečiť prechod týchto iónov na detektor [22]. Medzi najčastejšie používané detektory patria Faradayov pohár, elektrónový násobič a fotonásobič. FT-ICR alebo orbitrap sú zariadenia plniace úlohu analyzátoru a detektora súčasne [23].

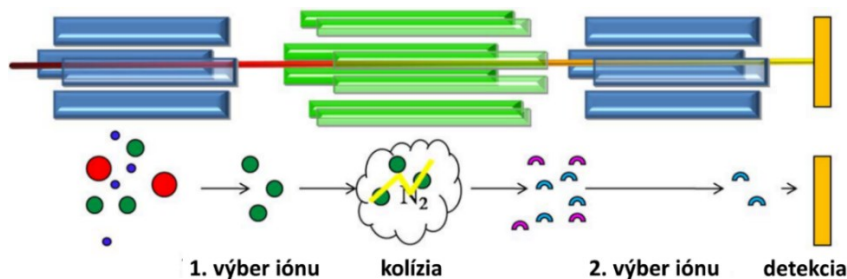
Kvadrupól

Kvadrupól je vďaka svojmu kompaktnému dizajnu, odolnosti a spoľahlivosti jeden z najpopulárnejších hmotnostných analyzátorov [24]. Pozostáva zo štyroch tyčových elektród, ktoré sú voči sebe umiestnené paralelne. Na dve protiľahlé tyče je vložené kladné jednosmerné napätie, na zvyšné dve záporné. Na všetky tyče je pritom superponované vysokofrekvenčné striedavé napätie. Ión je privedený do stredu osy kvadrupólu a začína oscilovať. Pri konkrétnom pomere jednosmerného a striedavého napätia môže stabilne oscilovať iba ión s určitým m/z . Tento ión sa dostane až na detektor, ostatné ióny sú zachytené na tyčiach kvadrupólu alebo zanikajú (obr. 7) [25].



Obr. 7: Kvadrupól (upravené podľa [26]).

Sériovým radením kvadrupólov možno vytvoriť tzv. trojitý kvadrupól (MS/MS, obr. 8). Prvý (Q1) a tretí (Q3) takto radený kvadrupól slúži ako hmotnostný analyzátor. Druhý kvadrupól (Q2) plní úlohu kolíznej cely, kde dochádza k fragmentácii vybraných iónov ich kolíziou s inertným plynom (napr. N₂) [27].

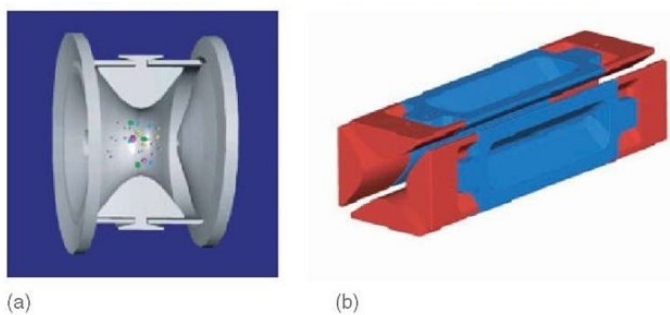


Obr. 8: Trojitý kvadrupól (upravené podľa [28]).

Iónová pasca

Iónová pasca sa skladá z troch elektród (jedna prstencová a dve koncové), na ktoré je vložené napätie, podobne ako u kvadrupólu. Ióny sú do pasce privádzané vstupným otvorom jednej z koncových elektród. Vhodným pomerom napätia vloženého na elektródy sú ióny v pasci zadržané. Následne dochádza k zmenám napätia a postupnému vypudzovaniu iónov s konkrétnym m/z na detektor cez výstupný otvor.

Iónové pasce môžu byť v 3D alebo lineárnom prevedení (obr. 9) [25].

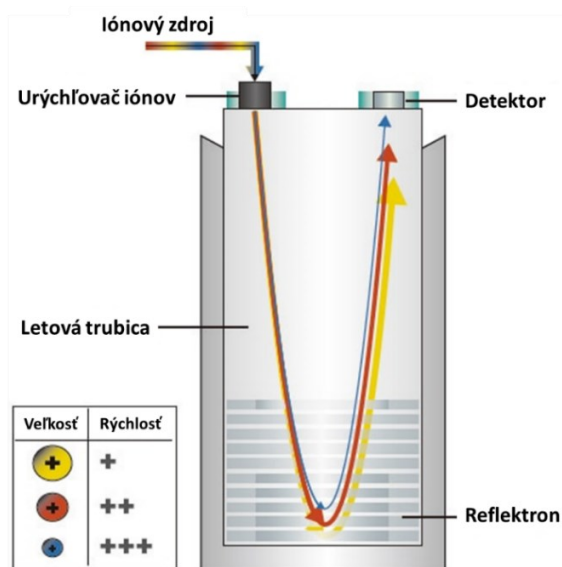


Obr. 9: a) 3D iónová pasca, b) 2D lineárna iónová pasca [29].

Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu (time-of-flight, TOF, obr. 10) pozostáva z letovej trubice (oblasť bez poľa), na začiatku ktorej sú ióny urýchľované napäťovým pulzom. Na konci tejto trubice sa nachádza detektor. Každý ión na začiatku získava rovnakú iniciálnu kinetickú energiu. Následne sa meria doba jeho letu trubicou. Čas, za ktorý ión dopadne na detektor, sa u iónov s rozdielnym m/z bude líšiť (čím menší ión, tým rýchlejší prelet trubicou). V súčasnosti sa využívajú tiež TOF analyzátory s reflektrom, ktorých úlohou

je predĺžiť dobu letu. Vďaka tomu je možné vyrovnávať malé rozdiely v iniciálnej kinetickej energii iónov [24].



Obr. 10: TOF analyzátor s reflektrom (upravené podľa [30]).

Iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou (FT-ICR)

Ide o jednu z najcitlivejších metód detekcie iónov a vyznačuje sa obzvlášť vysokým rozlíšením ($>10^7$). Ióny vstupujú do cely, ktorá je pod vysokým vákuom a teplota v nej sa blíži absolútnej nule. Táto cela je umiestnená uprostred veľmi silného magnetického poľa (4,7 – 13 T). Po vstupe do magnetického poľa sa pôsobením Lorentzovej sily ióny začínajú pohybovať po kruhovej trajektórii. Frekvencia tohto pohybu je závislá na ich pomere m/z . Krátky impulz vysokofrekvenčného napätia spôsobí excitáciu iónu a zväčšenie polomeru kruhu, po ktorom sa ión pohybuje. Frekvencia, pri ktorej k tejto excitácii dochádza je daná pomerom m/z . Takto excitované ióny indukujú striedavý prúd medzi detektorovými doskami. Frekvencia tohto prúdu je rovnaká ako cyklotrónová frekvencia iónov a intenzita je úmerná počtu iónov. Po zmene frekvencie, ktorá ión excitovala, sa ión vracia na svoju pôvodnú trajektóriu a dochádza k excitácii častíc s iným m/z [31].

Orbitrap

Orbitrap sa skladá z dvoch koncových elektród a centrálnej vretenovej elektródy, na ktorú je privádzaný jednosmerný prúd. To vedie k vysokému statickému napätiu medzi koncovými elektródami. Ióny, ktoré do orbitrapu vstupujú, sú zachytené k vretenovej elektróde a začínajú okolo nej krúžiť. Ióny oscilujú medzi vonkajšími elektródami

o rôznych frekvenciách a rozdelia sa do samostatných pásiem na základe ich rozdielnej m/z . Pre každú hodnotu m/z je typická konkrétna oscilačná frekvencia, ktorá je pomocou Fourierovej transformácie prevedená na výstupný signál [32][33].

2.2.3 Typy záznamov

Medzi záznamy, ktoré môžeme získať v prípade, že v priebehu analýzy **nedochádza k fragmentácii sledovaných molekúl**, patrí:

- Chromatogram celkového iónového prúdu (total ion current, TIC) – skenovanie prebieha v celom rozsahu očakávaných m/z . V každom bode TIC je možné získať kvalitatívne informácie v podobe hmotnostného spektra. Tiež je možné extrahovať chromatogram určitého konkrétneho iónu (rekonštituovaný iónový prúd) [6].
- Selektívny záznam jedného alebo viacerých iónov (selective ion monitoring, SIM) – Monitorovaný je jeden alebo viacero vybraných iónov s konkrétnym m/z . Vďaka tomu je možné rýchlejšie skenovanie a zvyšuje sa citlivosť detekcie [22].

V prípade tandemovej hmotnostnej spektrometrie, kedy v priebehu analýzy **dochádza k fragmentácii vybraných molekúl** (napr. pri využití trojitého kvadrupólu), je možné pracovať s ďalšími typmi záznamov:

- Sken produktových iónov – sken iónov, ktoré vznikli fragmentáciou selektívne vybraného prekursorového iónu. Využíva sa na objasnenie štruktúry analytu [6].
- Sken prekursorových iónov – sken poskytujúci spektrum všetkých prekursorových iónov, z ktorých mohol vzniknúť daný fragment. Využíva sa na identifikovanie štruktúrne podobných látok [6]. Napríklad na kvantifikáciu fosfolipidov po úprave vzorky biologického materiálu, čím je možné overiť čistotu vzorky po extrakcii [34].
- Sken neutrálnych strát – monitorované sú všetky prekursorové podliehajúce vybranej neutrálnej strate. Využíva sa na identifikáciu štruktúrne podobných látok.
- Selektívny záznam jednej (SRM) alebo viacerých (MRM) reakcií – sledovanie špecifickej fragmentačnej reakcie vybraného iónu. Využíva sa v kvantitatívnej analýze analytov obsiahnutých v zložitých zmesiach [6].

2.3 Úprava vzoriek biologického materiálu

Veľké množstvo vzoriek biologického materiálu nemôže byť priamo zavedené do LC/MS systému a je nutná ich úprava. Biologický materiál totiž predstavuje mimoriadne komplexnú maticu, ktorej súčasťou sú okrem iného proteíny, fosfolipidy, soli a ďalšie zložky, ktoré nie sú kompatibilné s chromatografickým systémom. Tieto zložky môžu jednak zvyšovať maticový efekt (potlačenie/zosilnenie ionizácie) a u proteínov hrozí riziko precipitácie v systéme a následné upchávanie kolóny. Tiež je dôležité, aby vzorka bola v kvapalnom skupenstve a pre umožnenie dobrej ionizácie, s využitím ESI alebo APCI, by vzorka nemala obsahovať neprchavé kyseliny, bázy alebo soli. Úpravou vzorky sme tiež schopný zakoncentrovať analyt a zvýšiť tak citlivosť analýzy [35]. Ide teda o dôležitý a časovo najnáročnejší krok (až 80 % celkového času analýzy), v ktorom môžeme súčasne izolovať a zakoncentrovať analyt [36].

