

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

VÝVOJ A VALIDACE HPLC METOD PRO STANOVENÍ
ENDOGENNÍCH A EXOGENNÍCH LÁTEK PRO TRANSPORTNÍ
A METABOLICKÉ STUDIE

Disertační práce

Ing. Miloš Hroch
2011

Školitel: Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.
Studijní obor: Farmaceutická analýza

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval především školiteli Doc. PharmDr. Milanu Nobilisovi, CSc., který svými připomínkami a radami přispěl k vypracování této disertační práce. Dále bych chtěl vyjádřit díky svým kolegům Prof. MUDr. Jiřině Martínkové, CSc. a Doc. Ing. Jaroslavu Chládkovi, Ph.D. za cenné náměty a spolupráci na grantových projektech ze kterých vznikly nosné publikace této disertační práce. Děkuji i Ing. Robertu Jirásko, Ph.D. za pomoc při interpretaci hmotnostních spekter. Zvláštní dík patří mé manželce a dětem za trpělivost a podporu během mého doktorského studia.

Tato práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne 1.11. 2011

Miloš Hroch

Obsah

| | |
|--|----|
| Úvod | 7 |
| 1. Přehled současného stavu řešené problematiky | 8 |
| 1.1 Bioanalýza | 8 |
| 1.2 Farmakokinetické studie | 9 |
| 1.3 Bioekvivalenční studie | 9 |
| 1.4 Terapeutické monitorování léčiv - TDM | 9 |
| 1.5 Princip kapalinové chromatografie, instrumentace a detektory | 10 |
| 1.6 Chromatografické kolony | 21 |
| 1.7 Základní chromatografické módy | 23 |
| 1.7.1 Mechanismy retence..... | 23 |
| 1.7.2 Chromatografie na reverzní fázi..... | 25 |
| 1.7.3 Iontově párová chromatografie | 27 |
| 1.7.4 Chromatografie na smíšených sorbentech..... | 28 |
| 1.7.5 Chromatografie na normální fázi | 29 |
| 1.7.6 Chromatografie na bázi hydrofilních interakcí..... | 29 |
| 1.7.7 Iontově výměnná chromatografie..... | 31 |
| 1.7.8 Některé další vybrané separační módy..... | 32 |
| 1.8 Typy stacionárních fází a nosičů chemicky vázaných stacionárních fází | 33 |
| 1.8.1 Silikagel | 33 |
| 1.8.2 Hybridní stacionární fáze | 34 |
| 1.8.3 Stacionární fáze na bázi oxidů kovů IV. skupiny | 35 |
| 1.8.4 Stacionární fáze na bázi siliciumhydridu | 36 |
| 1.8.5 Stacionární fáze na bázi porézního grafitického uhlíku | 37 |
| 1.8.6 Stacionární fáze na bázi polymerů | 37 |
| 1.9 Moderní trendy v kapalinové chromatografii | 38 |
| 1.9.1 Monolitické kolony | 42 |
| 1.9.2 Sub-2- μm sorbenty a extrémně účinná kapalinová chromatografie | 43 |
| 1.9.3 Core – shell sorbenty..... | 44 |
| 1.9.4 Využití vysoké teploty při separaci | 45 |
| 1.10 Odběr biologického vzorku a jeho příprava před analýzou | 46 |
| 1.10.1 Základní informace o vzorku..... | 46 |
| 1.10.2 Odběr a uchování vzorku před analýzou | 47 |
| 1.10.3 Příprava biologického vzorku před analýzou | 48 |
| 1.10.4 Deproteinace..... | 49 |
| 1.10.5 Extrakce z kapaliny do kapaliny..... | 50 |
| 1.10.6 Extrakce kapalina – pevná látka | 52 |
| 1.10.7 Molekulárně vtištěné polymery | 54 |
| 1.11 Vývoj chromatografické metody | 55 |
| 1.12 Validace | 57 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2. | <i>Cíle disertační práce</i> | 61 |
| 3. | <i>Výsledky a diskuze</i> | 62 |
| 3.1 | Stanovení 5-fluorouracilu, 5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu v lidské plasmě | 63 |
| 3.1.1 | Úvod..... | 63 |
| 3.1.2 | Experimentální část..... | 66 |
| 3.1.3 | Výsledky a diskuze..... | 68 |
| 3.2 | An Improved High-performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Methotrexate Polyglutamates in Red Blood Cells of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis | 88 |
| 3.2.1 | Komentář k metodě..... | 88 |
| 3.3 | HPLC determination of arginases inhibitor N-(omega)-hydroxy-nor-L-arginine using core-shell particle column and LC-MS/MS identification of principal metabolite in rat plasma | 109 |
| 3.3.1 | Komentář k metodě:..... | 109 |
| 4. | <i>Závěr</i> | 122 |
| 5. | <i>Abstrakt</i> | 125 |
| 6. | <i>Přehled použité literatury</i> | 127 |
| 7. | <i>Přehled publikační činnosti</i> | 152 |
| 7.1 | Publikace v časopisech s IF a rozhodujícím podílem na vypracování..... | 152 |
| 7.2 | Publikace ostatní s podílem na analytické části práce..... | 152 |
| 7.3 | Odborná sdělení..... | 155 |
| 8. | <i>Řešené granty</i> | 156 |
| 9. | <i>Seznam použitých zkratk</i> | 158 |
| | <i>Přílohy</i> | 161 |

Úvod

Využití metod kapalinové chromatografie má již po několik dekad své nezastupitelné místo v bioanalýze léčiv a patří mezi jednu z nejužívanějších analytických technik při jejich kvantitativní analýze. Hlavní hybnou silou rozvoje chromatografických metod je zejména **farmaceutický průmysl**, produkující při vývoji nových léčiv kvanta vzorků a žádající tedy vývoj účinných a rychlých separačních technik, které umožní v reálném čase tyto rozsáhlé soubory zpracovávat. Spolu s environmentálními požadavky na úspory organických rozpouštědel byla oblast farmacie jednou z hlavních hybných sil vývoje nových trendů v kapalinové chromatografii. V tomto směru bylo zásadním pokrokem zavedení extrémně účinné kapalinové chromatografie (UHPLC), monolitických kolon, „shell-type“ sorbentů, spojení separačních technik s hmotnostní detekcí a mnoha dalších do běžné praxe.

Tato práce je věnována metodám **vysokoúčinné kapalinové chromatografie** v **bioanalýze** malých molekul. Vzhledem k rozsáhlosti celé problematiky budou v teoretické části probrány především typy stacionárních fází, moderní trendy ve vývoji stacionárních fází a dále způsoby přípravy biologických vzorků před analýzou.

1. Přehled současného stavu řešené problematiky

1.1 *Bioanalýza*

Oproti farmaceutické analýze [1-2], která pracuje s roztoky farmak a jejich směsí v jasně definovaných maticích, bioanalytika [3-4] se zabývá problematikou analýzy látek přítomných v biologickém materiálu živočišného nebo rostlinného původu, tedy komplexních maticích, kde není prakticky možné kvalitativně popsat jejich úplné složení. Kladeny jsou též vysoké nároky na odběr, skladování a zpracování vzorků, vzhledem k nutnosti získat reprezentativní vzorek z většího celku a v maximální míře zachovat jeho kvalitativní i kvantitativní složení. Látky, se kterými v bioanalýze pracujeme, lze v základu rozdělit dle několika různých kritérií:

- **dle původu** – rostlinné / živočišné
- **dle vztahu k organismu** - endogenní (organismu vlastní - eobiotika) / exogenní (cizorodé – xenobiotika)
- **dle molekulové hmotnosti** – látky nízkomolekulární / vysokomolekulární

Separční chromatografické metody jsou v bioanalýze využívány např. v oblastech jako jsou **farmakokinetické** a **bioekvivalenční studie** při vývoj nových léčiv a zavádění generik, **terapeutickém monitorování** nebo třeba v **klinické** a **forenzní toxikologii**. V běžné praxi klinických laboratoří, kde jsou vysoké požadavky na průchodnost celého systému a ekonomický aspekt analýz, jsou hlavní konkurenční metodou chromatografických metod metody imunoanalytické, nicméně v současné době zatím nelze očekávat, že by zcela vytlačily metody chromatografické, vzhledem k obecně menší specifitě.

1.2 Farmakokinetické studie

Zřejmě nejdůležitějším úkolem farmakokinetické studie je popis osudu léčiva v organismu, tedy absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece (ADME). Sledována je závislost koncentrace léčiva, případně jeho metabolitu/ů na čase v určitých kompartmentech [5]. Tyto studie jsou prováděny zejména v rámci preklinického a klinického testování při vývoji nového léčivého přípravku [6-8] a jsou nutným podkladem pro jeho přihlášení k registraci státní autoritou (New Drug Application – NDA). Bezpečnost a účinnost léčiva jsou nejdůležitějšími posuzovanými kritérii.

1.3 Bioekvivalenční studie

Cílem bioekvivalenčních studií [9] je průkaz, že generický přípravek nebo nová léková forma má v rámci předem stanovených limitů vlastnosti shodné s originálním, případně referenčním léčivem. Bioekvivalenční studie musí být také provedena při zavádění nové cesty podání farmaka. Mezi jedny z hlavních sledovaných parametrů patří **plocha pod křivkou plasmatických koncentrací** (Area Under Curve - AUC), **maximum plasmatických koncentrací (c_{\max})** a **čas dosažení maxima plasmatických koncentrací (t_{\max})** sledované látky. Tyto parametry jsou počítány z farmakokinetických dat získaných měřeními plasmatických koncentrací po podání léčivého přípravku. Bezpečnost a účinnost jsou opět hlavními sledovanými kritérii.

1.4 Terapeutické monitorování léčiv - TDM

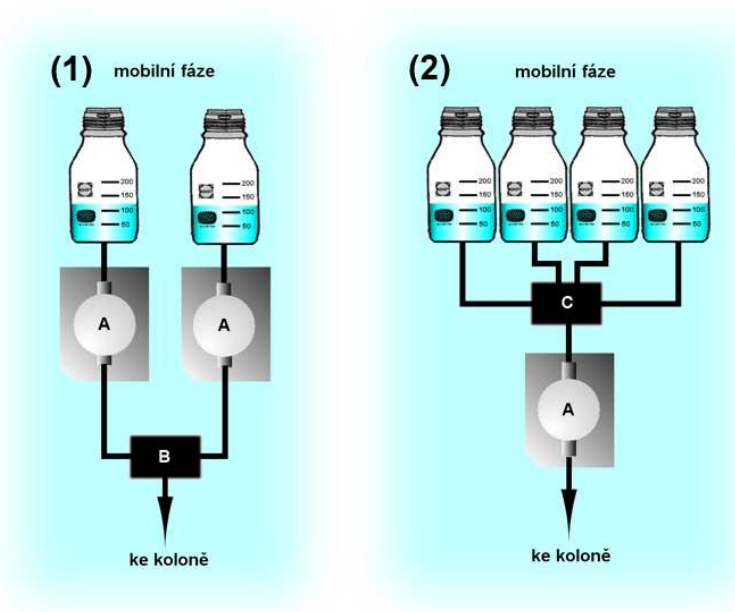
Hlavní význam terapeutického monitorování léčiv [10-14] (Therapeutic Drug Monitoring - TDM) spočívá zejména v **individualizaci farmakoterapie** [15]. Důvodů pro individualizaci dávkování léčiv je hned několik. Asi nejdůležitější se týká léčivých přípravků s úzkým **terapeutickým rozmezím (terapeutickým oknem, terapeutickým indexem)** [5, 16], tedy takových, kde se málo liší dávka účinná a toxická. Dále u pacientů s malnutričním syndromem (snížená absorpce léčiva) a s poruchami ledvin (snížená exkrece léčiva) nebo jater (snížená biotransformace léčiva). Účelem je udržení stabilní plasmatické koncentrace farmaka nebo jeho metabolitu v předem vymezeném intervalu, za účelem maximalizace terapeutického efektu, při udržení tolerovatelných nežádoucích účinků léčby.

Využití nalézá zejména u léčiv, kde je popsán úzký vztah mezi plasmatickou koncentrací a dávkou. TDM je využíváno i u látek s vysokou **inter- a intra-individuální variabilitou** plasmatických koncentrací po podání standardní dávky léčiva. Příčinou této variability mohou být genetický polymorfismus, lékové interakce, komorbidita či celkový zdravotní stav nebo věk nemocného.

Dalším důvodem pro TDM může být sledování spolupráce pacienta při léčbě („**compliance**“), kde na základě stanovení koncentrace léčiva či jeho metabolitu v cílovém kompartmentu lze rozlišit, zda k selhání léčby dochází vlivem objektivních příčin, jako je např. genotyp, fenotyp (pomalí/rychlí metabolizátoři), volba nevhodného způsobu terapie, poddávkování či nespolupráci (non-compliance) pacienta. Asi nejdůležitějším výsledkem TDM je snížení případných rizik nežádoucích účinků a zvýšení efektivity farmakoterapie a tím celkové zkvalitnění života pacientů. Nelze přehlížet ani hledisko ekonomické, kdy není zbytečně plýtváno prostředky na neefektivní lékovou terapii a následnou léčbu vzniklých zdravotních komplikací. Ve všech výše uvedených případech nám bioanalytické chromatografické metody umožňují stanovení sledovaných látek a na základě zjištěných koncentrací zvolit adekvátní farmakoterapeutický zásah. Chromatografické metody využívané pro TDM musí být citlivé, dostatečně selektivní s vyhovujícím dynamickým rozsahem. Při zpracování větších sérií vzorků v rutinním provozu klinické laboratoře je samozřejmým požadavkem i dostatečná rychlost a ekonomická stránka analýz.

1.5 Princip kapalinové chromatografie, instrumentace a detektory

Principem kapalinové chromatografie je rozdělování látek mezi pevnou nebo kapalnou stacionární a kapalnou mobilní fází na základě různé afinity k těmto fázím [17-18]. Nejrozšířenějším typem kapalinové chromatografie je **vysokoučinná kapalinová chromatografie** (High Performance Liquid Chromatography - **HPLC**), kdy je mobilní fáze protlačována za vysokého tlaku kolonou obsahující porézní stacionární fázi. Typický chromatograf pro HPLC je složen z následujících částí: **Degaser** je zařízení sloužící pro odplynění mobilní fáze před vstupem na chromatografického systému. Pokud není toto zařízení součástí chromatografu, je třeba používané mobilní fáze před použitím řádně odplynit např. použitím podtlaku, či pomocí ultrazvuku. Dále je vhodné v tomto případě použít v průběhu analýzy helia, probublávaného pomocí frity do používané mobilní fáze.



Obrázek 1. Chromatografické pumpy a tvorba gradientu. Uspořádání pro vysokotlaký gradient (1), uspořádání pro nízkotlaký gradient (2). Chromatografická pumpa (A), vysokotlaký směšovač (B), přepínací ventil pro míchání nízkotlakého gradientu (C).

Pokud nejsou použité mobilní fáze řádně odplyněny, může docházet k řadě problémů způsobených tvorbou bublin v chromatografickém systému. Toto platí zejména v případě směsí methanolu s vodou nebo pufry. Další součástí systému je chromatografická **pumpa**/y. Toto zařízení generuje nastavený průtok mobilní fáze skrze celý chromatografický systém. Pumpy musí být navrhovány s ohledem na použití při vysokých tlacích, což v současné době činí 60 až 120 MPa při použití UHPLC technologie (*Kap. 1.9.2*) a dále s ohledem na dosahování co nejmenšího kolísání průtoku. Při tvorbě gradientu může být využito dvojího přístupu (*Obr. 1*): Při **vysokotlakém gradientu** je mobilní fáze A i B čerpána každá svojí pumpou a jejich míchání je prováděno ve speciálním směšovacím zařízení za pumpami ve vysokotlaké části systému. Při **nízkotlakém gradientu** je mobilní fáze čerpána pouze jednou pumpou a k míchání fází dochází v řízeném směšovači v nízkotlaké části systému ještě před vstupem do pumpy. Výhodou vysokotlakého systému je velmi malý mrtvý objem mezi směšovací částí a vstupem na kolonu, proto je tento koncept vhodný pro moderní technologie založené na UHPLC a tvorbu rychlých gradientů. Nevýhodou je možnost pracovat pouze s binárním gradientem. Výhodou nízkotlakého konceptu je možnost generování až kvartérních gradientů, na druhou stranu tyto systémy mají větší mrtvé objemy mezi místem míchání a vstupem na kolonu a dále u nich dochází k většímu kolísání průtoku, což způsobuje generování vyššího šumu na detektoru.

Další částí HPLC systému je **dávkovací ventil**, který umožňuje vstup kapalného vzorku do toku mobilní fáze. Tato komponenta je v dnešní době integrální součástí **autosampleru**. Používá se většinou šesticestný ventil, který dovoluje přepínání toku mobilní fáze mezi nástřikovou smyčkou, odpad a vstup na kolonu. Moderní autosamplery jsou většinou termostatované, umožňují tvorbu sekvencí analýz vzorků a programování operací v autosampleru pomocí sady standardních příkazů např. pro on-line derivatizace nebo jiné automatické operace bez zásahu obsluhy.

Po **nástřiku** prostřednictvím dávkovacího ventilu přichází směs látek na kolonu rozpuštěná v mobilní fázi. **Kolona** je většinou umístěna v **kolonovém termostatu**, který udržuje teplotu při separaci na předem zvolené úrovni, či tvorbu teplotního programu, který však nemá takový význam jako v plynové chromatografii (GC). Jednotlivé látky rozpuštěné v mobilní fázi interagují různě dlouhou dobu se stacionární fází na základě svých fyzikálně-chemických vlastností a po průchodu **chromatografickou kolonou** vycházejí ve více či méně rozdělených zónách.

Tyto zóny poté procházejí **detektorem** jehož výstupem je závislost signálu měřené veličiny na čase, nazývaná **chromatogram**. K tomu, aby bylo možné látku detekovat je zapotřebí, aby obsahovala ve své molekule funkční skupinu nebo strukturní motiv detekovatelný příslušnou technikou. Tzn. **chromofor** pro absorpci ve viditelném nebo UV oboru spektra, **fluorofor** - systém schopný absorpce a následné emise světla s delší vlnovou délkou pro fluorescenční detekci, funkci podléhající oxido-redukčním změnám pro detekci elektrochemickým detektorem, či ionizovatelnou funkční skupinu pro detekci pomocí hmotnostního spektrometru (MS).

Pokud molekula nemá žádnou z uvedených vlastností a není vhodná nebo možná její derivatizace, jako poslední možnosti detekce lze využít **univerzálních detektorů**. Nejstarším z nich je refraktometrický detektor, jehož použití však sebou přináší problémy s teplotní stabilitou vlivem silné závislosti indexu lomu na teplotě a dále nemožnost využití gradientové eluce. Dalším univerzálním detektorem je např. ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) [19-22], CNLSD (Condensation Nucleation Light Scattering Detector) [19, 23-24] nebo CAD (Charged Aerosol Detector) [25-26], který patří v dnešní době asi k nejlepším univerzálním detektorům vzhledem k minimální závislosti odezvy na struktuře látky, velkému dynamickému rozsahu, citlivosti a snadnosti použití. Mimo možnosti analýzy látek, které nejsou jinými technikami detekovatelné přináší použití univerzálních detektorů ještě jednu výhodu.

Tím, že je jejich odezva závislá na absolutním množství látky a víceméně nezávislá na její struktuře, lze z chromatogramu usuzovat na procentuální zastoupení jednotlivých látek směsi, což např. u UV/VIS detekce nelze, vzhledem k tomu, že intenzita signálu závisí nejenom na množství analytu v mobilní fázi, ale i na absorpčním koeficientu jednotlivých látek při dané vlnové délce, který se může lišit až o několik řádů. Avšak i při použití univerzálních detektorů je třeba mít na mysli, že jejich odezva není na typu látky 100% nezávislá [27].

Mezi detektory rutinně používané patří **UV/VIS detektor**, využívající absorpce záření charakteristické vlnové délky v rozmezí 190-950 nm při průchodu sloupcem roztoku obsahujícího látky vykazující absorpci na dané vlnové délce. Detektor vykazuje dobrou linearitu a robustnost, a je použitelný pro detekci širokého spektra látek. Citlivost je závislá na typu chromoforu látky. Tento detektor nám mimo detekce průchodu absorbujícího analytu neposkytuje žádnou další informaci. Modifikací jednobarevného UV/VIS detektoru je **multikanálový UV/VIS detektor** umožňující simultánně sledovat absorpci eluentu na několika vlnových délkách a **detektor s diodovým polem** (Photodiode Array - **PDA**), který umožňuje při záznamu chromatogramu ukládat zároveň i spektrum ve vybraném rozsahu vlnových délek. Z těchto záznamů lze konstruovat tzv. **spektrochromatogramy** ve 2D nebo 3D reprezentaci. Pomocí PDA lze mimo detekce průchodu zóny analytu získat i komplementární informaci o spektru dané látky a využít v určitém rozsahu např. k ověření identity látky nebo pro stanovení „čistoty píku“ (peak purity test).

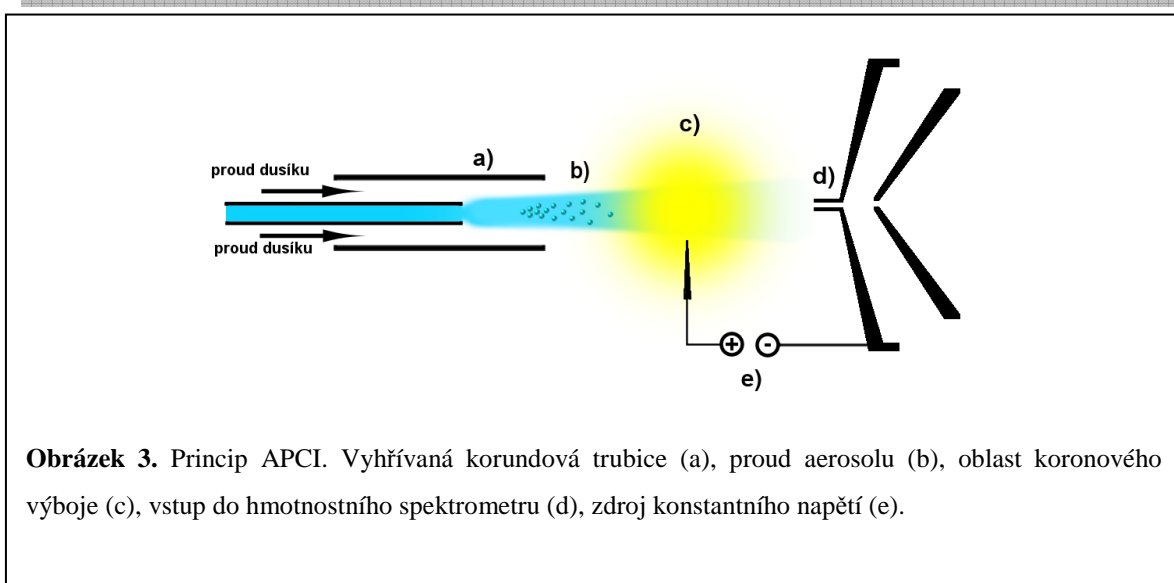
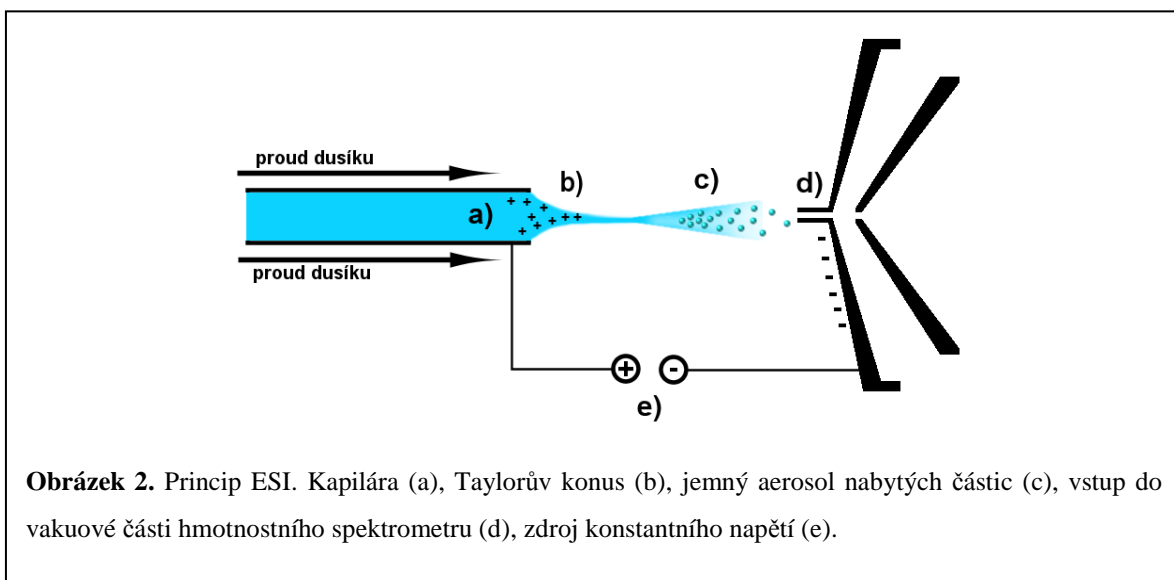
Dalším z běžných detektorů je **fluorescenční detektor**. Využívá vlastní, nebo derivatizací získané fluorescence látek. Fluorescence se projevuje u molekul schopných absorpce záření s následnou emisí na vyšší vlnové délce. Výhodou oproti UV/VIS detektoru je vyšší citlivost a lepší selektivita. Lepší selektivita je dána tím, že fluorofor obsahuje ve své molekule pouze limitované množství látek a snižuje se tak potenciale riziko interferencí v biologickém materiálu. Moderní typy fluorescenčních detektorů jsou schopné poskytnout výstup obdobný DAD nicméně fluorescenční emisní nebo excitační spektrochromatogramy jsou získávány na jiném principu. Mezi jevy, které je nutné mít na mysli při použití fluorescenčního detektoru patří např. omezená linearita při měření vysokých koncentrací vlivem koncentračního zhášení fluorescence. Dále vliv matričních efektů, projevujících se jako zhášení fluorescence některými látkami jako jsou např. jodidy, kyslík nebo některé kovové kationty (Fe^{3+} , Cu^{2+}), které by mohli být přítomné ve vzorku nebo mobilní fázi. Podrobnější výklad mechanismu fluorescence, vliv struktury látek a dalších vlivů na fluorescenci podává přehledně review [28].

Zvláštní postavení mezi detektory využívanými v HPLC má **hmotnostní detektor** (hmotnostní spektrometr). Hmotnostní spektrometrie je metoda využívající separace iontů v plynné fázi dle jejich hmotnosti a náboje. Pokud látka neionizuje, není její detekce pomocí MS možná. Základními částmi hmotnostního detektoru (Mass Spectrometry Detector - MSD) je iontový zdroj, iontová optika, hmotnostní analyzátor, detektor iontů, vakuový systém a počítač. Princip detekce je následující: Molekuly analytů jsou převedeny v iontovém zdroji na ionty při přechodu z kapalné do plynné fáze. Vzniklé ionty jsou směřovány do vakuové části přístroje a po průchodu iontovou optikou jsou disperzním prvkem, jímž je hmotnostní analyzátor, separovány v čase, nebo prostoru na základě poměru hmota/náboj (m/z), pomocí vhodně modulovaného elektromagnetického pole. Rozdělení iontů umožňuje jejich selektivní detekci elektronásobičem, nebo fotonásobičem. Výstupem MSD je záznam množství iontů dopadajících na detekční prvek v závislosti na poměru m/z .

Vzhledem k tomu, že existuje mnoho mechanismů převodu látek do ionizovaného stavu, budou dále zmíněny pouze některé **měkké ionizační techniky** [29]. Mezi režimy ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization – **API**) patří **ESI** (Electrospray Ionization) [30-33], **DESI** (Desorption Electrospray Ionization) [31-32], **APCI** (Atmospheric pressure Chemical Ionization) [31-32], **DAPCI** (Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization) [32, 34], **APPI** (Atmospheric Pressure Photoionization) [31-32]. Při sníženém tlaku pracují např. metody **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) [31-33] či **FAB** (Fast Atom Bombardment) [32]. Volba ionizační techniky se volí dle charakteru stanovované látky, přičemž hlavními kritérii jsou režim propojení se separační technikou (on-line, off-line), molekulová hmota, polarita a termální stabilita sledovaných látek. V kvantitativní bioanalýze malých molekul v on-line spojení se separační technikou patří mezi nejběžnější metody ionizace techniky ESI, APCI a v některých případech APPI, proto budou tyto API techniky dále zmíněny podrobněji.

Při **ionizaci v elektrospreji** [29-30, 33, 35] (Electrospray Ionization – ESI) je tok mobilní fáze z HPLC přiváděn do iontového zdroje kapilárou na jejímž konci je vložen vysoký kladný, nebo záporný potenciál 3-5 kV. Koncentricky s kapilárou je do iontového zdroje vháněn proud dusíku, který slouží k pneumatickému zmlžování mobilní fáze. Vlivem vloženého vysokého napětí nese vznikající aerosol náboj. Tím jak v iontovém zdroji dochází k odpařování rozpouštědla, zmenšuje se poloměr kapek aerosolu a tím roste i velikost povrchového náboje.

Při dosažení tzv. Rayleighova limitu [36] dojde ke coulombické explozi, roztržení nabité kapky a vzniku jemnějšího aerosolu. Tento krok se několikrát opakuje čímž dojde k převedení polárních a ionizovaných látek v kapalně fázi na ionty v plynné fázi. Technika ESI se s výhodou používá při analýze středně polárních až polárních tepelně méně stálých analytů při nižších průtocích mobilní fáze. Metoda je vhodná i pro látky s vyšší molekulovou hmotou. Zvláštní postavení má ESI při analýze proteinů, díky tvorbě několikanásobně nabitých částic. Vícenásobný náboj umožňuje analyzovat biomolekuly s vysokou molekulovou hmotou i na přístrojích s omezeným hmotnostním rozsahem, tím že vlivem vyššího náboje dochází ke snižování hodnoty m/z . Jednou z nevýhod použití ESI je vyšší šum pozadí a vyšší riziko přítomnosti **matričních efektů** [37-42]. ESI nelze dobře použít ani v případě čistě nepolárních mobilních fází, tedy např. při spojení s NPLC kvůli špatné ionizaci.



Při **chemické ionizaci** (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI) [29] stejně jako v ESI musí nejprve dojít ke zmlžení eluentu z kolony proudem dusíku, tím však podobnost končí. Vzniklý aerosol je veden korundovou trubicí zahřátou na vysokou teplotu 300-500°C, kde dojde k jeho desolvataci. Suchý aerosol poté prochází oblastí koronového výboje vznikajícího vložením vysokého potenciálu 3-4 kV na kovovou jehlu (tzv. „**corona needle**“). V oblasti koronového výboje jsou přítomny kladně, nebo záporně nabitě částice vznikající ionizací dusíku, vodních par a dalších složek mobilní fáze přítomných v iontovém zdroji. Srážkami s těmito částicemi dochází k intermolekulárnímu přenosu náboje, kterým z neutrálních částic analytu vznikají ionty. Metoda je vhodná pro termicky stabilní látky s nižší polaritou a nižší molekulovou hmotou. V iontovém zdroji může docházet k tvorbě fragmentů díky vyšší energii dodané molekulám při ionizaci. V APCI lze pracovat i s průtoky mobilní fáze do 2 ml.min⁻¹. Šum pozadí je ve srovnání s ESI nižší stejně jako riziko matričních efektů. Nevýhodou je práce při vyšších teplotách, kdy se již některé z analytů mohou rozkládat a nižší citlivost než při použití ESI.

Fotoionizace (Atmospheric Pressure PhotoIonization – APPI) patří oproti výše uvedeným technikám ionizace k méně používaným. Eluent z chromatografické kolony je nejprve zmlžen proudem dusíku a desolvatován působením teploty (250-300°C). K ionizaci dochází působením krátkovlnného UV záření na molekuly analytu a solventu přítomné v eluentu z kolony. K tomuto účelu se využívá záření kryptonové lampy produkující fotony s energií 10 eV. Primárními částicemi vznikajícími při fotoionizaci jsou radikál-kationty M^{+} tvořené vyražením jednoho elektronu z molekuly. Mimo radikál-kationtů vznikají molekuly $[M+H]^{+}$ při přenosu protonu na molekulu analytu např. z použitého solventu. Oba typy částic vstupují do hmotnostního spektrometru. Ionizace analytu může být podpořena přítomností snadno ionizovatelného dopantu [43-44], který po ionizaci přenáší náboj na molekuly analytu obdobně jako v případě APCI. K tomuto účelu se k eluentu přidává např. aceton, toluen, chlorbenzen nebo anisol. Metoda fotoionizace je vhodná pro málo polární a nepolární analyty špatně ionizující při použití ESI nebo APCI. Typické použití je např. při analýze steroidů.

Hmotnostní detektor je schopný mimo vlastní detekce ionizovatelných látek dodat množství informací kvalitativního charakteru. Základní kvalitativní informaci kterou získáváme, je informace o **monoizotopické hmotě**, z níž lze při dostatečné přesnosti určení hmoty vypočítat sumární vzorec látky.

U měkkých ionizačních technik až na výjimky (viz. dále „in-source fragmentation“) zpravidla nedochází k rozsáhlejší fragmentaci molekul v iontovém zdroji a vznikajícími částicemi jsou nabitě **protonované** $[M+H]^+$, nebo **deprotonované molekuly** $[M-H]^-$ dle toho zda pracujeme v **pozitivním** či **negativním módu**. Někdy je pro ně používán termín **pseudomolekulární** nebo **kvazimolekulární ionty**, používání těchto termínů se však nedoporučuje [45]. Mimo uvedeného aduktu $[M+H]^+$ v pozitivním módu, může docházet i k tvorbě dalších charakteristických aduktů např. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[2M+H]^+$, zejména v závislosti na použité mobilní fázi a podmínkách ionizace. Tyto ionty nám v podstatě neposkytují žádnou strukturní informaci, pouze z nich lze potvrdit údaj o monoizotopické hmotě látky. Aby bylo možné získat informaci o struktuře, musí být proveden MS^n experiment s fragmentací vybraných iontů. Principem MS^n experimentu je opakované štěpení nabitých molekul, kdy vybraný rodičovský ion z MS^1 je štěpen na dva či více dceřiných fragmentů (MS^2). Ze vznikajících fragmentů může být opět jeden vybrán a podroben dalšímu štěpení tzv. MS^3 . Cyklus štěpení lze u některých typů detektorů opakovat vícenásobně tzv. MS^n kde „n“ se běžně pohybuje v rozsahu ~ 2-6. Fragmentace je docílena buď kolizí iontů s inertním plynem přítomným v tzv. **kolizní cele**, nebo v iontové pasti, která slouží jako hmotnostní analyzátor i kolizní cela zároveň. Jedná se o tzv. kolizemi indukovanou disociaci - **Collision Induced Dissociation (CID)** [29-30, 33, 46]. Speciálním typem fragmentace je fragmentace v iontovém zdroji tzv. **in-source fragmentation** [29-30, 33]. Té je dosaženo aplikací vysokého napětového potenciálu ve vakuovém rozhraní. Ionty jsou urychlovány vysokým potenciálem a získávají velkou kinetickou energii. Kolizemi se zbytky neutrálního plynu dochází k jejich CID.

Vzhledem k tomu, že na fragmentace v tomto uspořádání má vliv mnoho faktorů, není obecně možné vytvářet knihovny spekter přenositelné mezi jednotlivými přístroji tak, jak je to běžné např. u GC-MS s EI ionizací (Electron-Impact ionization). Ze stejného důvodu nejsou do dnešního dne zcela jasné všechny fragmentační mechanismy u API metod a možnosti interpretace těchto spekter jsou pouze omezené [47-51]. V tomto směru za zmínku stojí především review Holčapka et al. [51]

Typ záznamu spektra v pozitivním, či negativním módu je závislý na typu stanovovaných látek. Pro molekuly, které mají bazický charakter a jsou schopné přijímat proton se primárně volí pozitivní záznam spektra. Látky kyselého charakteru jsou přednostně zaznamenávány v záporném módu záznamu.

Pokud je to z hlediska chromatografie možné, volí se i pH mobilní fáze takové, které podporuje ionizaci analytu. Jsou však velmi hojně popsány případy látek acidobazického charakteru, kdy je ionizace v širokém rozsahu pH překvapivě málo závislá na hodnotě pH mobilní fáze [52].