2.3.1 Precipitácia proteínov

Ide o proces, pri ktorom dochádza k odstraňovaniu proteínov z biologického materiálu (najčastejšie plazma alebo sérum). Ako precipitačné činidlo sa používa s vodou miešateľné organické rozpúšťadlo, kyselina alebo soľ. Po pridaní, premiešaní a odstredení sa číry supernatant môže priamo nastreknúť na kolónu. V prípade potreby je možné supernatant odpariť a následne rekonštituovať do menšieho množstva vhodného rozpúšťadla, čím dôjde k zakoncentrovaniu analytu.

Tento spôsob úpravy vzorky je jednoduchý, rýchly a vhodný takmer pre všetky typy malých molekúl, pričom nezáleží na ich polarite. Takto upravená vzorka ale stále obsahuje fosfolipidy a malé endogénne molekuly, ktoré môžu interferovať s ionizačným procesom hmotnostného spektrometru, znižovať účinnosť LC kolóny a tiež zvyšovať maticový efekt. Ďalšou nevýhodou je riziko väzby analytu na precipitát [35][37].

2.3.2 Extrakcia na pevnú fázu (solid phase extraction, SPE)

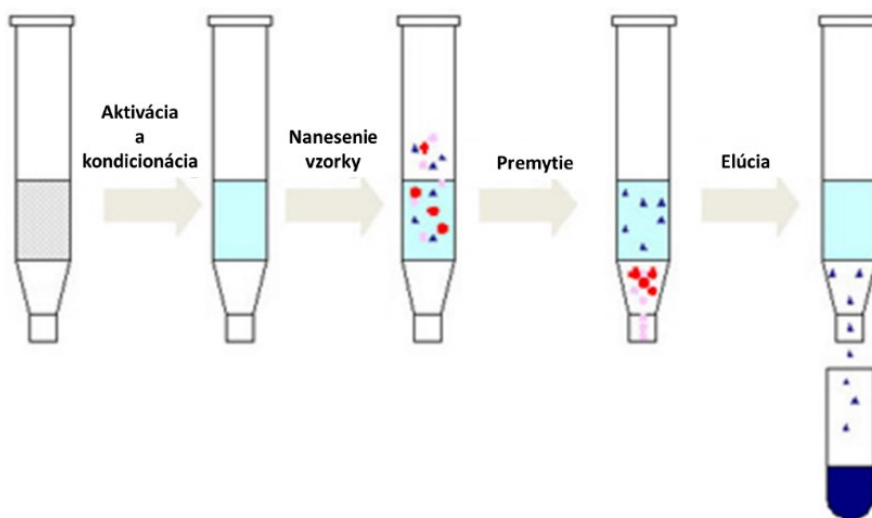
Je to metóda úpravy vzorky, pri ktorej dochádza k nanieseniu analyzovaného biologického materiálu na kolónku naplnenú sorbentom, následnej interakcii analytu s touto stacionárnou fázou, vymytiu balastov a v závere k elúcii čistého analytu. Analyt môže so sorbentom interagovať rôznymi mechanizmami (podobne ako je tomu v kvapalinovej chromatografii) a pri SPE kolónkach je tiež k dispozícii široké spektrum stacionárnych fáz:

- Reverzné SPE (-C8, -C18, -fenyl atď.)
- Normálne SPE (-CN, -NH₂ atď.)
- Iónovo-výmenné SPE (slabé a silné organické kyseliny a bázy)
- Molekulárne vtlačené polyméry [35]

Celá extrakcia pozostáva zo štyroch hlavných krokov (obr. 11). Pre prechod použitých rozpúšťadiel a samotného biologického materiálu sorbentom je potrebné vákuum.

- 1) **Aktivácia a kondicionácia** – Navlhčenie sorbentu a umožnenie interakcie analytu so stacionárnou fázou. Pri nepolárnych sorbentoch sa najčastejšie používajú s vodou miešateľné organické rozpúšťadlá. Následne musí byť sorbent premytý vodou alebo vhodným pufrom, aby nedošlo k precipitácii proteínov z biologického materiálu. Pri použití polárnych stacionárnych fáz sa používajú nepolárne rozpúšťadlá.
- 2) **Nanesenie vzorky** – v tomto kroku dochádza k prechodu väčšiny proteínov, makromolekúl a solí cez sorbent do odpadu a k zachyteniu analytu na stacionárnej fáze.
- 3) **Premytie** – v tomto kroku dochádza k vymytiu balastov, ktoré ostali v sorbente.
- 4) **Elúcia** – dochádza k uvoľneniu analytu zo stacionárnej fázy.

Následne je možné eluát odpariť pod prúdom dusíka a rekonštituovať do menšieho množstva vhodného rozpúšťadla, čím dôjde k zakoncentrovaniu [35][38].



Obr. 11: SPE extrakcia (upravené podľa [39]).

2.3.3 Extrakcia kvapalina-kvapalina (liquid-liquid extraction, LLE)

LLE je spôsob úpravy vzorky, kedy dochádza k extrakcii analytu z biologického materiálu (vodná fáza) do organického rozpúšťadla, ktoré je s vodou nemiešateľné. Väčšina komponent matrice (fosfolipidy, proteíny, anorganické soli...) pritom ostáva vo vodnej fáze. Tento spôsob extrakcie je vhodný najmä pre nepolárne látky, ktoré ochotne prestupujú do organických rozpúšťadiel. Pre polárne látky je vhodné zvoliť iný spôsob úpravy vzorky. Distribúciu analytu medzi jednotlivými fázami popisuje rozdeľovací a distribučný koeficient, hodnoty $\log P$ a $\log D$. Z vodnej do organickej fázy môže prestupovať iba neionizovaná molekula. V prípade, že je molekula schopná ionizácie, je potrebné upraviť pH hodnotu roztoku. Tak dochádza k potlačeniu ionizácie analytu a podporeniu extrakcie. Na úpravu pH sa využívajú kyslé, zásadité alebo tlmivé roztoky. Keďže je analyt extrahovaný do organického rozpúšťadla nemiešateľného s vodou, ktoré nie je kompatibilné s LC na reverzných fázach, je po extrakcii nutné vzorku rekonštituovať do vhodného rozpúšťadla [35][37].

2.3.4 Mikroextrakčné techniky

Využitie konvenčných metód úpravy vzorky je do určitej miery limitované (potreba veľkého množstva vzorky a vysoká spotreba organických rozpúšťadiel, nižšia selektivita atď.). Tieto nevýhody sú redukované použitím mikroextrakčných techník úpravy vzorky. Nielenže ide o environmentálne prijateľnejší spôsob úpravy vzorky, pri ktorom dochádza k výrazne menšej spotrebe organických rozpúšťadiel. Zároveň je potrebné menšie množstvo samotnej vzorky a výhodou je tiež možnosť automatizácie/semi-automatizácie [40]–[42].

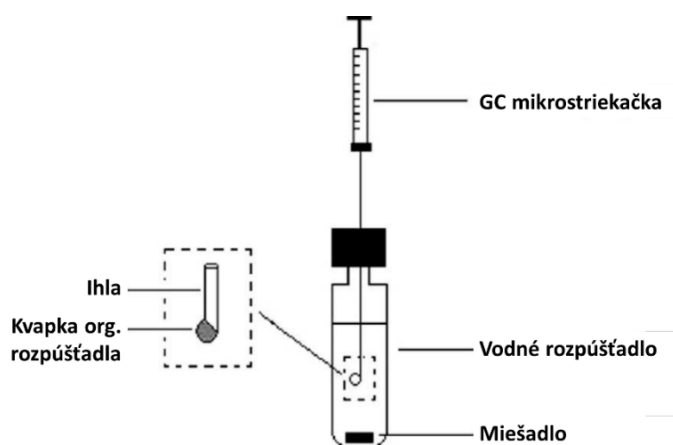
Mikroextrakcia kvapalinou (liquid-phase microextraction, LPME)

LPME je technika založená na princípe LLE. V tomto prípade je ale spotreba rozpúšťadla len pár μl . Rozlišujeme tri základné kategórie mikroextrakcie kvapalinou [43].

Mikroextrakcia dutým vláknom – Základom je porézne vlákno (najčastejšie vyrobené z polypropylénu), ktoré je zavedené do vialky naplnenej vzorkou (vodná fáza). Póry dutého vlákna sú vyplnené organickým rozpúšťadlom nemiešateľným s vodou. Lumen dutého vlákna je vyplnený akceptorovým médiom, ktoré môže byť zhodné s organickým rozpúšťadlom vyplňajúcim póry (dvojfázový systém – uplatnenie nachádza najmä pri analýzach neutrálnych molekúl s využitím plynovej chromatografie (GC))

alebo ním môže byť vodný pufer (trojfázový systém – vhodný pre extrakciu kyslých/bázických analytov). Analyzovaná látka je extrahovaná zo vzorky, cez rozpúšťadlo vyplňajúce póry, až do akceptorového média buď na základe pasívnej difúzie (dvojfázové systémy) alebo na základe pH gradientu (trojfázové systémy). Akceptorové médium môže byť po extrakcii rovno analyzované (GC/LC). Pre trojfázové systémy existuje aj 96-jamková alternatíva, ktorá sa označuje PALME (parallel artificial liquid membrane extraction) [44].

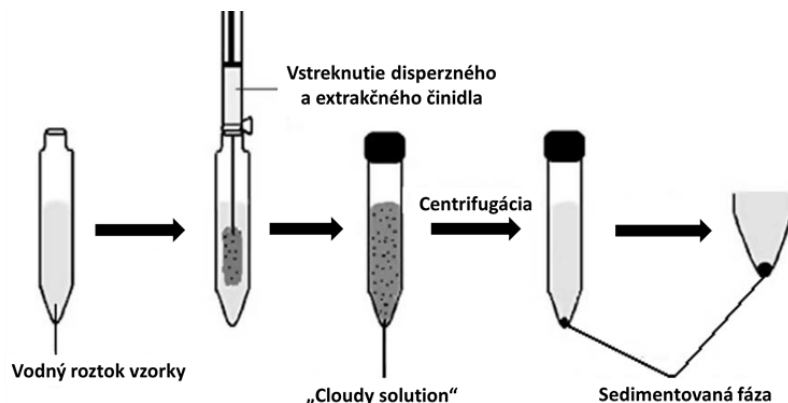
Mikroextrakcia jednou kvapkou (obr. 12) – Extrakcia z vodného roztoku prebieha do malej kvapky (rádovo nl až μ l) organického rozpúšťadla nemiešateľného s vodou. Táto kvapka je umiestnená na špičke mikrostriekačky, po skončení extrakcie sa nasaje do striekačky a môže byť priamo analyzovaná. Táto metóda je čiastočne komplikovaná nízkou stabilitou kvapky a je potrebné opatrné zaobchádzanie. Čiastočným riešením tejto nestability je ale „head-space“ mikroextrakcia jednou kvapkou, kedy sa ihla spolu s kvapkou nachádza nad hladinou analyzovanej vzorky. V tomto prípade je možné rýchlejšie miešanie vzorky pričom nedochádza k narušeniu kvapky [45].



Obr. 12: Mikroextrakcia jednou kvapkou (upravené podľa [43]).

Disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina (obr. 13) – Do vodnej vzorky je vstreknuté extrakčné činidlo (10 – 250 μ l), ktoré má vyššiu hustotu ako voda a je s vodou nemiešateľné. Súčasťou vstrekovanej zmesi je tiež disperzné činidlo (0,15 – 2,5 ml), ktoré je rozpustné súčasne vo vzorke aj v extrakčnom činidle. Následne dochádza k vzniku „cloudy solution“, čiže výraznému rozptýleniu extrakčného činidla vo vzorke. Vďaka veľkému medzifázovému povrchu je extrakcia z vodnej fázy veľmi rýchla. Nasleduje centrifugácia a odber sedimentovaného extrakčného činidla, ktoré sa ďalej

analyzuje. Ako disperzné činidlo najčastejšie slúži acetón, metanol, etanol alebo acetonitril [46].



Obr. 13: Disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina (upravené podľa [43]).

Sorpčné mikroextrakčné techniky

Mikroextrakcia pevnou fázou je technika, pri ktorej sa využíva kremenné vlákno potiahnuté tenkou vrstvou polymérovej stacionárnej fázy. Toto vlákno je zasunuté v ochrannej ihle. Pri extrakcii prepichnete septum ochrannou ihlou a následne vysunieme vlákno buď priamo do analyzovanej vzorky alebo nad vzorku („head-space“ extrakcia). Po extrakcii sa vlákno zasunie naspäť do ihly a prenesie k analýze. V prípade GC analýz dochádza k termálnej desorpcii analytu z vlákna, u LC analýz je potrebná desorpcia do vhodného rozpúšťadla [47]. Okrem vlákna môžu byť sorbentom obalené aj iné predmety (tenký film, miešadlo). Pri miešadlovej mikroextrakcii dochádza k extrakcii analytu z matrice na miešaciu tyčinku, ktorá je potiahnutá tenkou vrstvou polyméru [48].

Mikroextrakcia sorbentom naplneným v striekačke je technika, pri ktorej je sorbent priamo v striekačke (medzi ihlou a piestom). Oproti klasickému SPE je použité podstatne menšie množstvo sorbentu a navyše je možné opakované použitie (viac ako 100krát). Podobne ako u SPE pozostáva extrakcia zo štyroch základných krokov: kondicionácia, nabratie vzorky, vymytie balastov a elúcia [49]. Na podobnom princípe, kedy k extrakcii analytu na pevnú fázu dochádza pri prietoku vzorky, fungujú aj ďalšie mikroextrakčné techniky. Sorbentom môže byť potiahnutá napríklad vnútorná strana ihly, alebo kapiláry, prípadne ním môžu byť naplnené špičky mikropipety [48].

2.4 Kardioprotektívne látky

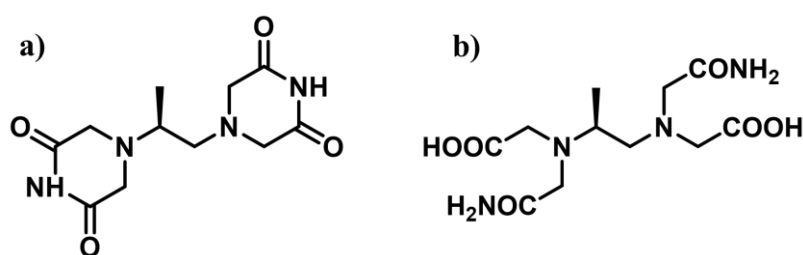
Kardiotoxicity je závažný nežiadúci účinok liečiv využívaných na liečbu širokého množstva nádorových ochorení – antracyklínových chemoterapeutík (ANT). Ide

o nežiadúci účinok závislý na kumulatívnej dávke, pričom sa môže vyskytovať v akútnej (do týždňa), chronickej (do roka) a neskorej (desiatky rokov) forme. Najzávažnejšia je chronická a neskorá forma kardiotoxicity, ktorá môže viesť k srdcovému zlyhávaniu, arytmiám a ďalším vážnym poškodeniam myokardu [50]. Hlavným cieľom ANT je topoizomeráza 2 (TOP2). ANT interagujú s oboma izoformami TOP2 pričom pre účinok je kľúčová interakcia s topoizomerázou 2 α (TOP2A) [51]. Mechanizmus kardiotoxického pôsobenia ANT nie je úplne objasnený. Predpokladá sa, že je daný buď schopnosťou antracyklínov chelatovať voľné železo, čím vzniká komplex železo-ANT. Tento komplex reaguje s kyslíkom a tak sa zvyšuje produkcia reaktívnych foriem kyslíka v kardiomyocytoch. Následne dochádza k zvyšovaniu oxidatívneho stresu a poškodzovaniu DNA [52]. Druhou možnou teóriou kardiotoxického pôsobenia je samotná väzba ANT na TOP2B v kardiomyocytoch, čím dochádza k poškodzovaniu buniek [53].

Jednou z možností prevencie kardiotoxicity je použitie kardioprotektívnych látok. Jediné v súčasnosti registrované liečivo s kardioprotektívnym účinkom je dexrazoxan (DEX) [50].

2.4.1 Dexrazoxan (DEX)

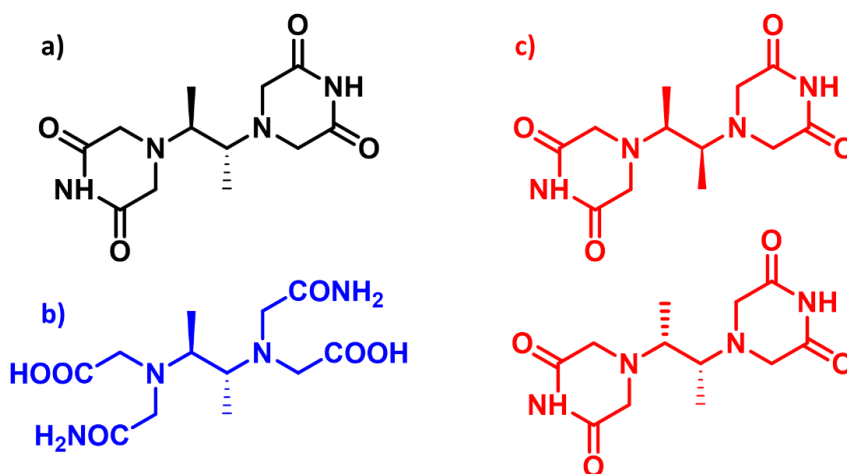
Dexrazoxan (obr. 14a) je vo vode rozpustné liečivo, analóg kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA). Po hydrolyze molekuly dochádza k vzniku metabolitu podobného EDTA (ADR-925, obr. 14b), ktorý je silný chelátor železa [52]. Podobne ako príčina kardiotoxicity nie je presne známa, mechanizmus účinku DEX taktiež nie je úplne objasnený. Tradičná teória tvrdí, že kardioprotektívny účinok je daný schopnosťou otvoreného metabolitu chelatovať voľné železo, vďaka čomu je obmedzený vznik komplexu železo-ANT. Súčasná štúdia však tvrdia, že kardioprotektívny účinok je pravdepodobne daný interakciou parentného liečiva DEX s TOP2B, vďaka čomu nemôžu ANT vytvárať komplex ANT-TOP2B v kardiomyocytoch (kardiomyocyty sú terminálne diferencované bunky a neexprimujú TOP2A) [51][53].



Obr. 14: Chemická štruktúra dexrazoxanu (a) a jeho metabolitu ADR-925 (b).

2.4.2 Nový analóg dexrazoxanu s lepším kardioprotektívnym účinkom: 4,4'-(bután-2,3-diyl)bis(piperazín-2,6-dión) (ICRF-193)

Látka ICRF-193 (obr. 15a) bola syntetizovaná ako jeden z analógov DEX. *In vitro* [54] a pilotné *in vivo* štúdie naznačujú, že táto látka má lepší kardioprotektívny účinok ako DEX. V molekule ICRF-193 sa nachádzajú dve chirálne centrá, súčasne ide o symetrickú molekulu. Poskytuje teda dva diastereoizoméry.



Obr. 15: Chemická štruktúra ICRF-193 (a), jeho metabolitu ICRF-193_{met} (b) a racemátu (c).

Schopnosť inhibície TOP2B vykazuje *R,S* diastereoizomér (mezoforma, ICRF-193). V prípade zmesi *S,S* a *R,R* enantiomérov hovoríme o racemáte, ktorý je takmer bez účinku (obr. 15c) [1].

Podanie ICRF-193 do organizmu je ale do značnej miery komplikované jeho nedostatočnou rozpustnosťou vo vode. Preto bolo vyvinuté proliečivo GK-667, ktoré je dobre rozpustné vo vode a po podaní do organizmu sa rýchlo premieňa na účinný ICRF-193, ktorý následne metabolizuje na neúčinný ICRF-193_{met} (obr. 15b) [55].

3 Cieľ práce

Cieľom tejto práce bolo:

- 1) **Vyvinúť UHPLC-MS/MS metódu na separáciu diastereoizomérov ICRF-193 (mezoforma) a racemátu** a overiť tak čistotu štandardného roztoku racemátu.
- 2) **Vyvinúť a optimalizovať SPE extrakcie ICRF-193 a jeho metabolitu (ICRF-193_{met}) z plazmy** a zvýšiť tak citlivosť súčasnej metódy.