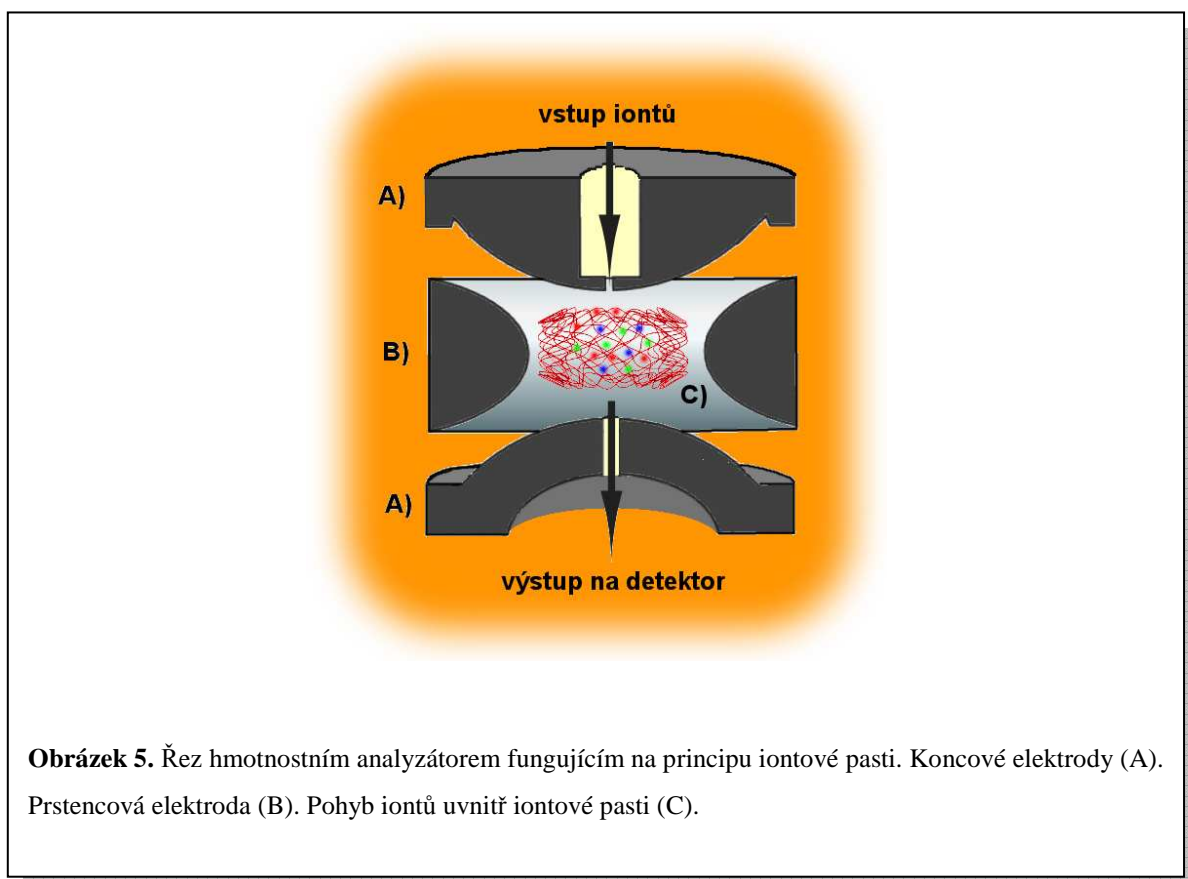
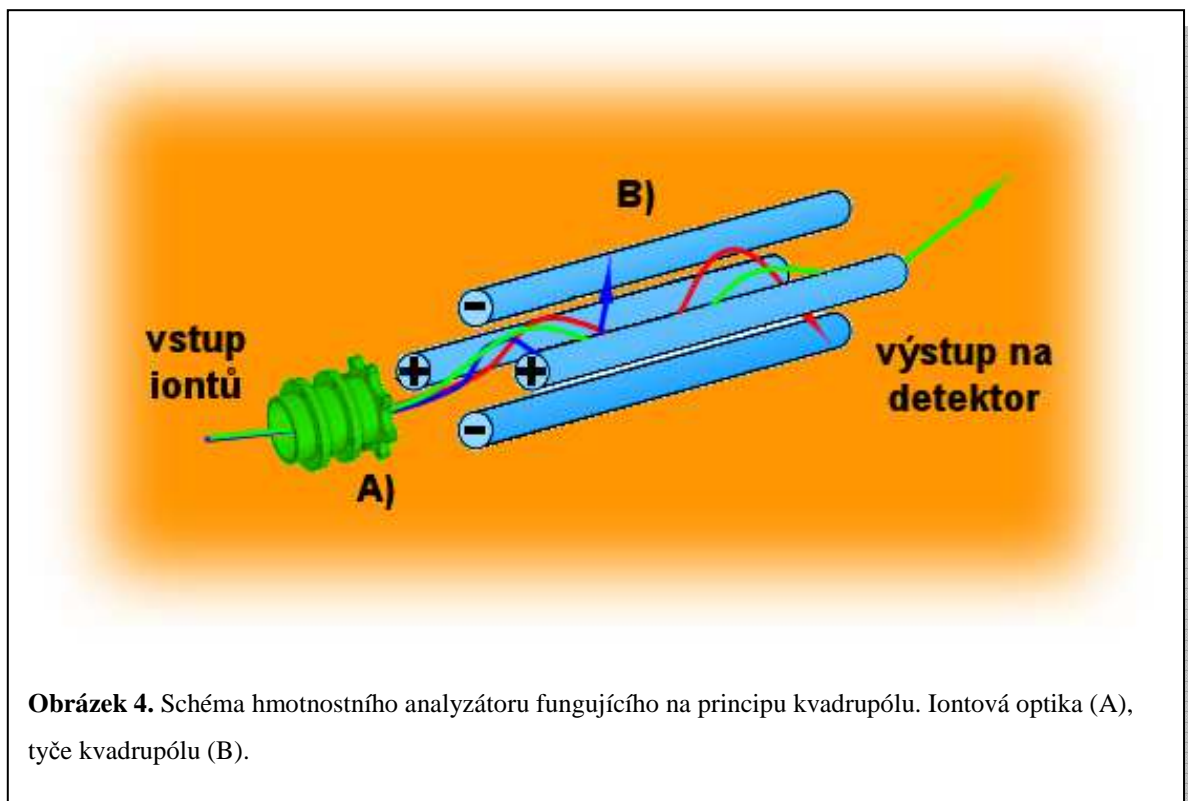
Mezi základní typy hmotnostních analyzátorů využívaných v hmotnostních spektrometrech, které jsou běžně on-line spojovány se separačními technikami v bioanalýze malých molekul, patří kvadrupól a iontová past. **Kvadrupól** je tvořen čtyřmi pravidelně uspořádanými leštěnými tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu (*Obr. 4*). Kombinací kladného a záporného napětí se superponovanou střídavou vysokofrekvenční složkou vloženou na tyto tyče je v prostoru kvadrupólu vytvořeno elektromagnetické pole, které působí na dráhu procházejících iontů dle jejich poměru hmota/náboj (m/z). Ionty se pohybují po sinusoidní křivce s určitou amplitudou (*Obr. 4*). Pouze částice s přesně daným poměrem m/z projdou v ose kvadrupólu až do detektoru. Ostatní částice se rozkmitají vyšší amplitudou a dojde k jejich vyhasnutí na tyčích kvadrupólu. Zařízení tedy slouží jako hmotnostní filtr. Vzhledem k tomu, že jednoduchý kvadrupól neumožňuje provádění MS^n experimentů je jeho využití pouze omezené. Tuto nevýhodu řeší provedení detektoru nazývané **trojitý kvadrupól**. Jak sám název napovídá je tento detektor tvořen třemi nezávislými kvadrupóly. První a poslední slouží jako hmotnostní filtr (analyzátor) podobně jako v případě jednoduchého kvadrupólu. Prostřední, nazývaný **kolizní cela** slouží k fragmentaci iontů vybraných prvním kvadrupólem. Fragmentace je docílena kolizí molekul s atomy inertního plynu. Vzniklé dceřiné ionty jsou selektivně propouštěny posledním kvadrupólem na detekční prvek. Mezi výhody tohoto typu detektoru patří velký lineární dynamický rozsah ($\sim 10^6$) a citlivost detekce v SIM módu. Nevýhodou je možnost provádět MS^n pouze do druhého stupně na rozdíl od iontové pasti a horší citlivost ve full-scan módu. Detektor je vhodný pro kvantitativní analýzu.

3D iontovou past tvoří prostor vymezený třemi speciálně tvarovanými elektrodami (*Obr. 5*) v němž se ionty vlivem jimi generovaného elektromagnetického pole pohybují po zvlněných cirkulárních trajektoriích ve středu pasti [53]. Změnou parametrů elektromagnetického pole dochází k přechodu iontů na metastabilní dráhy a jejich úniku z pasti směrem na detektor (elektronásobič, fotonásobič). Mezi výhody iontové pasti patří dobrá citlivost ve full-scan módu a možnost provádění MS^n fragmentací. Mezi nevýhody patří horší lineární dynamický rozsah a zhoršování měření přesnosti hmoty vlivem prostorového náboje v cele analyzátoru.

Tento typ detektoru je vhodný pro kvalitativní strukturně zaměřené analýzy, nepatří mezi detektory první volby pro účely kvantifikace, vzhledem k výše uvedenému horšímu lineárnímu dynamickému rozsahu. Novější modifikací je lineární iontová past, která řeší některé nedostatky 3D pastí [54].

Při záznamu MS signálu lze pracovat v několika různých módech, které budou dále popsány. Při **Full Scan** záznamu monitorujeme široký rozsah m/z v řádu několik set až několika tisíc. Pokud integrujeme intenzity signálů napříč celým sledovaným rozsahem m/z , získáváme tzv. **Total Ion Current (TIC)**. Dalším módem je **Selective Ion Monitoring (SIM)**, kdy je skenována pouze menší vybraná část m/z v rozsahu několika desetin až jednotek. Při **Multiple Reaction Monitoring (MRM)** někdy nazývaném také **Selected Reaction Monitoring (SRM)** sledujeme přechod z předem vybraného rodičovského iontu na dceřiný iont s daným m/z . Většinou pro kvalitativní účely je také využíváno módů **Product** a **Precursor Ion Scanning**. Při **Product Ion Scanning** jsou po fragmentaci vybraného rodičovského iontu sledovány všechny ionty dceřiné (rozdíl od MRM, kdy se sleduje pouze jediný dceřiný iont). **Precursor Ion Scanning** poskytuje informaci o všech přechodech, kde z různých rodičovských iontů vzniká jeden typický fragment. Význam má zejména pro vyhledávání strukturně obdobných látek. **Constant neutral loss scan** slouží k vyhledávání přechodů, kde dochází ke ztrátě neutrální částice s předem danou hmotou. Užití je obdobně jako v případě **Precursor Ion Scanning**.

Limitem použitelnost hmotnostní detekce v HPLC je nepřítomnost netěkavého pufru v mobilní fázi (fosfáty, boráty apod.) a schopnost látky ionizovat. Další problematickou oblastí je úprava vzorku před analýzou. Jednoduché a rychlé úpravy jako je deproteinace nebo pouhé ředění vzorku mají v LC-MS pouze omezené využití vzhledem k riziku matričních efektů [37-42] způsobených přítomností endogenních látek (většinou vysokomolekulárních) ve špatně přečištěné biologické matrici. Přes některé nevýhody MS týkající se zejména ceny, provozních nákladů a nároků na obsluhu, se jedná o naprosto nenahraditelný nástroj. Ve farmaceutickém průmyslu a bioanalýze léčiv a metabolitů je LC-MS jednou z nejpoužívanějších technik [55-60].



1.6 Chromatografické kolony

Chromatografická kolona používaná v HPLC je tvořena nerezovou nebo PEEK trubicí zcela vyplněnou částicemi stacionární fáze nebo monolitem (*Kap. 1.9.1*) a zakončená rozhraním, které zamezuje úniku stacionární fáze a umožňuje připojení do chromatografického systému. Chromatografickou kolonu lze v zásadě popsat několika základními parametry. V první řadě je to **typ stacionární fáze** a její **povrchová modifikace**, těmto dvěma parametrům bude věnováno několik následujících kapitol, protože mají rozhodující význam při výběru vhodné kolony pro danou bioanalytickou aplikaci. K těmto základním parametrům charakterizujícím stacionární fázi dále přistupují:

Velikost částic, která má vliv na účinnost chromatografické separace. Zmenšováním velikosti částic dochází ke snižování difúzních vzdáleností a snižování odporu proti přenosu hmoty ve stacionární fázi, čímž roste separační účinnost kolon. Snižování průměru částic má však své limity, které jsou dány zejména nárůstem tlaku. V současné době jsou běžně používané průměry 5,0 – 4,0 – 3,5 – 3,0 – 2,7 – 1,7 μm .

Velikost pórů stacionární fáze má vliv na celkovou povrchovou plochu sorbentu, která roste s klesajícím průměrem pórů a dále má vliv na kinetiku transportu analytů, což je důležitý parametr při analýze biopolymerů a makromolekulárních látek, kde musí být zvolena dostatečná velikost pórů pro umožnění interakce makromolekul se stacionární fází.

Stupeň pokrytí se vyjadřuje buď jako procento silanolových skupin na povrchu sorbentu které je obsazeno chemicky vázanou stacionární fází nebo jako koncentrace chemicky vázané stacionární fáze vztažené na jednotku povrchu, většinou jako $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$. Nízký stupeň pokrytí způsobuje nižší retenci hydrofobních látek. Vysoký počet nevyvázaných a nedeaktivovaných silanolových skupin vede k problémům s chvostováním píků bazických látek.

Distribuce velikosti částic a jejich **morfologie** jsou dalšími důležitými parametry, které ovlivňují účinnost kolony a zpětný tlak. Snahou je docílit monodisperzní soustavy pravidelných sférických částic.

Průměr kolony má vliv především na velikost průtoku mobilní fáze. Při přenosu metody mezi kolonami různého průřezu je nutné zachovat stejnou lineární rychlost mobilní fáze. Vztah mezi změnou velikosti průtoku při změně průměru kolony, kde D_1 a D_2 jsou průměry kolon a F_1 a F_2 průtoky, je dán jako:

Rovnice 1.

$$\left(\frac{D_1}{D_2}\right)^2 = \frac{F_1}{F_2}$$

Tzn. že s menším průměrem kolony při zachování stejné lineární rychlosti (tedy i retenčního času analytů) musí být snížen průtok, což vede k úspoře mobilní fáze. Zmenšení průměru kolony sebou také přináší zlepšení detekčních limitů. Nevýhodou zmenšování průměru je snižování účinnosti separace v případě velkého mimokolonového mrtvého objemu u látek s nízkou retencí.

Délka kolony rozhoduje o účinnosti kolony. S rostoucí délkou roste účinnost separace, ale stejně jako v případě snižování velikosti částic, prodlužování kolony sebou přináší nárůst tlaku. Standardně používané délky kolon jsou 50 – 100 – 125 – 150 – 250 mm.

Všechny výše uvedené parametry mají rozhodující vliv na kvalitu separace a musí jim být věnována pozornost při výběru vhodné kolony pro danou bioanalytickou aplikaci. V bioanalytice je běžný formát kolon 150x4.6 mm s 5 a 3 μm částicemi, avšak vzhledem ke snahám o úsporu chromatografických rozpouštědel je často využíváno kolon s menším průměrem (3 mm).

V kombinaci s MS detekcí jsou v poslední době oblíbené krátké kolony 20-50 mm s průměrem 2.1 mm a velikostí částic 1.7 μm pro rychlé metody, které dovolují použití nízkých průtoků vhodných pro MS a přináší zvýšení citlivosti a zkrácení času analýz. Jak bylo ale uvedeno výše, velká pozornost musí být v tomto případě věnována minimalizaci mimokolonových mrtvých objemů.

1.7 Základní chromatografické módy

V této kapitole budou probrány mechanismy retence, které se uplatňují v kapalinové chromatografii a základní typy běžných chromatografických módů jako je separace na normální fázi (Normal Phase - NP), separace v obrácených fázích (Reversed Phase - RP), iontově výměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography – IEC) a některé další.

1.7.1 Mechanismy retence

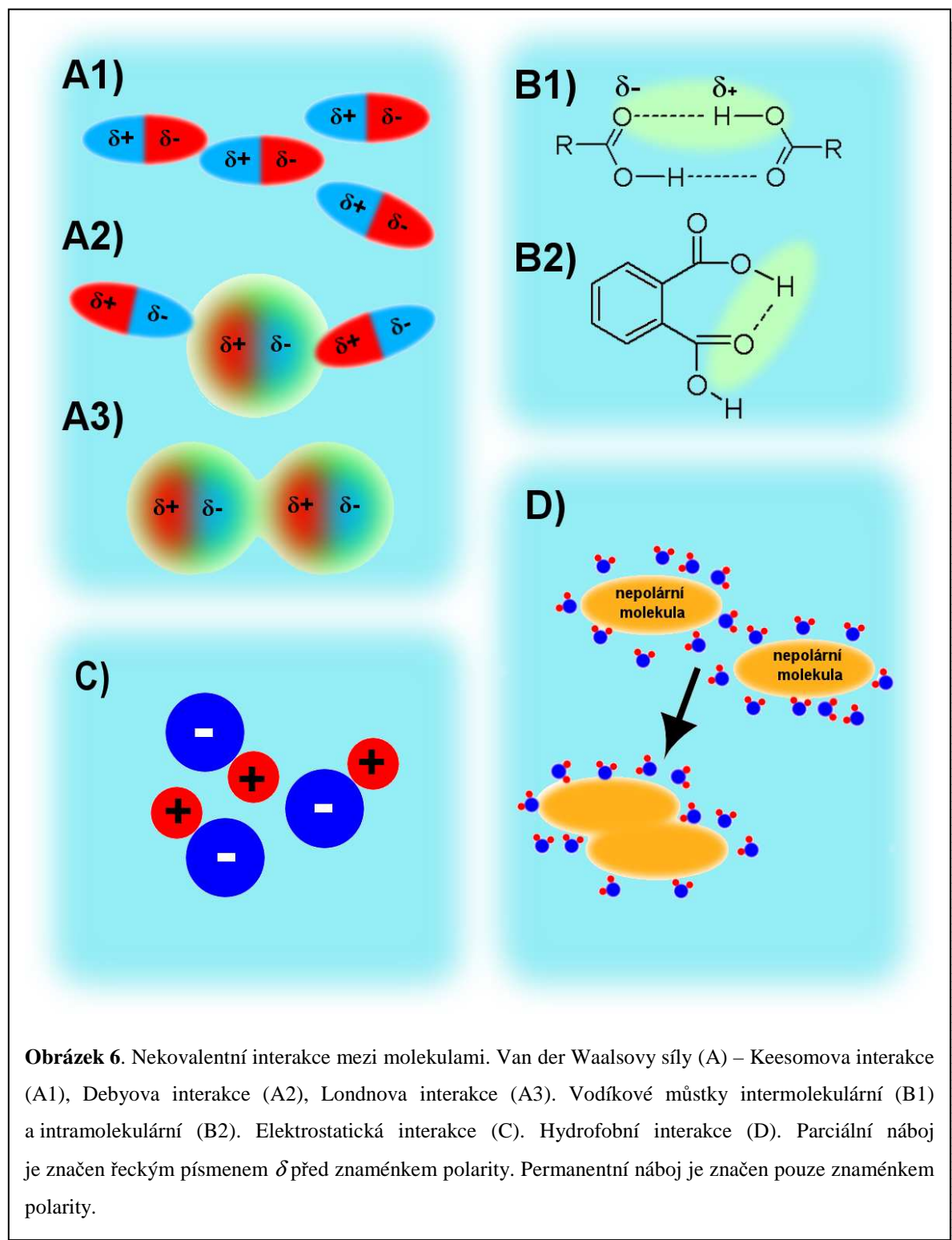
Retenční mechanismus je založen na schopnosti molekul nekovalentně interagovat s povrchem stacionární fáze a s mobilní fází. Uplatňují se zde interakce, které lze v zásadě rozdělit do několika základních skupin (*Obr. 6*):

Van der Waalsovy interakce [61] (*Obr. 6A*) zahrnují několik typů nekovalentních interakcí založených na atraktivních nebo repulsivních silách mezi permanentními dipóly (**Keesomovy interakce**), mezi permanentním dipólem a indukovaným dipólem (**Debyovy interakce**) a mezi indukovanými dipóly (**Londonovy interakce**). Van der Waalsovy interakce patří mezi nejslabší, s energiemi v oblasti 2-4 KJ.mol⁻¹, nicméně vzhledem k obrovskému množství těchto interakcí je jejich vliv značný.

Při **hydrofobních interakcích** [62] dochází ke shlukování hydrofobních částí molekul tak, aby vytvořily co nejmenší styčný povrch s polárním prostředím (*Obr. 6C*). Tento typ interakcí je zodpovědný za velmi nízkou rozpustnost nepolárních uhlovodíků ve vodě.

Vodíkové můstky vznikají mezi molekulami obsahující vodík navázaný na elektronegativní atom. Interaguje zde kladný parciální náboj vzniklý na vodíkovém atomu se záporným parciálním nábojem na elektronegativním atomu. Vodíkové můstky mohou být jak inter- tak intramolekulární (*Obr. 6B*). Řadí se mezi slabší typy interakcí (4-13 KJ.mol⁻¹), jejíž síla je daná rozdílem elektronegativity vodíku a kovalentně vázaného atomu.

Elektrostatické interakce někdy též nazývané **coulombické nebo iontové interakce** jsou založené na vzájemném přitahování částic s permanentním nábojem opačné polarity (*Obr. 6D*). Energie elektrostatických interakcí je velmi vysoká v rozmezí 400-4000 KJ.mol⁻¹.



Obrázek 6. Nekovalentní interakce mezi molekulami. Van der Waalsovy síly (A) – Keesomova interakce (A1), Debyova interakce (A2), Londnova interakce (A3). Vodíkové můstky intermolekulární (B1) a intramolekulární (B2). Elektrostatická interakce (C). Hydrofobní interakce (D). Parciální náboj je značen řeckým písmenem δ před znaménkem polarity. Permanentní náboj je značen pouze znaménkem polarity.

V přírodě se běžně vyskytují vzájemné kombinace výše uvedených interakcí, např. ion-dipól, ion-indukovaný dipól apod. Stejně tak chromatografická separace je většinou založena na kombinaci více typů uvedených interakcí a před vývojem metody je vhodné, seznámit se s chemickou strukturou stanovovaných látek, navrhnout typy převažujících interakcí a na jejich základě zvolit vhodný typ stacionární a mobilní fáze.

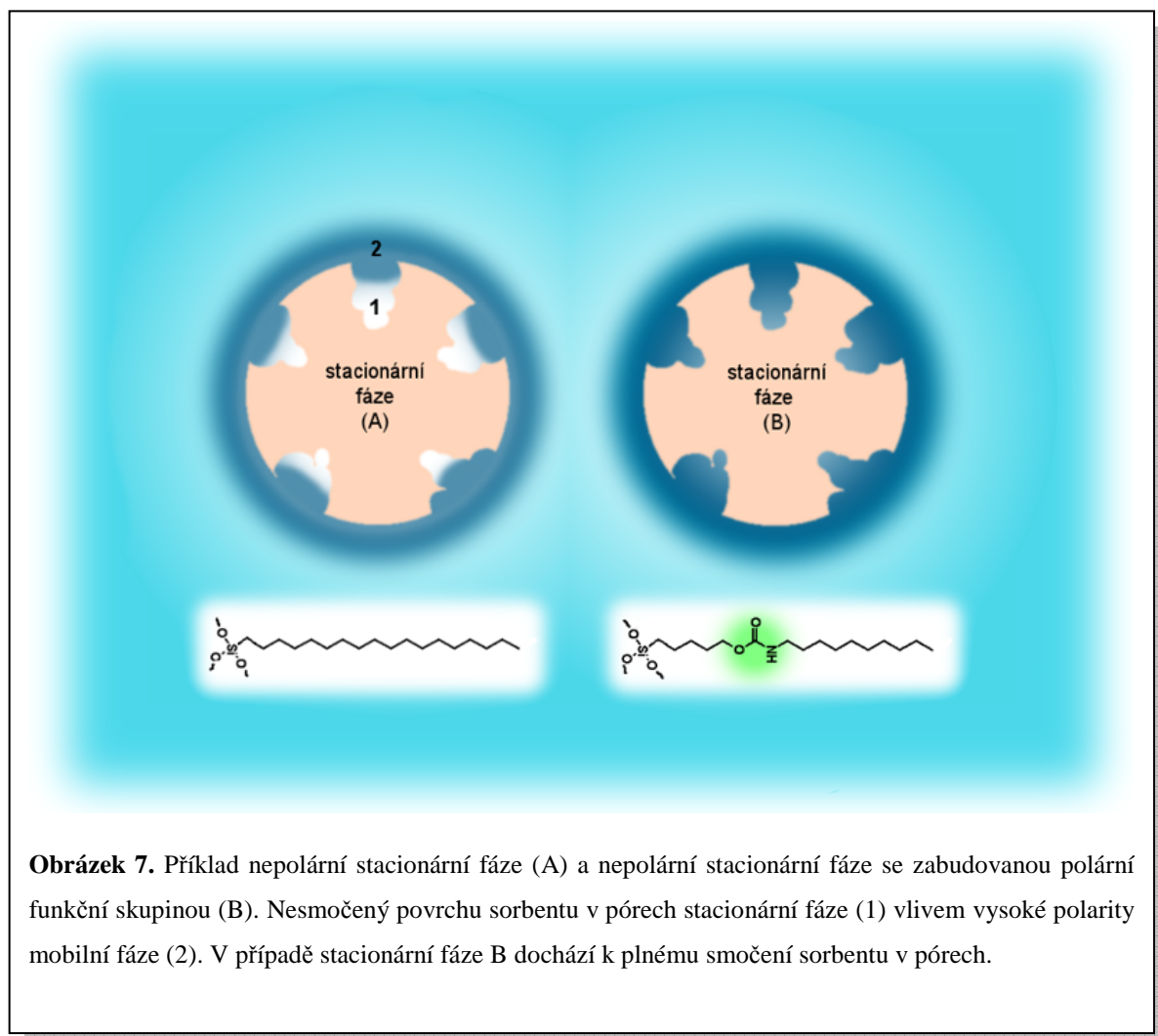
1.7.2 Chromatografie na reverzní fázi

Separace na reverzní fázi (Reversed Phase Liquid Chromatography - RPLC) patří v dnešní době svým zastoupením stále k nejrozšířenějším a to nejen v bioanalýze a farmaceutické analýze. Separací mechanismus je založen na rozdělování analytu mezi polární mobilní fázi a zakotvenou nepolární stacionární fázi. RPLC je vhodná pro separaci středně polárních až nepolárních látek s rozdílnou hydrofobicitou. S rostoucí hydrofobicitou analytu a rostoucí polaritou mobilní fáze se zvyšuje retence [18].

Mobilní fáze je tvořena směsí vody nebo pufru a organického rozpouštědla mísitelného s vodou (např. methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, isopropanol, apod.). Přestože za posledních 30 let bylo vynaloženo velké úsilí k objasnění retenčních mechanismů na reverzní fázi, stále chybí jednotný pohled na tuto problematiku, pojednání na toto téma předkládají souhrnně např. tyto publikace [63-75]. V dnešní době existuje nespočetné množství reverzních chemicky vázaných stacionárních fází. Jejich výčet přesahuje rozsah této disertační práce, proto zde budou vyjmenovány pouze některé z nich.

Jedna z nejstarších a stále nejpoužívanější je v tomto směru oktadecylová (C18) modifikace, dále oktylová (C8), bifenylová [76], alkyl-fenylová nebo pentafluorofenylová (PFP). Z dalších pak dodecylová (C12), hexylová (C6), cyklohexylová, případně s C1 - C4 modifikací [17]. Mezi relativně novější patří fáze s dlouhým alifatickým řetězcem, triakontylová a tetratriakontylová (C30, C34) [77-78], navázaným cholesterolem [79] nebo zajímavý typ kolon s perfluorovaným alifatickým řetězcem [80]. Kolony s vázanou stacionární fází tvořenou kyanonitrilem, diolem a aminopropylem leží na pomezí reverzní a normální fáze.

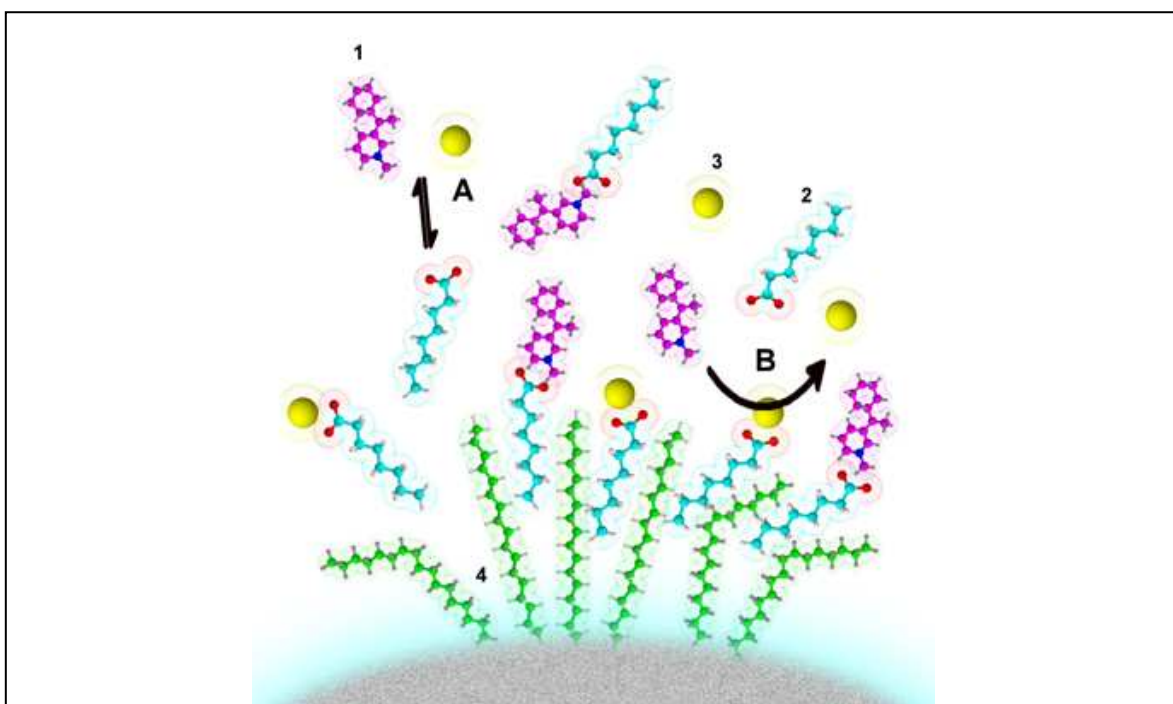
Mezi nevýhody RP chromatografie patří špatná retence velmi polárních a nabitých molekul. Tento problém lze částečně řešit používáním iontově párových činidel (*Kap. 1.7.3*) nebo vysoce vodných mobilních fází. Oba uvedené případy jsou však problematické při použití MS jako detekční techniky. Dále při použití vysokého procenta vody v mobilní fázi na obyčejných kolonách dochází ke špatnému smáčení stacionární fáze, vypuzování mobilní fáze z pórů sorbentu (*Obr. 7A*), což v konečném důsledku vede k nereprodukovatelným retenčním časům, špatné účinnosti kolon a postupnému kolapsu stacionární fáze [81].



Jedním z kroků ve vývoji stacionárních fází pro řešení tohoto problému bylo využití **zabudovaných polárních funkčních skupin** [82] v hydrofobním řetězci (*Obr. 7B*). Zabudování polární funkční skupiny má pozitivní vliv jak na vlastní interakci stacionární fáze s polárním analytem, tak na její smáčivost v mobilních fázích s vysokým procentem vody (>95%) a snižuje také náchylnost ke kolapsu stacionární fáze v tomto prostředí. Dochází ke zlepšení retence, separačních vlastností a reprodukovatelnosti retenčních časů. Nicméně neřeší problém se špatnou citlivostí a nestabilitou signálu MS detekce při vysokých obsazích vody. Pokrokem v tomto směru bylo zavedení **HILIC** chromatografie. Tento typ chromatografie bude popsán podrobněji v *Kapitole 1.7.6*, vzhledem k tomu, že využívá jiného retenčního mechanismu než RPLC.

1.7.3 Iontově párová chromatografie

Mezi zvláštní typy chromatografie na reverzní fázi patří iontově párová chromatografie [83-85], která umožňuje separaci směsí vysoce polárních, iontových nebo ionizovatelných sloučenin společně s neutrálními molekulami po přidání iontově párového činidla do mobilní fáze. Na mechanismus IPC lze v zásadě nahlížet dvěma způsoby a to buď jako na tvorbu iontových párů mezi činidlem a analytem v mobilní fázi a interakcí těchto navenek elektroneutrálních částic s nepolární stacionární fází, nebo jako na dynamické pokrytí stacionární fáze iontově párovým činidlem a iontovou výměnu nabitých molekul na takto modifikovaném povrchu [86-87] (*Obr. 8*). Jako iontově párových činidel nesoucích záporný náboj se většinou využívá alkylsulfonátů sodných s nerozvětveným alifatickým řetězcem C3-C13. Použití alkylsulfonátů ve spojení s MS detekcí však není vhodné z důvodu jejich nízké těkavosti, proto se v tomto případě využívá látek ze skupiny perfluorovaných karboxylových kyselin s C2-C7 (kyselina trifluoroctová – tridekafluoroheptanová).



Obrázek 8. Princip iontově párové chromatografie. Mechanismus tvorby iontových párů v mobilní fázi (A). Mechanismus dynamicky modifikované stacionární fáze s iontovou výměnou na jejím povrchu (B). Kladně nabitá molekula s kvarterním dusíkem (1), iontově párové činidlo (2), kladně nabitý protiont (3), oktadecylová stacionární fáze (4).

Jako iontově párových činidel nesoucích kladný náboj se využívá buď kvartérních amoniových solí (např. soli tetrabutylammonia) nebo v případě využití MS detekce, těkavějších látek ze skupiny dialkylammonium acetátů (alkyl = C3-C5). Jak bylo zmíněno výše, metoda je vhodná pro látky silně polární, látky nesoucí permanentní náboj nebo látky ionizovatelné úpravou pH mobilní fáze. Oproti iontově výměnné chromatografii, která bude zmíněna dále, má IPC výhodu zejména v možnosti simultánně separovat jak nabitě, tak nenabitě molekuly, volbou délky alkylového řetězce činidla lze optimalizovat retenci stanovovaných látek, získávají jsou lepší tvary píků a metoda je reprodukovatelnější. Nevýhodou iontově párové chromatografie ve srovnání s RPLC je menší robustnost, pomalejší ustalování rovnováhy na koloně z čehož plyne problematické použití gradientové eluce, tvorba falešných píků a vysoká perzistence činidel v chromatografickém systému působící problémy při analýze dalších látek, zejména ve spojení s MS detekcí. MS detekce se využívá spíše méně, vzhledem k vysoké perzistenci IP činidel v iontovém zdroji a následné supresi ionizace dalších analytů na úkor iontově párového činidla. Nepříznivým faktorem je i cena ultračistých iontově párových činidel pro použití v chromatografii.

1.7.4 Chromatografie na smíšených sorbentech

Mechanismu smíšené retence (mixed mode retention) je dosahováno kombinací hydrofobních a elektrostatických interakcí (iontová výměna) mezi analytem a stacionární fází. Tohoto typu chromatografické separace je využíváno zejména v případech, kdy užití samotné RPLC nebo IEC neposkytuje dostatečné rozdělení komplexní směsi nabitých a neutrálních látek a zároveň dovoluje obejít nevýhody IPC zmíněné výše. Separace v mixed-mode režimu lze docílit několika způsoby. K tomuto účelu lze sériově kombinovat kolony s různými typy stacionárních fází (RP, IEC) [88-90], užít sorbentů nesoucích na svém povrchu jak hydrofobní alkylové řetězce, tak funkční skupiny nesoucí náboj [91-92], případně pro naplnění kolony využít dvou typů částic, jednoho s hydrofobní modifikací a druhého iontoměničového [93]. V posledních několika letech se na trhu objevily kolony s náplněmi na bázi mixed-mode sorbentů se zakotvenou chemickou fází tvořenou alifatickým, případně alifatico-aromatickým řetězcem v jehož těle je obsažena funkční skupina nesoucí permanentní kladný, nebo záporný náboj a umožňují tak smíšenou retenci založenou jak na hydrofobních tak iontově výměnných mechanismech. Je však třeba uvést, že i na klasických oktadecylových kolonách lze do určité míry mixed-mode mechanismus založený na hydrofobní interakci a kationtové výměně pozorovat [94].

1.7.5 Chromatografie na normální fázi

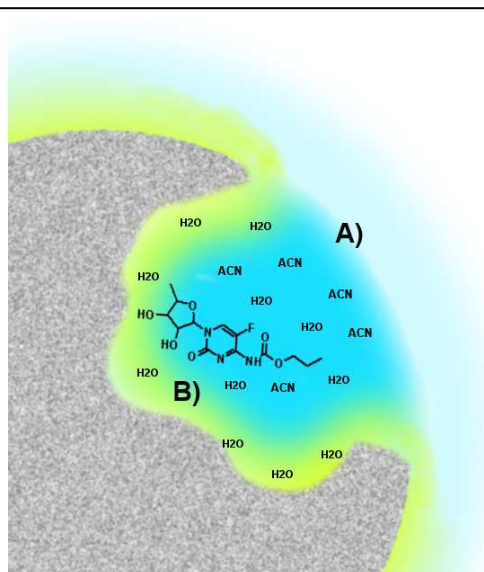
Separace na normální fázi (Normal Phase Liquid Chromatography - NPLC) s využitím polárního sorbentu (silikagel, alumina, silikagel kovalentně modifikovaný - kyanopropyl, aminopropyl, diol) a bezvodé mobilní fáze tvořené nepolárním rozpouštědlem (hexan, heptan, dichlormethan) s polárním modifikátorem (isopropanol, ethylacetát, chloroform) patří k historicky nejstarším separačním módům a až do 80. let 20. století se jednalo o nejrozšířenější druh chromatografické separace.

S nástupem chemicky vázaných reverzních stacionárních fází v 70. letech 20. století dochází až na některé výjimky (*Kap. 1.7.6*) k odklonu od tohoto separačního módu. Separace je založena na interakci (adsorpci/desorpci) analytu s polárním povrchem sorbentu. Retence při NPLC roste s rostoucí polaritou analytu a rostoucí hydrofobicitou mobilní fáze [18]. Metoda je vhodná pro separaci polárních i neutrálních látek, polohových izomerů, homologů, látek lišících se funkčními skupinami a látek, které nelze uspokojivě separovat na reverzní fázi.

Problémem NPLC je zejména pomalé ustalování rovnováhy na sorbentech založených na oxidech kovů a heterogenita povrchu zejména u starších typů sorbentů založených na silikagelu typu A (*Kap. 1.8.1*) vedoucí k chvostování (tailing) či frontování (fronting) píků. V bioanalýze a farmaceutické analýze není příliš rozšířena zejména kvůli špatné rozpustnosti hydrofilních látek v používaných mobilních fázích [95-96] a problémům při spojování s MS. Obecně je nahrazována hydrofilní interakční chromatografií (Hydrophilic Interaction Chromatography - HILIC) [97].

1.7.6 Chromatografie na bázi hydrofilních interakcí

Jak již bylo uvedeno výše, původní separace na normální fázi je v posledních letech nahrazována modernější metodou HILIC [81, 97], kterou lze chápat jako zvláštní typ NP separace. V literatuře se lze též setkat s označením ANP (Aqueous Normal Phase) chromatografie. Jako stacionární fáze se využívá polárního sorbentu, který je tvořen buď samotným silikagelem (případně materiálem na bázi ZrO_2 , TiO_2), silikagelem s chemicky vázaným řetězcem obsahujícím polární skupinu/y amino, diol, kyano, amid případně silikagelem modifikovaným sulfoalkylbetainem [98-99].



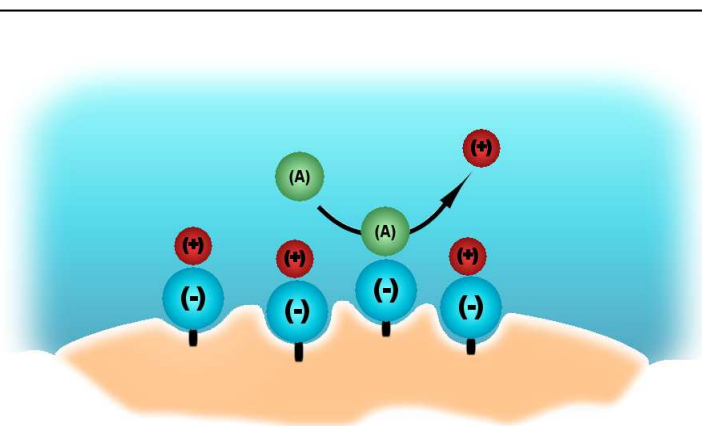
Obrázek 9. Principi HILIC chromatografie. Separace je založena na rozdělování analytu mezi málo polární mobilní fázi (A) a vrstvu vody sorbovanou na povrchu stacionární fáze (B). Dalšími mechanismy jsou elektrostatická interakce analytů s povrchem stacionární fáze a adsorpce.

Ukázalo se, že v HILIC módu lze použít i sorbenty s navázaným fluorovaným alifatickým řetězcem nebo pentafluorofenylem [100], díky tzv. U-retenčnímu profilu („U-shape“) [101], kdy retence látky s rostoucím obsahem organické složky (acetonitril, methanol) v mobilní fázi nejprve klesá a po dosažení určité hranice začíná opět růst. Mobilní fáze je tvořena převážně směsí vody nebo vodného roztoku pufru s vysokým obsahem polárního organického rozpouštědla (acetonitril, methanol). Oproti reverzní fázi je obsah organické složky v opačném poměru a organické rozpouštědlo většinou tvoří více jak 60% mobilní fáze. Pro provedení HILIC separace je zapotřebí minimálně 3-5% obsahu vody v mobilní fázi [102], která tvoří tenkou vrstvu na povrchu sorbentu a v systému funguje jako silný eluent (*Obr. 9*). Na mechanismu separace se podílí rozdělování polárního analytu mezi mobilní fázi a vrstvu vody na povrchu sorbentu [97-98, 103], povrchová adsorpce [103-104] a elektrostatická interakce [102]. S rostoucím obsahem organické složky roste retence polárních analytů. HILIC je s výhodou používána pro rozdělení směsí polárních látek, které vykazují pouze slabou retenci na reverzní fázi a proto má své nezastupitelné místo v bioanalýze [105] a farmaceutické analýze [96]. Díky vysokému obsahu dobře těkavé organické složky je metoda zvláště vhodná pro spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí v módu MS-ESI, kde usnadňuje zmlžování a zvyšuje účinnost ionizace analytu a tím zlepšuje citlivost stanovení [106-107].

Další nespornou výhodou je možnost přímého nástřiku vzorků zpracovaných RP-SPE extrakcí nebo deproteinací organickým rozpouštědlem, bez nutnosti odpařování organické složky. V neposlední řadě je výhodou i nižší pracovní tlak na koloně ve srovnání s RP chromatografií, díky vysokému obsahu organické složky v mobilní fázi.

1.7.7 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie [108] (Ion Exchange Chromatography - IEC) využívá elektrostatické interakce mezi molekulou analytu a stacionární fází, která je většinou tvořena modifikovaným silikagelem nebo organickým polymerem jež má na svém povrchu navázány vhodné funkční skupiny pro výměnu iontů. Mezi stacionárními fázemi využívanými v IEC zdaleka nejvíce převládají polymerní materiály [109] založené na bázi polystyren-divinylbenzenových pryskyřic, které jsou rezistentní v širokém rozsahu pH 1-12. Důležitým parametrem sorbentů v IEC je iontově výměnná kapacita udávaná v mega-ekvivalentech na gram sorbentu (mequiv.g^{-1}). Jako mobilních fází se využívá roztoků pufrů s danou iontovou silou, jejichž ionty se účastní spolu s analytem kompetice o místa na iontoměniči. Ekvivalentem změny koncentrace organické složky při gradientové eluci v RPLC je změna iontové síly mobilní fáze v IEC. Separaci lze ovlivnit i změnou pH mobilní fáze u ionizovatelných látek. Stacionární fáze může vystupovat jako silný nebo slabý katex nebo anex, dle povrchových funkčních skupin. Mezi silné ionexy patří látky s permanentním nábojem. Funkční skupiny na povrchu sorbentu, které se nejčastěji využívají pro iontovou výměnu jsou funkce karboxylová (slabý katex), sulfonová (silný katex), amino (slabý anex) a tetraalkylammoniová (silný anex).



Obrázek 10. Princip iontové výměny na katexové stacionární fázi. Zakotvená funkční skupina se záporným nábojem (-), kladně nabitý protiiont (+), kladně nabytý analyt (A).

Nevýhodou IEC je zejména vysoký obsah solí v mobilní fázi a z toho pramenící problémy při výběr použitelných detektorů. Vysoký obsah málo těžkých nebo netěžkých solí je nekompatibilní zejména s MS detekcí, avšak i v případě UV/VIS detekce může docházet k problémům při použití nízkých vlnových délek (< 230 nm), kvůli UV absorpci některých anorganických aniontů. Vysoká vodivost mobilní fáze způsobená vysokým obsahem solí snižuje citlivost stanovení při použití vodivostního detektoru.

1.7.8 Některé další vybrané separační módy

Další uvedené chromatografické módy nejsou v bioanalýze léčiv (malých molekul) většinou využívány, proto budou dále zmíněny jen v přehledu. **Vylučovací a gelová permeační chromatografie** (Size Exclusion Chromatography - SEC, Gel Permeation Chromatography – GPC) nalézají nejvyššího využití zejména pro separace makromolekul (proteiny, peptidy, oligonukleotidy, apod.). Dělení probíhá takřka výhradně na základě velikosti molekuly, bez výraznějších chemických interakcí mezi analytem a stacionární fází. Jako stacionární fáze pro HPLC jsou využívány polystyren divinylbenzenové kopolymery nebo methakrylát. **Bioafinitní chromatografie** využívá silně specifických nekovalentních molekulárních interakcí charakteristických pro živé organismy, jako jsou interakce enzym – substrát (kofaktor, inhibitor), antigen – protilátka. Jako stacionární fáze se využívají specifické biopolymery, např. enzym nebo protilátka, navázané na inertním nosiči.

Chromatografie hydrofobních interakcí (Hydrophobic Interaction Chromatography – HIC) je velmi podobná chromatografii na reverzních fázích, využívá však polárnějších sorbentů. Využití nalézá opět v separaci biopolymerů, které svou hydrofobní částí interagují se stacionární fází. Nižší hydrofobicita stacionární fáze umožňuje pro separaci použít nižší eluční síly rozpouštědel a tím zachovat funkci biopolymerů bez jejich denaturace.

1.8 Typy stacionárních fází a nosičů chemicky vázaných stacionárních fází

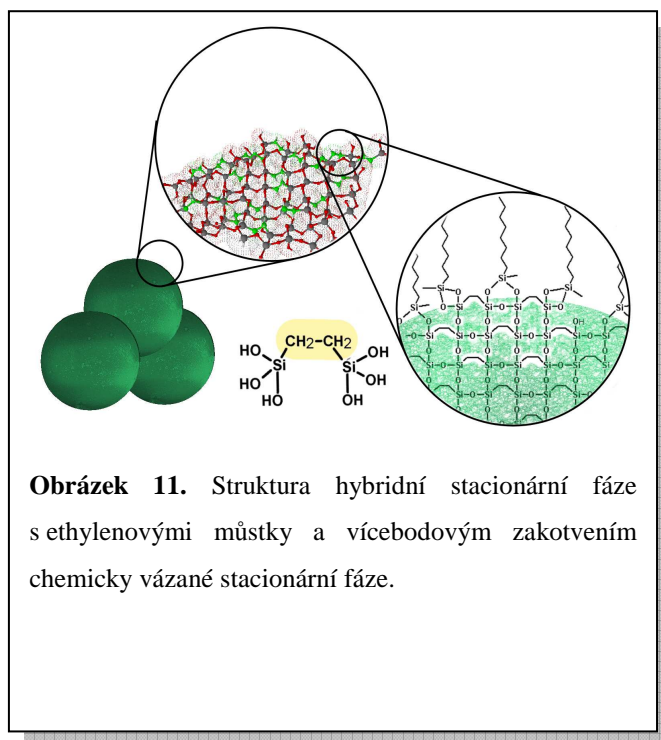
1.8.1 Silikagel

Silikagel patří v současné době stále k nejrozšířenějším materiálům využívaným buď přímo jako polární stacionární fáze v NPLC (HILIC) nebo jako nosič pro chemicky vázané fáze v RPLC a to zejména díky snadné modifikaci prostřednictvím povrchových silanolových skupin. Mezi další výhody patří jeho dobré mechanické vlastnosti, velký aktivní povrch, snadná výroba monodisperzních částic a možnosti ovlivnit velikost pórů. Pro užití v chromatografii je typ silikagelu označován velkými písmeny A, B nebo C. Silikagel typu A patří ke starším typům, které ve své struktuře obsahují jistá množství kovů, jako např. železa. Díky tomu na povrchu vznikají adsorpční centra, která způsobují chvostování zejména bazických látek. Z tohoto důvodu se již nepoužívá. Silikagel B je v dnešní době nejužívanějším typem. Jedná se o vysoce čistý materiál, bez nežádoucích příměsí kovů ve své struktuře. Nejnovějším typem je silikagel C, obsahující ve své povrchové struktuře hydridovou vazbu. Více o tomto typu silikagelu bude uvedeno v *Kapitole 1.8.4*.

Zásadní nevýhodou silikagelu je nižší chemická i termická stabilita. Obecně udávaný pracovní rozsah kolon na bázi silikagelu je v rozmezí pH=3-7 [110-111]. V silně kyselém prostředí dochází k hydrolýze siloxanové vazby a ztrátě chemicky vázaných fází, v alkalickém prostředí zase k rozpouštění samotného silikagelu. Tento efekt je ještě prohlouben použitím fosfátových, karbonátových nebo borátových pufrů [112] a teplotou nad 40°C. Nevýhodou silikagelu je i přítomnost volných silanolových skupin, které se chovají jako adsorpční centra a jsou příčinou chvostování píků, zejména u látek bazického charakteru. Z výše uvedených důvodů jsou vyvíjeny nové alternativní typy sorbentů ať už na bázi silikagelu, či jiných materiálů. Některé z nich budou popsány dále.

1.8.2 Hybridní stacionární fáze

Základní myšlenka při tvorbě hybridních stacionárních fází byla možnost kombinace výhod sorbentů na bázi silikagelu a výhod polymerních sorbentů [113-115]. Zatímco silikagel vyniká vysokou separační účinností a mechanickou stabilitou, tak polymerní fáze jsou velmi odolné v širokém rozsahu pH a neobsahují ve své struktuře silanolové skupiny. Část komerčně vyráběných kolon (např. Phenomenex Gemini, Waters BEH) využívá speciálně modifikovaného typu

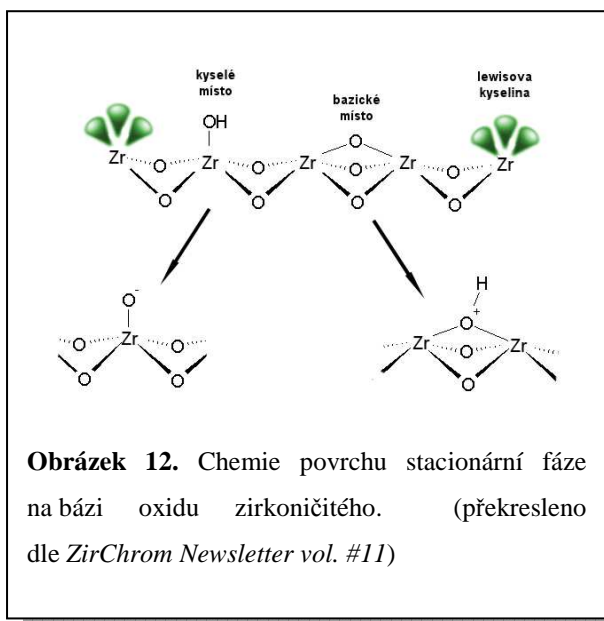


Obrázek 11. Struktura hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky a vícebodovým zakotvením chemicky vázané stacionární fáze.

stacionární fáze tvořené organo-křemičitým kopolymerem, kde jsou v povrchové struktuře atomy křemíku spojovány ethylenovými můstky tzv. „**cross-link**“ technologie (*Obr. 11*). Tento koncept zásadním způsobem zvyšuje odolnost fází v silně alkalickém prostředí. Při chromatografii v obrácených fázích bývá pro zvýšení odolnosti v kyselém prostředí tato technologie kombinována s vícebodovým zakotvením alifatického řetězce prostřednictvím dvou silanolových skupin. Díky tomu jsou tyto fáze odolné v širokém rozmezí pH 1-12.

1.8.3 Stacionární fáze na bázi oxidů kovů IV. skupiny

Jedna velká skupina relativně nových sorbentů je založena na **oxidech kovů IV. skupiny**, **oxidu zirkoničitém** (ZrO_2 – zirconia) [116-118] a **oxidu titaničitém** (TiO_2 – titania) [119]. Oproti silikagelu vykazují nejen výrazně vyšší stabilitu v extrémních podmínkách, ale navíc poskytují odlišnou selektivitu. Ve srovnání se silikagelem mají tyto oxidy podstatně komplikovanější chemismus povrchu. Zatímco nemodifikovaný silikagel vystupuje jako měnič kationtů,



povrch sorbentů na bázi oxidů kovů IV. skupiny má amfoterní charakter a jeho chování je závislé na pH mobilní fáze. Mimo to jsou na povrchu přítomna centra s charakterem Lewisových kyselin umožňující elektronové donor-akceptorové interakce.

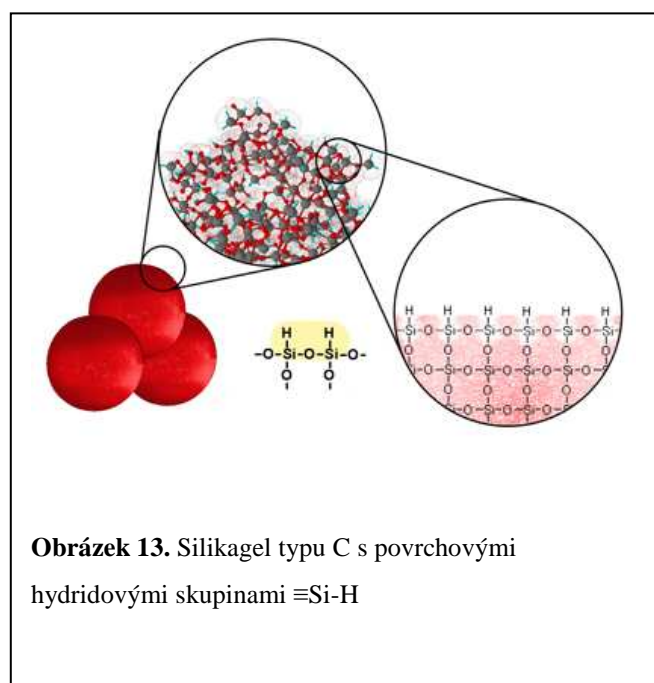
V bioanalýze léčiv (malých molekul) není tento typ sorbentů zatím příliš rozšířen, i když farmaceutické aplikace se již v literatuře objevují [120-123]. Kolony s **oxidem zirkoničitém** [118] lze bez modifikace povrchu (*Obr. 12*) použít pro separace v systému normální fáze. Povrch ZrO_2 lze však také modifikovat [117] organickým polymerem jako je polystyren, polybutadien, polyethylenimin případně pyrolytickým uhlíkem, z nichž některé lze dále chemicky upravit kovalentně vázaným organickým řetězcem, například oktadecylem. Takto modifikovaný povrch vykazuje smíšenou retenční charakteristiku (mixed-mode retention) a umožňuje interakce jak hydrofobní, tak iontově výměnné.

Hlavní výhodou ZrO_2 sorbentu je vysoká stálost v celém rozsahu pH 1-14, potencovaná dále vysokou teplotní stálostí až do hodnot okolo 200°C [124-125]. Vysoká teplota při separaci umožňuje rapidně snížit čas analýzy a navíc v některých případech využívat čistou vodu jako mobilní fáze vzhledem k jejím unikátním vlastnostem při vysokých teplotách [126-128]. Mimo klasické částicové náplně byly učiněny i pokusy o výrobu monolitů (*Kap. 1.9.1*) na bázi ZrO_2 [129] případně $\text{ZrO}_2\text{-HfO}_2$ [130-131].

Chemismus stacionárních fází na bázi **oxidu titaničitého** je velmi obdobný chemismu zirkoniových kolon. Nicméně ve srovnání s předešlými typy je na povrchu TiO_2 až 12 různých typů hydroxylových skupin [132]. První komerčně dodávané stacionární fáze na bázi TiO_2 se objevily již před rokem 2004.

1.8.4 Stacionární fáze na bázi siliciumhydridu

Jedná se o zvláštní typ silikagelu, někdy označovaného jako **silikagel typu C** (silica hydride, C silica), který je charakteristický monovrstvou hydridových $\equiv\text{Si-H}$ funkčních skupin na svém povrchu (*Obr. 13*) [133-134], která nahrazuje až 95% silanolových $\equiv\text{Si-OH}$ funkčních skupin běžného silikagelu [135].



Obrázek 13. Silikagel typu C s povrchovými hydridovými skupinami $\equiv\text{Si-H}$

na silikagelu typu C je možnost používat tyto sorbenty jak v čistě vodných tak zcela bezvodých mobilních fázích a využívat tak dvou separačních módů (RPLC, NPLC) [133-134]. S výhodou lze využít kombinovaného NP – RP mechanismu separace pro směsi jak hydrofobních tak hydrofilních látek. Kolony plněné těmito sorbenty vykazují velmi rychlou ekvilibraci při změně mobilní fáze, díky nepatrné zbytkové silanolové aktivitě.

1.8.5 Stacionární fáze na bázi porézního grafitického uhlíku

Historie výzkumu porézního grafitického uhlíku (Porous Graphitic Carbon – PGC) [136-138] s jeho využitím jako stacionární fáze, sahá až do 70. let 20. století, jako odezva na hledání materiálů, které by obešly nevýhody silikagelu (*Kap 2.8.1*). Vzhledem k problémům s původními sorbenty se použitelné stacionární fáze na bázi GPC objevují až v posledních 15-20 letech. Pro využití v kapalinové chromatografii jsou zajímavé zejména z hlediska zcela odlišné selektivity oproti RP materiálům, teplotní a chemické stability a v některých případech vzhledem k retenci velmi polárních látek, které nejsou zadržovány na reverzní fázi. Další předností je nepřítomnost silanolových skupin a možnost díky planárnímu povrchu separovat některé geometrické izomery nebo diastereoizomery. Stacionární fáze na bázi grafitického uhlíku jsou někdy nanášeny na nosič na bázi zirkonia (C/ZrO_2) [139] nebo aluminy (C/Al_2O_3) [140]. Díky své vysoké teplotní stabilitě lze materiál využít ve vysokoteplotní kapalinové chromatografii [141]. Vyčerpávající popis vlastností PGC a možností využití přináší ve svém review West et al. [138].

1.8.6 Stacionární fáze na bázi polymerů

Další skupinou stacionárních fází používaných ať už jako nosiče k navázání modifikátoru nebo přímo jako sorbentu, jsou polymerní materiály jejichž základ je většinou tvořen polystyren – divinylbenzenovým kopolymerem. Výhodou těchto materiálů je vysoká stálost v širokém rozmezí pH a absence silanolových skupin, na druhé straně mezi zásadní nevýhody limitující jejich použití patří bobtnavost a nízká mechanická stabilita [142]. Masivnímu rozšíření brání i špatná chromatografická účinnost [142] a hlavní užití nalézají zejména v oblasti přípravy vzorků jako sorbenty pro SPE extrakce.

1.9 Moderní trendy v kapalinové chromatografii

V posledních 10-15 letech lze v oblasti kapalinové chromatografie zaznamenat velký rozvoj, jehož hlavní hybnou silou je zejména farmaceutický průmysl. Pokud shrneme některé nové směry, kterými se ubírá kapalinová chromatografie, tak hlavní snahou je zejména zkrácení času nezbytného pro analýzu, zmenšení celkového měřítka analýz vyplývajícího z potřeby snižování množství vzorku potřebného k analýze, zlepšení stability stacionárních fází v extrémních podmínkách, zvýšení účinnosti kolon a hledání stacionárních fází s odlišnou selektivitou oproti nejběžnějšímu používanému materiálu, jímž je silikagel (ev. silikagel s chemicky vázaným oktadecylem). Cílem je dosažení účinné separace tak, aby bylo možné v rámci jedné analýzy stanovovat komplexní směsi látek v krátkém čase, bez nutnosti komplikované pre-analytické přípravy vzorku či nutnosti analyzovat jeden vzorek několika různými metodami. Svou roli hraje i snižování nákladů a využívání technologií šetrných k životnímu prostředí. Ucelený přehled moderních trendů v bioanalýze s využitím chromatografických metod podávají například tyto práce [143-144]. V současné době je otevřen obrovský prostor pro invence v oblasti chromatografické instrumentace zejména díky moderním technologiím jako je nanotechnologie, mikrofluidika nebo technologie mikroobrábění (microfabrication) [145-148]. Tyto technologie umožňují miniaturizaci celého chromatografického systému z čehož vyplývá možnost snižování objemů vzorků i činidel, výrazného snížení doby analýzy a v neposlední řadě i rozměrů chromatografické instrumentace.

Pokud budeme chtít zkrátit celkový čas analýzy, můžeme toho docílit několika způsoby. Nejjednodušším způsobem je zkrácení délky chromatografické kolony a zvýšení průtoku mobilní fáze. Tento přístup ovšem není zcela optimální u klasických kolon s d_p sorbentu 3-5 μm , vzhledem ke ztrátě rozlišení chromatografické separace. Částečně je tento problém řešen spojením LC/MS a LC/MS/MS, kde je zhoršení rozlišení píků při separaci nahrazeno zvýšenou selektivitou detekce, ale i tak není tento postup vhodný pro analýzu vzorků v komplikovaných maticích. Z tohoto důvodu byly zavedeny v LC některé nové technologie, které budou podrobněji diskutovány dále. Ještě před tím, zde však bude uvedeno několik základních vztahů, které usnadní pochopení vlivu vybraných parametrů na zlepšování účinností separace a zkracování času analýz.

Výpočet **selektivity a retenčního faktoru**. Ve vztahu pro výpočet selektivity (α) jsou retenční faktory látky 1 a látky 2 ($t_{r1} < t_{r2}$) označeny jako k_1 a k_2 . Ve vztahu pro výpočet retenčního faktoru (k) jsou uvedeny retenční čas látky (t_r) a mrtvý retenční čas (t_M):

$$\text{Rovnice 2. a 3} \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad k = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

Následující vztah umožňuje výpočet **rozlišení** mezi dvěma sousedními chromatografickými píky, kde je počet teoretických pater (N), selektivita (α), retenční faktor (k):

$$\text{Rovnice 4.} \quad R_s = \frac{\sqrt[2]{N}}{4} \frac{k}{k+1} \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

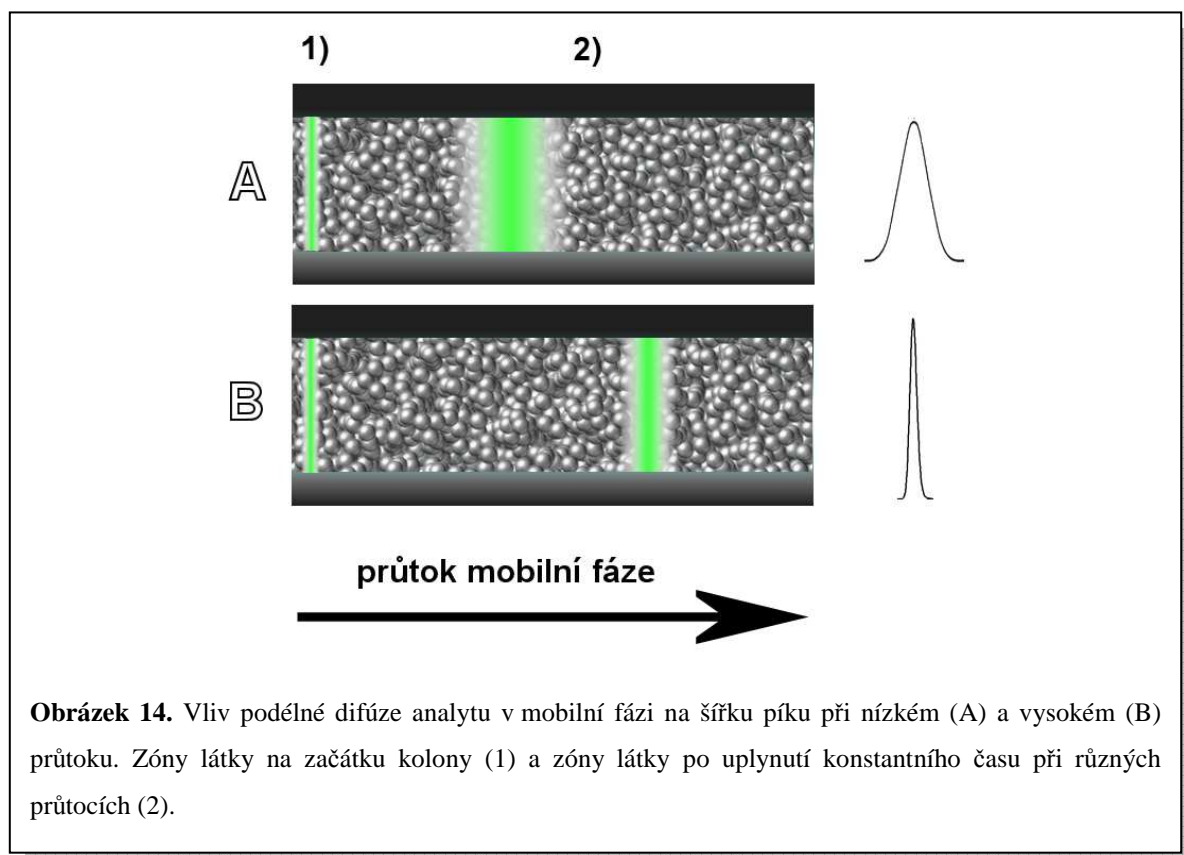
Vztah mezi počtem teoretických pater (N) výškovým ekvivalentem teoretického patra (**HETP**) a délkou kolony (L) a vztah pro výpočet lineární rychlosti mobilní fáze (u):

$$\text{Rovnice 5. a 6} \quad N = \frac{L}{\text{HETP}} \quad u = \frac{L}{t_M}$$

Jednou z možností jak objektivně posuzovat separační účinnost kolony a postihnout různé faktory ovlivňující separaci je prostřednictvím **výškového ekvivalentu teoretického patra - HETP** (Height Equivalent to a Theoretical Plate), který je definován van Deemterovým vztahem (*Rovnice 7*) [18]. Van Deemterova rovnice udává vztah mezi výškovým ekvivalentem teoretického patra **HETP**, lineární rychlosti mobilní fáze (u), průměrem částic stacionární fáze (d_p) a difúzním koeficientem (D_M) analytu. Ve vztahu dále figuruje konstanta λ vztahující se k homogenitě náplně kolony, konstanta γ vztahující se k omezení difúze vlivem náplně kolony, konstanta c jež se vztahuje k retenčnímu faktoru látky a konstanta ω vztahující se k morfologii náplně kolony (tvar částic, velikost pórů, distribuce velikosti apod.).

$$\text{Rovnice 7.} \quad \text{HETP} = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{c\omega d_p^2 u}{D_M}$$

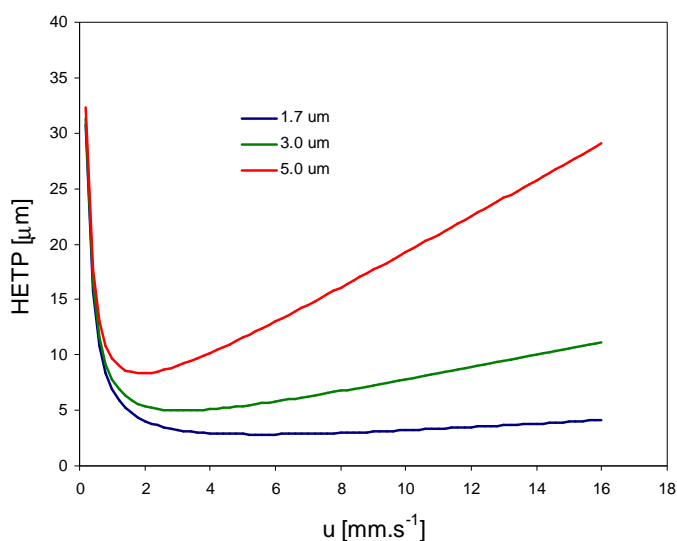
Rovnice se skládá ze součtu tří členů ovlivňujících HETP. **První člen** se vztahuje k příspěvku vířivé difúze. Tento člen není závislý na lineární rychlosti mobilní fáze, ale vyjadřuje vliv velikosti částic sorbentu a kvalitu naplnění kolony. S klesající velikostí částic a rostoucí homogenitou náplně se příspěvek tohoto členu snižuje. Vliv na šířku píku je demonstrován na *Obrázku 17*. v *Kapitole 1.9.2* pojednávající o sub-2- μm částicích a UHPLC. **Druhý člen** postihuje závislost na podélné difúzi analytu v mobilní fázi (*Obr. 14*) a jeho velikost je nepřímo úměrná lineární rychlosti mobilní fáze. Dále je ovlivněn viskozitou mobilní fáze, teplotou a molekulovou hmotou analytu. Při běžně používaných průtocích je tento člen zanedbatelný vlivem nízké rychlosti difúze analytů v kapalném prostředí vzhledem k rychlosti mobilní fáze. **Třetí člen** pak vyjadřuje vztah HETP k odporu proti přenosu hmoty mezi mobilní a stacionární fází s přímo úměrnou závislostí na lineární rychlosti mobilní fáze. Mimo toho je ovlivněn velikostí difúze analytu, viskozitou mobilní fáze, porozitou a morfologií stacionární fáze, teplotou a retenčním faktorem látky.



Obrázek 14. Vliv podélné difúze analytu v mobilní fázi na šířku píku při nízkém (A) a vysokém (B) průtoku. Zóny látky na začátku kolony (1) a zóny látky po uplynutí konstantního času při různých průtocích (2).

Jak vyplývá z uvedených vztahů, tak pokud budeme chtít zlepšit rozlišení dvou píků (*Rovnice 4*) můžeme tak učinit hned několika způsoby:

1) **Zvýšením počtu teoretických pater kolony**, čehož lze dosáhnout buď použitím delší kolony (*Rovnice 5*), nebo snížením výškového ekvivalentu teoretického patra - HETP. Jak vyplývá z van Deemterova vztahu (*Rovnice 7*) HETP se snižuje se snižováním lineární rychlosti mobilní fáze (pouze do určité hodnoty, poté opět prudce vzrůstá), zmenšováním průměru částic stacionární fáze a zlepšením transferu analytu mezi mobilní a stacionární fází. Změna HETP v závislosti na lineární rychlosti mobilní fáze a velikosti částic (d_p) je demonstrována na *Obrázku 15*. Z tohoto obrázku jasně vyplývá, že se snižováním průměru velikosti částic se snižuje HETP což přináší zlepšení rozlišení. Výrazným způsobem se také s klesající velikostí d_p snižuje závislost HETP na lineární rychlosti mobilní fáze. Z toho plyne zásadní výhoda v možnosti zvyšování průtoku mobilní fáze kolonou a snižování času analýzy, bez kompromisního omezení rozlišení. Obou těchto výhod využívá zejména UHPLC, která bude podrobněji zmíněna v *Kapitole 1.9.2*.

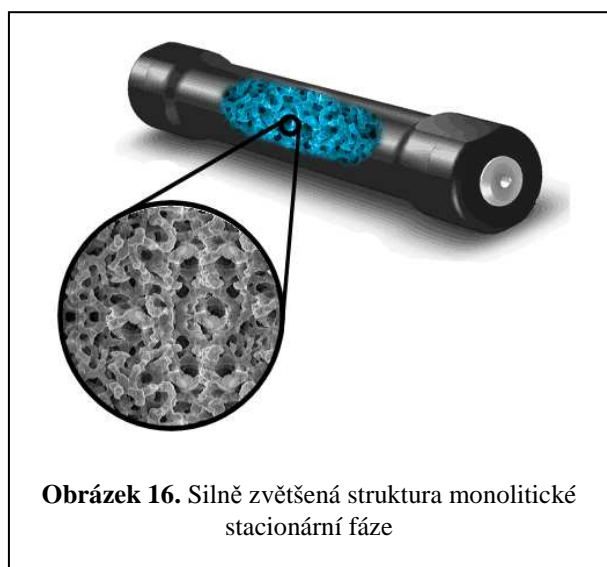


Obrázek 15. Závislost velikosti výškového ekvivalentu teoretického patra HETP na lineární rychlosti průtoku mobilní fáze a na velikosti částic stacionární fáze. Křivky byly modelovány na základě *Rovnice 7* v programu Excel.