4 Experimentálna časť

4.1 Použitý materiál, prístroje, pomôcky a chemikálie

4.1.1 Chemikálie

mezo-4,4'-(bután-2,3-diyl)bis(piperazín-2,6-dión) (ICRF-193), Katedra organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

rac-4,4'-(bután-2,3-diyl)bis(piperazín-2,6-dión) (ďalej označovaný len ako racemát), Katedra organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Kys. *mezo*-*N,N'*-bis(karbamoylmetyl)-2,3-diaminobután-*N,N'*-dioctová (ICRF-193_{met}), Katedra organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

rac-4,4'-(propán-1,2-diyl)bis(1-metylpiperazín-2,6-dión) (GK-627, I.S.ICRF-193), Katedra organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

(propán-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetamid (4AMD , I.S.ICRF-193_{met}), Katedra organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Metanol LC-MS čistoty, Merck, Nemecko

Acetonitril LC-MS čistoty, Merck, Nemecko

Kyselina mravčia LC-MS čistoty, Merck, Nemecko

Mravčan amónny LC-MS čistoty, Merck, Nemecko

Dimetylsulfoxid HPLC čistoty (DMSO), Merck, Nemecko

Prázdna králičia plazma s heparínom ako antikoagulačnou prísadou, ITEST plus, Česká republika

Milli-Q voda pripravovaná pomocou Millipore čistiaceho systému, Merck Millipore, Nemecko

Disodná soľ etyléndiamíntetraoctovej kyseliny (EDTA), Merck, Nemecko

4.1.2 Chromatografický materiál

Kolóny:

ZORBAX Bonus RP (100 × 3,0 mm; 1,8 μm), Agilent, USA

Luna Omega Polar (100 × 2,1 mm; 1,6 μm), Phenomenex, USA

Predkolóna:

SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC Fully Porous Polar C18 2.1mm ID
Columns (Phenomenex, USA)

4.1.3 Prístroje

Chromatografický systém (Shimadzu, Japonsko):

Hmotnostný spektrometer s analyzátorom typu trojitý kvadrupól – ESI⁺ ionizácia
(LCMS-8030) spojený s UHPLC zostavou (Nexera X2).

UHPLC zostava Nexera X2 Shimadzu – degasser 20 A₅ , dve LC- 30 AD pumpy
(jedna s integrovanou kontrolnou jednotkou), CTO - 30A kolónový termostat.

Chromatografický program LabSolutions.

Ďalšie prístroje:

Analytické váhy CPA225D-0CE (Sartorius, Nemecko)

IEC CL31R Multispeed (Thermo, USA)

Ultrazvukový kúpeľ Ecoson U-3 STH (Ecoson, Slovensko)

SPE vákuový manifold Visiprep 5-7030 (Supelco, Nemecko)

Elektrická odsávačka Mevacs M46 (Medist, Slovensko)

Wizard advanced IR Vortex (Velp Scientifica, Taliansko)

4.1.4 Pomôcky

SPE kolónky:

Discovery DSC-PH (100 mg/1 ml, Supelco, Nemecko)

Select HLB SPE (30 mg/1 ml, Supelco, Nemecko)

Discovery DSC-18 (100 mg/1 ml, Supelco, Nemecko)

Hypersep Verify AX (130 mg/1 ml, Thermo Scientific, USA)

Millex-GV filters (0,22 µm)

4.2 Príprava roztokov

4.2.1 Zásobné roztoky

Zásobné roztoky boli pripravované v koncentráciách 1 mg/ml. Príprava prebiehala rozpustením požadovaného množstva substancie v potrebnom množstve rozpúšťadla: metanol (I.S._{ICRF-193met}), 50% roztok metanolu vo vode (ICRF-193_{met} a I.S._{ICRF-193}) a DMSO (ICRF-193). Rozpúšťanie ICRF-193 bolo potrebné podporiť

vložením roztoku do ultrazvukového kúpeľa na 10 minút. Takto pripravené zásobné roztoky boli skladované pri teplote -20 °C a stabilné po dobu jedného mesiaca.

4.2.2 Pracovné roztoky

Pracovné roztoky boli pripravené nariadením potrebného množstva zásobného roztoku na požadovanú koncentráciu za použitia vhodného rozpúšťadla. Boli skladované pri teplote 4 °C a použiteľné po dobu siedmich dní. Pracovné roztoky ICRF-193 a ICRF-193_{met} boli pripravené v koncentráciách 1 – 50 µM. Pracovné roztoky vnútorných štandardov boli pripravené v koncentráciách 0,25 mg/ml pre I.S.ICRF-193 a 0,5 mg/ml pre I.S.ICRF-193_{met}.

4.2.3 Štandardné roztoky

Štandardné roztoky boli pripravované v čas potreby riedením zo zásobných alebo pracovných roztokov do Milli-Q vody na koncentráciu 100 µM. V prípade vývoja metódy na separáciu ICRF-193 a racemátu bol štandardný roztok pripravený riedením do metanolu (c = 5 µg/ml). Tieto roztoky boli využité pri optimalizácii SPE extrakcií a pri vývoji chromatografických metód.

4.3 Nastavenia MS detekcie

Použitou ionizačnou technikou bol elektrosprej nastavený v pozitívnom móde. Analyzátorom bol trojitý kvadrupól a na kvantifikáciu bol použitý SRM mód. Parametre MS sú uvedené v tab. 1. SRM prechody jednotlivých analytov sú uvedené v tab. 2.

Tab. 1: Nastavenie parametrov hmotnostného spektrometra.

Parametre MS	
Prietok nebulizačného plynu	3 l/min
Prietok sušiaceho plynu	15 l/min
Napätie rozhrania	4,5 kV
Teplota DL	250 °C
Teplota "heat" bloku	400 °C
CID tlak plynu	230 kPa

Tab. 2: SRM prechody pre kvantifikáciu.

SRM prechody			
	Prekurzorový ión (<i>m/z</i>)	Produktový ión (<i>m/z</i>)	Kolízna energia (eV)
ICRF-193, racemát	283,3	169,1	-12
ICRF-193 _{met}	319,1	187,2	-16
I.S.ICRF-193	297,1	169,0	-14
		84,1	-25
I.S.ICRF-193 _{met}	303,1	127,1	-26
		58,1	-22

4.4 Vývoj chromatografickej metódy na separáciu ICRF-193 a racemátu

Analýza prebiehala s využitím UHPLC-MS/MS systému na kolóne ZORBAX Bonus RP, s využitím mobilnej fázy zloženej z 0,25% kyseliny mravčej (A) a metanolu (B). Testované boli rôzne izokratické elúcie (20 až 50% organickej fázy). Prietok bol 0,3 ml/min, teplota na kolóne 30 °C, nástrek 1 µl a dĺžka analýzy 6 minút.

Pri vývoji metódy a výbere vhodného pomeru mobilnej fázy sme pracovali so štandardom analyzovaných látok v metanole ($c = 5 \mu\text{g/ml}$). Pri analýze samotnej vzorky racemátu sa jednalo o metanolickeý roztok o koncentrácii 200 µg/ml pričom pík racemátu bol odvádzaný do odpadu aby nedošlo k presýteniu detektora. Na stanovenie koncentrácie ICRF-193 vo vzorke bola využitá metóda vonkajšieho štandardu ($c = 0,2 \mu\text{g/ml}$).

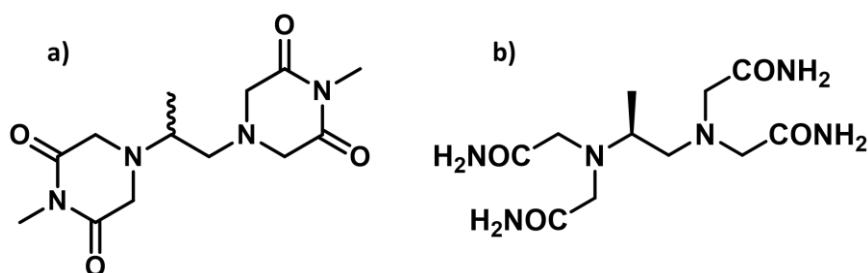
4.5 Vývoj metódy extrakcie na pevnú fázu pre ICRF-193 a jeho metabolit

4.5.1 Chromatografické podmienky a vnútorné štandardy

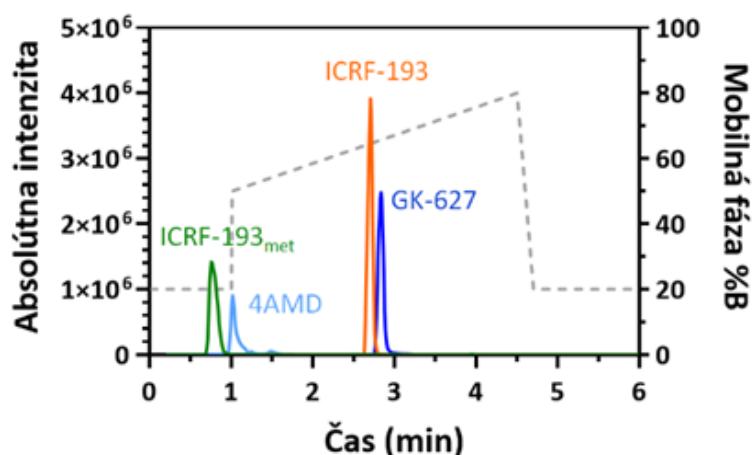
Meranie prebiehalo taktiež na UHPLC-MS/MS systéme za využitia kolóny Luna Omega Polar s rovnakým typom predkolóny, mobilnými fázami boli 1 mM mravčan amónny (A) a acetonitril (B). Na základe predchádzajúcich experimentov realizovaných na našom pracovisku bol na analýzu vzoriek po SPE zvolený nasledujúci gradient: 0,0 – 1,0 min (20 % B), 1,01 – 4,5 min (50 – 80 % B), 4,7 – 6,0 min (20 % B). Prietok bol 0,25 ml/min, teplota na kolóne 30 °C, nástrek 1 µl a dĺžka analýzy 6 minút.

Nakoľko mobilná fáza mohla obsahovať ióny železa, ktoré by ICRF-193_{met} mohol chelatovať a kolóna je z nerezovej oceli (lúhovanie iónov), bol na premytie kolóny pred analýzou používaný 2 mM roztok EDTA a acetonitrilu (80 : 20; v/v) a premývanie prebiehalo 4 hodiny pri prietoku 0,25 ml/min. Následne bola kolóna minimálne 2 hodiny premývaná mobilnou fázou, aby bola EDTA z kolóny dostatočne odstránená.

Ako vnútorné štandardy boli použité štruktúrne analógy. Pre ICRF-193 bol vybraný analóg GK-627 (obr. 16a), pre ICRF-193_{met} to bol 4AMD (obr. 16b). Reprezentatívny chromatogram s vyznačeným gradientom je uvedený na obr. 17.



Obr. 16: Chemická štruktúra GK-627 - I.S._{ICRF-193} (a) a 4AMD - I.S._{ICRF-193_{met}} (b).



Obr. 17: Reprezentatívny chromatogram pre stanovenie ICRF-193 a ICRF-193_{met}.

4.5.2 SPE extrakcie

Testované kolónky a podmienky extrakcie

Optimalizácia SPE extrakcie prebiehala z vodného štandardu alebo zo spikovanej plazmy (100 μ M). Testovali sme štyri typy SPE kolóniek: Select HLB SPE, Discovery DSC-PH, Discovery DSC-18, Hypersep Verify AX. Pri optimalizácii extrakcie na prvých troch menovaných kolónkach sme pracovali s činidlami uvedenými v tab. 3a. Pri optimalizácii extrakcie na kolónke Hypersep Verify AX boli použité činidlá uvedené v tab. 3b.

Tab. 3: Podmienky SPE extrakcie: a) pre kolónky Select HLB SPE, Discovery DSC-PH a Discovery DSC 18; b) pre kolónku Hypersep Verify AX.

Podmienky SPE extrakcie	
	Aktivácia: metanol (1 ml)
	Kondicionácia: Milli-Q voda (1 ml)
a)	Nanesenie vzorky: prázdna plazma + ICRF-193 + I.S.ICRF-193 (100 µl)
	Premytie: Milli-Q voda alebo 0,25% kys. mravčia (300 – 500 µl)
	Elúcia: metanol, acetonitril (300 µl)
	Aktivácia: metanol alebo acetonitril (1 ml)
	Kondicionácia: Milli-Q voda, 0,5% kys. mravčia (1 ml)
	Nanesenie vzorky: vodný štandard, spikovaná plazma (100 µl)
b)	Premytie: Milli-Q voda (300 µl)
	Elúcia: zmes acetonitril/kys. mravčia 9 : 1 (v/v) (300 µl)
	zmes acetonitril/kys. triflóroctová 99 : 1 (v/v) (300 µl)
	Rekonštitúcia: 20% acetonitril (200 µl)

Pre zaistenie dostatočnej čistoty vzoriek boli eluáty získané po extrakcii z plazmy centrifugované (4 min, 3500 ot.). Všetky eluáty boli na záver filtrované (0,22 µm) a následne prenesené k analýze.

Vybrané validačné parametre

Po výbere vhodnej kolónky a optimalizácii extrakcie boli metódy čiastočne validované. Hodnotená bola linearita, výťažnosť a matricové efekty (n = 3).

- Linearita v plazme bola testovaná v rozsahu 0,02 – 1 µM, vzorky boli pripravené pridaním 3 µl pracovného roztoku o potrebnej koncentrácii a 3 µl vnútorného štandardu do 147 µl prázdnej plazmy. Následne bolo 100 µl plazmy použitých na extrakciu.
- Výťažnosť z plazmy bola vypočítaná v percentách ako priemerná hodnota pomeru plochy pod píkom spikovanej prázdnej plazmy (10 µM) pred a po extrakčnom procese.
- Matricové efekty boli vypočítané ako priemerná hodnota pomeru plochy pod píkom spikovanej prázdnej plazmy (10 µM) po extrakčnom procese a plochy pod píkom čistého štandardného roztoku.

5 Výsledky a diskusia

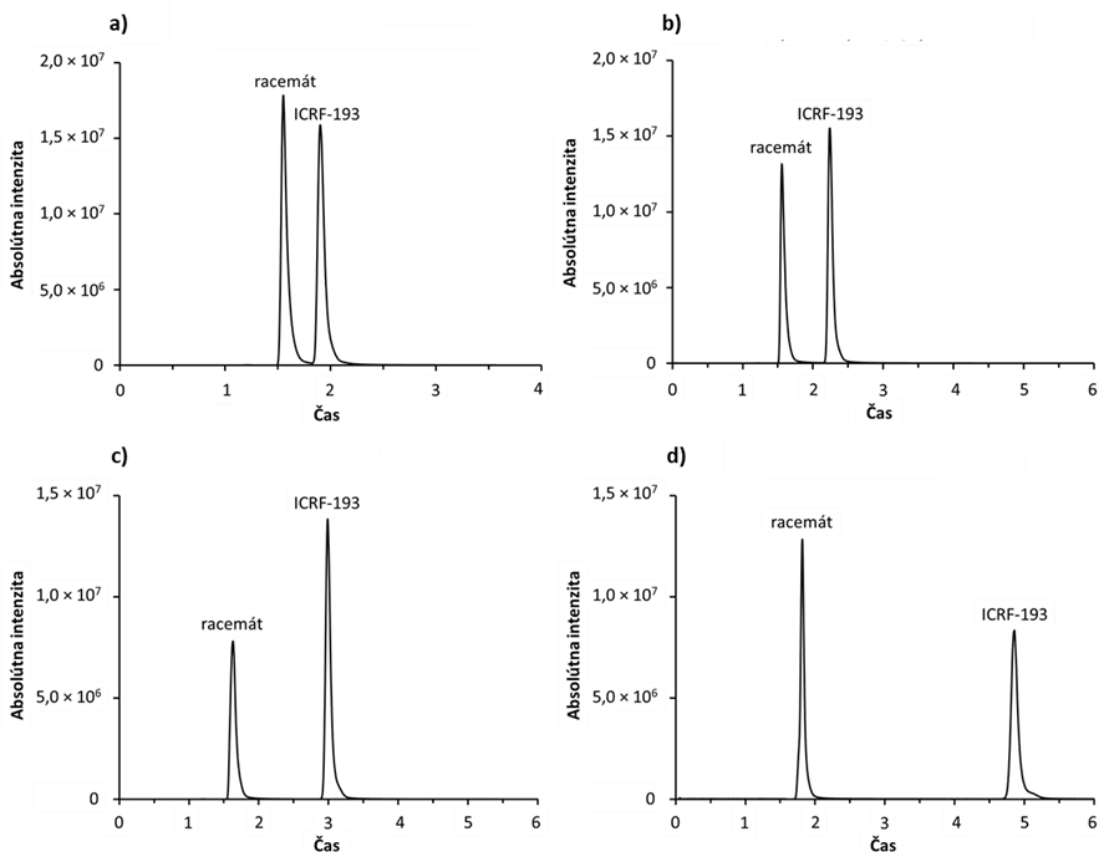
5.1 Vývoj chromatografickej metódy na separáciu ICRF-193 a racemátu a analýza vzorky racemátu

5.1.1 Vývoj metódy

Vzhľadom k vyššie zmienenému cytoprotektívnemu účinku racemátu proti ANT-indukovanej toxicite nastala otázka, či racemát neobsahuje nečistotu ICRF-193 (mezofорма), ktorá by mohla pri vyšších koncentráciách túto protekciu buniek navodzovať. V prípade kontaminácie analyzovanej vzorky racemátu určitým množstvom ICRF-193, sa predpokladalo, že pôjde o stopové množstvo a preto bolo potrebné analyzovať vzorku racemátu v dostatočne vysokej koncentrácii, aby bolo prípadné ICRF-193 detekovateľné. Túto skutočnosť bolo nutné zohľadniť aj pri vývoji chromatografickej metódy a teda bolo potrebné dosiahnuť čo najvyššie rozlíšenie analyzovaných látok. Chromatografická metóda bola vyvinutá na základe modifikácie už validovanej metódy používanej pre analýzu DEX a jeho metabolitu (ADR-925). Testované boli rôzne pomery organickej a vodnej zložky MF pri izokratickej elúcii. Prehľad testovaných pomerov spolu s faktormi symetrie a rozlíšením píkovej je uvedený v tab. 4. Chromatogramy jednotlivých meraní sú uvedené na obr. 18. Najvyššie rozlíšenie pri súčasnom zachovaní symetrie píkovej bolo dosiahnuté pri izokratickej elúcii 80 : 20 (A : B, v/v).

Tab. 4: Vybrané chromatografické parametre optimalizovanej metódy na separáciu ICRF-193 a racemátu. Parametre sú vypočítané podľa rovnice 4 a 5.

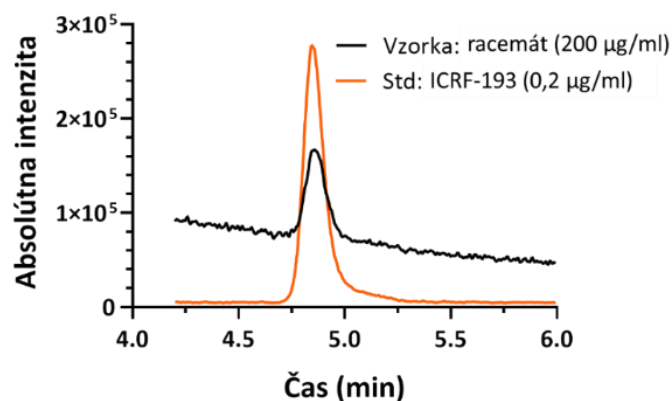
MF (A : B, v/v)	Analyt	Retenčný čas (min)	Faktor symetrie	Rozlíšenie
80 : 20	racemát	1,8	1,1	23,3
	ICRF-193	4,9	1,2	
70 : 30	racemát	1,6	1,4	10,0
	ICRF-193	3,0	1,6	
60 : 40	racemát	1,6	2,1	6,0
	ICRF-193	2,2	1,7	
50 : 50	racemát	1,5	2,0	3,3
	ICRF-193	1,9	1,8	



Obr. 18: Separácia ICRF-193 a racemátu pri izokratickej elúcii. Reprezentatívne chromatogramy testovaných pomerov MF (A : B, v/v) **a)** 50 : 50; **b)** 60 : 40; **c)** 70 : 30; **d)** 80 : 20.