2) **Změnou selektivity (α) nebo změnou retence (k).** Oba uvedené parametry jsou závislé na chemických interakcích sledovaných látek se stacionární a mobilní fází a lze je tedy ovlivnit např. složením mobilní fáze (organický modifikátor, pufr, iontově párová činidla), chemismem stacionární fáze nebo teplotou při separaci.

1.9.1 Monolitické kolony

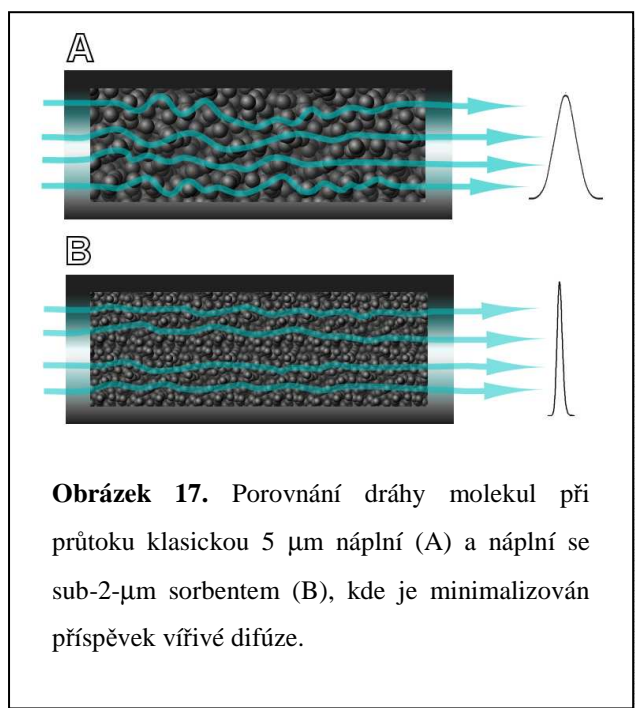
Přestože první experimenty s využitím monolitických kolon pro separaci probíhaly již na přelomu 80. a 90. let 20. století [149-151], první komerčně vyráběné kolony tohoto typu se na trhu objevily až po roce 2000 [152]. Náplň kolon je vyrobena z jednoho kusu sorbentu tzv. monolitu který může být tvořen silikagelem, silikagelem s chemicky vázanou stacionární fází nebo materiálem na bázi organického polymeru



jako je polymethyl-methakrylát, polystyren-divinylbenzen, polyakrylamid [153-154], popsány jsou i pokusy o přípravu monolitů na bázi grafitického uhlíku [131, 155], zirkonia [129, 131] a titania [156]. Materiál monolitu je tvořen vysoce porézní strukturou obsahující dva typy pórů, tzv. makropóry a mezopóry [131]. Zatímco makropóry tvořící síť kanálků propojených napříč celým monolitem se svojí průměrnou velikostí v řádu jednotek mikrometru poskytují dostatečnou permeabilitu pro vysoký průtok mobilní fáze, mezopóry, které jsou velké pouze okolo 10 nm poskytují dostatečně velký povrch pro účinný přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází [131]. Díky vysokému průtoku mobilní fáze na koloně, až do $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, je možné zkrácení analýzy 5-10x oproti klasickým kolonám [153] a doba analýzy může dosahovat nízkých hodnot v řádu několika jednotek až desítek vteřin dle povahy vzorku [157-158], při účinnosti separace srovnatelné s $3,5 \mu\text{m}$ náplní klasických částicových kolon [153]. Kolony našly uplatnění v oblasti „vysokoprostupných“ (high-throughput) analýz ve farmaceutickém průmyslu, separaci enantiomerů a komplexních biologických vzorků [153]. Nejčastěji používaným materiálem monolitických kolon je silikagel [159]. Nevýhodou monolitických kolon je omezený výběr chemicky vázaných stacionárních fází, omezená životnost při vysokých tlacích a při $\text{pH} > 7$ [159]. Kvůli vysokým průtokům mobilní fáze není metoda příliš vhodná pro spojení s hmotnostním detektorem. Problematikou užití monolitických stacionárních fází v bioanalýze se zabývá např. práce [160].

1.9.2 Sub-2- μm sorbenty a extrémně účinná kapalinová chromatografie

Extrémně účinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography – UHPLC) využívá jedné z možností jak zvýšit účinnost separací, zlepšit rozlišení a snížit jejich závislost na lineární rychlosti mobilní fáze, kterou je zmenšení průměru částic stacionární fáze. Tento efekt je umožněn zlepšením přenosu hmoty mezi stacionární a mobilní fází a zmenšením vířivé difúze. Až do roku 2004 se v analytické chromatografii běžně používaly sorbenty s velikostí částic 3-5 μm , poté byly na

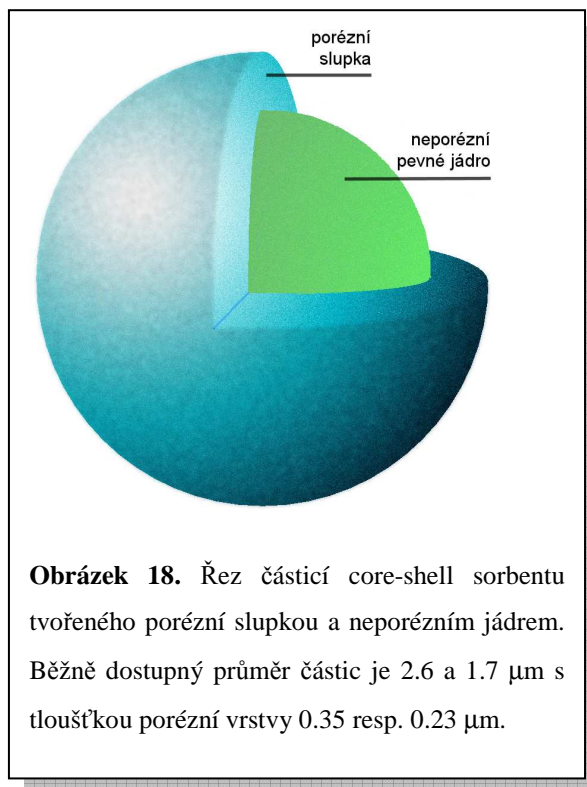


Obrázek 17. Porovnání dráhy molekul při průtoku klasickou 5 μm náplní (A) a náplní se sub-2- μm sorbentem (B), kde je minimalizován příspěvek vířivé difúze.

trh uvedeny tzv. sub-2- μm sorbenty s průměrem částic 1,7 μm , které umožnily docílit velmi vysokých separačních účinností a dramatického snížení času nutného k analýze vzorku [159, 161]. V některých případech bylo možné užitím sub-2- μm sorbentů snížit čas analýzy až 20x ve srovnání s klasickou náplní 5 μm částicemi, při zachování stejné selektivity, kapacity i účinnosti separace. Snížení velikosti částic však vede k nárůstu tlaku na koloně a tyto nové sorbenty vyžadovaly vývoj nové generace kapalinových chromatografů schopných pracovat při tlacích až 120 MPa, přičemž limit konvenčních HPLC je okolo 40 MPa. Vyšší tlak v chromatografickém systému však nebyl jediným důvodem pro vývoj nové instrumentace, spolu se zrychlením analýz bylo nutné vyřešit nástřik vzorku za vysokého tlaku, zvýšit rychlost nástřiku a akviziční rychlost detektorů, zlepšit přesnost pump pro gradientové eluce a snížit veškeré mrtvé objemy pro zachování vysokého rozlišení separace. Lze očekávat, že UHPLC se již v brzké době stane standardem v kapalinové chromatografii stejně, jako se před několika dekádami stala HPLC. Mezi další výhody využití sub-2- μm sorbentů, které nebyly zmíněny výše, patří například velký výběr chemicky vázaných stacionárních fází. Občas se lze v literatuře setkat s označením tohoto typu chromatografie zkratkou UPLC (Ultra-performance Liquid Chromatography). Jedná se však o obchodní patentově chráněný název, kde vlastníkem práv je firma Waters.

1.9.3 Core – shell sorbenty

Zásadním problémem při snižování velikosti částic sorbentu je nárůst tlaku na chromatografické koloně který roste s reciprokou hodnotou druhé mocniny průměru částic. Snížení průměru částic na polovinu znamená tedy čtyřnásobný nárůst tlaku. Tento problém lze částečně řešit využitím tzv. „core-shell“ sorbentů [144, 162]. Částice tvoří neporézní jádro pokryté porézní vrstvou sorbentu, která je silná zpravidla 0,35 nebo 0,23 μm . Díky sníženým difúzním vzdálenostem [163] analytů dosahují tyto kolony při průměru částic 2,6 μm podstatně lepších účinností než kolony s 3 μm částicemi a účinností se



Obrázek 18. Řez částicí core-shell sorbentu tvořeného porézní slupkou a neporézním jádrem. Běžně dostupný průměr částic je 2,6 a 1,7 μm s tloušťkou porézní vrstvy 0,35 resp. 0,23 μm .

blíží separacím na sub-2- μm částicích, při tlacích umožňujících práci na konvenčních chromatografických systémech s limitem 40-60 MPa. „Core-shell“ sorbenty se vyrábějí většinou s průměry 2,6 nebo 1,7 μm .

Při použití „core-shell“ sorbentů na konvenčních systémech je nutné minimalizovat veškeré mrtvé objemy, tzn. využívat spojovacích kapilár s menším průměrem a nízkoobjemových detekčních cel. Nevýhodou kolon s tímto typem částic je snížená kapacita vzhledem k menšímu celkovému objemu stacionární fáze a tedy nutnost pracovat s menšími objemy nástřiků a nižšími koncentracemi látek ve vzorku. Porovnání kolon plněných „core-shell“ sorbentem s kolonami se sub-2- μm částicemi a jejich využití při farmaceutickém screeningu je diskutováno například v práci Fekete et al. [164].

1.9.4 Využití vysoké teploty při separaci

První experimenty se separací látek za vyšších teplot byly prováděny již v 60. letech 20. století [165], nicméně pozornost se k této problematice vrací až v poslední dekádě a to zejména díky novým typům sorbentů odolných vůči vysokým teplotám [166] a pokrokům v instrumentaci. Jako „vysokoteplotní“ chromatografie (High Temperature Liquid Chromatography – HTLC) jsou většinou označovány separace při teplotách v rozmezí 40(60) – 200°C s mobilní fází v kapalném stavu [167-169]. Zvýšení teploty na chromatografické koloně umožňuje snížit viskozitu mobilních fází a tím získat prostor pro vyšší průtoky, aniž by byl dosažen tlakový limit chromatografického systému. Dále se zvyšují difúzní koeficienty solutů, což vede ke zlepšení transferu hmoty mezi stacionární a mobilní fází [159].

Tyto efekty společně umožňují využít menších částic, či delších kolon a zvýšit tak účinnost separace, či výrazně zkrátit čas analýzy při zachování dostatečného rozlišení. Mezi další výhody patří snížení obsahu organických rozpouštědel v mobilní fázi, zlepšení tvaru píků bazických látek [170], možnost ovlivnění selektivity [171] či využití čisté vody jako mobilní fáze při velmi vysokých teplotách [125-128, 159, 172]. Metoda je vhodná i ke spojení s hmotnostní spektrometrií. O kombinaci HTLC-MS a jejím využití ve farmaceutické analýze pojednává například Heinisch et al. [173].

Limitem této techniky může být stabilita použité stacionární fáze, nicméně jak již bylo uvedeno, v dnešní době jsou k dispozici moderní sorbenty s modifikovaným silikagelem [174], sorbenty na bázi oxidů kovů IV. skupiny [125] případně porézního grafitického uhlíku [175] umožňující separace za teplot 100-200 °C. Zásadním limitem pro využití v bioanalýze je teplotní stabilita stanovovaných látek [176] a dostupnost technologie mimo akademická pracoviště.

1.10 Odběr biologického vzorku a jeho příprava před analýzou

Náročnost přípravy biologického vzorku k analýze je úměrná komplexnosti biologické matrice, ve které má být stanovení prováděno, požadovaných dolních koncentračních limitech stanovení (LOD, LLOQ) a počtu látek stanovovaných v rámci jedné metody. Celý analytický proces počíná odběrem vzorku a transportem vzorku do laboratoře, pokračuje přes jeho zpracování, vlastní separaci a detekci a je zakončen zpracováním naměřených dat. Ve všech výše uvedených bodech tohoto procesu je možné zanechat chybu a ovlivnit tak kvalitu výsledných dat.

1.10.1 Základní informace o vzorku

Základní informace, které je vhodné a v některých případech nutné znát před vývojem celé metody jsou následující:

Co chceme stanovit a v jakých formách? Na první pohled se může tento bod zdát jako zcela samozřejmý a triviální, nicméně ve své praxi jsem se setkal s tak bizarními požadavky zejména ze strany lékařů, že považuji za nutné zde ve zkratce uvést. Jde o specifikaci, zda je třeba stanovit pouze parentní látku, či i její metabolit/y. Pokud je třeba stanovit metabolity, pak vymezit jejich rozsah. Ne vždy je účelné ve studiích stanovit všechny v literatuře popsané metabolity, ať už pro jejich nízkou koncentraci, nepřítomnost v dané matici nebo nulový terapeutický či toxický potenciál. Pokud je látka ve vzorku přítomna ve více formách, je nutné specifikovat které formy se budou stanovovat, zda postačí stanovit jejich sumu, či zda je nutné kvantifikovat jednotlivá individua. Jako příklad můžou sloužit konjugáty léčiv s kyselinou glukuronovou, irinotecan a jeho metabolity ve formě karboxylátu a laktonu, metotrexát a jeho polyglutamáty, oxidovaná a redukovaná forma glutathionu a mnoho dalších.

V jakých koncentračních mezích se budou pohybovat stanovované látky? S tímto bodem souvisí především náročnost přípravy biologického vzorku a požadavky na chromatografickou separaci a detekci (velikost nástřiku, použití ultračistých rozpouštědel, využití selektivní detekce). Čím nižších koncentračních limitů je třeba dosáhnout, tím propracovanější musí být příprava vzorku, případně selektivita stanovení a tím větší nároky jsou také kladeny na čistotu používaných činidel.

V jaké matrici bude analyt přítomen? Vzhledem k obrovskému množství matric, se kterými se můžeme v bioanalýze setkat, patří tato informace ke zcela stěžejním. Jen v případě živočišného materiálu může být analýza prováděna např. v plné krvi, plasmě, séru, žluči, moči, stolici, potu, slinách, mateřském mléce, cerebrospinální tekutině, erythrocytech, periferních mononukleárních krevních buňkách, homogenátech tkání a mnoha dalších a každá z těchto matric je zcela specifická svým složením a vyžaduje rozdílný přístup při přípravě vzorku a vývoji chromatografické metody. Opět zejména mezi lékaři často rozšířený mýtus, že jednou zavedená metoda, např. pro stanovení v plasmě je univerzální pro všechny další matrice.

Jaké množství vzorku bude k dispozici? Tento bod je důležitý hlavně při stanovení nízkých koncentrací, kdy je třeba vzorek při přípravě zakoncentrovat, případně v neonatologii, kde obecně nejsou k dispozici velké objemy vzorků.

Mimo těchto základních informací bychom měli zjistit údaje o stabilitě analytů, zejména z hlediska fotostability, termální odolnosti, citlivosti na změnu pH, náchylnosti k oxidaci na vzduchu nebo působením některých činidel běžně používaných při přípravě vzorku, apod.

1.10.2 Odběr a uchování vzorku před analýzou

Nedílnou součástí celého analytického procesu je odběr biologického materiálu a jeho uchování před analýzou. Špatný odběr a skladování mohou nepříznivě ovlivnit kvalitu výsledných dat. Je na analytikovi/farmakologovi, aby poskytl údaje o správném postupu odběru a uchování vzorku.

Je třeba specifikovat zejména denní dobu odběru, vzhledem k cirkadiálním rytmům pozorovaným při biotransformaci některých léčiv. Specifikovat zda má být odběr proveden nalačno či po jídle, v jakém čase/časech po podání léčiva apod. Dále musí být určen typ nádoby pro odběr vzorku, zda má obsahovat antikoagulant a jaký, zda má být světlotěsná, apod.

Nedílnou součástí protokolu musí být specifikace teploty při transportu (pokojová teplota, 4°C, suchý led, tekutý dusík), požadavky na světlotěsný obal a rychlost transportu do laboratoře při zadaných podmínkách. Vždy je třeba pamatovat, že jakýkoliv invazivní odběr vzorku je spojen se stresem pacienta, který může ovlivnit koncentrace určitých látek v systémovém oběhu jako např. některých hormonů, glukózy, insulínu apod.

1.10.3 Příprava biologického vzorku před analýzou

Příprava biologického vzorku do formy vhodné pro analýzu kapalinovou chromatografií má zásadní vliv na kvalitu získaných dat, ať už po stránce kvalitativní či kvantitativní. Musíme si uvědomit, že analyzované látky jsou ve vzorku většinou přítomny v minoritním zastoupení v přítomnosti konstituentů biologické matrice, které jsou často v několikařádovém nadbytku a mnohé z nich přímo interferují se stanovením. Na úpravu vzorku lze v zásadě pohlížet ze dvou úhlů:

1. Převedení analytu/ů do formy kompatibilní s instrumentací, odstranění interferujících látek či zakoncentrování vzorku (odstranění matrice nebo její části).
2. Zlepšení vlastností pro separaci či detekci (derivatizační reakce analytů).

Z pohledu bodu č.1 ideální příprava vzorku zcela **odstraňuje nepotřebné či problematické složky matrice** zatímco v maximální míře zachovává obsah sledovaného analytu. Z pohledu bodu č. 2 je ideální taková **derivatizační reakce**, která probíhá v minimálním počtu kroků, deriváty jsou stabilní, reakcí vzniká definované chemické individuum a derivatizační činidlo je levné, stabilní, snadno dostupné a s vyhovující čistotou. Derivatizace mohou probíhat v „*pre-column*“, „*on-column*“ a „*post-column*“ formátu. Blíže o derivatizacích a jejich využití v kapalinové chromatografii pojednávají např. tyto práce [177-183]. Přehled derivatizačních reakcí využívaných v LC/MS analýze lze získat např. zde [184-187].

Součástí úpravy vzorku může být i uvolnění analytu z matrice v případě, že je vázán v konjugované formě (glukuronid, sulfát, apod.) či na proteiny. V bioanalýze malých molekul jsou nejběžněji odstraňovanými složkami vysokomolekulární látky např. proteiny a dále lipidické složky vzorku, jejichž přítomnost může interferovat se stanovením, ale hlavně svoji adsorpcí na koloně snižovat účinnost a kvalitu separace. V některých případech je možné provádět **přímý nástřik vzorků**. Jedná se zejména o matrice, kde je podíl balastních látek zanedbatelný, případně neinterferují se stanovením a nesnižují životnost instrumentace, včetně kolon. Tento přístup je však v bioanalýze spíše výjimečný a používá se v některých případech například pro moč nebo žluč. I v případě přímého nástřiku je však třeba minimálně provést odstředění nebo filtraci vzorku k zamezení průniku pevných částic do chromatografického systému.

Přes všechny pokroky v analytické instrumentaci, příprava vzorků, hlavně těch s komplikovanými maticemi je stále úzkým hrdlem celého analytického procesu. Vyčerpávající výčet možností úpravy vzorků před analýzou podávají práce [188-190]. V této kapitole budou diskutovány pouze běžnější postupy v bioanalýze malých molekul s důrazem na některé moderní trendy.

1.10.4 Deproteinace

Pravděpodobně nejjednodušším z postupů úpravy vzorku je deproteinace. Principem metody je buď denaturace bílkovin a jejich vysrážení z roztoku, nebo mechanické odstranění ultrafiltrací případně dialýzou. Zároveň s denaturací dochází i k uvolnění některých látek z vazby na protein. K denaturaci lze použít působení fyzikálních či chemických vlivů. Jako fyzikální postup deproteinace se využívá například **působení teploty** (90-100 °C). Při použití teploty může být limitem termická stabilita stanovovaných látek. Ultrafiltrace či dialýza zase diskriminuje část analytu navázaného na proteiny. Tohoto efektu lze však účelně využít například při stanovení volné frakce léčiva. Při použití ultrafiltrů je třeba ověřit, zda nedochází k adsorpci lipofilních analytu/ů na materiál membrány, jak jsme například pozorovali u metotrexátu nebo barviva Rhodamin 123. V tomto případě je lepší využít rovnovážné dialýzy [191].

Činidla používaná pro chemickou denaturaci lze rozdělit do několika skupin. Při **deproteinaci kyselinami** dochází k tvorbě nerozpustné soli s kationickou formou bílkovin. Mezi běžně používaná kyselá činidla patří kyselina trichloroctová, sulfosalicylová, chloristá, metafosforečná a wolframová. Precipitaci je vhodné provádět za snížené teploty okolo 5°C [192]. **Deproteinace solemi kovů** využívá opět tvorby nerozpustné soli, avšak oproti deproteinaci kyselinami tvoří bílkoviny anionickou část. K deproteinaci se využívá nejčastěji roztoků síranu zinečnatého, případně měďnatého, někdy ve směsi s organickým rozpouštědlem jako je methanol. **Deproteinace organickými rozpouštědly** využívá snížení rozpustnosti bílkovin v málo polárním prostředí vznikajícím po přidání činidla. K tomuto účelu je využíváno např. přídavku methanolu, acetonitrilu, acetonu či jejich směsi. Mezi nepřilíš běžné způsoby deproteinace patří **vysolování** např. nasyceným roztokem síranu amonného, nicméně tento způsob je pro odstranění bílkovin málo efektivní.

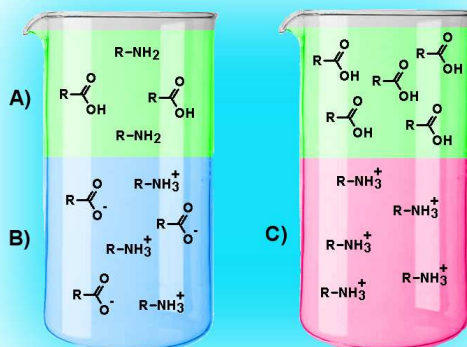
Novější implementace deproteinačních technik využívají **precipitačních destiček** (Protein Precipitation Plates) v 96 jamkovém uspořádání [193]. Destičky jsou tvořeny jamkami pro vzorek na jejichž dně je umístěna fritra, kterou je vzorek po vysrážení přefiltrován [190]. Využití precipitačních destiček umožňuje jak zlepšení přesnosti a správnosti analýz, tak značnou úsporu času při přípravě vzorku. Nevýhodou použití těchto destiček může být nespecifická adsorpce analytu na materiál frity [190].

Výhodou deproteinace je rychlá a levná příprava vzorku. Je často používána jako metoda první volby při vývoji metody. Mezi nevýhody tohoto postupu patří nedokonalé odstranění bílkovin, fosfolipidů, případně některých dalších interferentů, ředění vzorku deproteinačním činidlem a nemožnost vzorek zakoncentrovat, na rozdíl od SPE a L-L extrakce, jak bude uvedeno dále. Při použití organických rozpouštědel pro deproteinaci vadí při RPLC i vysoký obsah rozpouštědla, které je nutné odpařit. Dalším rizikem je nekompatibilita použitého činidla se stanovovaným analytem (rozklad, esterifikace methanolem, apod.) či okluze části vzorku/analytu v nehomogenním precipitátu v případě volby špatného postupu. Z výše uvedených důvodů je metoda deproteinace někdy kombinována s dalšími postupy nebo nahrazována jinými technikami (viz. dále).

1.10.5 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce kapalina-kapalina (LLE) patří mezi další často využívané postupy přípravy vzorku. Principem je rozdělování analytu na základě svých fyzikálně-chemických vlastností mezi dvě nemísitelné kapalně fáze lišící se polaritou, zpravidla vodnou a organickou. Organickou fází může tvořit jedno či více rozpouštědel ve směsi. Její výběr závisí na typu látky, kterou je třeba izolovat od interferentů přítomných ve vzorku. Poměr koncentrace látky v organické a vodné vrstvě je nazýván rozdělovací koeficient $P = C_{\text{org}}/C_{\text{w}}$. Selektivitu, či výtěžnost extrakce lze pro látky mající acidobazický charakter zvýšit úpravou pH.

Organické látky acidobazického charakteru se ve vodné fázi nalézají v ionizované či neutrální formě, dle jejich disociační konstanty (K_d), jak je demonstrováno na *Obrázku 19*. V prvním případě znázorněném na *Obrázku 19* přechází do organické vrstvy jak analyt tak interferent, přičemž kvůli disociaci ve vodné fázi je výtěžnost analytu nízká. Po okyselení vodné vrstvy je potlačena disociace analytu a zvýšena ionizace interferentu, což vede jak ke zvýšení výtěžku extrakce, tak ke zlepšení selektivity díky tomu, že interferent zůstává ve vodné fázi. Příklad je symetrický jak pro bazický analyt, tak pro extrakci nepolárního interferentu a zachování polárního analytu ve vodné fázi.



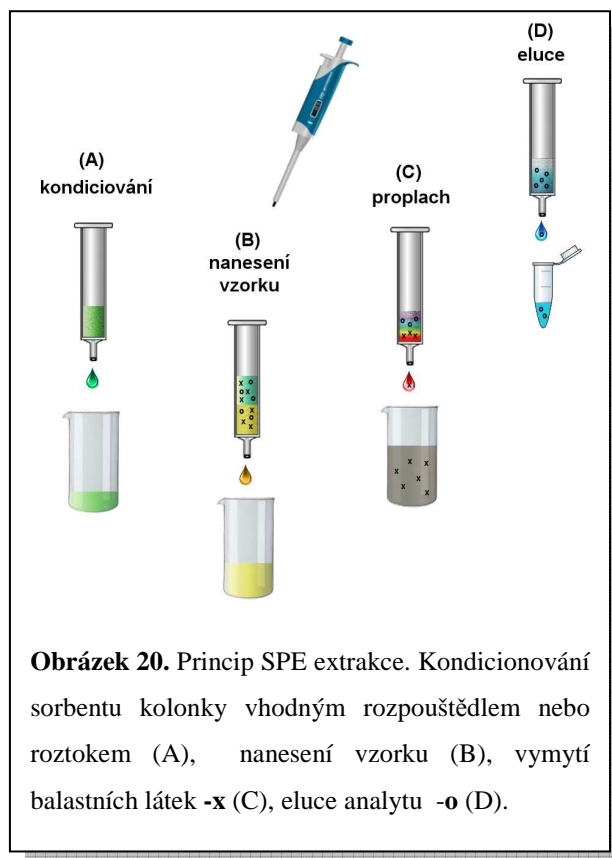
Obrázek 19. Princip extrakce kapalina-kapalina. Organická vrstva (A - žlutě), vodná vrstva (B - modře), vodná vrstva po oxyselení (C - červeně). Analyt je reprezentován látkou $R-COOH$ kyselého charakteru, interferent je reprezentován látkou $R-NH_2$ bazického charakteru.

Z organického extraktu musí být před nástřikem na RP kolonu nejprve odpařeno rozpouštědlo a extrakt musí být rekonstituován v rozpouštědle kompatibilním s použitou mobilní fází. Tento krok zároveň umožňuje zakoncentrování vzorku. Mezi výhody LLE patří snadnost provedení a nízká cena. Při jejím použití je nezbytně nutné používat přídavek vnitřního standardu. Mezi nevýhody LLE organickými rozpouštědly patří zejména špatná selektivita a nízká výtěžnost pro polární analyty, tvorba emulsí, malé možnosti automatizace či velká spotřeba rozpouštědel často vysoce toxických (halogenovaná rozpouštědla).

Mezi modifikace LLE patří například **SALLE (Salting-out Assisted LLE)** [190, 194] využívající snížení rozpustnosti látky ve vodné vrstvě přídavkem anorganické soli. Dalším novějším přístupem je **dispersivní mikroextrakce kapalina-kapalina** (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction – DLLME) [195-196]. Mezi trendy posledních let patří využití **iontových kapalin** (ionic liquids) v separačních technikách [197]. Iontové kapaliny jsou nejčastěji tvořeny objemným nesymetrickým organickým kationtem s organickou či anorganickou aniontovou částí. Díky svým vlastnostem jako je dobrá termická stabilita, nehořlavost, nízká tenze par, polarita a hydrofobicita lze očekávat jejich rozšíření při přípravách vzorků pomocí L-L extrakce [197-200], zejména u polárních analytů, které nelze klasickými organickými rozpouštědly extrahovat kvůli velkému rozdílu v polaritě. Nevýhodou bránící jejich masivnějšímu využití je v současné době jejich velmi vysoká cena.

1.10.6 Extrakce kapalina – pevná látka

Tento druh extrakce je běžně znám pod označení **SPE extrakce** z anglického **Solid Phase Extraction** a využívá podobných principů jako kapalinová chromatografie. SPE umožňuje nejen odstranění nežádoucích součástí matrice, ale i zakoncentrování vzorku. SPE procedura se ve většině případů skládá z následujících kroků: kondicionace sorbentu, nanesení vzorku s obsahem vnitřního standardu, promytí a eluce analytu/ů (Obr. 20). Principem SPE extrakce je selektivní zachycení analytu pevným sorbentem a vymytí balastních látek při promývacím kroku. U látek majících acidobazický charakter lze opět



Obrázek 20. Princip SPE extrakce. Kondicionování sorbentu kolonky vhodným rozpouštědlem nebo roztokem (A), nanesení vzorku (B), vymytí balastních látek -x (C), eluce analytu -o (D).

využít potlačení, nebo zvýšení ionizace úpravou pH a ovlivnit tak interakce analytů/interferentů se sorbentem. Po promytí jsou analyty z SPE sorbentu uvolněny vhodným elučním činidlem.

V případě použití organického elučního činidla a RP chromatografie, musí být organické rozpouštědlo odpařeno a vzorek rekonstituován ve vhodném roztoku kompatibilním s použitou mobilní fází. Použití SPE kolonek s náplní HILIC v kombinaci s RPLC sebou přináší výhodu možnosti přímého nástřiku eluátu do chromatografického systému bez nutnosti odpařování, vzhledem k tomu, že použité eluční činidlo je v tomto případě tvořeno vodou (pufrem) bez obsahu, případně s nízkým obsahem organické složky. Extrakce je možné provádět v několika formátech při využití extrakčních kolonek, 96 jamkového formátu, SPE disků či ve formátu pro dispersivní SPE. V současné době je SPE pravděpodobně jednou z nejpoužívanějších technik úpravy vzorku, za což vděčí velkému výběru různých typů sorbentů, dobré reprodukovatelnosti extrakcí a univerzálnosti. Běžně dostupné formáty SPE pracují s reverzní fází, normální fází / HILIC, ionexy, se sorbenty se smíšenou retenční charakteristikou (mixed-mode) a s grafitickým uhlíkem.

Zajímavé možnosti přináší i využití hydrofilně-lipofilních sorbentů (hydrophilic-lipophilic balanced – HLB), které díky zabudované polární funkční skupině mají dobrou smáčivost i pro vodné roztoky a navíc poskytují rozšířenou selektivitu pro hydrofilní látky. Oproti L-L extrakci má SPE výhodu zejména v možnosti extrahovat daleko širší škálu látek pokud jde o jejich polaritu. Zatímco při použití L-L extrakce je izolace velmi polárních látek do organické vrstvy prakticky vyloučena, při užití SPE a volbě vhodného sorbentu je možné s dobrou výtěžností (recovery) zachytit na sorbentu i velmi polární analyty. Výhodou je i možnost automatizace. Mezi nevýhody SPE extrakce patří zdlouhavá příprava vzorku a cena.

Při SPE extrakci lze používat i odlišných postupů než při klasické SPE kdy je sorbent vázán na nosič a vzorek je tímto sorbentem protlačován. Mezi tyto postupy patří například MSPD (Matrix solid-phase dispersion) [201], kdy je sorbent dispergován v matrici vzorku. Mezi modifikace MSPD patří **dispersivní SPE (dSPE)** [190] známá také jako metoda QuEChERS (Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe). Tato metoda kombinuje metodu LLE ev. SALLE (Kap. 1.10.5) s SPE extrakcí interferentů na částicích sorbentu dispergovaných v oddělené organické fázi obsahující analyt.

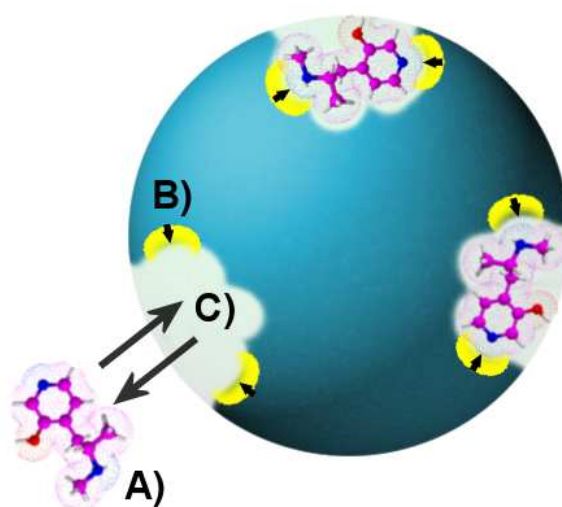
Vybrané SPE sorbenty jsou též v několika posledních letech dostupné ve formě **náplně pipetovacích špiček** (disposable pipette extraction - **DPX**). Přečištění vzorku a jeho zakoncentrování lze tedy provádět jednoduše v malém měřítku a bez nutnosti dalšího vybavení. Jejich hlavní využití lze například spatřit při odstranění fosfolipidů z biologických vzorků na ZrO₂ sorbentu před LC-MS analýzou. Již delší dobu je také dostupná mikroextrakce na tuhé fázi (Solid Phase Microextraction – **SPME**), avšak tato metoda našla využití spíše v oblasti GC.

V posledních letech je velký důraz kladen na minimalizaci matričních efektů v LC-MS analýze, které jsou často způsobeny fosfolipidy přítomnými v biologické matrici. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda **hybridní SPE extrakce** [202-203] využívající kombinace deproteinace vzorku okyseleného roztokem organického rozpouštědla (methanol, acetonitril) společně s SPE extrakcí na zirkoniových částicích, které díky kyselým Lewisovským centrům na svém povrchu interagují s fosfátovou částí fosfolipidů a odstraňují je tak z roztoku. Formát je obdobný jako u precipitačních destiček (Kap. 1.10.4), avšak s tím rozdílem, že pod filtrační fritou je navíc vrstva sorbentu na bázi ZrO₂.

1.10.7 Molekulárně vtištěné polymery

Jedním z nejdůležitějších požadavků při přípravě vzorku v bioanalýze je vysoká selektivita pro cílové analyty. V tomto směru byl učiněn velký pokrok s nástupem **molekulárně vtištěných polymerů** (Molecularly Imprinted Polymers – MIP) [204-206] použitých jako sorbentů při SPE. MIP sorbenty využívají obdobných rekogničních mechanismů se kterými se můžeme setkat v biologii, jako při interakcích enzym-substrát nebo antigen-protilátka, z čehož plyne jejich vysoká selektivita.

Tyto materiály jsou syntetizovány ze směsí polyfunkčních monomerních jednotek a cílového analytu, se kterým tyto jednotky nekovalentně interagují. Po polymeraci monomerů je cílová molekula z materiálu vymyta a v polymerní matrici zůstávají volné kavity s charakteristickými vazebnými místy. Výsledný produkt má vysokou rozpoznávací schopnost pro strukturně příbuzné látky, které je schopen s velkou výtěžností a selektivitou izolovat z komplikované směsi. Nevýhodou je v současné době limitované množství MIP, pouze pro malý počet vybraných skupin látek.



Obrázek 21. Molekulárně vtištěný polymer. Molekula analytu (A), která selektivně interaguje s funkčními skupinami (B) na povrchu kavity (C).

Moderním trendem poslední doby je využití **nanočástic při SPE** extrakcích [207-208], například při přechodu k menším měřítkům analýz a při použití v mikrofluidních zařízeních [209-211].

1.11 Vývoj chromatografické metody

V předchozích kapitolách byly stručně popsány běžné typy detektorů, stacionárních fází, mechanismy retence látek na vybraných fázích a některé z metod přípravy vzorku. Zbývá se tedy v krátkosti zmínit o vývoji vlastní separační metody.

Na počátku známe pouze cílové analyty a matici vzorku. Na základě struktury a fyzikálně-chemických vlastností analytů musíme navrhnout vhodný typ detekce a vhodný mód separace (RP, NP, HILIC, IEC, apod.). Dle typu chromatografie poté volíme iniciální složení mobilní fáze. Ta musí být kompatibilní s použitou stacionární fází a detekční technikou. Složení by mělo být voleno tak, aby byly maximalizovány interakce analyt - stacionární fáze.