5.1.2 Analýza vzorky racemátu

Pri samotnej analýze sme pracovali so vzorkou o koncentrácii $200 \mu\text{g/ml}$. Vzhľadom k tak vysokej koncentrácii a snahe zabrániť presýteniu detektora bol celý pík látky eluovanej v retenčnom čase racemátu odvádzaný do odpadu. Detekčné okno ICRF-193 bolo v čase 4,2 – 6 min. Koncentrácia štandardu ICRF-193 bola $0,2 \mu\text{g/ml}$ a chromatografický záznam nečistoty a štandardu je uvedený na obr. 19. Na základe kvantifikácie metódou vonkajšieho štandardu bolo zistené, že koncentrácia ICRF-193 vo vzorke racemátu ($200 \mu\text{g/ml}$) bola $70,4 \text{ ng/ml}$ a teda racemát obsahoval iba 0,035 % ICRF-193. Vzhľadom k vysokej účinnosti látky ICRF-193 môžeme pozorované protektívne účinky racemátu vo vysokých koncentráciách čiastočne pripísať práve tejto kontaminácii [2].



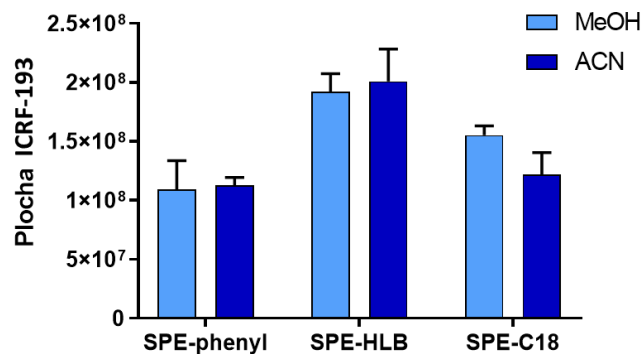
Obr. 19: Analýza vzorky racemátu.

5.2 SPE extrakcia ICRF-193 a ICRF-193_{met}

Súčasná analytická metóda, z ktorej sme vychádzali, využívala na úpravu vzorky proteínovú precipitáciu avšak nebola dostatočne citlivá na stanovenie farmakokinetického profilu ICRF-193 v plazme. Z toho dôvodu sme sa pokúšali o zvýšenie citlivosti, konkrétne sme sa zamerali na krok úpravy vzorky. Vzhľadom k rozdielnej polarite analytov bola pri analýze DEX, jeho analógov a metabolitov vo väčšine štúdií využitá proteínová precipitácia [56]–[59]. LLE je v tomto prípade nevhodná z dôvodu vysokej hydrofilite analytov (záporné hodnoty log P). SPE extrakcie boli podľa našich zistení doposiaľ použité len raz a extrahovaný bol iba DEX a jeho analógy, nie polárny metabolit [60]. Zamerali sme sa teda na SPE extrakcie, ktoré navyše umožňujú zakoncentrovanie analytu. Analýza a úprava vzorky oboch analytov je však komplikovaná ich rozdielnou polaritou (log P štruktúrne podobného dexrazoxanu = -2,6 [61]; ADR-925 = -6,7 [62]).

5.2.1 SPE extrakcia ICRF-193

Kvôli vyššie spomenutému rozdielu v polarite jednotlivých analytov sme sa v prvom kroku zamerali na SPE extrakciu samotného ICRF-193. Pre všetky testované kolónky (Discovery DSC-PH, Select HLB SPE, Discovery DSC-18) boli kroky extrakcie rovnaké (viď kapitola 4.5.2, tab. 3). Ako premývacie činidlo bola použitá voda a testované boli dve elučné činidlá (metanol a acetonitril). Najvyššia odozva detektoru bola dosiahnutá pri použití kolóniek „Select HLB SPE“ (obr. 20). Následne bola metóda optimalizovaná a to hlavne krok oplachu a elúcie. V rámci oplachu bol okrem vody testovaný tiež 5% vodný roztok metanolu a 0,25% vodný roztok kyseliny mravčej. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté za podmienok uvedených v tab. 5.

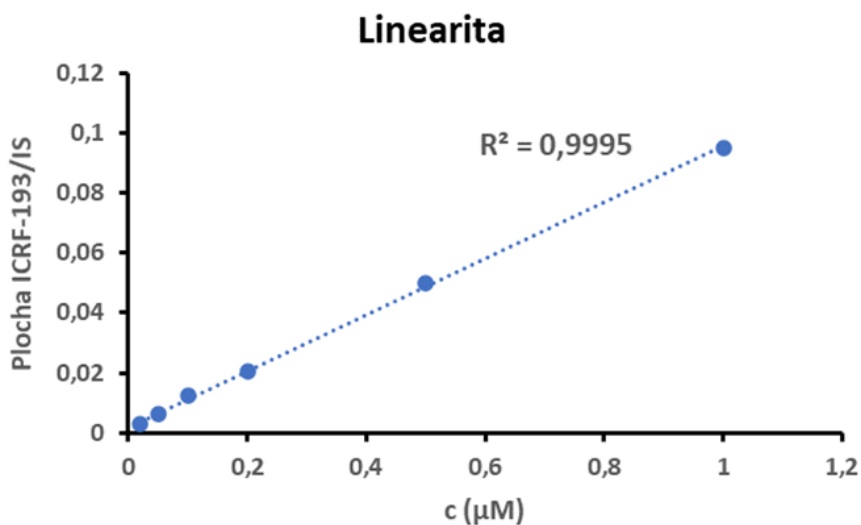


Obr. 20: Výsledky SPE extrakcie ICRF-193 na troch testovaných kolónkach.

Tab. 5: Podmienky optimalizovanej SPE extrakcie ICRF-193 na HLB sorbente.

	Aktivácia	Kondicionácia	Vzorka	Oplach	Elúcia
Použité činidlo	MeOH	H ₂ O	Spikovaná plazma	0,25% HCOOH vo vode	MeOH
Objem (ml)	1,0	1,0	0,1	0,4	0,3

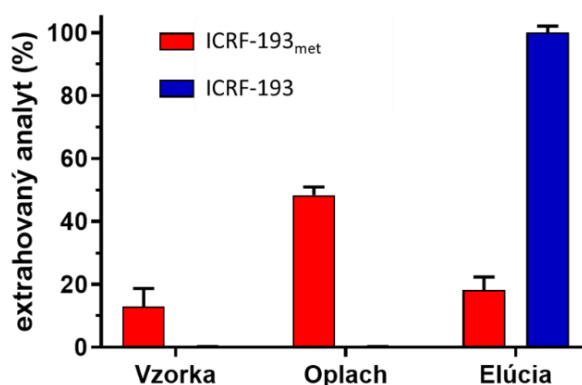
Ďalej bola metóda čiastočne validovaná. Linearita bola vypočítaná ako pomer plochy píku analyzovanej látky a jej vnútorného štandardu – bola stanovená v koncentračnom rozmedzí 0,02 – 1 μM s koeficientom determinácie (R^2) $\geq 0,9995$ (obr. 21). Výťažnosť a matricový efekt boli vypočítané spôsobom uvedeným v kapitole 4.5.2. Výťažnosť ICRF-193 na kolónkach Select HLB SPE bola 98,7 % a matricový efekt 99,7 %. Spodný limit kvantifikácie bol 0,02 μM , čo je 25× menej ako pri využití proteínovej precipitácie v pilotných meraniach (LLOQ = 0,5 μM).



Obr. 21: Linearita metódy extrakcie na HLB sorbente.

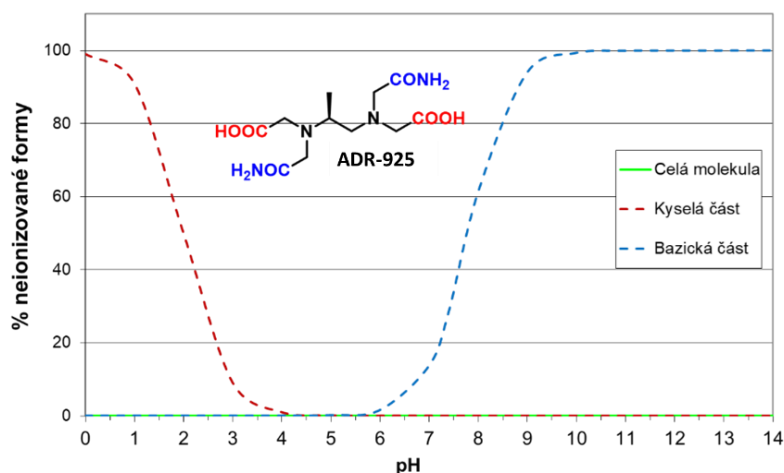
5.2.2 SPE extrakcia ICRF-193 a ICRF-193_{met}

Na základe výsledkov z predchádzajúceho merania sme na rovnakej kolónke (Select HLB SPE) testovali súčasnú extrakciu ICRF-193 aj ICRF-193_{met}. HLB sorbent je hydrofilne-lipofilne vyvážený sorbent. Ide o polymér na báze styrénu, ktorého retenčný mechanizmus je založený prevažne na interakcii analytu s reverznou fázou. Vďaka hydrofilnej modifikácii však dochádza aj k retencii polárnejších zlúčenín [63] a preto sme na týchto kolónkach skúšali súčasne extrahovať aj polárny metabolit. Pre overenie retencie metabolitu na sorbente sme najprv pracovali s vodným štandardom analyzovaných látok a analyzovaný bol každý krok extrakcie. Z obr. 22 je ale zjavné, že väzba metabolitu na sorbent nebola dostatočná a v priebehu extrakcie dochádzalo k výrazným stratám. V dôsledku nízkej výťažnosti (15 až 20 %) na týchto kolónkach teda nebola možná súčasná extrakcia ICRF-193 a jeho metabolitu (ICRF-193_{met}).



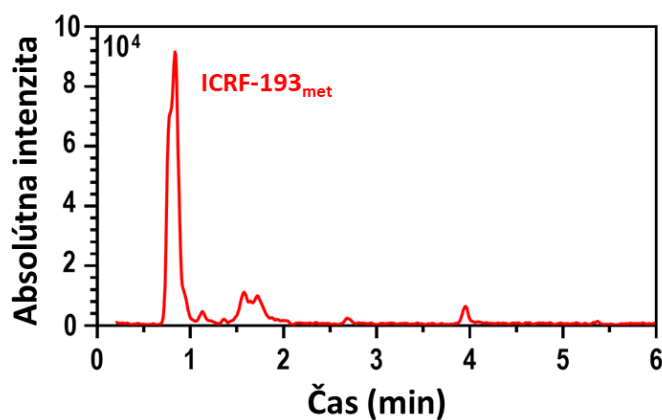
Obr. 22: Priebeh SPE extrakcie ICRF-193 spolu s metabolitom na kolónkach Select HLB SPE.

Nakoľko je kyslá časť molekuly ICRF-193_{met} plne ionizovaná v širokom rozmedzí pH (ionizácia štruktúrne podobného ADR-925 je uvedená na obr. 23) na SPE extrakciu boli otestované kolónky obsahujúce viacmodálny sorbent tvorený dvoma funkčnými skupinami – reverzná fáza (C8) a iónomenič (kvartérny amín - anex). Konkrétne išlo o kolónky Hypersep Verify AX.

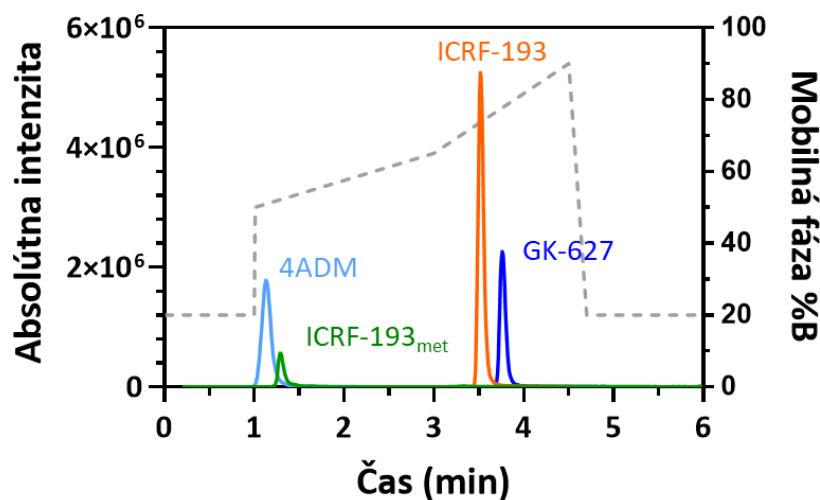


Obr. 23: Ionizácia ADR-925 v závislosti na zmene pH [64].

V rámci extrakcie boli testované rôzne činidlá (vid' kapitola 4.5.2, tab. 3). Keďže ide o iónovymenný sorbent, na elúciu bolo potrebné použiť silne kyslý roztok. Aby nebol silne kyslý extrakt nastrekovaný na kolónu, bolo nutné zahrnúť aj krok vysušenia pod prúdom dusíku a rekonštitúcie do 20% acetonitrilu. Napriek tomu však dochádzalo k výraznej supresii signálu pre ICRF-193_{met} a zhoršeniu tvaru píku (obr. 24), čo vyžadovalo úpravu chromatografickej metódy. V rámci modifikácie metódy boli testované rôzne mobilné fázy (metanol, acetonitril, mravčan amónny a kys. mravčia). Najlepších výsledkov bolo dosiahnutých pri použití 0,25% kys. mravčej (A) a metanolu (B) pri nasledujúcom gradiente: 0,0 – 1,0 min (20 % B), 1,01 – 3,0 min (50 – 65 % B), 3,01 – 4,5 min (65 – 90 % B), 4,51 – 6,0 min (20 % B). Nakoľko metanol generuje vyšší spätný tlak, bol tiež upravený prietok na 0,2 ml/min. Reprezentatívny chromatogram takto upravenej metódy spolu s grafickým znázornením použitého gradientu je uvedený na obr. 25.

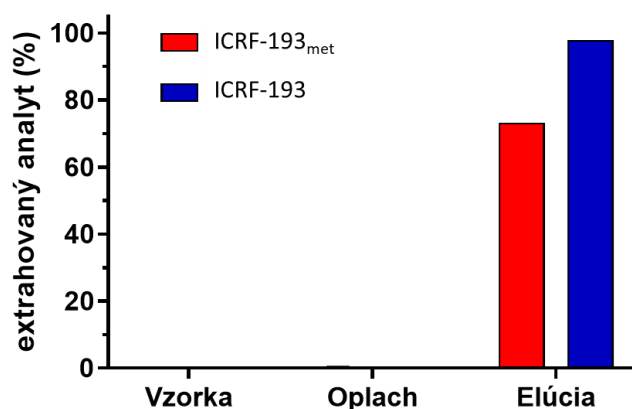


Obr. 24: Zhoršenie tvaru píku pre ICRF-193_{met}.



Obr. 25: Reprezentatívny chromatogram pre stanovenie ICRF-193 a ICRF-193_{met} pri SPE extrakciách na kolónkach Hypersep Verify AX.

Pri využití týchto kolóniek už k stratám analytu v skorších fázach extrakcie (t. j. nanesenie vzorky a oplach) nedochádzalo (obr. 26). Následne bola metóda optimalizovaná (tab. 6) a čiastočne validovaná.



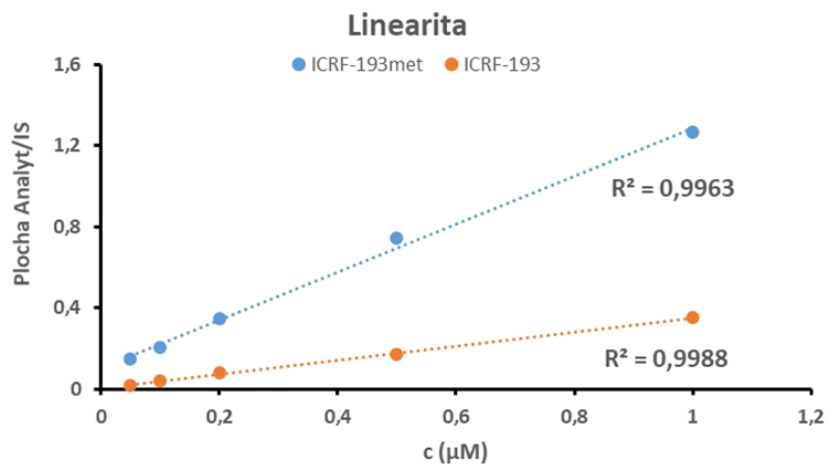
Obr. 26: Priebeh SPE extrakcie ICRF-193 spolu s metabolitom na kolónkach Hypersep Verify AX.

Tab. 6: Podmienky optimalizovanej SPE extrakcie ICRF-193 a ICRF-193_{met} na kolónkach Hypersep Verify AX.

	Aktivácia	Kondicionácia	Vzorka	Oplach	Elúcia	Rekonštitúcia
Použitý činidlo	ACN	H ₂ O	Spikovaná plazma	H ₂ O	10% HCOOH v ACN	20% ACN vo vode
Objem (ml)	1,0	1,0	0,1	0,3	0,5	0,2

V rámci validácie bola hodnotená linearita (obr. 27) – vypočítaná ako pomer plochy píku analyzovanej látky a jej vnútorného štandardu. Stanovená bola v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 1 μM (hodnota 0,02 μM do grafu nebola zahrnutá

nakoľko bol u nej pomer signálu k šumu príliš vysoký a teda nebola opakovateľná) a koeficient determinácie (R^2) pre ICRF-193 bol $\geq 0,9988$; pre ICRF-193_{met} $\geq 0,9963$.



Obr. 27: Linearita metódy extrakcie ICRF-193 a ICRF-193_{met} na kolónkach Hypersep Verify AX.

Výtťažnosť a matricový efekt boli vypočítané spôsobom uvedeným v kapitole 4.5.2. Pre ICRF-193 bola výtťažnosť 99,8 % a matricový efekt 104,4 %. Pre ICRF-193_{met} bola výtťažnosť 47,4 % a matricový efekt 75,9 %. Dôvodom nižšej výtťažnosti pre ICRF-193_{met} bolo zadržiavanie analytu na SPE kolónkach sorbentom iónomeniča. Vyššej výtťažnosti by sa nám pravdepodobne podarilo dosiahnuť pri použití kolóniek so slabým anexom. S využitím kolóniek „Hypersep Verify AX“ bol spodný limit kvantifikácie pre ICRF-193 a ICRF-193_{met} 0,05 μM , čo je 10 \times menej ako pri využití proteínovej precipitácie v pilotných meraniach (LLOQ = 0,5 μM).

6 Záver

V rámci tejto diplomovej práce bola vyvinutá UHPLC-MS/MS metóda na separáciu ICRF-193 a racemátu. Analýza prebiehala na kolóne ZORBAX Bonus RP ($100 \times 3,0$ mm, $1,8 \mu\text{m}$) a ako mobilná fáza bola využitá 0,25% kys. mravčia (A) a metanol (B) pri izokratickej elúcii 80 : 20 (A : B, v/v). Táto metóda bola následne použitá na analýzu vzorky racemátu, pričom sa zistilo, že vzorka obsahovala 0,035 % ICRF-193. Vzhľadom k vysokej účinnosti látky ICRF-193 môžeme pozorované protektívne účinky racemátu vo vysokých koncentráciách čiastočne pripísať práve tejto kontaminácii.

Zároveň boli vyvinuté SPE extrakcie pre ICRF-193 a ICRF-193_{met} z plazmy s cieľom zlepšenia citlivosti stanovenia. S využitím kolóniek „Select HLB SPE“ bolo možné analyzovať iba samotný ICRF-193, pričom LLOQ sa nám, oproti proteínovej precipitácii využitej v pilotných meraniach, podarilo znížiť 25násobne. Citlivosť by bolo ďalej možné zvýšiť zavedením kroku odparenia a následnej rekonštitúcie vzorky.

ICRF-193_{met}, vzhľadom k jeho vysokej polarite, na týchto kolónkach nebol zadržiavaný, dochádzalo k jeho vymývaniu v skorších fázach extrakcie a pri extrakcii z vodného roztoku bola výťažnosť iba medzi 15 – 20 %. Na základe toho boli testované kolónky „Hypersep Verify AX“. Výhodou týchto kolóniek bol sorbent tvorený dvoma funkčnými skupinami (reverzná fáza a iónomenič – anex). Na týchto kolónkach bola možná súčasná extrakcia ICRF-193 aj ICRF-193_{met} pri dosiahnutí relatívne dobrej a opakovateľnej výťažnosti polárneho metabolitu (47,4 %) a došlo k 10násobnému zníženiu LLOQ. Vzhľadom k silnej väzbe metabolitu na anexový sorbent bola na elúciu využívaná 10% kyselina mravčia a v dôsledku kyslosti extraktu bolo potrebné zahrnúť krok rekonštitúcie. Napriek rekonštitúcii ale dochádzalo (pravdepodobne prítomnosťou kyseliny mravčej) k výraznej supresii signálu pre ICRF-193_{met} a bolo potrebné modifikovať chromatografickú metódu. Zlepšenie signálu a tvaru píku metabolitu bolo dosiahnuté úpravou mobilnej fázy, kedy bola namiesto mravčanu amónneho a acetonitrilu použitá 0,25% kys. mravčia (A) a metanol (B). Metóda bola čiastočne validovaná overením linearity, matricových efektov a výťažnosti.