Jedním z přístupů optimalizace separace může být tzv. **mapování retenčních časů** (retention mapping) [212]. V tomto případě se snažíme o získání souboru dat, který dostatečně vypovídá o retenčním chování sledovaných látek při provádění minimálního počtu experimentů. Získáme tak závislost retenčního chování látek i pro podmínky, které nebyly přímo testovány, avšak leží v experimentálně vymezených hranicích. Hledáním maxim těchto závislostí vzhledem k rozlišení získáme informaci o optimálních podmínkách separace. Důležité je správně odhadnout parametr/y, které mají klíčový vliv na změnu selektivity a rozlišení. Testovanými parametry jsou většinou: obsah organické složky mobilní fáze, koncentrace a typ pufru, pH, aditiva jako iontově párová činidla, teplota, průtok, typ stacionární fáze a další. Postup, kdy je testována vždy závislost pouze jednoho parametru („one-factor-at-the-time“ – OFAT) může být časově náročný a neefektivní, z tohoto důvodu se někdy využívá změny více parametrů v rámci jednoho experimentu a data jsou zpracovávána pomocí počítačem asistované optimalizace [213-215]. V případě jednoduchých závislostí lze využít k výpočtům tabulkových procesorů jako je Microsoft Excel nebo Calc. Pro složitější aplikace je k dispozici několik softwarových prostředků určených přímo k tomuto účelu [215-219].

Pro první experimenty v rámci optimalizace chromatografické separace připravíme roztok analytů v čistém rozpouštědle. Jak bylo uvedeno výše, z parametrů ovlivňujících separaci se snažíme nalézt takové, které mají rozhodující vliv na selektivitu separace. Při optimalizaci je obecná snaha o minimalizaci počtu prováděných experimentů z hlediska časové úspory. Na základě designu experimentu provedeme experimenty, kterými zjistíme retenční charakteristiky látek za daných podmínek.

Jejich zpracováním (graf, výpočet, specializovaný software) zjistíme optimální podmínky chromatografické separace a parametry, které nejvíce ovlivňují selektivitu. V druhé fázi vývoje metody používáme mimo roztoku standardů v čistém rozpouštědle též vzorek blankové matrice připravený některou z výše popsanych metod úpravy vzorku. Nástřikem upravené blankové matrice a standardů získáme dva chromatogramy. Na základě jejich porovnání separační metodu dále optimalizujeme tak, aby bylo minimalizováno množství interferencí analytů se složkami matrice.

V této fázi je vhodné ověřit selektivitu metody (*Kap. 1.12*) změřením většího počtu vzorků blankové matrice z více zdrojů. Zjišťuje se, zda nedochází k interferencím se stanovovanými látkami. V případě vývoje metody pro TDM u určitých chorob je třeba vzít v úvahu výskyt komorbidit a na základě farmakoterapie těchto komorbidit začlenit do testování selektivity i tyto látky. Asi nejčastěji se mohou jako potencionální interference vyskytovat látky ze skupiny NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs), kontraceptiva, antidepresiva, betablokátory, antidiabetika, apod. Okruh látek se liší dle věku a částečně i pohlaví v některých případech (kontraceptiva, hormonální léčba). U starších jedinců je vysoký předpoklad polyfarmacie. Z tohoto důvodu by selektivita metod primárně určených pro monitorování starších pacientů měla být důkladněji testována s ohledem na vybraný okruh potencionálně interferujících látek.

Pokud optimalizací chromatografických podmínek jako je změna pH, složení MF, jejího pH, průtoku, teploty apod. nedosáhneme dostatečné separace interferentů a analytů navzájem, volíme jinou metodu úpravy vzorku, jiný typ stacionární fáze případně jiný typ detekce.

V tomto směru bylo pro bioanalýzu velkým pokrokem zavedení LC-MS metod do běžné praxe, vzhledem k tomu, že MS poskytuje vysoce selektivní způsob detekce, kde v mnoha případech látky koelující s analyty při detekci nevadí. Neplatí to však obecně, vzhledem k riziku matričních efektů jak bylo zmíněno v *Kapitole 1.5* (sekce „*Hmotnostní detektor*“) a v případě koeluce izobarických sloučenin v MS¹. V případě izobarů totiž nejsme schopni rozlišit na základě hmot tyto látky od sebe. Oproti výše uvedenému postupu, kdy je primární pozornost věnována optimalizaci chromatografické separace a dostatečnému rozlišení všech píků, při vývoji metod s MS detekcí je přístup poněkud jiný. Zde je pozornost soustředěna spíše na optimalizaci parametrů vlastní detekce a úpravu vzorku z hlediska matričních efektů. Při použití MS není vždy požadována dokonalá chromatografická separace díky vysoké selektivitě detektoru. V mnoha případech není ani taková separace reálná vzhledem k množství látek stanovovaném v rámci jedné analýzy.

Občas se objevují metody, které separace nevyužívají vůbec a vzorek je nastříkovaný přímo do iontového zdroje hmotnostního detektoru, obecně však tento postup nelze doporučit právě z hlediska matričních efektů.

1.12 *Validace*

Posledním krokem v celém řetězci vývoje nové chromatografické metody, či jejím zavádění do laboratorní praxe je její validace. Validací ověřujeme, zda metoda splňuje předem specifikované požadavky k užití pro zamýšlený účel. Další definice říká, že validace je postup, jímž získáváme vysoký stupeň jistoty, že zamýšlený proces (v našem případě analýza vzorku) bude trvale poskytovat produkt (výsledky analýz), odpovídající předem stanovené specifikaci. Validace nám může pomoci odhalit slabá místa celého analytického procesu a stanovit limity, v jejichž mezích je možné metodu spolehlivě užívat.

Požadavky na validaci nejsou univerzálně definovány [220]. Jejich konkrétní podoba závisí na typu a zamýšleném užití analytické metody. Z tohoto důvodu jsou vydávána, zejména regulatorními orgány jako je například FDA (*Food and Drug Administration*), ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) nebo EMEA (*European Medicines Agency*) závazná doporučení pro validace metod v daném sektoru. V bioanalýze nejužívanějším doporučením pro validace je *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* [221].

Novější evropskou obdobou je pak *Guideline on Bioanalytical Method Validation* [222]. Některé aspekty validací jsou dále zmiňovány například v pracích [223-226]. Základní validační parametry budou popsány v následujícím textu a vycházejí z posledního doporučení EMEA [222].

Selektivita je schopnost metody zcela jednoznačně odlišit požadovaný analyt a vnitřní standard od možných interferentů. Počet nezávislých vzorků blankové matrice pro stanovení selektivity činí alespoň $n=6$. Kriteříem úspěšnosti testu je nepřítomnost interferencí v retenčním čase analytu/ů, které by přesáhly 20% odezvy analytu při koncentraci na spodním limitu stanovitelnosti (Lower Limit of Quantification - LLOQ). Pro vnitřní standard je to 5%. Někdy je místo termínu selektivita nesprávně užíváno termínu **specifita**. Metoda je specifická pouze v případě, že poskytuje signál pouze pro jeden vybraný analyt, což je v případě separačních technik velmi málo běžný jev.

Přenos mezi nástřiky (Carry-over) se zjišťuje nástřikem blankového vzorku, kterému předcházela nástřik vzorku na horním limitu kvantifikace (Upper Limit of Quantification - ULOQ). Kriteériem úspěšnosti testu je nepřítomnost signálu analytu v blankovém vzorku který by přesáhl 20% odezvy na dolním limitu stanovitelnosti (LLOQ). Pro vnitřní standard hodnota činí 5%.

Dolní limit stanovitelnosti (Lower Limit Of Quantification – LLOQ) je taková koncentrace analytu, kdy je možné jej stanovit s dostatečnou přesností a správností. Za LLOQ se často klade nejnižší kalibrační bod. Případné interference musí mít odezvu nižší než 20% odezvy analytu na LLOQ.

Přesnost (Precision) vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými měřeními vzorku téže koncentrace. Přesnost je ověřována na několika koncentračních hladinách. Většinou na LLOQ a dále na nízké (3xLLOQ) střední (okolo 50% rozsahu kalibrace) a vysoké (okolo 75% rozsahu kalibrace) koncentraci v rámci kalibrační křivky. Počet nezávislých vzorků na každé koncentrační hladině je $n \geq 5$. Pokud jsou vzorky zpracovány po sobě, změřeny na jednom přístroji, jedním člověkem, jedná se o tzv. **opakovatelnost** (repeatability). Pokud jsou vzorky měřeny s větším časovým odstupem, různými lidmi na různých přístrojích v rámci jedné laboratoře, jedná se o tzv. **mezilehlou přesnost** (intermediate precision). Posledním případem je měření vzorků v různých dnech, různých laboratořích, různými lidmi na různých přístrojích. V tomto případě se jedná o určení tzv. **reprodukovatelnosti** metody (reproducibility). Přesnost se počítá jako variační koeficient z naměřených hodnot. Variační nesmí přesáhnout 20% na LLOQ a 15% na ostatních koncentračních hladinách.

Správnost (Accuracy) vyjadřuje míru shody změřené koncentrace s koncentrací skutečnou. Tato shoda je na základě změřené koncentrace vyjádřena v procentech nominální hodnoty. Často se však míra shody vyjadřuje jako procentuální rozdíl mezi změřenou a nominální hodnotou, tedy jako **relativní chyba** nebo **bias**. Stejně jako u přesnosti je přesnost zjišťována pro více koncentračních hladin (LLOQ, nízká, střední a vysoká) měřeními paralelních vzorků ($n \geq 5$) na každé hladině. Zjištěná koncentrace musí ležet v rozmezí $\pm 20\%$ nominální koncentrace na LLOQ a $\pm 15\%$ na ostatních koncentračních hladinách.

Rozsah metody je koncentrační rozmezí, ve kterém metoda poskytuje lineární vztah mezi koncentrací a odezvou detektoru, při zachování předem dané přesnosti a správnosti. Za spodní hranici rozsahu se většinou považuje LLOQ, zatímco horním limitem je ULOQ.

V tomto rozmezí musí hodnota poskytovat výsledky s přesností vyjádřenou jako variační koeficient $CV \leq 15\%$ (20% na LLOQ) a správností v rozmezí $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ na LLOQ) okolo nominální hodnoty.

Kalibrační křivka definuje vztah mezi koncentrací analytu a odezvou detektoru. Odezva se v rámci validace ověřuje na alespoň šesti koncentračních hladinách ($n \geq 6$) vymezených **rozsahem** (viz. výše) pro minimálně tři nezávislá měření. Vzorky pro zjištění kalibrační závislosti se připravují ve stejné matrici jako jsou vzorky určené k analýze. V rámci měření kalibrační závislosti se k měření přidává také blankový vzorek a nulový kalibrační bod (blankový vzorek s přídavkem pouze vnitřního standardu). Po zjištění regresní rovnice kalibrační křivky jsou pro ověření správnosti zpětně vypočítány koncentrace jednotlivých kalibračních bodů. Vypočtená správnost musí být v rozmezí $\pm 15\%$ nominální hodnoty standardu (na LLOQ $\pm 20\%$). Toto kritérium musí splnit alespoň 75% kalibračních standardů z minimálně šestibodové kalibrační závislosti. V případě více opakování na jednotlivých kalibračních hladinách musí na dané hladině výše uvedená kritéria správnosti splnit alespoň 50% vzorků.

Matriční efekty nekontrolovatelným způsobem ovlivňují při detekci odezvu analytů. Problematika matričních efektů se týká zejména případů fluorescenční nebo hmotnostní detekce. Pro ověření matričních efektů se zjišťuje takzvaný matriční faktor (matrix factor) a měří se jako poměr odezvy analytu (vnitřního standardu) přidaného do blankové matrice po její úpravě (např. SPE extrakci) a odezvy vzorku, kde byl analyt (vnitřní standard) přidán ve stejné koncentraci do čistého rozpouštědla. Matriční faktor by měl být změřen pro alespoň šest nezávislých blankových matic pro nízkou ($< 3 \times \text{LLOQ}$) a vysokou koncentraci analytu (ULOQ). Matričními efekty v rámci validace se zabývá ve své práci např. Eeckhaut et al. [40].

Ověřením **stability** zjišťujeme, že žádný z kroků celého analytického procesu negativním způsobem neovlivňuje koncentraci analytu/ů ve vzorku. Získáváme informaci v jakých mezích můžeme se vzorkem pracovat. Sledovanými parametry může být např. vliv matrice vzorku, vliv pH, vliv teploty při přípravě, skladování nebo v autosampleru, vliv světla, stání na vzduchu, vzorkovnic k uchování a manipulaci se vzorky apod. Stabilita je zjišťována pro každou matici na alespoň dvou koncentračních hladinách ($< 3 \times \text{LLOQ}$, ULOQ). Porovnávají jsou hodnoty zjištěné okamžitě po přípravě vzorku s hodnotami zjištěnými po aplikaci daných podmínek. Zjištěné koncentrace by měly ležet v rozsahu $\pm 15\%$ nominální hodnoty. Několik poznámek k měření stability podává například práce [227].

Mezi stability běžně zjišťované při validaci bioanalytické metody patří: **Krátkodobá stabilita** při pokojové teplotě. Aplikovaný časový interval by měl pokrýt standardní dobu přípravy a manipulaci se vzorkem v rozmraženém stavu před analýzou. Dalším měřeným parametrem je **stabilita v autosampleru**. Testovaný časový interval by měl pokrýt maximální dobu po kterou bude vzorek přítomen za dané teploty v autosampleru před analýzou. Tato doba je závislá na velikosti běžně zpracovávaných sekvencí vzorků a době jedné analýzy, včetně doby případných ekvilibračních kroků a doby náběru vzorku při nástřiku. **Dlouhodobá stabilita** nám podává informaci, po jakou dobu je možné vzorek skladovat při určité teplotě před jeho analýzou. Většinou se měří pro teploty 4°C (skladování v lednici), -20°C (skladování v mrazáku), -80°C pro skladování v hlubokomrazicím boxu a pro některé analyty -195°C při skladování v tekutém dusíku. Časový interval může být od několika dnů po několik let a je závislý od doby, po kterou budou běžně vzorky za daných podmínek skladovány.

Dalším ze sledovaných parametrů je **stabilita při zmrazení a rozmrazení** vzorku. Tento validační test se provádí z toho důvodu, že často jsou vzorky před provedením analýzy zamrazovány, případně je zapotřebí opakování analýzy ze zamraženého vzorků. Proto je nutné ověřit, zda zmrazením a rozmrazením nedochází k degradaci analytu/ů. K tomuto účelu je vzorek vždy rozmražen, odebrán alikvót k analýze a opětovně zamrazen. Tento cyklus se většinou na stejném vzorku několikrát opakuje. Mezi jednotlivými cykly musí být minimálně 12 hodinový interval. Počet opakování by měl pokrývat předpokládaný počet rozmrazování vzorku během rutinního používání metody, většinou se počet volí $n=3$. Pokud jsou zamrazovány i zásobní roztoky standardů, je třeba testy stability provádět i pro ně.

V rámci validace je také prováděn **test způsobilosti systému**. V rámci tohoto testu jsou získány údaje vztahující se např. k opakovatelnosti nástřiku, účinnosti kolony vyjádřené jako počet teoretických pater, rozlišení, symetrii píků a opakovatelnosti. V testu způsobilosti metody by měly být zahrnuty především kritické parametry mající vliv na úspěšné provedení analýzy. Tento test by měl být prováděn před každým použitím metody a výsledky testu by měly být porovnány s výsledkem získaným při validaci metody.

2. Cíle disertační práce

Předkládaná disertační práce je věnována vývoji a validaci metod pro transportní a metabolické studie. Předmětem je bioanalýza léčiv s využitím kapalinové chromatografie. Hlavním cílem byl vývoj metod pro stanovení vybraných látek v biologické matrici s využitím HPLC. Jednalo se zejména o vývoj a optimalizaci přípravy vzorku a separace s následnou validací metody. Metody byly aplikovány buď v základním výzkumu při experimentech na laboratorních zvířatech nebo při terapeutickém monitorování léčiv (TDM) používaných v klinické praxi.

Dílčí cíle práce:

1. Vývoj metody pro stanovení polyglutamátů metotrexátu v lidských erythrocytech za účelem TDM při nízkodávkovém podávání metotrexátu u vybraných autoimunitních poruch.
2. Vývoj metody pro TDM cytostatika 5-fluorouracilu včetně jeho vybraných metabolitů v lidské plasmě pro účely individualizace farmakoterapie při léčbě karcinomu rekta.
3. Vývoj metody pro stanovení inhibitoru argináz N-(ω)-hydroxy-nor-L-argininu v plasmě a identifikace jeho hlavního metabolitu pomocí LC-MS. Metoda byla využita pro pilotní farmakokinetickou studii na potkanech.

3. Výsledky a diskuze

V této kapitole je popsán vývoj a validace metody pro stanovení **5-fluorouracilu** a jeho neaktivního metabolitu **5-fluoro-5,6-dihydrouracilu**. Na vypracování této bioanalytické metody se podílel výhradně autor disertační práce. Vývoj zahrnoval nalezení kolony vhodné pro separaci a optimalizaci chromatografických podmínek, dále pak nalezení vhodného postupu úpravy vzorku, validaci metody a zpracování vzorků dodávaných Onkologickou klinikou Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Práce zabývající se klinickými aspekty individualizace dávkování 5-fluorouracilu s kapitolou zabývající se metodou stanovení byla přijata do českého recenzovaného časopisu „*Klinická farmakologie a farmacie*“ a v současné době je v tisku.

Dále jsou zde uvedeny komentáře ke dvěma metodám, které byly publikovány v odborných zahraničních časopisech s impakt-faktorem. Jedná se o stanovení **polyglutamátů metotrexátu v lidských erythrocytech** a stanovení **N-(ω)-hydroxy-nor-L-argininu v potkaní plasmě**, včetně identifikace jeho metabolitu metodou LC/MS/MS. Analytická část byla opět zcela v kompetenci autora této práce, včetně sepsání manuskriptů a publikování metod v odborných časopisech. Texty těchto článků jsou v disertační práci k dispozici v plném rozsahu.

Na statistickém zpracování dat v diskutovaných pracích se podílel Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D. Konzultantem při vývoji metod byl Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc. Na klinické a farmakologické části prací se podíleli MUDr. Jiří Grim, Ph.D., MUDr. Jana Tuková, Ph.D., Doc. MUDr. Pavla Doležalová, Ph.D. a Prof. MUDr. Jiřina Martínková CSc. Experimentální část práce na zvířatech a zpracování části vzorků pro účely validace metody stanovení nor-NOHA byla provedena Ing. Zuzanou Havlínovou.

V *Kapitole 7.2* je uveden přehledný seznam dalších prací publikovaných v recenzovaných časopisech a časopisech s impakt-faktorem, na kterých jsem spolupracoval. Tyto práce zahrnují širší problematiku než analytickou stránku věci a podílel jsem se na nich jako analytik při optimalizaci či zavádění HPLC metod a analýzou vzorků biologického materiálu.

3.1 Stanovení 5-fluorouracilu, 5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu v lidské plasmě

3.1.1 Úvod

Přestože 5-fluorouracil (FU) má za sebou již více jak padesátiletou historii v klinické praxi, stále si drží významné místo v protinádorové terapii [228]. Nejčastější indikací pro podání 5-fluorouracilu je paliativní [229], adjuvantní [230] či neoadjuvantní [231] léčba solidních nádorů zažívacího traktu. V kombinaci s jinými cytostatiky (oxaliplatina, irinotekan) je používán k léčbě některých dalších nádorů jako karcinomu hlavy a krku, plic, prsu, močového měchýře, prostaty, dělohy a děložního čípku. 5-Fluorouracil je podáván formou bolusu případně infuze v několika cyklech. Farmakologii fluoropyrimidinů včetně metabolismus 5-fluorouracilu popisují např. práce [228, 232]. Mnoho let používaný přístup k dávkování 5-fluorouracilu, založený na velikosti plochy těla, se ukazuje jako problematický, vzhledem k velké interindividuální variabilitě jeho farmakokinetiky a nízkému terapeutickému indexu. Z tohoto důvodu se přistupuje k individuální, farmakokineticky řízené terapii [233-234]. K tomuto účelu však musí být k dispozici vhodná metoda stanovení plasmatických koncentrací 5-fluorouracilu. Jejich dostupnost v klinických laboratořích je limitovaná, ať už z důvodů značně problematického časově náročného vývoje metody stanovení pomocí HPLC - UV/VIS či nedostupnosti LC-MS technologie.

Pro účely TDM v rámci studie „*Individuální predikce dávkového režimu 5-fluorouracilu v léčbě kolorektálního karcinomu*“ (grant IGA, NS/9693-4) byla vyvinuta metoda stanovení 5-fluorouracilu a jeho tří hlavních metabolitů. Struktury látek jsou uvedeny na *Obrázku 22*.

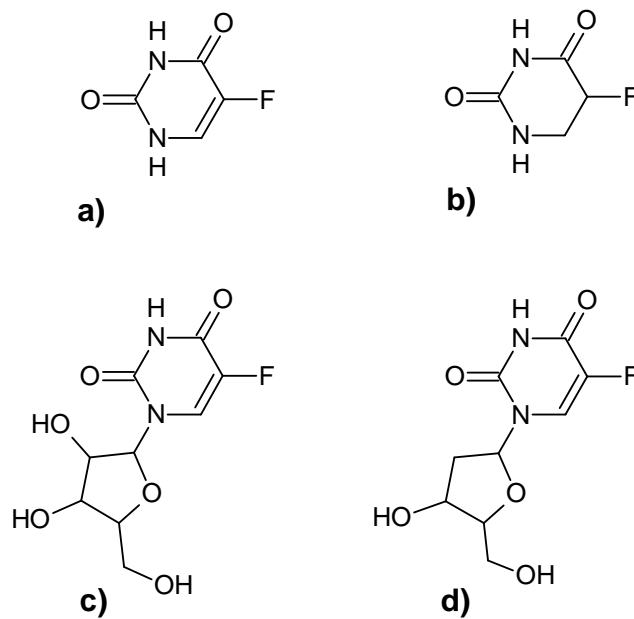
Jak si lze povšimnout zejména u 5-fluorouracilu a 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu (FUH₂), jde o látky značně strukturně podobné, lišící se pouze jednou dvojnou vazbou, navíc velmi polární, špatně absorbující v UV/VIS, bez přítomnosti fluoroforu s nízkou molekulovou hmotou. Tyto vlastnosti již samy o sobě představují komplikaci při vývoji vhodné chromatografické metody.

Připočteme-li dále nutnost stanovení těchto látek v komplikované biologické matrici jako je plasma a nutnost rozlišení těchto látek od endogenních, strukturně podobných látek, uracilu a jeho dihydroderivátu 5,6-dihydrouracilu, stojíme před náročným chromatografickým úkolem. Absorpční spektra látek jsou na *Obrázku 23*.

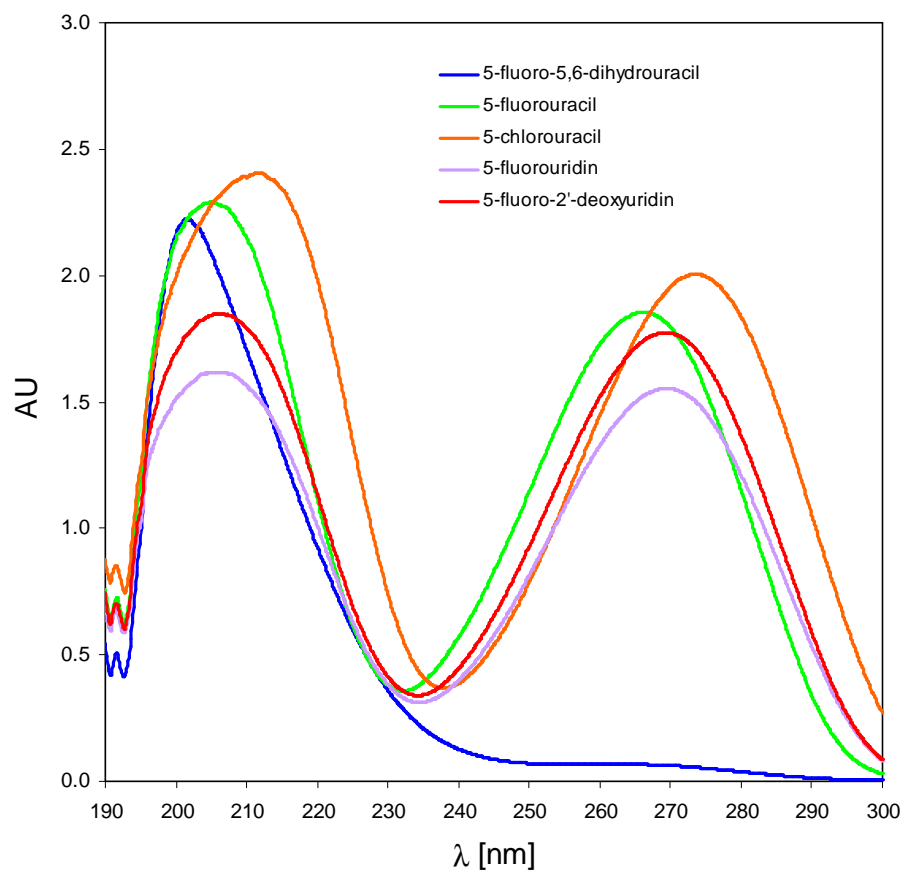
Vývoj metody probíhal v první polovině roku 2009. V této době byly v literatuře popsány postupy využívajících různých přístupů k přípravě vzorku, vlastní separaci i detekci 5-fluorouracilu a příbuzných látek. Mezi metody využívané k přípravě vzorků pro stanovení 5-fluorouracilu a příbuzných látek patří deproteinace [235-238], L-L extrakce [239-251] či SPE extrakce [252-254]. Detekce byla ve většině uvedených případů prováděna v UV/VIS s vlnovou délkou pod 270 nm. K detekci bylo využíváno i MS, nicméně 5-fluorouracil je vhodné před analýzou derivatizovat vzhledem k tomu, že tato látka poskytuje jak v ESI tak APCI velmi slabý signál [245].

Separace byla často prováděna v čistě vodných mobilních fázích [241, 247, 250, 255] či s využitím sériového řazení více kolon [244]. Od ukončení vývoje metody v roce 2009 bylo publikováno několik dalších prací pojednávajících o stanovení 5-fluorouracilu a jeho metabolitů v biologických matricích [256-262]. Recentní přehled prací zabývajících se stanovením samotného 5-fluorouracilu podává Breda et al. [263].

V době vývoje byl u většiny výše uvedených metod limit jejich použitelnosti pro naši studii v tom, že neumožňovaly stanovení metabolitů 5-fluorouracilu, případně zde nebyl překryv s metabolity požadovanými v zadání, další zcela zásadní překážkou použitelnosti byly vysoké limity stanovitelnosti (LLOQ) 5-fluorouracilu, které se pohybovaly v řádu jednotek $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro studii bylo zapotřebí detekčních limitů až o dva řády nižších, v oblasti desítek $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a možnost docílit těchto limitů s využitím UV/VIS detekce, vzhledem k absenci jiné vhodné možnosti detekce na našem pracovišti.



Obrázek 22. Chemická struktura 5-fluorouracilu (a) a jeho metabolitů 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu (b), 5-fluorouridinu (c), 5-fluoro-2'-deoxyuridinu (d)



Obrázek 23. UV/VIS absorpční spektra sledovaných látek s koncentrací $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl

3.1.2 Experimentální část

V této části budou popsány výsledné parametry metody. V diskuzi pak budou probrány detailněji jednotlivé kroky vývoje metody.

Seznam použitých přístrojů, vybavení, materiálu a chemikálií

Chemikálie:

| | |
|----------------------------------|------------------------------|
| 5,6,-dihydro-5-fluorouracil | dar firmy Roche |
| 5-fluorouracil | Fluka (kat. č. 47576) |
| 5-fluorouridin | Fluka (kat. č. 47580) |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | Sigma (kat. č. F0503) |
| 5,6-dihydrouracil | Sigma (kat. č. D7628-5G) |
| Uracil | Sigma (kat. č. U0750-5G) |
| Mravenčan amonný | Sigma (kat. č. 70221-100G-F) |
| Dihydrogenfosforečnan draselný | Sigma (kat. č. P5655-500G) |
| Chlorid sodný | Lachner (kat. č. 30423) |
| Síran měďnatý heptahydrát p.a. | Lachema |
| Kyselina chlorovodíková 35% p.a. | Lachner (kat.č. 10033-A35) |
| Kyselina sírová 97% p.a. | Merck (kat.č. 1.00731) |
| Methanol (LiChrosolv) | Merck (kat.č. 1.06007) |
| Acetonitril (LiChrosolv) | Merck (kat.č. 1.00030) |
| Ultračistá voda (MilliQ) | Millipore |
| Stlačený dusík 99.99% | Linde |

Přístroje:

Kapalinový chromatograf 1200 Series (Agilent, Palo Alto, USA)

UV/VIS spektrofotometr UV-2101 PC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

pH metr (WTW, Weilheim, Německo)

centrifuga IEC CL31E (Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA)

SPE manifold, 24-pozic (Watrex, Prague, Česká republika)

termoblok Termovap (Ecom, Praha, Česká republika)

pipety mL 100-1000 μL a 10-100 μL (Biohit, Helsinky, Finsko)

SPE kolonky:

Atoll 100/1 a 100/3 (Interchim, Montlucon, Francie)

Oasis HLB 1cc/30mg (Waters, Milford, USA)

SupelClean LC-SCX 1mL (Supelco, Bellefonte, USA)

Příprava vzorku

Vzorky plasmy (1.5 ml) z hlubokomrazacího boxu -80°C se nechají rozmrazit ve tmě na termobloku při 30°C . Ke vzorkům se přidá 60 μl vnitřního standardu v 10 mmol.l^{-1} HCl (5-chlorouracil, $c=10\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$) a poté se vortexují a odstředí (11000 g, 5 min). Následuje SPE extrakce na kolonkách Atoll 100/3 (Interchim, Francie) dle následujícího postupu: promytí kolonky 2 ml acetonitrilu, 2 ml methanolu a 1 ml vody MilliQ, kondicionace 1 ml fosfátového pufru (KH_2PO_4 , 10 mmol.l^{-1} , $\text{pH}=2,0$), nanesení a prosátí 1.5 ml vzorku plasmy s vnitřním standardem. Následuje promytí 1 ml mravenčanového pufru (HCOONH_4 , 10 mmol.l^{-1} , $\text{pH}=5,0$) do sucha a eluce 500 μl směsi acetonitril-methanol (80:20, v/v). Po odpaření pod proudem dusíku (15 min, 45°C) jsou vzorky rekonstituovány ve 200 μl kyseliny chlorovodíkové (10 mmol.l^{-1}).

Separace

Separace je prováděna na chromatografické koloně LUNA PFP(2) 150 mm x 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, Torance, USA) gradientovou elucí. Mobilní fáze A je tvořena vodou MilliQ (pH upraveno na hodnotu 2,5). Mobilní fáze B tvoří směs methanolu a mobilní fáze A (1:1, v/v). Gradientový program je následující: 0,0–5,5 min 6 % B, 5,5–15 min 6–50 % B, 15–17 min 100 % B, 17–20 min 6 % B.

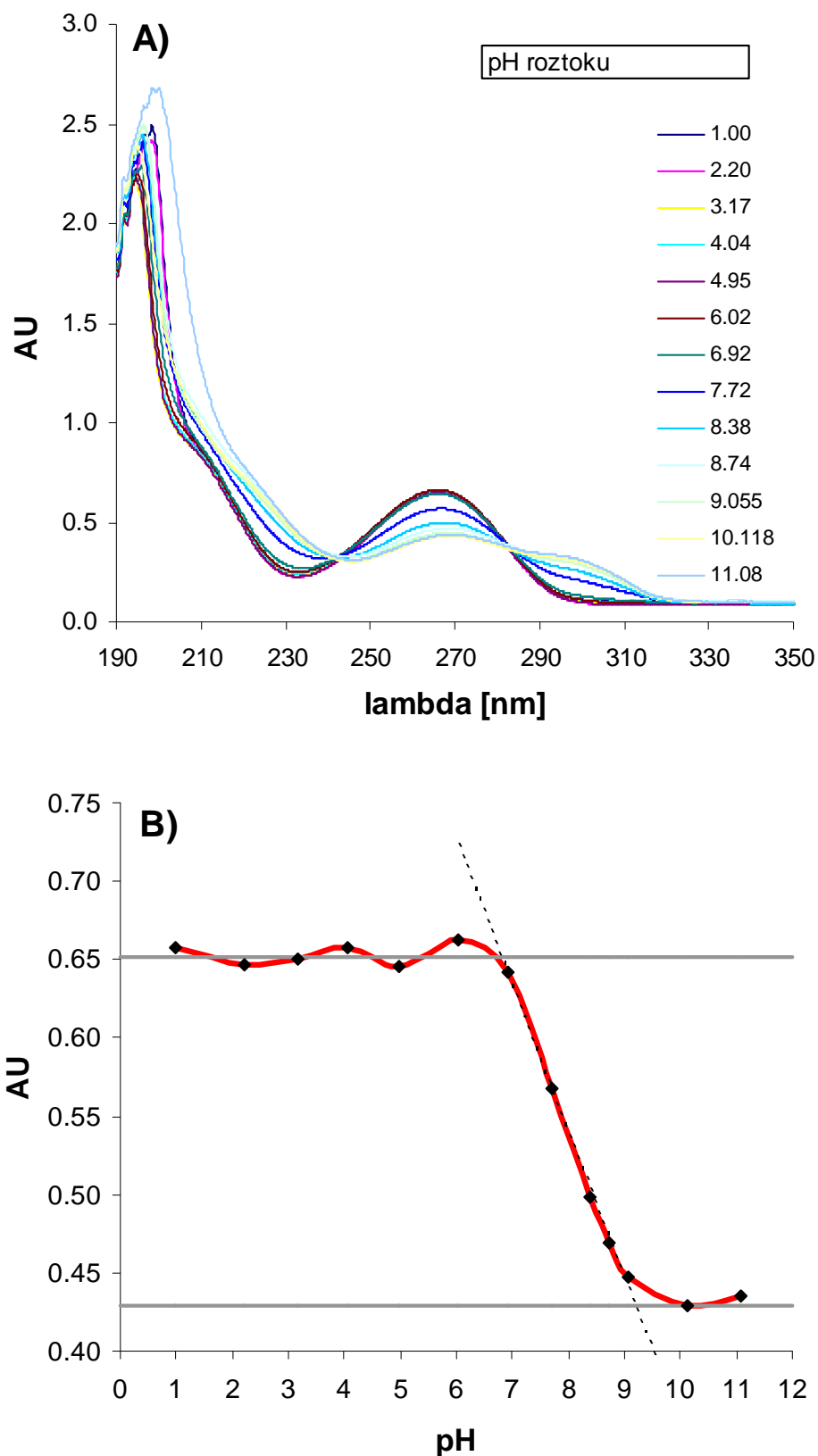
Detekce

Detekce látek byla prováděna v UV/VIS oblasti v krátkovlnné části UV spektra. K detekci byl využit následující program vlnových délek: 0,0 - 10,35 min 210 nm, 10,36 - 20 min 260 nm. Takto nízká vlnová délka byla použita vzhledem k absenci absorpčního maxima 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu při vyšších vlnových délkách (*Obr. 23*). Pro detekci 5-chlorouracilu (vnitřní standard), 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu byla použita již vyšší vlnová délka vzhledem k přítomnosti absorpčního maxima okolo 260 nm. Při této vyšší vlnové délce byl získán čistší chromatogram.

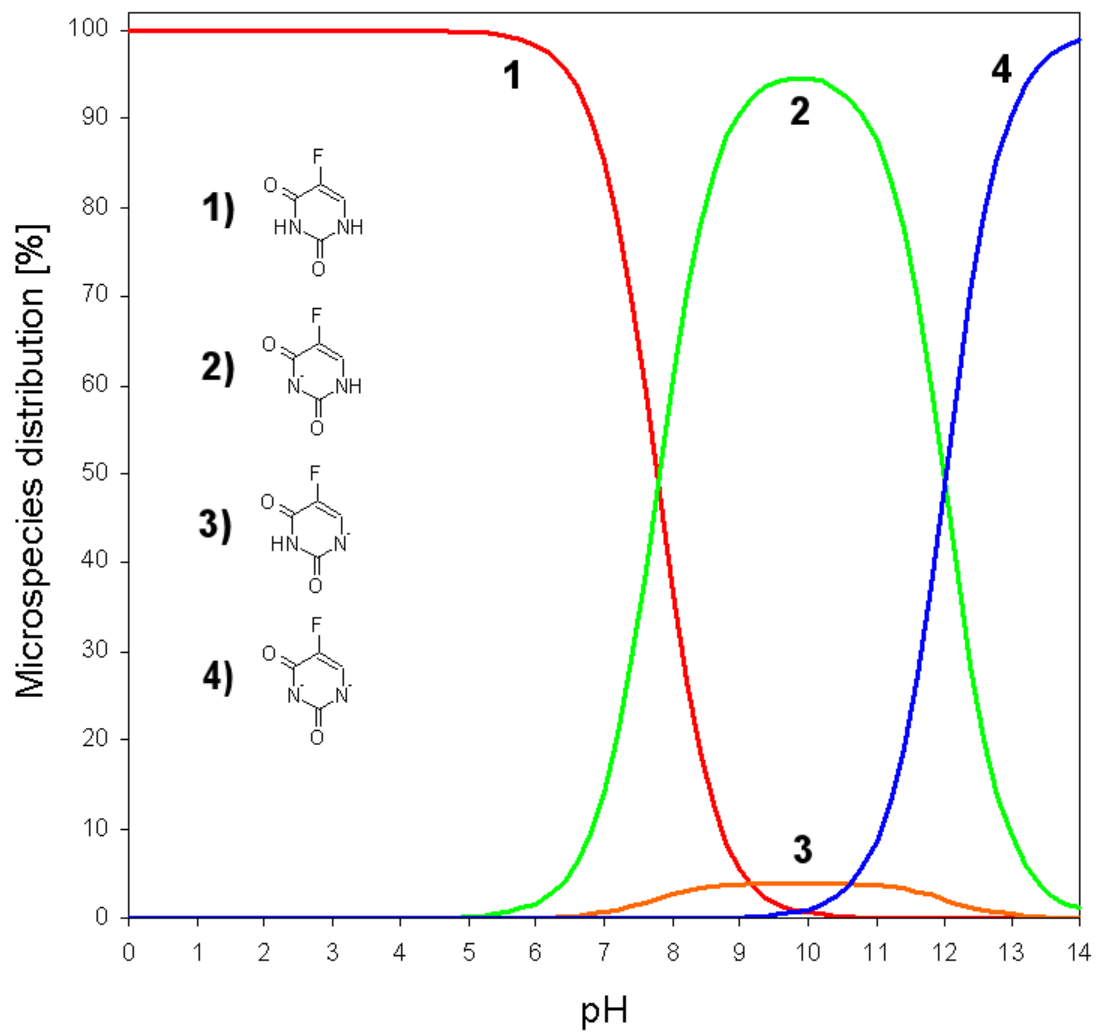
3.1.3 Výsledky a diskuze

Při vývoji metody byl kladen požadavek na separaci celkem 5 látek ze skupiny halogenovaných derivátů pyrimidinu a dihydropyrimidinu od jejich přirozených nehalogenovaných analogů uracilu a 5,6-dihydrouracilu a dalších endogenních látek přítomných v plasmě. Jednalo se o 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (FUH₂), 5-fluorouracil (FU), 5-chlorouracil (CIU, vnitřní standard), 5-fluorouridin (FUrd) a 5-fluoro-2'-deoxyuridin (FdUrd). Před započítím vývoje metody byla proměřena UV/VIS absorpční spektra všech uvedených halogenovaných derivátů, pro zjištění absorpčních maxim. Dále byla experimentálně zjištěna přibližná hodnota pK_a 5-fluorouracilu jako modelové látky pro prvotní odhad jejího retenčního chování v závislosti na pH mobilní fáze.

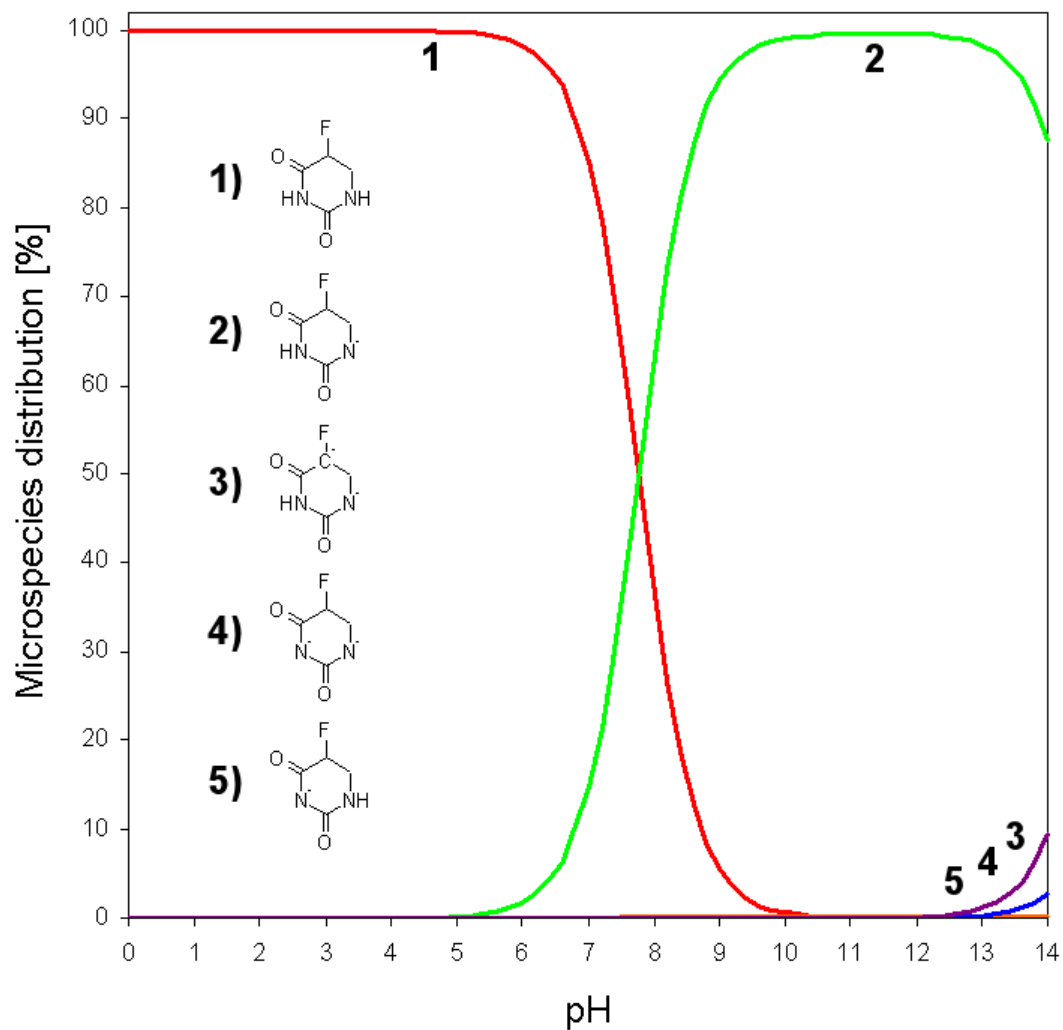
Hodnota pK_a byla zjišťována pomocí spektrofotometrického proměření sady roztoků 5-fluorouracilu jednotné koncentrace při různých hodnotách pH (*Obr. 24A*). Z naměřených dat byl vynesena graf závislosti absorbance při 265 nm, což je vlnová délka jednoho z absorpčních maxim, na pH roztoku (*Obr. 24B*). Z inflexního bodu sigmoidní závislosti byla zjištěna hodnota pK_a ~ 8, která velmi dobře korespondovala s údajem nalezeným v literatuře pK_a=7.93 [264]. Hodnota byla potvrzena i predikčním softwarem „*Marvin, Calculator Plugin and Chemical Terms*“, který je volně dostupný na internetu jako Java aplet. Stejným softwarem byly modelovány křivky zastoupení jednotlivých ionizovaných forem stanovovaných látek v závislosti na pH (*Obr. 25 - 29*).



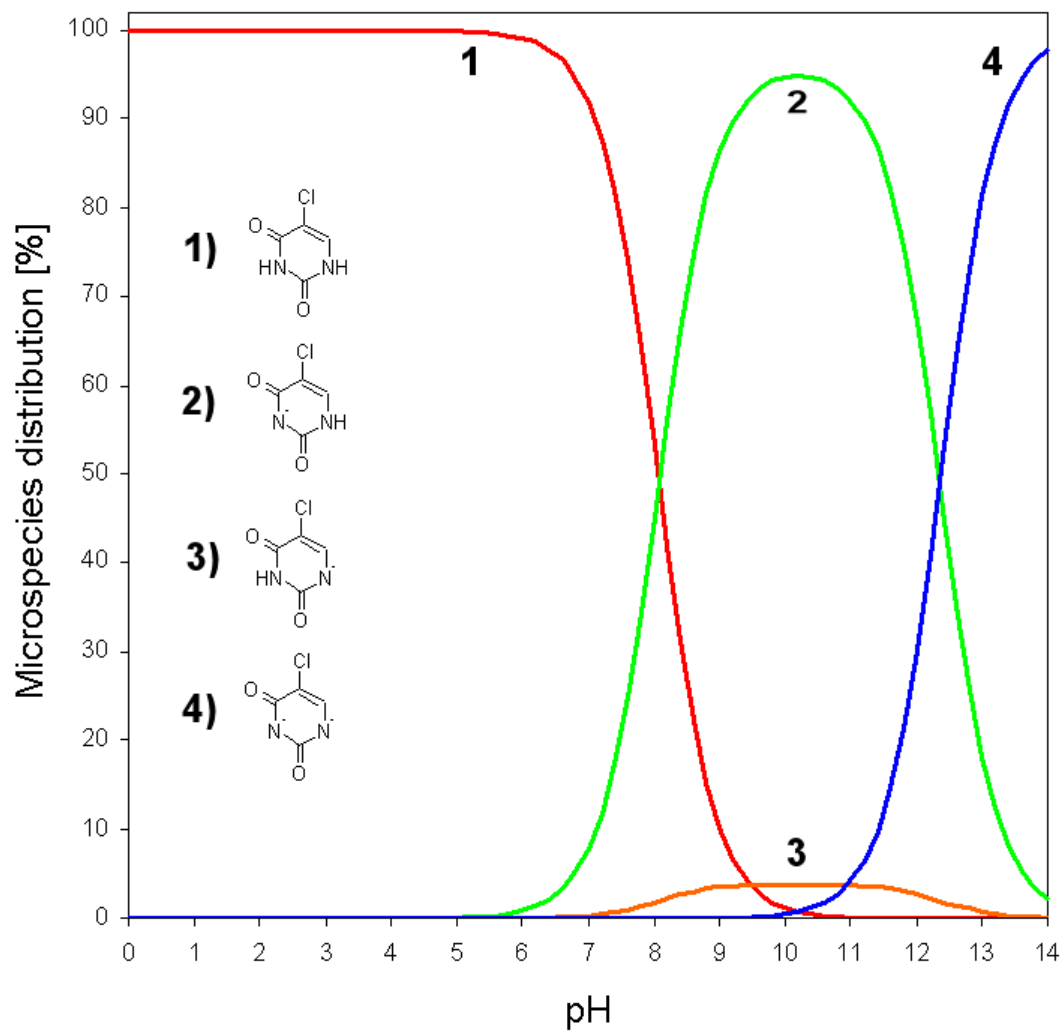
Obrázek 24. Závislost absorpčního spektra 5-fluorouracilu na hodnotě pH (A). Absorbance ($\lambda=265$ nm) v závislosti na pH roztoku 5-fluorouracilu (B). Z grafu B byla zjištěna přibližná hodnota pKa ~ 8 5-fluorouracilu.



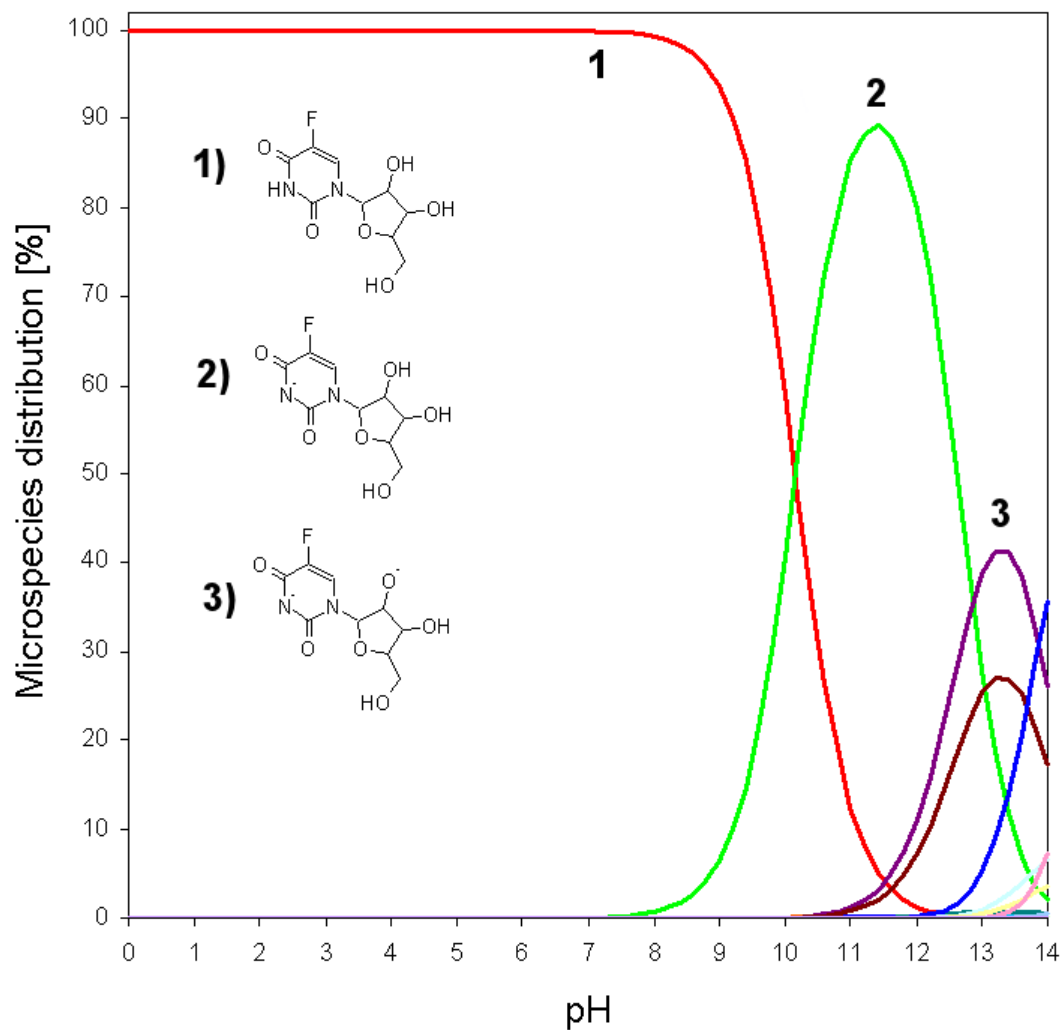
Obrázek 25. Distribuce neionizované a jednotlivých ionizovaných forem 5-fluorouracilu v závislosti na pH.



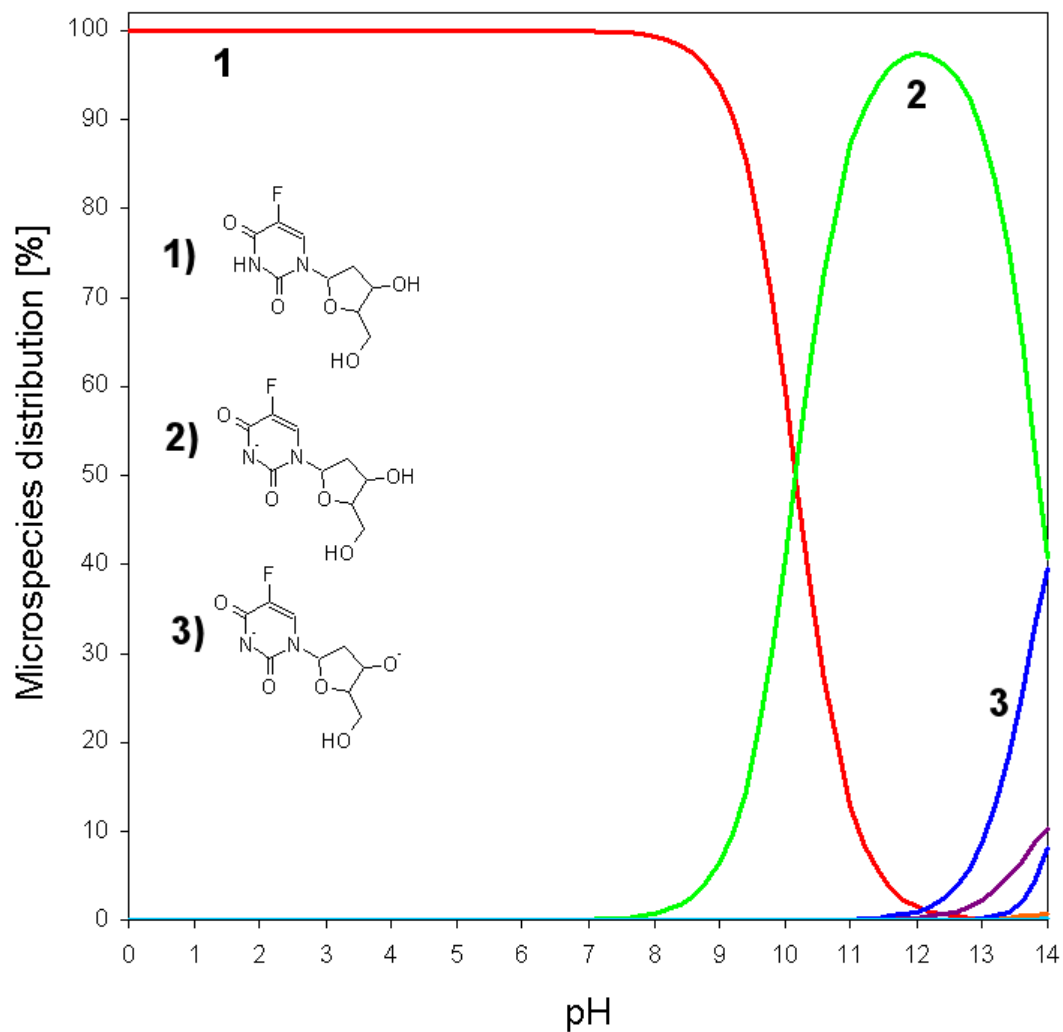
Obrázek 26. Distribuce neionizované a jednotlivých ionizovaných forem 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu v závislosti na pH. Vzhledem k nestabilitě látky v alkalickém prostředí, nelze uvedené formy látky při pH vyšším jak ~9 v roztoku očekávat.



Obrázek 27. Distribuce neionizované a jednotlivých ionizovaných forem 5-chlorouracilu (vnitřní standard) v závislosti na pH.



Obrázek 28. Distribuce neionizované a jednotlivých ionizovaných forem 5-fluorouridinu v závislosti na pH. Pro přehlednost byly uvedeny pouze tři nejvíce zastoupené formy z celkových patnácti. Stabilita látky v silně alkalickém prostředí může být diskutabilní a zjišťování této stability nebylo předmětem předkládané práce.



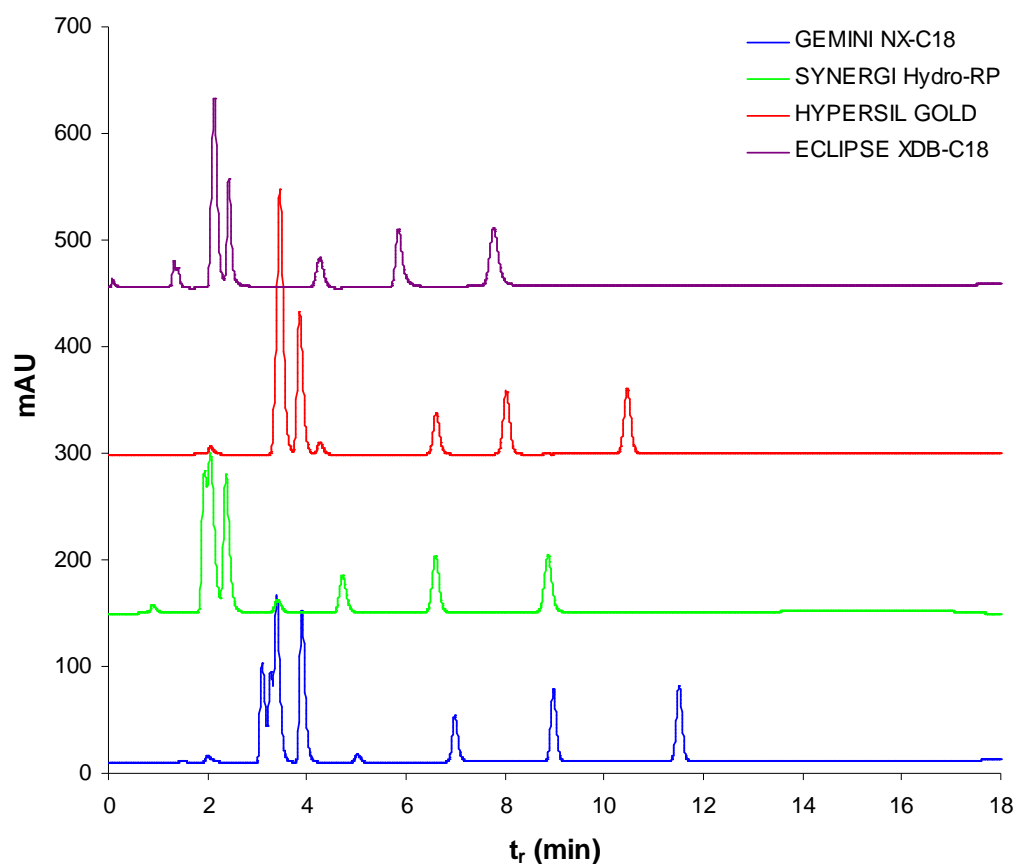
Obrázek 29. Distribuce neionizované a jednotlivých ionizovaných forem 5-fluoro-2'-deoxyuridinu v závislosti na pH. Pro přehlednost byly uvedeny pouze tři nejvíce zastoupené formy z celkových devíti. Stabilita látky v silně alkalickém prostředí může být diskutabilní a zjišťování této stability nebylo předmětem předkládané práce.

Při vývoji metody bylo nejprve testováno celkem 9 kolon s různými stacionárními fázemi (Tab. 1-3). Vzhledem k velkému rozsahu polarit jednotlivých látek bylo pro testování separace využito lineární gradientové eluce s počátkem ve 100% mobilní fáze A (MFA) s rychlostí nárůstu objemové koncentrace mobilní fáze B (MFB) 1% za minutu při průtoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. MFA byla tvořena vodou MilliQ ($\text{pH}=2.5$) a MFB se skládala z methanolu a MFA (1:1, v/v). Kyselý pH mobilní fáze bylo použito vzhledem ke skutečnosti, že stanovované látky se chovají jako slabé kyseliny jak vyplývá z Obrázků 25-29 a literatury [264]. Použitím kyselé mobilní fáze dochází k potlačení jejich disociace a tedy zvýšení hydrofobicity. K detekci byl použit UV/VIS detektor nastavený na vlnovou délku 210 nm.

Výsledky experimentu jsou shrnuty na Obrázcích 30-32. Retenční časy, rozlišení a symetrie píků pro jednotlivé kolony jsou uvedeny v Tabulkách 1-3. Z výsledků vyplývá, že jako zcela nevhodné je použití všech kolon s oktadecylovou modifikací povrchu stacionární fáze (Gemini NX-C18, Synergy 4u Hydro-RP, Hypersil GOLD, Eclipse XDB-C18). Ve všech případech docházelo ke koeluci většího či menšího počtu stanovovaných látek. Z kolon se stacionární fází C18 se jako nejlepší ukázala kolona Gemini NX-C18, bohužel rozlišení 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu uracilu a dihydrouracilu bylo nedostatečné (Obr. 30, Tab. 1).

Další skupinou testovaných kolon byly kolony s pentafluorofenylovou modifikací stacionární fáze (XSelect CSH Fluorophenyl, Hypersil PFP, Luna PFP(2)). Tento typ modifikace byl vybrán záměrně, vzhledem k odlišné selektivitě ve srovnání s oktadecylovou stacionární fází, zlepšené selektivitě pro fluorované a chlorované látky a možnosti použít tyto kolony ve vodných mobilních fázích. Z testovaných kolon se jako nevhodné ukázaly fáze XSelect CSH Fluorophenyl a Hypersil PFP. Dobré separace bylo dosaženo s kolonou Luna PFP(2), kde byly všechny požadované látky separovány s nejlepším rozlišením (Obr. 31, Tab. 2). Tato kolona se ukázala jako nejvhodnější ze všech testovaných stacionárních fází a byla použita pro další vývoj metody.

Mimo klasických kolon s plně porézními sorbenty byly také testovány kolony s „core-shell“ technologií (Kap. 1.9.3). Testovány byly stacionární fáze Ascentis Expres F5 ($2,7 \text{ } \mu\text{m}$) a Kinetex PFP ($2,6 \text{ } \mu\text{m}$), obě s pentafluorofenylovou modifikací. Lépe z testu vyšla kolona Kinetex, avšak rozdělení všech sedmi látek se nepodařilo uskutečnit na ani jedné z kolon s „core-shell“ technologií (Obr. 32, Tab. 3), při použití konvenčního chromatografu, který vzhledem k tlakovému limitu neumožňoval docílit optimálního průtoku mobilní fáze.



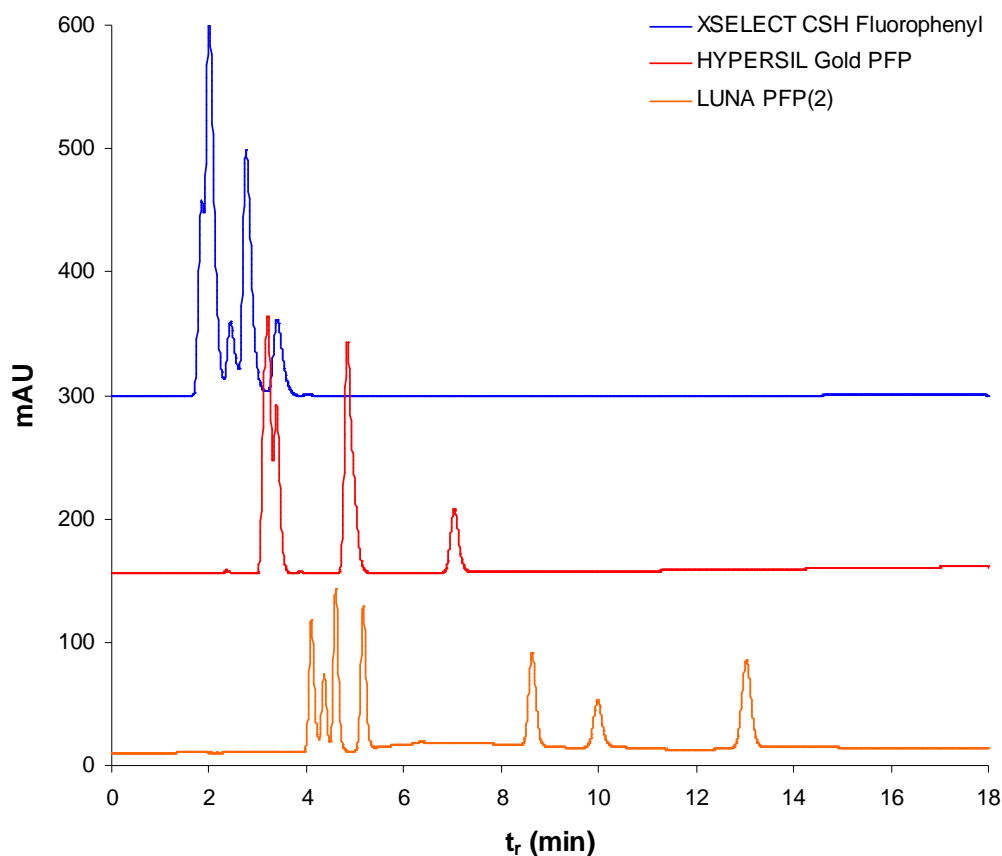
| Kolona | Phenomenex Gemini NX-C18 | | | |
|----------------------------|--------------------------|----------------|------------------------|------|
| Rozměr | 150 mm x 4.6 mm | | | |
| Sorbent | 5 µm | | | |
| Látka | t _r [min] | R _s | W _{0.5} [min] | Sym. |
| 5,6-dihydrouracil | 3.06 | - | 0.0631 | 0.86 |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil | 3.24 | 1.6 | 0.0650 | 0.86 |
| uracil | 3.36 | 1.1 | 0.0643 | 0.88 |
| 5-fluorouracil | 3.87 | 4.4 | 0.0704 | 0.89 |
| 5-chlorouracil | 6.92 | 21.5 | 0.0971 | 0.91 |
| 5-fluorouridin | 8.91 | 11.3 | 0.1100 | 0.99 |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 11.45 | 12.9 | 0.1213 | 0.99 |

| Kolona | Phenomenex Synergi Hydro-RP | | | |
|----------------------------|-----------------------------|----------------|------------------------|------|
| Rozměr | 150 mm x 4.6 mm | | | |
| Sorbent | 4 µm | | | |
| Látka | t _r [min] | R _s | W _{0.5} [min] | Sym. |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil | 1.882 | - | 0.0905 | 0.74 |
| 5,6-dihydrouracil | 1.885 | 0.02 | 0.1236 | 0.60 |
| uracil | 2.026 | 0.74 | 0.1012 | 0.69 |
| 5-fluorouracil | 2.327 | 1.83 | 0.0918 | 0.81 |
| 5-chlorouracil | 4.668 | 12.12 | 0.1354 | 0.86 |
| 5-fluorouridin | 6.537 | 7.63 | 0.1527 | 0.96 |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 8.793 | 8.14 | 0.1733 | 0.94 |

| Kolona | Thermo Hypersil GOLD | | | |
|----------------------------|----------------------|----------------|------------------------|------|
| Rozměr | 150 mm x 4.6 mm | | | |
| Sorbent | 5 µm | | | |
| Látka | t _r [min] | R _s | W _{0.5} [min] | Sym. |
| 5,6-dihydrouracil | 3.33 | - | 0.0841 | 0.79 |
| uracil | 3.42 | 0.65 | 0.0793 | 0.84 |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil | 3.42 | 0.00 | 0.0813 | 0.92 |
| 5-fluorouracil | 3.81 | 2.79 | 0.0837 | 0.89 |
| 5-chlorouracil | 6.54 | 16.04 | 0.1165 | 0.93 |
| 5-fluorouridin | 7.95 | 6.73 | 0.1294 | 0.96 |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 10.36 | 10.34 | 0.1456 | 0.97 |

| Kolona | Eclipse XDB-C18 | | | |
|----------------------------|----------------------|----------------|------------------------|------|
| Rozměr | 150 mm x 4.6 mm | | | |
| Sorbent | 5 µm | | | |
| Látka | t _r [min] | R _s | W _{0.5} [min] | Sym. |
| 5,6-dihydrouracil | 2.13 | - | 0.0788 | 0.72 |
| uracil | 2.13 | 0.00 | 0.0890 | 0.77 |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil | 2.15 | 0.13 | 0.0882 | 0.78 |
| 5-fluorouracil | 2.43 | 1.77 | 0.0954 | 0.74 |
| 5-chlorouracil | 4.22 | 8.01 | 0.1681 | 0.71 |
| 5-fluorouridin | 5.89 | 5.58 | 0.1837 | 0.83 |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 7.77 | 5.64 | 0.2088 | 0.82 |

Obrázek 30 a Tabulka 1. Chromatogramy separace uracilu, 5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouracilu, 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu na plně porézních částicových sorbentech s oktadecylovou modifikací povrchu. Gradientová eluce probíhala v systému mobilních fází MFA - voda (pH=2,5) a MFB - methanol:MFA (1:1, v/v) s nárůstem 1% MFB za minutu při průtoku 1,0 ml.min⁻¹.

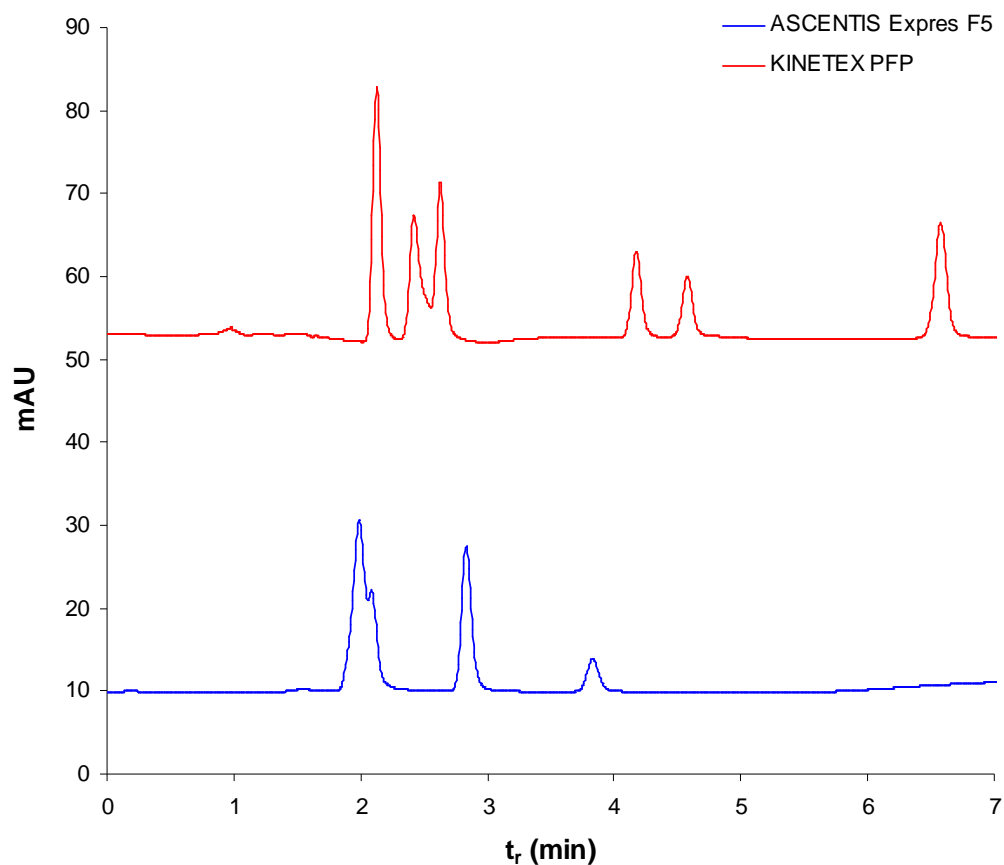


| Kolona | | Waters XSelect CSH Fluorophenyl | | | |
|----------------------------|-------------|---------------------------------|-----------------|------|--|
| Rozměr | | 150 mm x 4.6 mm | | | |
| Sorbent | | 3.5 μ m | | | |
| Látka | t_r [min] | R_s | $W_{0.5}$ [min] | Sym. | |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil | 1.76 | - | 0.0954 | 0.56 | |
| 5,6-dihydrouracil | 1.79 | 0.20 | 0.0890 | 0.55 | |
| 5-fluorouracil | 1.95 | 1.06 | 0.0874 | 0.63 | |
| uracil | 1.95 | 0.02 | 0.0971 | 0.59 | |
| 5-fluorouridin | 2.37 | 2.39 | 0.1068 | 0.66 | |
| 5-chlorouracil | 2.69 | 1.79 | 0.1043 | 0.64 | |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 3.31 | 3.05 | 0.1359 | 0.70 | |

| Kolona | | Thermo Hypersil GOLD PFP | | | |
|----------------------------|-------------|--------------------------|-----------------|------|--|
| Rozměr | | 150 mm x 4.6 mm | | | |
| Sorbent | | 5 μ m | | | |
| Látka | t_r [min] | R_s | $W_{0.5}$ [min] | Sym. | |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil | 3.071 | - | 0.0786 | 0.85 | |
| 5,6-dihydrouracil | 3.101 | 0.22 | 0.0837 | 0.79 | |
| uracil | 3.182 | 0.58 | 0.0801 | 0.84 | |
| 5-fluorouracil | 3.337 | 1.13 | 0.0815 | 0.87 | |
| 5-chlorouracil | 4.770 | 8.84 | 0.1092 | 0.89 | |
| 5-fluorouridin | 4.897 | 0.65 | 0.1197 | 0.9 | |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 6.928 | 8.59 | 0.1585 | 0.89 | |

| Kolona | | Phenomenex LUNA PFP(2) | | | |
|----------------------------|-------------|------------------------|-----------------|------|--|
| Rozměr | | 150 mm x 4.6 mm | | | |
| Sorbent | | 5 μ m | | | |
| Látka | t_r [min] | R_s | $W_{0.5}$ [min] | Sym. | |
| 5,6-dihydrouracil | 4.359 | - | 0.1367 | 0.76 | |
| uracil | 4.657 | 1.37 | 0.1197 | 0.88 | |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil | 4.800 | 0.70 | 0.1207 | 0.91 | |
| 5-fluorouracil | 5.411 | 2.89 | 0.1282 | 0.94 | |
| 5-chlorouracil | 9.110 | 13.62 | 0.1912 | 0.99 | |
| 5-fluorouridin | 10.56 | 4.13 | 0.2217 | 1.02 | |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 14.094 | 8.73 | 0.2547 | 1.03 | |

Obrázek 31 a Tabulka 2. Chromatogramy separace uracilu, 5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouracilu, 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu na plně porézních částicových sorbentech s pentafluorofenylovou modifikací povrchu. Gradientová eluce probíhala v systému mobilních fází MFA - voda (pH=2,5) a MFB - methanol:MFA (1:1, v/v) s nárůstem 1% MFB za minutu při průtoku 1,0 ml.min⁻¹.



| Kolona | Phenomenex KINETEX PFP | | | | Kolona | Supelco ASCENTIS Express F5 | | | |
|----------------------------|------------------------|----------------|------------------------|------|----------------------------|-----------------------------|----------------|------------------------|------|
| Rozměr | 150 mm x 3.0 mm | | | | Rozměr | 150 mm x 3.0 mm | | | |
| Sorbent | 2.6 μm | | | | Sorbent | 2.7 μm | | | |
| Látka | t _r [min] | R _s | W _{0.5} [min] | Sym. | Látka | t _r [min] | R _s | W _{0.5} [min] | Sym. |
| 5,β-dihydrouracil | 2.111 | - | 0.0725 | 0.81 | 5,β-dihydrouracil | 1.654 | - | 0.076 | 0.78 |
| uracil | 2.135 | 0.20 | 0.0721 | 0.82 | uracil | 1.974 | 2.50 | 0.0744 | 0.76 |
| 5-fluoro-5,β-dihydrouracil | 2.417 | 2.27 | 0.0739 | 0.81 | 5-fluoro-5,β-dihydrouracil | 2.012 | 0.30 | 0.0728 | 0.77 |
| 5-fluorouracil | 2.63 | 1.69 | 0.0744 | 0.84 | 5-fluorouracil | 2.094 | 0.67 | 0.0709 | 0.80 |
| 5-chlorouracil | 4.174 | 10.98 | 0.091 | 0.90 | 5-chlorouracil | 2.837 | 5.70 | 0.0825 | 0.79 |
| 5-fluorouridin | 4.577 | 2.50 | 0.0985 | 0.92 | 5-fluorouridin | 2.839 | 0.01 | 0.0813 | 0.85 |
| 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 6.577 | 11.07 | 0.1141 | 0.98 | 5-fluoro-2'-deoxyuridin | 3.833 | 6.50 | 0.0987 | 0.85 |

Obrázek 32 a Tabulka 3. Chromatogramy separace uracilu, 5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouracilu, 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu na kolonách s „core-shell“ technologií a pentafluorofenylovou modifikací povrchu. Gradientová eluce probíhala v systému mobilních fází MFA - voda (pH=2,5) a MFB - methanol:MFA (1:1, v/v) s nárůstem 1% MFB za minutu při průtoku 0,45 ml.min⁻¹.

V dalším kroku bylo přistoupeno k optimalizaci přípravy vzorku. Nejprve byla testována možnost prosté deproteinace roztoky kyseliny chloristé nebo trichloroctové. Výsledkem však byly extrakty obsahující příliš mnoho látek interferujících se stanovením. Dále bylo testováno využití L-L extrakce pomocí několika organických rozpouštědel nemísitelných s vodou. Extrakce probíhala z vodné fáze po jejím okyselení kyselinou chloristou. Poměr objemu organické a vodné fáze byl 1000:250 μ l. Výsledky experimentu stručně shrnuje *Tabulka 4*. Jak si lze povšimnout využití L-L extrakce nebylo v tomto případě příliš vhodné k obecně velmi nízkým účinnostem extrakce, zejména v případě 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu. Výjimku tvoří pouze 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu při použití ethylacetátu jako extrakčního činidla, kde se výtěžnost pohybovala přes 86%. V době vývoje metody již byly na trhu k dispozici iontové kapaliny (*Kap. 1.10.5*), které by pravděpodobně byly daleko vhodnějšími extrakčními činidly než klasická organická rozpouštědla, nicméně jejich testování nebylo možné vzhledem k jejich vysoké ceně.

Tabulka 4. Výtěžnost extrakce 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouracilu, 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu z vodné fáze.

| Výtěžnost extrakce | | | | |
|---------------------------|-------------------|------|------|-------|
| Extrakční činidlo | Sloučenina | | | |
| | výtěžnost % | | | |
| | FUH ₂ | FU | FUrd | FdUrd |
| tert-butylmethyl ether | 11.7 | 30.3 | 2.36 | 0.00 |
| diethylether | 6.2 | 10.5 | 0.43 | 0.29 |
| dichlormethan | 3.2 | 0.6 | 0.06 | 0.15 |
| chloroform | 1.8 | 1.5 | 70.9 | 0.15 |
| ethylacetát | 86.5 | 28.3 | 14.0 | 0.52 |

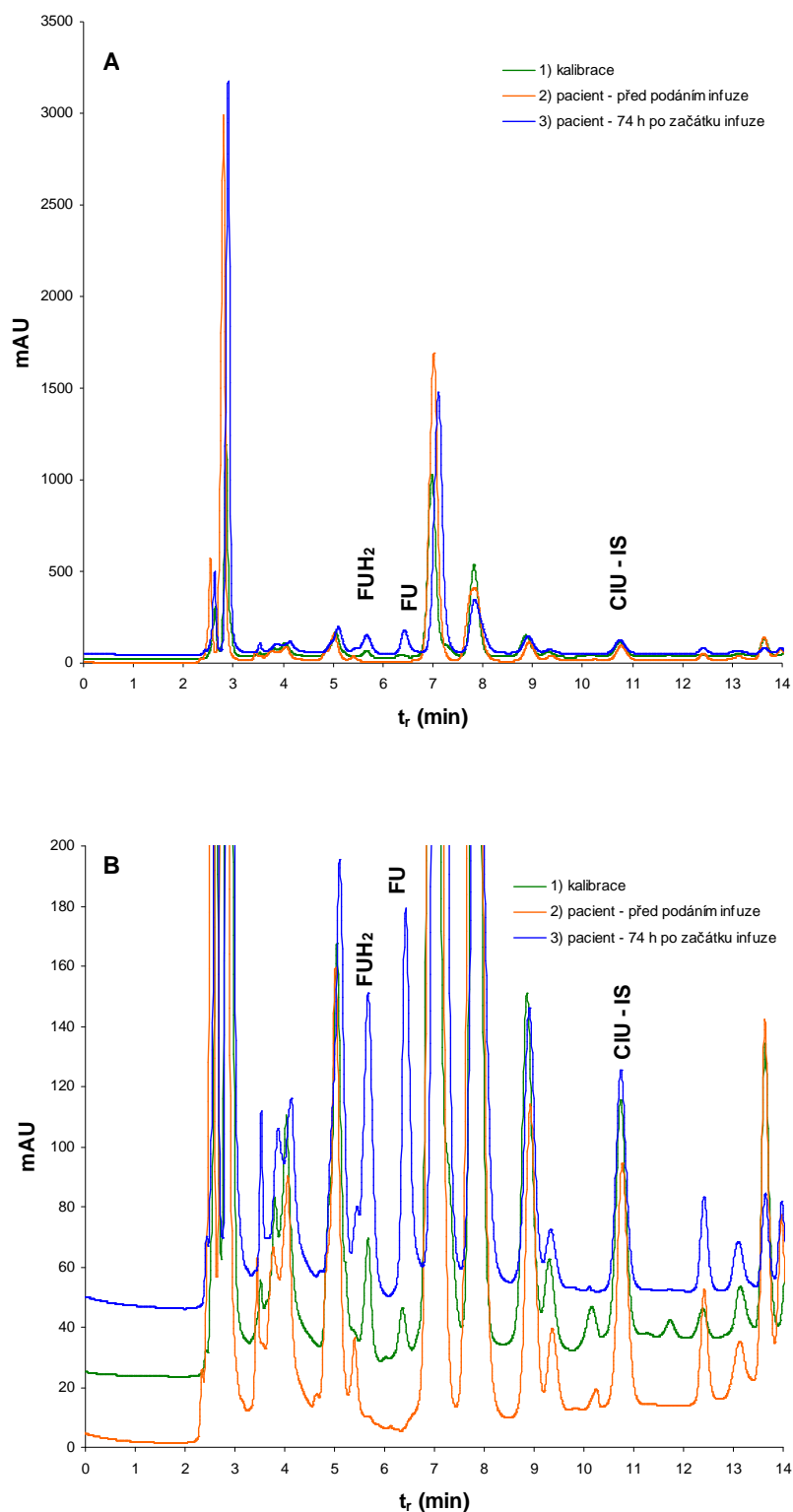
Mezi poměrně zajímavé metody izolace 5-fluorouracilu a jeho vybraných metabolitů z biologické matrice, které bych zde rád zmínil, patří metoda Guerrieriho [252]. Tato metoda využívá ligand-výměnného mechanismu při SPE extrakci na silném katexu (SCX) modifikovaném měďnatými ionty. Postup byl na našem pracovišti testován na kolonkách Supelclean LC-SCX. Bohužel se ukázalo, že se 5-fluoro-5,6-dihydrouracil rozkládá v alkalickém prostředí při eluci roztokem amoniaku. Bylo testováno několik dalších sloučenin potenciálně vhodných jako eluční činidla pro ligandovou výměnu místo amoniaku (např. hydrazin, hydroxylamin, glycin, ethylendiamin, kyselina šťavelová, citronová, askorbová, cystein, thiokyanatan amonný), bohužel bez přesvědčivých výsledků. Hlavními nedostatky byly zejména následné problémy s chromatografií, špatná výtěžnost extrakce případně rozklad 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu.

Pro přípravu vzorků byly dále testovány extrakční kolonky s hydrofilně-lipofilní náplní (Oasis HLB, Waters). Zde se projevil problém s nízkou retencí analytů na SPE kolonce a jejich ztrátě již při promývání kolonky čistou vodou. Poslední z testovaných SPE kolonek byly kolonky Atoll, které byly využity například v práci Déporte et al. [265] při extrakci uracilu a 5,6-dihydrouracilu z plasmy. Sorbent těchto SPE kolonek je tvořen polymerem s velmi velkou plochou aktivního povrchu, vyznačující se dobrou adsorpční kapacitou i pro velmi polární látky. Již po prvních experimentech se ukázalo použití tohoto typu sorbentu jako velmi výhodné.

Původní metoda SPE extrakce [265] byla modifikována pro naše účely. V první řadě se ukázalo, že iniciální proplach pouze 1 ml methanolu není postačující vzhledem ke skutečnosti, že při závěrečné eluci, ke které jsme používali směs acetonitrilu s methanolem dochází k vymývání interferentů rušících stanovení FUH₂, které se uvolňují z materiálu sorbentu. Z tohoto důvodu byl zařazen iniciální proplach a kondicionace kolonek nejprve 2 ml acetonitrilu následované 2 ml methanolu. V dalším kroku byla organická rozpouštědla vymyta 1 ml vody a kolonka kondicionována 1 ml fosfátového pufru (KH₂PO₄, 10 mmol.l⁻¹, pH=2.0). Kyselé pH bylo zvoleno pro potlačení disociace analytů. Oproti původní práci jsme zjistili, že není nutné vzorek před aplikací na kolonky ředit fosfátovým pufrům. Po aplikaci vzorku na kolonkou následoval promývací krok 1 ml roztoku mravenčanu amonného (HCOONH₄, 10 mmol.l⁻¹, pH=5.0). Pro eluci bylo oproti původní práci použito opět modifikovaného složení elučního činidla obsahujícího směs acetonitril:methanol (20:80, v/v). Toto složení poskytovalo optimální výtěžnost všech analytů při minimalizaci koeluce interferujících látek.

Eluáty byly sbírány do 3 ml skleněných zkumavek a odpařeny pod proudem dusíku (10 min, 45°C) s následnou rekonstitucí ve 200 µl roztoku kyseliny chlorovodíkové (10 mmol.l⁻¹). Vzhledem k nutnosti stanovení nízkých koncentrací v řádu desítek ng.ml⁻¹ bylo nutné zakoncentrování vzorku během SPE extrakce. Důvodem byla zejména slabá absorpce analytů při využití UV/VIS detekce. Pro první experimenty bylo vzato k SPE extrakci 1 ml plasmy. Při užití tohoto objemu a rekonstituci ve 200 µl objemu bylo dosaženo pětinasobného zakoncentrování. Zvýšením objemu zpracovávané plasmy na 1.5 ml bylo možné dosáhnout lepšího limitu stanovitelnosti. Zpracování většího objemu než 1.5 ml již nebylo žádoucí vzhledem k zátěži pacientů, kteří mimo odběrů pro stanovení 5-fluorouracilu a metabolitů absolvují i další invazivní odběry pro jiná biochemická vyšetření.

Posledním krokem ve vývoji metody byla finální úprava gradientové eluce, pH a průtoku mobilní fáze a teploty při separaci pro dosažení maximální rozlišení 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu a 5-fluorouracilu od endogenních látek, zejména uracilu a 5,6-dihydrouracilu, na koloně Luna PFP(2) (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Z uvedených parametrů měly rozhodující vliv na separaci výše uvedených látek zejména hodnota pH, kde s rostoucím pH docházelo ke zhoršování účinnosti separace čtyř výše uvedených látek. Z tohoto důvodu byla ponechána hodnota pH=2,5 s ohledem na dostatečnou účinnost separace a životnost kolony. Teplota měla opět vliv na separaci zejména uracilu a 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu. Z testovaného rozsahu 15-40 °C bylo nejlepších výsledků dosaženo při teplotě 20°C, avšak pro separaci byla nakonec zvolena teplota o 5 °C vyšší, vzhledem k omezení případných fluktuací zejména v letních měsících, kdy je zvýšené riziko, že Peltierovy články určené k chlazení kolonového termostatu nebudou schopné dostatečně odvádět teplo z regulovaného prostoru a dojde k nekontrolovatelným změnám teploty a posunům v retenčních časech. Výsledné parametry separace jsou následující: 0,0-5,5 min 6 % B, 5,5-15 min 6-50 % B, 15-18 min 6 % B při průtoku mobilní fáze 0,7 ml.min⁻¹ a teplotě 25°C.



Obrázek 33. Ukázka chromatogramů stanovení 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu, 5-fluorouracilu a 5-chlorouracilu v plasmě. Jedná se o stejný chromatogram v malém (A) a velkém rozlišení (B). Chromatogram kalibračního standardu připraveného v blankové plasmě s koncentrací $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu a $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 5-fluorouracilu (1), vzorek plasmy pacienta před podáním infuze 5-fluorouracilu (2), vzorek plasmy pacienta odebraný 74 hodin po začátku kontinuální *i.v.* infuze roztoku 5-fluorouracilu s rychlostí podávání $700 \text{ mg}/24\text{h}/\text{m}^2$ (3).

Vzhledem k tomu, že během pilotních testů se neprokázala přítomnost metabolitů 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu v lidské plasmě při podání standardních dávek 5-fluorouracilu, byla metoda validována pouze pro stanovení 5-fluorouracilu a hlavního neaktivního metabolitu 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu. Vyšší koncentrace aktivních metabolitů 5-fluorouridinu a 5-fluoro-2'-deoxyuridinu lze pravděpodobně očekávat spíše intracelulárně. Pro buněčnou matici (homogenáty tkání ev. periferní mononukleární krevní buňky) však nebyla metoda vyvíjena ani validována, vzhledem k tomu, že tento požadavek nebyl vznesen.

Validace byla prováděna na našem pracovišti v rámci jedné laboratoře, kde byly vzorky z onkologické kliniky následně rutinně zpracovávány. Vzorky pro provádění validačních testů byly připraveny v blankové lidské plasmě. Koncentrace vzorků kontroly kvality (QC vzorků) a koncentrace kalibrátorů jsou uvedeny v *Tabulce 5*.

Tabulka 5. Koncentrace kalibrátorů a vzorků kontroly kvality použitých v rámci validační studie.

| Koncentrace kalibračních vzorků | | |
|--|---------------------|-------|
| <i>hladina</i> | <i>koncentrace</i> | |
| | ng.ml ⁻¹ | |
| | FUH ₂ | FU |
| L1 | 50.2 | 25.3 |
| L2 | 100.3 | 50.6 |
| L3 | 200.6 | 101.3 |
| L4 | 401.3 | 202.5 |
| L5 | 802.5 | 405.0 |
| L6 | 1605.0 | 810.0 |

| Koncentrace QC vzorků | | |
|------------------------------|---------------------|-----|
| <i>hladina</i> | <i>koncentrace</i> | |
| | ng.ml ⁻¹ | |
| | FUH ₂ | FU |
| QC1 | 120 | 60 |
| QC2 | 600 | 300 |
| QC3 | 1200 | 600 |

Selektivita

Selektivita metody byla ověřena na sedmi nezávislých vzorcích blankové plasmy. Měřením bylo prokázáno, že v žádné z použitých plasem nedochází k interferencím na retenčních časech sledovaných látek.

Linearita kalibrační závislosti a LLOQ

Linearita byla testována pomocí kalibračních vzorků na šesti nenulových koncentračních hladinách. Na každé koncentrační hladině bylo analyzováno celkem sedm nezávislých vzorků. LLOQ byl stanoven jako spodní bod kalibrační křivky. Přesnost a správnost byly na této hladině ověřeny měřením sedmi paralelních vzorků. Experimentem bylo prokázáno, že metoda poskytuje lineární odezvu v závislosti na koncentraci v rozmezí 50,2 – 1605 ng.ml⁻¹ pro 5-fluoro-5,6-dihydrouracil a 25,3 – 810 ng.ml⁻¹ pro 5-fluorouracil (Tab. 6). Tento koncentrační rozsah s velkou rezervou pokryl rozmezí koncentrací obou analytů ve vzorcích plasmy pacientů léčených 5-fluorouracilem během studie.

Tabulka 6. Výsledky měření linearity kalibrační závislosti a LLOQ

| Kalibrační křivka $y=ax+b$ | | |
|--|--------------------|------------------|
| Sloučenina | | |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (PRŮMĚR ± SD), n=7 | směrnice a | 1.5547 ± 0.0717 |
| | intercept b | 0.0642 ± 0.0521 |
| | koef. deter. r^2 | 0.9991 ± 0.0016 |
| 5-fluorouracil (PRŮMĚR ± SD), n=7 | směrnice a | 2.9667 ± 0.0890 |
| | intercept b | -0.0266 ± 0.0158 |
| | koef. deter. r^2 | 0.9998 ± 0.0002 |

| LLOQ | | | |
|--|------------------------|-----------------|------------------|
| Sloučenina | hladina | přesnost | správnost |
| | | RSD% | RE % |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (PRŮMĚR ± SD), n=7 | 50 ng.ml ⁻¹ | 10.01 | 16.8 |
| 5-fluorouracil (PRŮMĚR ± SD), n=7 | 25 ng.ml ⁻¹ | 6.75 | -2.52 |

Přesnost a správnost metody

Přesnost a správnost metody byla zjišťována na celkem třech koncentračních hladinách s pěti opakováními na každé hladině pro testy prováděné v rámci jednoho dne („intra-day“) a třemi opakováními na každé hladině pro testy prováděné během třech různých dnů („inter-day“), tedy celkem devíti vzorky na každé koncentrační hladině (Tab. 7).

Tabulka 7. Výsledky měření přesnosti a správnosti metody

| Přesnost a správnost (v rámci měření během jednoho dne) | | | |
|--|-----|-----------------|------------------|
| Sloučenina | | přesnost | správnost |
| | | RSD% | RE % |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (PRŮMĚR ± SD), n=5 | QC1 | 5.21 | 13.3 |
| | QC2 | 1.41 | 3.51 |
| | QC3 | 2.00 | 8.88 |
| 5-fluorouracil (PRŮMĚR ± SD), n=5 | QC1 | 1.68 | -0.440 |
| | QC2 | 1.23 | -0.850 |
| | QC3 | 2.18 | 1.09 |

| Přesnost a správnost (v rámci měření během tří různých dnů) | | | |
|--|-----|-----------------|------------------|
| Sloučenina | | přesnost | správnost |
| | | RSD% | RE % |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (PRŮMĚR ± SD), n=9 | QC1 | 8.40 | 8.53 |
| | QC2 | 4.68 | 4.26 |
| | QC3 | 2.31 | 11.0 |
| 5-fluorouracil (PRŮMĚR ± SD), n=9 | QC1 | 4.23 | -3.37 |
| | QC2 | 2.02 | -1.70 |
| | QC3 | 1.52 | 0.770 |

Výtěžnost analytů z biologické matrice

Výtěžnost metody byla sledována na třech koncentračních hladinách s pěti opakováními na každé hladině. Porovnávány byly odezvy roztoků látek připravených v 10 mmol.l⁻¹ HCl s odezvou analytů v biologické matrici po standardní přípravě vzorku SPE extrakcí a rekonstitucí v 10 mmol.l⁻¹ HCl. Při ředění látek v 10 mmol.l⁻¹ HCl bylo vzato v potaz 7,5 násobné zakonzentrování vzorků při SPE extrakci. Výsledek testu prokázal vysokou a konzistentní výtěžnost analytů z biologické matrice s dobrou opakovatelností (Tab. 8).

Tabulka 8. Výsledky měření výtěžnosti analytu z biologické matrice

| Výtěžnost analytu z biologické matrice | | |
|--|-----|------------------------------|
| Sloučenina | | Výtěžnost analytu [%] |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (PRŮMĚR ± SD), n=5 | QC1 | 79.9 ± 5.7 |
| | QC2 | 93.5 ± 7.8 |
| | QC3 | 88.5 ± 6.0 |
| 5-fluorouracil (PRŮMĚR ± SD), n=5 | QC1 | 93.7 ± 8.8 |
| | QC3 | 95.6 ± 7.6 |
| | QC3 | 88.4 ± 5.9 |

Stabilita

Z dalších parametrů byla zjišťována krátkodobá stabilita a stabilita při zmražení – rozmražení. Stabilita zmražení-rozmražení („freeze–thaw“) byla zjišťována pouze pro dva cykly, vzhledem ke skutečnosti, že pro analýzu byly od každého pacienta k dispozici alespoň 3 alikvóty plasmy po 1,5 ml a nepředpokládalo se vícenásobné rozmrazování vzorků i při opakování analýz. Krátkodobá stabilita byla zjišťována pro rozmražené vzorky na dvou koncentračních hladinách. Test probíhal při laboratorní teplotě 23°C pod dobu pěti hodin za běžných světelných podmínek, v laboratoři bez přímého slunečního svitu při osvětlení zářivkovým světlem ze vzdálenosti 3 m v uzavřených polypropylenových vzorkovnicích. Výsledky měření stability jsou shrnuty v *Tabulce 9*. Dlouhodobá stabilita nebyla zjišťována vzhledem k dostatku literárních údajů [247-248, 251, 266] a vzhledem k tomu, že vzorky byly zpracovány v rámci jednoho týdne při uskladnění v -80°C. Provedené testy prokázaly dostatečnou stabilitu vzorků po dobu zpracování. Naším experimentem se za běžných laboratorních podmínek během pětihodinového stabilitního testu neprokázala často uváděná degradace 5-fluorouracilu světlem.

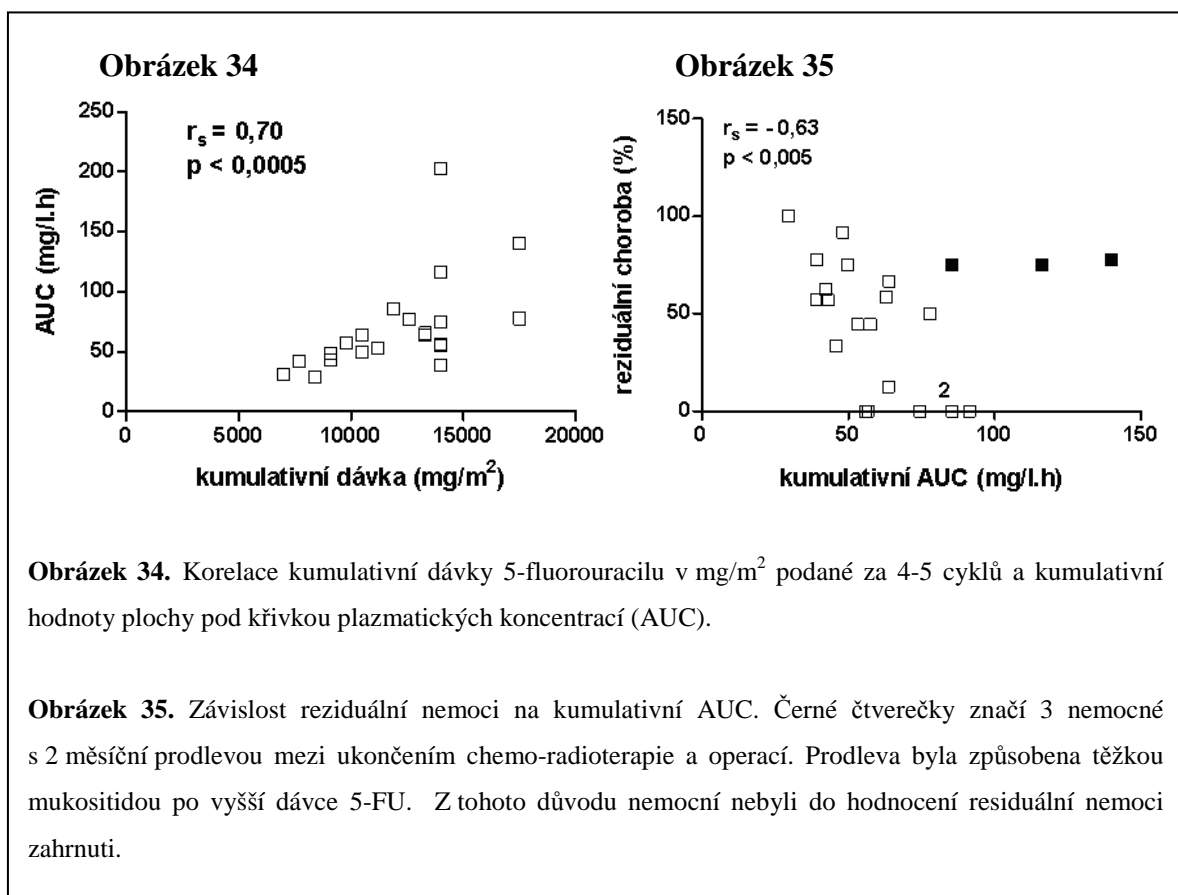
Tabulka 9. Výsledky měření stability analytů

| Krátkodobá stabilita | | |
|--|-----|------------------------------|
| Sloučenina | | Výtěžnost analytu [%] |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (PRŮMĚR ± SD), n=3 | QC1 | 112.6 ± 1.8 |
| | QC3 | 95.4 ± 0.87 |
| 5-fluorouracil (PRŮMĚR ± SD), n=3 | QC1 | 103.9 ± 1.7 |
| | QC3 | 103.0 ± 1.3 |

| Stabilita zmražení - rozmražení | | | |
|--|-----|------------------------------|------------------|
| Sloučenina | | Výtěžnost analytu [%] | |
| | | 1. cyklus | 2. cyklus |
| 5-fluoro-5,6-dihydrouracil (PRŮMĚR ± SD), n=3 | QC1 | 101.6 ± 1.4 | 108.4 ± 1.7 |
| | QC3 | 99.9 ± 1.0 | 97.6 ± 1.6 |
| 5-fluorouracil (PRŮMĚR ± SD), n=3 | QC1 | 88.0 ± 2.8 | 95.5 ± 2.4 |
| | QC3 | 100.5 ± 1.9 | 98.1 ± 0.5 |

Z výsledků validace vyplývá, že metoda splňuje kritéria daná všeobecně uznávaným doporučením *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, Food and Drug Administration [221].

Vyvinutá metoda byla využita při prospektivní otevřené klinické studii pro TDM pacientů ($n=25$) léčených s kolorektálním karcinomem (CRC) neoadjuvantní chemo-radioterapií, která probíhala po dobu 4-5 týdnů. Aplikovaná dávka záření činila 50.5 Gy ve 28 frakcích. Po celou dobu souběžně s radioterapií byla podávána kontinuální *i.v.* infuze 5-fluorouracilu prostřednictvím portu implantovaného do *v. jugularis* nebo *v. subclavia*. V rámci studie byla rychlost infuze měněna v rozmezí 200 - 1000 mg/24h/m² v závislosti na dosahované ustálené plasmatické koncentraci a toxických efektech léčby. Na základě měření plasmatických koncentrací 5-fluorouracilu bylo zjištěno, že kumulativní dávka za dobu léčby dobře koreluje s kumulativní AUC (Obr. 34). Z výsledků bylo dále zjištěno, že s kumulativní AUC je negativně korelováno reziduální onemocnění (Obr. 35). Regrese nádoru byla zjištěna u 19 z 23 nemocných (2 nemocní zatím nebyli operováni). Kompletní patologická remise byla dosažena u pěti nemocných vyznačujících se kumulativní AUC pro celou léčbu $> 59 \text{ mg} \cdot (\text{l} \cdot \text{h})^{-1}$. V době přípravy disertační práce nebyla ještě studie ukončena. Předběžné statistické zpracování prozatím získaných dat provedl Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D (Univerzita Karlova v Praze, LFHK).

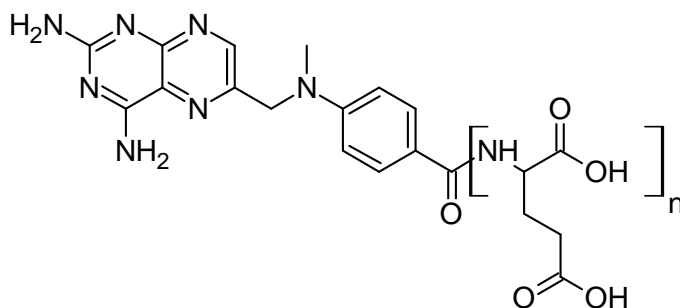


3.2 An Improved High-performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Methotrexate Polyglutamates in Red Blood Cells of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis

Miloš Hroch, Jana Tuková, Pavla Doležalová and Jaroslav Chládek
Biopharmaceutics and Drug Disposition 2009 Apr; 30(3):138-48

3.2.1 Komentář k metodě

Koncentrace **polyglutamátů metotrexátu** (MTXGI₂₋₇, diglutamát až heptaglutamát) v erythrocytech je důležitým markerem pro individualizaci farmakoterapie nízkodávkovým metotrexátem (MTX), při léčbě vybraných autoimunitních onemocnění jako je např. psoriáza nebo revmatoidní artritida [267-272]. Pro stanovení celkové koncentrace MTXGI₂₋₇ v erythrocytech byla vypracována chromatografická metoda s fluorescenční detekcí. Hlavními kritérii při vývoji byla citlivost metody, dobrá selektivita, krátký celkový čas analýzy, jednoduchost chromatografické separace a dlouhodobá stabilita kolony při opakovaném nástřiku vzorků připravených z biologické matrice. V době vypracování metodiky byla k účelu stanovení MTXGI_n v erythrocytech publikována pouze jedna práce [273], pro naše účely však nevyhovovala zejména délkou chromatografické separace s časem analýzy jednoho vzorku 20 minut. Pro účely studie dále nebylo nutné separovat jednotlivé polyglutamáty MTX. Metoda byla vyvíjena na koloně **GEMINI C18**, patřící mezi kolony s hybridní křemíko-uhlíkovou stacionární fází (*Kap. 1.8.2*) odolnou v širokém rozsahu pH (1-12), známé též svojí vynikající dlouhodobou stabilitou.



Obrázek 36. Struktura molekuly metotrexátu ($n=1$) a polyglutamátů metotrexátu ($n=2-7$ jednotek připojených amidickou vazbou v poloze 5 glutamylového zbytku).

Enzymatická hydrolýza

Pro účely studie nebylo nutné separovat a stanovovat jednotlivé polyglutamáty MTX, ale byla zjišťována pouze jejich celková koncentrace. Z tohoto důvodu byly nejprve polyglutamáty přítomné ve vzorku podrobeny enzymatické hydrolýze γ -glutamylhydrolázou za vzniku metotrexátu, který byl následně stanovován. Enzymatická hydrolýza probíhala ve tmě po dobu 6 hodin při teplotě 37°C a jako zdroj enzymu byla použita vybraná šarže lidské plasmy, která byla přidávána ke vzorku erytrocytů.

Příprava vzorku

Erytrocyty jsou jako matrice pro práci poměrně problematické. V první fázi vývoje metody bylo testováno několik způsobů přípravy vzorků deproteinací kyselinou chloristou, kyselinou trichloroctovou nebo působením tepla (90°C). Použití termální extrakce nebo kyseliny chloristé vedlo ke vzniku precipitátu gelovité konzistence, který nebylo možné odstředit a získat supernatant použitelný k nástřiku na kolonu. Dobrých výsledků vzhledem k morfologii precipitátu a výtěžnosti reakce bylo dosaženo s 0,8 mol.l⁻¹ roztokem kyseliny trichloroctové ve 40% (v/v) kyselině octové. Před deproteinací bylo ovšem nutné zchladit vzorky na teplotu okolo 4°C. Poté byla získána uniformní jemnozrnná sraženina, která velmi dobře sedimentovala při odstředování.

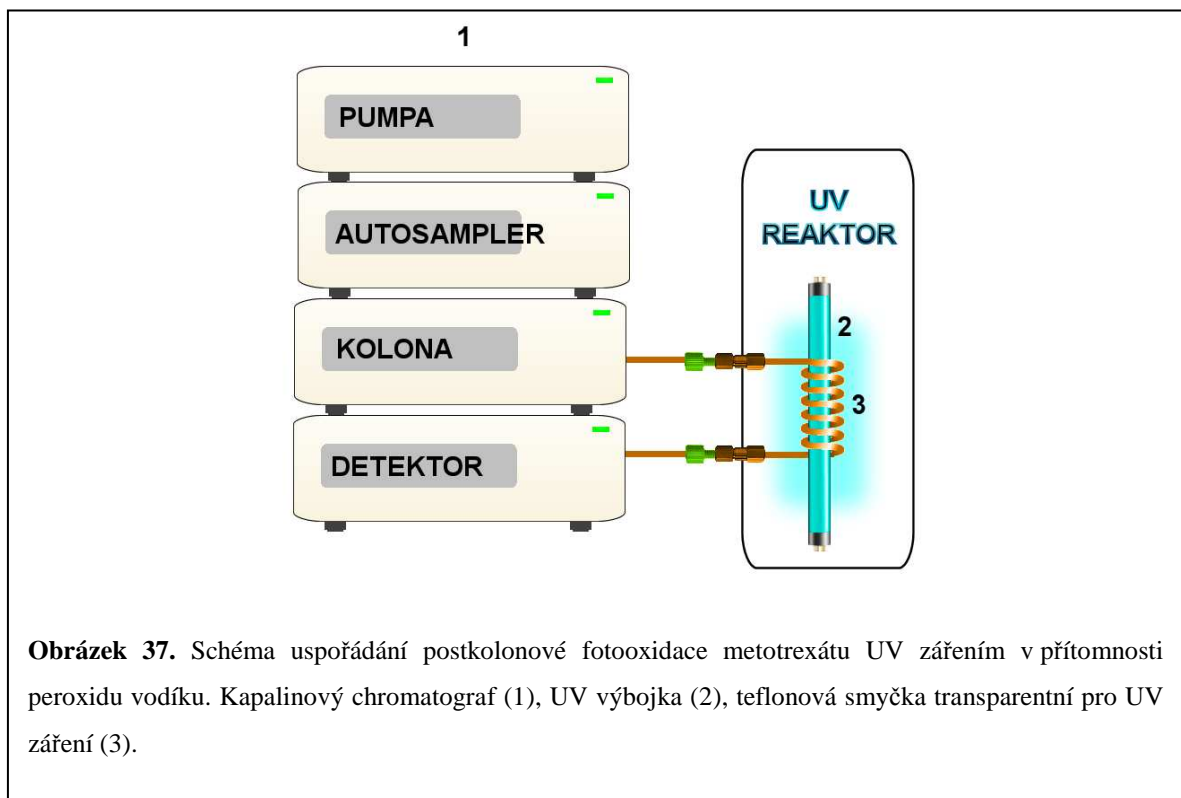
Separace

K separaci byla využita kolona GEMINI C18 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m sorbent (Phenomenex, Torrance, USA). Z hlediska selektivity a dostatečného rozlišení postačovala k separaci isokratická eluce. Výsledkem optimalizace mobilní fáze, zejména vzhledem k obsahu peroxidu vodíku, který měl zásadní vliv na odezvu analytu bylo následující složení: acetonitril:octan amonný (50 mmol.l⁻¹, pH=5,5):peroxid vodíku (30%, w/w) – 110:890:0.25 (v/v/v).

Detekce

Molekula metotrexátu je nositelem chromoforu s absorpcí v ultrafialové oblasti na vlnové délce $\lambda = 313$ nm. Absorpce však není dostatečná, aby umožnila dosáhnout detekčních limitů potřebných pro spolehlivé stanovení MTXGl_n v erytrocytech, jejichž celková koncentrace se pohybuje v řádu desítek až stovek nmol.l⁻¹.

Z tohoto důvodu bylo použito selektivní a citlivé fluorescenční detekce po post-kolonové fotooxidaci UV zářením, kde se využívá vzniku fluoreskujícího produktu metotrexátu [274-275] s excitační/emisní vlnovou délkou 370/463 nm. Principem je převedení MTX na fluoreskující produkt jeho oxidací peroxidem vodíku, který je aditivem mobilní fáze, při osvětlení UV zářením rtuťové výbojky. Pro dosažení maximální odezvy bylo nutné optimalizovat koncentraci peroxidu vodíku v mobilní fázi a dobu zdržení eluentu v derivatizační teflonové smyčce. Doba zdržení byla optimalizována změnou délky teflonové kapiláry. Schématické znázornění separace s post-kolonovou fotoderivatizací, které jsme využili, je znázorněno na *Obrázku 37*. Čas analýzy jednoho vzorku naší metodou činí cca 12 minut, bez nutnosti ekvilibrace kolony vzhledem k užití isokratické separace. Do dnešního dne bylo od vydání naší práce [276] publikováno několik dalších metod zabývajících se měřením $MTXGI_n$ v erythrocytech [277-278]. Jejich souhrn podává práce Goodmana [279]. Vypracovaná metoda byla využita ve studiích „*Vztah intracelulárních hladin metotrexátu ke klinickým a laboratorním parametrům aktivity onemocnění u dětí s idiopatickou artritidou*“ (grant IGA, NE-6681-3), „*Pilotní studie neinvazivního monitorování hepatotoxicity v průběhu dlouhodobé farmakokineticky řízené léčby psoriázy metotrexátem a kyselinou listovou*“ (grant IGA, NS-10364-3). Na základě zavedení této metody a jejím využitím v několika studiích byly publikovány práce [276, 280], které jsou dále uvedeny v plném rozsahu.



Obrázek 37. Schéma uspořádání postkolonové fotooxidace metotrexátu UV zářením v přítomnosti peroxidu vodíku. Kapalinový chromatograf (1), UV výbojka (2), teflonová smyčka transparentní pro UV záření (3).

An Improved High-performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Methotrexate Polyglutamates in Red Blood Cells of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis

Miloš Hroch^{a,*}, Jana Tuková^b, Pavla Doležalová^b, and Jaroslav Chládek^a

^aDepartment of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, Hradec Králové, Czech Republic

^bDepartment of Paediatrics and Adolescent Medicine, Charles University in Prague, 1st Medical School, Ke Karlovu 2, Prague, Czech Republic

ABSTRACT: Methotrexate is used widely in the pharmacotherapy of juvenile idiopathic arthritis. Polyglutamates of methotrexate are active metabolites which accumulate in cells including erythrocytes. Their intracellular concentration may reflect methotrexate bioavailability and, at the same time, may serve as a bioindicator for optimization of methotrexate therapy and drug monitoring. Therefore, a simple and selective isocratic reversed phase chromatographic method with fluorescence detection (excitation/emission wavelengths of 370/463 nm) was developed which quantifies the sum of all methotrexate polyglutamates in erythrocytes as methotrexate after their enzymatic conversion with γ -glutamylhydrolase. Separation was carried out on a Phenomenex GEMINI C18 column using a mobile phase flowing at a rate of 0.6 ml/min and consisting of a mixture (110:890:0.25 v/v) of acetonitrile, ammonium acetate buffer (0.05 M, pH = 5.5) and hydrogen peroxide 30% (w/w). The method was found linear over the concentration range of 25–400 nmol/l. Its intra- and inter-day precision and accuracy were characterized by coefficients of variation and relative errors less than 20%. The limits of detection and quantification achieved 10.9 and 32.9 nmol/l, respectively. The method was proved suitable for monitoring the concentration of methotrexate polyglutamates in erythrocytes of patients with juvenile idiopathic arthritis. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Key words: HPLC; methotrexate; RBC; juvenile idiopathic arthritis

Introduction

Methotrexate (MTX), 4-amino-10-methylpteroylglutamic acid, is a mainstay of juvenile idiopathic arthritis (JIA) treatment. Safety, efficacy and low toxicity of methotrexate in patients with JIA has been shown by multiple clinical studies in children and adolescents [1–4]. As an inhibitor of dihydrofolate reductase (DHFR), MTX has

anti-proliferative properties but its anti-inflammatory action after low intermittent doses results mainly from its interference with enzymatic pathways of purine metabolism [5,6]. The putative mechanism of action includes inhibition of aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) transformylase in cells which leads to an elevation of adenosine concentration [7,8]. Some investigators showed that, rather than MTX itself, its active polyglutamate metabolites (MTX-Gls) are more important for its effect [9–11].

Clinical studies also documented a large inter-patient variability in the pharmacokinetics of MTX [12]. This can be a factor contributing to the

*Correspondence to: Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic.
E-mail: hrochm@lfhk.cuni.cz

variability of therapeutic and toxic doses. Optimization of the initial treatment (dose, route of administration) is highly clinically relevant since sub-optimal doses may increase the risk of irreversible joint damage while, on the other hand, too aggressive therapy increases the risk of toxicity [13]. There is less value in monitoring low-dose MTX therapy using plasma concentrations of MTX, because MTX is rapidly cleared unchanged via glomerular filtration and tubular secretion within about 48 h [14]. Since the concentration of MTX-Gls represents an active principle and reflects the bioavailability of MTX [7,15,16], it should be the preferred characteristic used for optimization of MTX dosing.

Most studies published so far describe MTX determination in plasma or urine, but only a few address quantification of MTX-Gls in red blood cells (RBCs). Older assays for MTX have some disadvantages such as laborious sample preparation [17], the use of column switching and ion-pairing agents [18], radiochemicals [19] or non-specific enzymatic reactions [20]. On the other hand, the drawbacks of the methods for determination of MTX-Gls include the use of gradient elution with a long time for sample analysis including reequilibration of the chromatographic system [21] or the use of equipment not commonly available in the clinical laboratory [22,23]. Another approach to measure RBCs MTX-Gls concentration is fluorescence polarization immunoassay [24].

In our method, RBCs were treated with human plasma as a source of γ -glutamylhydrolase and the total concentration of MTX-Gls was measured after enzymatic cleavage to MTX. A new, relatively simple, fast and selective liquid chromatographic method was established with fluorescence detection and isocratic elution which is based on post-column on-line photooxidation of MTX [25,26].

Experimental

Chemicals and reagents

Methotrexate was kindly donated by Ebewe Arzneimittel (Unterach, Austria). 4-Amino-10-methylpteroyl diglutamic acid (MTX-Gl₂), 4-amino-10-methylpteroyl triglutamic acid (MTX-Gl₃),

4-amino-10-methylpteroyl tetraglutamic acid (MTX-Gl₄) and 4-amino-10-methylpteroyl pentaglutamic acid (MTX-Gl₅) were obtained from Schircks Laboratories (Jona, Switzerland). All polyglutamates were provided as ammonium salts. LiChrosolv acetonitrile, ammonium acetate, glacial acetic acid and hydrogen peroxide (30%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, nimesulide, sulfasalazine, prednisone, methylprednisolone, mercaptoethanol and trichloroacetic acid were supplied by Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic) and potassium phosphate was from Lachema (Brno, Czech Republic). All chemicals were of analytical-reagent grade or best available purity. Drug-free human plasma used as a source of γ -glutamylhydrolase and blank whole blood for RBCs separation were kindly donated by the teaching hospital transfusion unit (Hradec Králové, Czech Republic). Water was purified and deionized with the MilliQ system (Millipore, Milford, MA, USA).

Instruments

The chromatograph Agilent 1100 series HPLC, consisting of degasser, quaternary pump, autoinjector, thermostated column compartment and fluorescence detector (Agilent, Palo Alto, CA, USA) was used for all separations. Chromatographic data were captured and evaluated with ChemStation software. Post-column derivatization was carried out with photochemical reaction unit Beam Boost (ICT, Frankfurt, Germany), equipped with a low-pressure mercury lamp Sylvania - G8T5 (CTS, Prague, Czech Republic), enclosed with fluoropolymer reaction coil (6.2 m, I.D. 0.30 mm). The coil and lamp were covered with aluminium metal leaf, for increasing the ultraviolet (UV) light reflection. A photoreactor was placed at the column output before the detector. For sample incubation a thermostated shaker Vortemp 56 EVC (Tehtnica, Zelezniky, Slovenia) was used.

Patients and sample collection

The study was approved by the Local Research Ethics Committee and informed consent was obtained from the patients and/or their legal guardians according to the Declaration of

Helsinki (Fifth revision, 2000, Edinburgh, Scotland). Venous blood samples of 3 ml for MTX-Gls determination and routine biochemical tests were collected in Li-heparinized tubes (BD Vacutainer systems, Plymouth, UK). In order to minimize the concentrations of parent MTX monoglutamate in RBCs, sampling was performed 6 days after the last administration. RBCs were separated by centrifugation at $900 \times g$ for 10 min and after isolation washed twice with an equivalent volume of phosphate buffer saline (PBS). The plasma and buffy-coat were discarded. Separation and washing proceeded within 2 h after collection and the temperature did not exceed 4°C during these steps. Packed RBCs were stored at -80°C prior to analysis. Before freezing, the hematocrit of washed and centrifuged samples was measured.

Agents, buffers, stock solutions

Buffer for enzymatic treatment was prepared as 200 mmol/l potassium phosphate with 250 mmol/l mercaptoethanol (pH ~ 4.2 – 4.5) and was stored at 4°C . The deproteinization agent was prepared as 0.8 mol/l trichloroacetic acid solution in 40% (v/v) acetic acid. Stock solutions of MTX-Gl₂, MTX-Gl₃, MTX-Gl₄ and MTX-Gl₅ at concentrations of 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{mol/l}$ were prepared by dilution of 100 $\mu\text{mol/l}$ working solutions of MTX-Gls (in 0.1 mol/l potassium hydroxide) with water. Stock solutions were stored in 2 ml screw capped plastic tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at -80°C in the dark.

Calibrators preparation

The sample preparation procedure described by Dervieux [21] was used with some modifications. Briefly: Calibrators were prepared before analysis from stock solutions of MTX-Gl₃. A volume 5 μl of MTX-Gl₃ at a concentration level 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{mol/l}$ was added to 95 μl of blank RBCs lysate (final concentration 50, 100, 200, 400 nmol/l of MTX-Gl₃ in RBCs), 100 μl of plasma and 100 μl of phosphate buffer with mercaptoethanol (for enzymatic treatment) in a 1.5 ml Eppendorf tube. The mixture was gently vortex-mixed. Calibrators were incubated for 6 h at 37°C . The Eppendorf tubes content after incubation was cooled down to 4°C , coagulated with

100 μl of deproteinization agent (0.8 M trichloroacetic acid in 40% (v/v) acetic acid), thoroughly vortex-mixed for 10 s and centrifuged for 5 min at $15000 \times g$. The clear supernatant was transferred to a vial and a total volume of 100 μl was injected on a HPLC column.

Sample preparation

A volume of 100 μl of hemolysed RBCs was mixed with 100 μl of phosphate buffer with mercaptoethanol (for enzymatic treatment) and 100 μl of human plasma. The mixture was vortex mixed for 15 s followed by incubation at 37°C for 6 h. After incubation, the samples were treated in the same manner as the standards. All samples and standards containing MTX or MTX-Gls were handled under dim light.

Chromatographic conditions

Separation was carried out on a Gemini C18 110A reverse phase column (150×4.6 mm I.D., 5 μm particle size), protected with Gemini C18 4×3 mm guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) at 30°C . The mobile phase was prepared fresh the day before analysis and after 3 days of use it was discarded. It consisted of 50 mmol/l ammonium acetate buffer (pH = 5.5)–acetonitrile–hydrogen peroxide (890:110:0.25, v/v). Prior to use, the mobile phase was filtered through a 0.22 μm Durapore filter (Millipore, Milford, MA, USA). Hydrogen peroxide was added after filtration. The mobile phase was delivered isocratically at a flow rate of 0.6 ml/min and the effluent after post-column photoderivatization was monitored at emission wavelength 463 nm with the excitation wavelength set at 375 nm. The time of sample analysis was 13 min. The peak areas were used for quantitative calculations and the results were normalized on the hematocrit of the sample. These chromatographic conditions were used on the basis of optimization described hereinafter.

Validation

Validation of the method involved determination of system suitability, calibration linearity, intra- and inter-day precision and accuracy, limit of detection and quantification, recovery and

sample stability in autosampler and during three freeze-thaw cycles. Validation was done with parameters ascertained during method optimization.

Results and Discussion

Method optimization

On the basis of findings published by Dervieux MTX-Gl₃ was used as a standard for calibration. MTX-Gl₃ predominates in RBCs of patients with rheumatoid arthritis above all other MTX-Gls [21] and is suitable as a marker of long-chain MTX-Gls concentrations [27].

During the method development, the concentration of organic modifier in the mobile phase, pH and the ionic strength of the acetate buffer, hydrogen peroxide content in mobile phase, the length of the derivatization coil and the duration of the enzymatic-hydrolysis step were optimized. This optimization was undertaken to improve method sensitivity, selectivity and time effectiveness.

Sensitivity

Sensitivity of the method was strongly influenced by the irradiation time of MTX in a photoreactor. This time was dependent on the flow rate of the mobile phase and the length/volume of the derivatization coil. Another contributing factor was the hydrogen peroxide concentration in the mobile phase. Four derivatization capillaries with increasing length (1.3, 2.5, 6.2 and 20 m) were used. Mobile phases with peroxide concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 2 ml/l were prepared and used after 30 min of equilibration of the chromatographic system. The intensity of fluorescence was evaluated using a standard solution of 25 nmol/l MTX in PBS (Figure 1).

The highest response was achieved with 0.25 ml/l hydrogen peroxide and the length of 6.2 m. With this coil length, the best detector response was observed with relatively small deviation over a wide range of hydrogen peroxide concentrations. Peroxide concentrations higher than 1 ml/l and a long derivatization coil leads to rapid fluorescence diminution. The irradiation time must be optimized precisely,

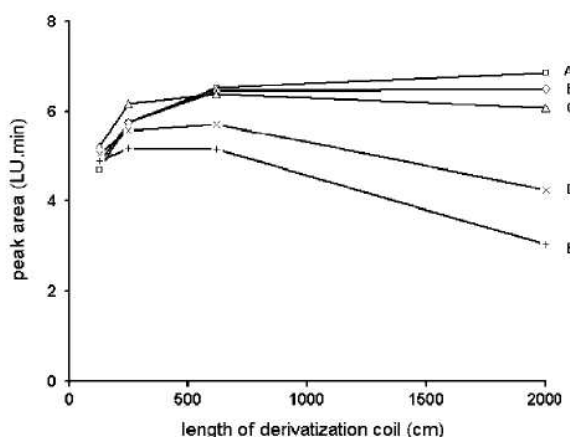


Figure 1. The effect of hydrogen peroxide content in mobile phase and length of derivatization coil in photoreactor on fluorescence detector response. Hydrogen peroxide concentration (A) 0.10, (B) 0.25, (C) 0.50, (D) 1.00, (E) 2.0 ml/l. Injected volume of 25 nmol/l MTX in PBS was 100 μ l.

because prolonged exposure to UV light leads to photodegradation of the fluorescent compound formed from MTX. As previously suggested, this effect is caused by a progressive photooxidation of 2,4-diaminopteridine-6-carboxyaldehyde to 2,4-diaminopteridine-6-carboxylic acid with subsequent decarboxylation to 2,4-diaminopteridine which has lower fluorescence [25,28]. For the flow rate of 0.6 ml/min, diameter and length of coil (6.2 m, 0.3 mm ID), the optimal irradiation time of 43.8 s was calculated. No significant broadening of peak shape with different lengths of derivatization coil was observed.

Selectivity

In order to separate MTX from endogenous substances present in RBCs or added plasma, the pH and ionic strength of the acetate buffer and organic modifier content in the mobile phase was optimized. The MTX peak was identified on the basis of its retention time and fluorescence emission spectra measured on-line. Selectivity was tested with blank and MTX-Gl₃ spiked RBCs ($c = 200$ nmol/l) prepared in the same manner as samples or standards. Eight samples of blank RBCs from different donors were tested.

Separation was tested with acetonitrile in the concentration range of 8–15% (v/v). As an optimum, an 11% (v/v) content in mobile phase

was chosen (data not shown). Since MTX has ionizable carboxyl groups (pKa 4.8, 5.5), there is a strong dependence of its retention behavior on the mobile phase pH. Five mobile phases with the pH values of the acetate buffer 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 were tested and selectivity was evaluated. With increasing basicity of the buffer, MTX retention time decreased while fluorescence response was enhanced (Figure 2). Optimal separation without interferences was achieved with the buffer of pH 5.5. At this value, the sensitivity of the method was lower than at higher pH, but better separation of MTX from endogenous compounds occurred.

Influence of the buffer ionic strength on the selectivity was tested with mobile phases of four ammonium acetate concentrations (12.5, 25, 50 and 100 mmol/l). The retention time was

concentration dependent; however, the detector response of the MTX was only slightly affected with ionic strength of the buffer in the tested concentration range (Figure 3). The best selectivity was achieved with an ammonium acetate concentration of 50 mmol/l.

Optimal assay conditions in terms of selectivity and sensitivity ascertained during method development were 11% of acetonitrile, 50 mmol/l acetate buffer (pH = 5.5), 0.25 ml/l of 30% hydrogen peroxide in the mobile phase and derivatization coil of 6.2 m in length. No interference was observed at MTX retention time (11.0 min) and resolution of MTX from interfering endogenous compounds was better than 2.5 (Figure 4). The retention time of MTX followed over 2 months was 11.00 ± 0.17 min (mean \pm SD, $n = 30$), and the coefficient of variation achieved was 1.5%.

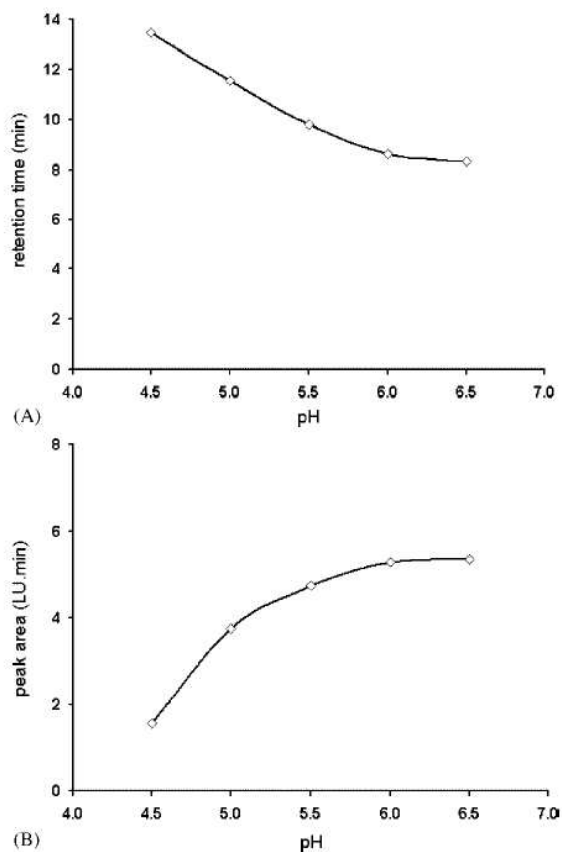


Figure 2. The effect of the pH of the mobile phase buffer on (A) MTX retention time and (B) detector response to MTX

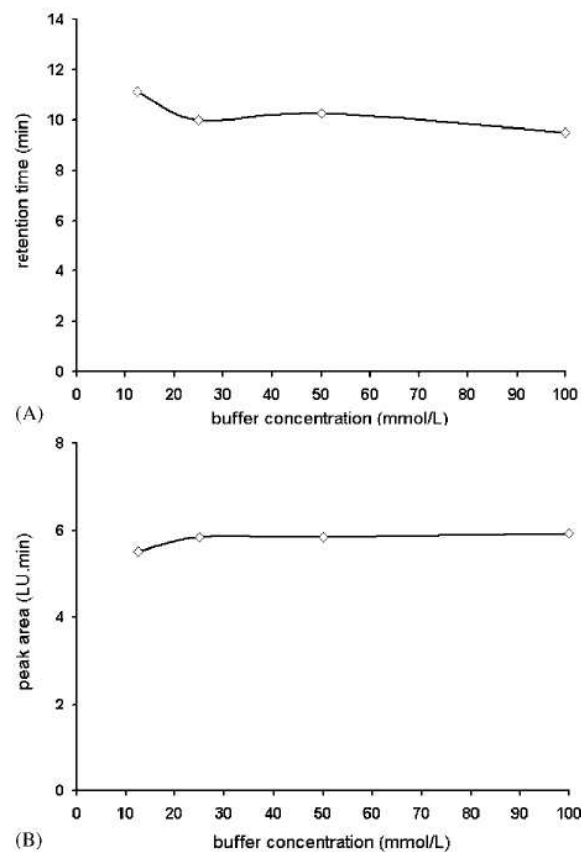


Figure 3. The effect of the concentration of the ammonium acetate buffer on (A) MTX retention time and (B) detector response

Time of hydrolysis

The efficiency of enzymatic conversion of MTX-Gls to MTX as a function of time was investigated. Twenty-four samples containing an equimolar mixture of the MTX-Gl₂₋₅ in RBCs with a total concentration of 200 nmol/l were prepared. Another set of samples containing 200 nmol/l MTX in RBCs were incubated at the same time. During incubation with phosphate buffer and plasma, samples were taken at 1 h intervals from both the mixture of MTX-Gl₂₋₅ and MTX and analysed for MTX concentration (Figure 5).

Figure 5 shows the formation of MTX from MTX-Gl₂₋₅ achieving its maximum after 16 h. The resulting concentration was 85% that of MTX in the sample incubated in parallel. During the entire period of incubation, the absolute concentration of MTX in the sample spiked with 200 nmol/l MTX decreased by less than 10%

indicating good stability of the compound. In order to shorten the duration of the sample preparation procedure, a 6 h incubation interval was used and a somewhat reduced efficiency of hydrolysis (70%) accepted. As indicated by the results of validation, this shortening of hydrolysis time did not reduce the precision and accuracy of the method and could be adopted when the quantification limit of 33 nmol/l is sufficient.

Suitability of the chromatographic system

System suitability was tested with ten repeated injections of enzymatically treated MTX-Gl₃ QC sample at a concentration of 50 nmol/l in RBCs. The coefficient of variation (CV) was 0.81% and 0.045% for peak area and retention time, respectively. The system fulfilled the criteria for injection repeatability better than 1%.

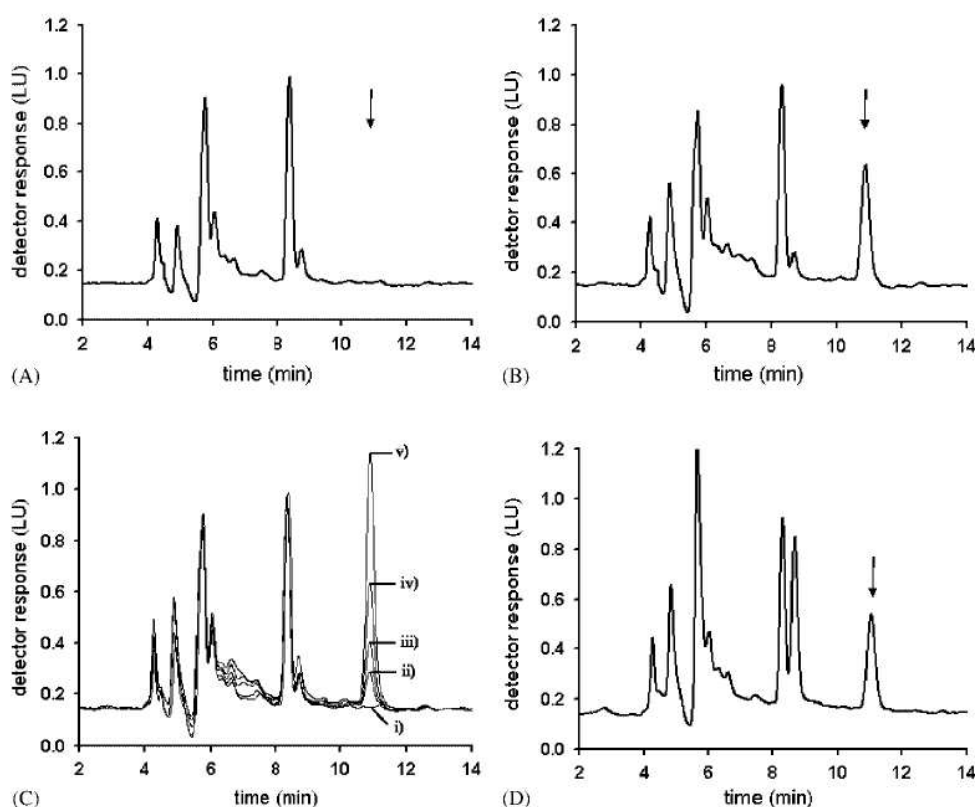


Figure 4. (A) Representative chromatograms of RBCs samples after enzymatic conversion of MTX-Gl₃ to MTX. (A) blank sample, (B) blank sample spiked with MTX-Gl₃ $c = 200$ nmol/l; (C) blank sample (i) of RBCs and sample spiked with MTX-Gl₃ (ii) 50, (iii) 100, (iv) 200 and (v) 400 nmol/l; (D) patient's sample

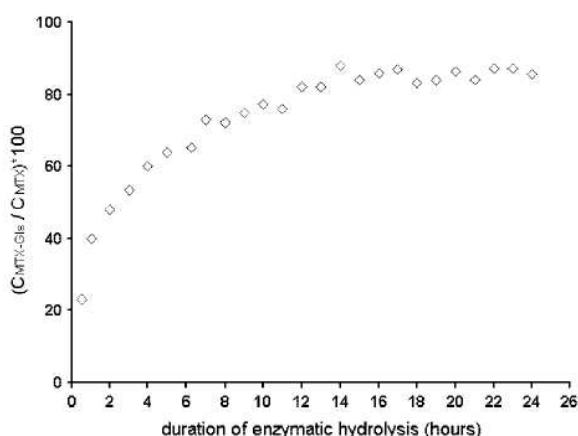


Figure 5. The effect of duration of incubation on the efficiency of MTX-Gls hydrolysis. Peak areas of MTX generated by hydrolysis of MTX-Gls were normalized to the peak area of the blank RBCs sample spiked with 200 nmol/l MTX (i.e. with the concentration equal to the sum of concentrations of all MTX-Gls added to the incubation mixture) and incubated using the same conditions

Calibration and linearity

Detector linearity was tested over the concentration range of 25–400 nmol/l MTX-Gl₃ in RBCs. A linear relationship between the mean detector response and the concentration of MTX-Gl₃ calibrators ($n = 3$ for each concentration) was observed. This method has been found linear over the tested range of concentration, with the regression equation $y = 0.0425x + 0.0186$ and the coefficient of determination of $R^2 = 0.9995$. Calibrations with MTX-Gl₂, MTX-Gl₄ and MTX-Gl₅ in concentration ranges of 50–400 nmol/l were also tested and similar results obtained as for MTX-Gl₃, with the following regression equations: MTX-Gl₂ $y = 0.0342x + 0.2784$ ($R^2 = 0.9996$), MTX-Gl₃ $y = 0.0379x + 0.9626$ ($R^2 = 0.9999$), MTX-Gl₄ $y = 0.0412x + 1.028$ ($R^2 = 0.9999$) and MTX-Gl₅ $y = 0.0367x + 0.237$ ($R^2 = 0.9983$). Calibration curves of polyglutamates are shown in Figure 6.

Accuracy and precision

For the evaluation of accuracy and precision, quality control (QC) samples were prepared by spiking of the blank packed RBCs with MTX-Gl₃ to four concentrations (30, 60, 170, 330 nmol/l). QC samples were treated in the same manner as samples or calibrators. Measurements were

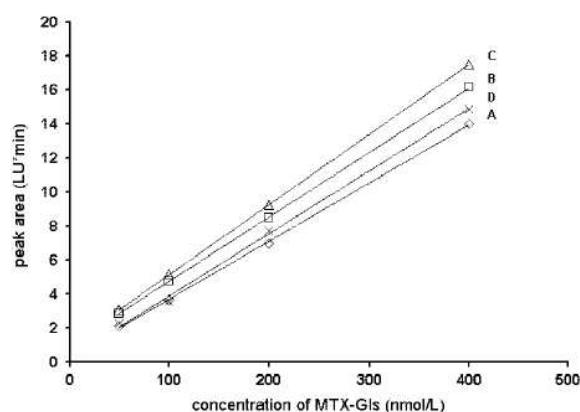


Figure 6. The calibration curves with different polyglutamates in range 50–400 nmol/l. (A) MTX-Gl₂ (B) MTX-Gl₃ (C) MTX-Gl₄ (D) MTX-Gl₅

Table 1. Inter- and intra-day precision and accuracy of the HPLC determination of methotrexate polyglutamates in red blood cells

| Concentration | CV (%) | RE (%) | <i>n</i> |
|------------------|----------------|--------|----------|
| Added (nmol/l) | Found (nmol/l) | | |
| Inter-day | | | |
| 30.0 | 26.4 | 18.3 | 25 |
| 60.0 | 56.6 | 9.8 | 25 |
| 170.0 | 158.4 | 5.1 | 25 |
| 330.0 | 314.5 | 5.3 | 25 |
| Intra-day | | | |
| 30.0 | 24.8 | 18.8 | 10 |
| 60.0 | 52.7 | 11.9 | 10 |
| 170.0 | 168.7 | 7.4 | 10 |
| 330.0 | 340.1 | 3.8 | 10 |

CV, coefficient of variation; RE, relative error.

performed on five different days and five sets of QC samples were assayed on each day. Intra-day precision was calculated for all concentration levels using ten QC samples. Precision and accuracy were calculated as the variation coefficient [$CV\% = 100 * (SD / \text{mean})$] and relative error [$RE\% = 100 * (C_{\text{found}} - C_{\text{added}}) / C_{\text{added}}$] respectively. Results are summarized in Table 1.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

Five aliquots of samples at concentration levels 20, 30 and 40 nmol/l MTX-Gl₃ in RBCs were assayed and precision and accuracy were calculated. LOQ was calculated as the lowest

concentration of QC sample which was measured with a precision of 20% and relative error of $\pm 20\%$ [29]. The LOD was derived from LOQ according to the equation $LOD = (3.3 \cdot LOQ) / 10$. The LOD and LOQ for MTX-Gl₃ in RBCs were 10.9 and 32.9 nmol/l, respectively.

Recovery

Packed RBCs spiked with MTX at concentration levels of 50, 100, 200, 400 nmol/l were used and compared with the samples with the same MTX concentration levels prepared in PBS buffer. Samples were incubated for 6 h and processed in the same manner as samples spiked with polyglutamates. The mean efficiency of the extraction process was between 70.3% and 72.8% over the concentration range of 50–400 nmol/l.

Influence of co-administered drugs

The selectivity of the method was further tested by spiking of blank packed RBCs with an equimolar mixture of non-steroidal anti-inflammatory drugs (diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, nimesulide, sulfasalazine) and hormones (prednisone, methylprednisolone). The final concentration of each drug was 1 μ M. Each sample was processed in the same manner as samples or standards for MTX-Gls determination. Chromatography proceeded for 2 h. As the results show, there were no peaks interfering at the retention time of MTX and no late-eluting peaks were detected (Figure 7).

Sample stability in autosampler

Stability was tested at two concentration levels (60 and 330 nmol/l MTX-Gl₃ in RBCs). It was measured immediately after enzymatic treatment and again after 24 h of standing in the autosampler (25°C, dark). Concentrations observed immediately after enzymatic conversion were 62.9 ± 7.0 nmol/l and 345.1 ± 10.1 nmol/l (mean \pm SD, $n = 10$) and after 24 h 59.2 ± 8.7 nmol/l and 361.5 ± 15.8 nmol/l (mean \pm SD, $n = 10$). No significant deterioration of samples was observed after 24 h, thus stability was sufficient for batch processing and the method allowed analysis of batches up to 120 samples per day.

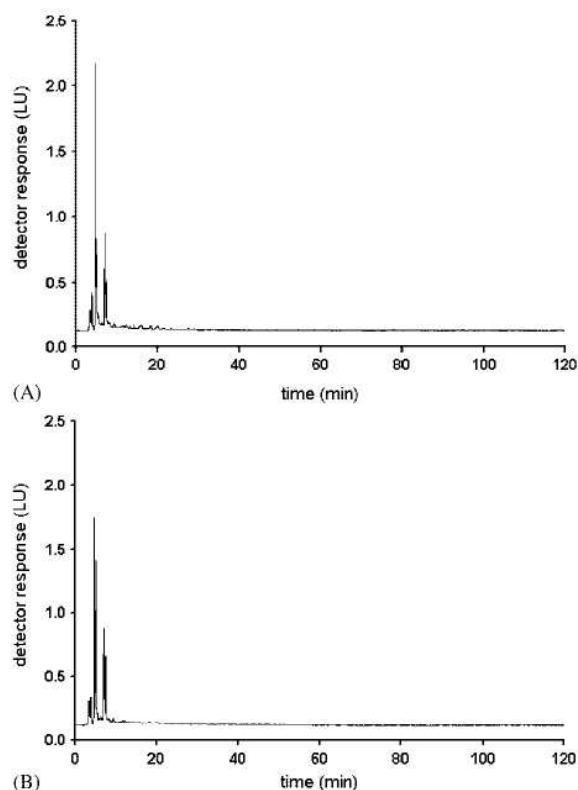


Figure 7. Representative chromatograms of (A) RBCs blank sample and (B) RBCs blank spiked with equimolar mix of diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, nimesulide, sulfasalazine, prednisone and methylprednisolone. Final concentration of each substance in RBCs is 1 μ M

Freeze–thaw stability

Samples with MTX-Gl₃ concentrations of 30, 60, 170, 330 nmol/l in RBCs were subjected to three 24 h freeze–thaw cycles. Each sample was allowed to thaw at room temperature and after removing an aliquot for analysis, was immediately replaced in the freezer (-80°C). Concentrations of MTX-Gl₃ were measured prior to the initial freezing of the samples and after each cycle. The results show that freeze–thaw stability of samples was limited (see Table 2). The mean decrease of MTX-Gl₃ concentration was 12% after the second cycle and 47% after the third cycle.

Clinical application of the method

The method has been used successfully in a pilot clinical trial evaluating the concentration of MTX-Gls in order to optimize MTX therapy in

Table 2. Stability of MTX-GL₃ QC samples in concentration range 30–330 nmol/l during three freeze–thaw (F–T) cycles

| Added (nmol/l) | Concentration | | | | | | | |
|----------------|---------------|-------|-------------|-------|-------------|------|-------------|------|
| | Before F–T | | F–T cycle 1 | | F–T cycle 2 | | F–T cycle 3 | |
| | | % | | % | | % | | % |
| 30.0 | 30.7 | 100.0 | 32.2 | 104.9 | 27.2 | 88.7 | 17.4 | 56.8 |
| 60.0 | 57.6 | 100.0 | 58.5 | 101.5 | 50.3 | 87.2 | 24.5 | 42.5 |
| 170.0 | 163.7 | 100.0 | 167.7 | 102.4 | 140.4 | 85.7 | 93.1 | 56.9 |
| 330.0 | 323.1 | 100.0 | 335.4 | 103.8 | 297.4 | 92.0 | 181.7 | 56.3 |

children with juvenile idiopathic arthritis (JIA). Methotrexate was administered once weekly, orally or subcutaneously, using a low-dose regimen. The effective recommended dose in children is generally higher than in adults and ranges between 7.5 to 15 mg/m² [4]. At weekly doses of more than 10 mg/m², the parenteral route is preferred, because oral bioavailability of the drug decreases at higher doses [30].

Follow-up evaluation of disease activity during routine clinic visits was used to assess the efficacy of MTX therapy in 38 JIA patients (18 boys, 20 girls, mean age 7.9 years). To assess the clinical effect of therapy, the American College of Rheumatology (ACR) pediatric definition of improvement was used [31]. This includes six parameters known as core set variables, which include the number of joints with active arthritis, the number of joints with limited range of motion, the physician global evaluation of disease activity on a visual analogue scale, the parents global assessment of the child's overall wellbeing on a visual analogue scale, the disability index of