7 Použitá literatura

- [1] Snapka, R. M.; et al. Inhibition of topoisomerase II by ICRF-193, the meso isomer of 2,3-bis(2,6-dioxopiperazin-4-yl)butane: Critical dependence on 2,3-butanediyl linker absolute configuration. *Biochem Pharmacol*, **1996**, *52(4)*, 543-549.
- [2] Jirkovská, A.; et al. Structure-activity relationship study of dexrazoxane analogues reveals ICRF-193 as the most potent bisdioxopiperazine against anthracycline toxicity to cardiomyocytes due to its strong topoisomerase II β interactions. *J. Med. Chem.*, **2021**, *64(7)*, 3997–4019.
- [3] Dong, M. W. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. 2nd Ed., John Wiley & Sons, New Jersey 2019. ISBN 9781119313793.
- [4] Broeckhoven, K.; Shoykhet, K.; Dong, M. W. *Modern HPLC Pumps: Perspectives, Principles, and Practices* [on-line], [Zobrazené 25. 10. 2020]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/modern-hplc-pumps-perspectives-principles-and-practices>.
- [5] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd Ed., John Wiley & Sons, New Jersey 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [6] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [7] Dolan, J. W. *Mobile-Phase Degassing: What, Why, and How* [on-line], [Zobrazené 20. 3. 2021]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/mobile-phase-degassing-what-why-and-how>.
- [8] http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html [Zobrazené 3. 11. 2020].
- [9] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha 2013. ISBN 9788026042440.
- [10] Svec, F. Monolithic columns: A historical overview. *Electrophoresis*, **2017**, *38*, 2810-2820.
- [11] Gumustas, M.; et al. The history of the core–shell particles and applications in active pharmaceutical ingredients via liquid chromatography. *Chromatographia*, **2019**, *82(1)*, 17-48.
- [12] Ahuja, S.; Rasmussen, H. (Eds) *HPLC method development for pharmaceuticals*. 1st Ed., Elsevier/Academic Press, Amsterdam 2007. ISBN 978-0-12-370540-2.
- [13] *Český lékopis 2017 – 1. díl (Pharmacopoea Bohemica)*. Grada Publishing, Praha

2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [14] http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm?fbclid=IwAR3o8HdOhNRULxnDn-VQ63pkllDLRiD5dmiWadTX6Ep5VICh7MsYGNUrMU [Zobrazené 19. 3. 2021].
- [15] Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass spectrometry: Principles and applications*. 3rd Ed., John Wiley & Sons, Chichester 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [16] Ho, C. S.; et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Biochem. Rev.*, **2003**, 24, 3–12.
- [17] <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf> [Zobrazené 20. 11. 2020].
- [18] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/apci-ionisation.xhtml> [Zobrazené 20. 11. 2020].
- [19] <http://mass-spectro.com/appi> [Zobrazené 22. 11. 2020].
- [20] Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. (Eds) *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, New Jersey 2007. ISBN 978-0-471-68162-5.
- [21] Hanold, K. A.; et al. Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS. *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 2842–2851.
- [22] McMaster, M. C. *LC/MS: A practical user's guide*. John Wiley & Sons, New Jersey 2005. ISBN 978-0-471-65531-2.
- [23] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/detectors.xhtml> [Zobrazené 8. 3. 2021].
- [24] Haag, A. M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In: Marzaei, H.; Carrasco, M. (Eds) *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*. Springer, Cham 2016. ISBN 978-3-319-41446-1.
- [25] Holčápek, M. *Hmotnostní analyzátory* [on-line], [Zobrazené 28. 11. 2020]. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf.
- [26] Domingues, P.; García, A.; Skrzydlewska, E. (Eds) *AACLifeSci course companion manual: Advanced analytical chemistry for life sciences*. 2018. ISBN 978-83-951534-7-1.
- [27] Carroll, K. M.; Lanucara, F.; Eyers, C. E. Quantification of Proteins and Their Modifications Using QconCAT Technology. In: Jameson, D.; Verma, M.; Westerhoff, H. V. (Eds) *Methods in Enzymology*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam 2011. ISBN 9780123851185.
- [28] Hermann, G. Analysis of (poly)phenols in red wine via LC-MS. Master's thesis. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna 2010.

- [29] <https://what-when-how.com/proteomics/quadrupole-ion-traps-and-a-new-era-of-evolution-proteomics/> [Zobrazené 29. 11. 2020].
- [30] https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html [Zobrazené 29. 11. 2020].
- [31] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/fticrms.shtml> [Zobrazené 29. 11. 2020].
- [32] <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/mass-analyzer-technology-overview.html> [Zobrazené 29. 11. 2020].
- [33] Schermenn, J.-P. *Spectroscopy and Modelling of Biomolecular Building Blocks*. Elsevier, Amsterdam 2008. ISBN: 978-0-444-52708-0.
- [34] Bavlovič Piskáčková, H.; et al. Electromembrane extraction of anthracyclines from plasma: Comparison with conventional extraction techniques. *Talanta*, **2021**, *223*, Article 121748.
- [35] Li, W.; Zhang, J.; Tse, F. L. S (Eds) *Handbook of LC-MS bionalysis - Best practices, experimental protocols, and regulations*. John Wiley & Sons, New Jersey 2013. ISBN 9781118159248.
- [36] Novakova, L.; Vlckova, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *656(1-2)*, 8-35.
- [37] Hansen, S. H.; Pedersen-Bjergaard, S. (Eds) *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample preparation, separation techniques, and mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Chichester 2015. ISBN 9781118716816.
- [38] <https://www.mn-net.com/chromatography/solid-phase-extraction-spe-information/> [Zobrazené 13. 12. 2020].
- [39] <https://www.affinisep.com/news-information/technology/30-solid-phase-extraction.html> [Zobrazené 13. 12. 2020].
- [40] Hemmati, M.; et al. Benefits of microsampling and microextraction for metabolomics studies. *Trends Anal. Chem.*, **2020**, *127*, Article 115899.
- [41] Jalili, V.; Barkhordari, A.; Ghiasvand, A. New extraction media in microextraction techniques. A review of reviews. *Microchem. J.*, **2019**, *153*, 104386.
- [42] Kocúrová, L.; Balogh, I. S.; Andruch, V. Solvent microextraction: A review of recent efforts at automation. *Microchem. J.*, **2013**, *110*, 599–607.
- [43] Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A. Liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*,

- 2010**, *29(1)*, 1–14.
- [44] Pedersen-Bjergaard, S. Microextraction With Supported Liquid Membranes. In: Poole, C. F. (Ed.) *Liquid-Phase Extraction*. Elsevier, Amsterdam 2020. ISBN 978-0-12-816911-7.
- [45] Guardia, M.; Armenta, S. Greening Sample Treatments. In: Guardia, M.; Armenta, S. *Green Analytical Chemistry*. Elsevier, Oxford 2011. ISBN 978-0-444-53709-6.
- [46] Zuloaga, O.; et al. Dispersive liquid-liquid microextraction: trends in the analysis of biological samples. *Bioanalysis*, **2015**, *7(17)*, 2211–2225.
- [47] Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *880(1)*, 35–62.
- [48] Kataoka, H. In-tube solid-phase microextraction: Current trends and future perspectives. *J. Chromatogr. A*, **2021**, *1636*, Article 461787.
- [49] Moein, M. M.; Said, R.; Bassyouni, F.; Abdel-Rehim, M. Solid phase microextraction and related techniques for drugs in biological samples. *J. Anal. Methods Chem.*, **2014**, *2014(10)*, Article 921350.
- [50] Cvetković, R. S.; Scott, L. J. Dexrazoxane: A review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs*, **2005**, *65(7)*, 1005–1024.
- [51] Marinello, J.; Delcuratolo, M.; Capranico, G. Anthracyclines as topoisomerase II poisons: From early studies to new perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *19(11)*, Article 3480.
- [52] McCormack, K. The cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) is consistent with sequestration of poly(ADP-ribose) by self-assembly and not depletion of topoisomerase 2B. *Ecancermedicalscience*, **2018**, *12*, Article 889.
- [53] Vavrova, A.; et al. Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *PLoS One*, **2010**, *8(10)*, Article e76676.
- [54] Hasinoff, B. B.; Patel, D.; Wu, X. A QSAR study that compares the ability of bisdioxopiperazine analogs of the doxorubicin cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) to protect myocytes with DNA topoisomerase II inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2020**, *399*.
- [55] Bavlovič Piskáčková, H.; et al. Development of water-soluble prodrugs of the bisdioxopiperazine topoisomerase II β inhibitor ICRF-193 as potential cardioprotective agents against anthracycline cardiotoxicity. *Sci. Rep.*, **2021**,

- 11(1), Article 4456.
- [56] Kollárová-Brázdová, P.; et al. Investigation of structure-activity relationships of dexrazoxane analogs reveals topoisomerase II β interaction as a prerequisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2020**, 373(3), 402–415.
- [57] Reimerová, P.; et al. UHPLC-MS/MS method for analysis of sobuzoxane, its active form ICRF-154 and metabolite EDTA-diamide and its application to bioactivation study. *Sci. Rep.*, **2019**, 9(1), Article 4524.
- [58] Kovarikova, P.; et al Development of LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of the cardioprotective drug dexrazoxane and its metabolite ADR-925 in isolated cardiomyocytes and cell culture medium. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2013**, 76, 243–251.
- [59] Bures, J.; et al. Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite. *Toxicology*, **2017**, 392, 1-10.
- [60] Lewis, R. C.; et al. A Sensitive and Specific Procedure for Quantitation of ADR-529 in Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Column Switching and Amperometric Detection. *Pharm. Res.*, **1992**, 9(1), 101–108.
- [61] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00380> [Zobrazené 20. 7. 2021].
- [62] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10402764#section=Computed-Properties> [Zobrazené 12. 1. 2021].
- [63] <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/supelco/54181u?context=product> [Zobrazené 16. 8. 2021].
- [64] Materiály na výuku farmaceutickej chémie. Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova.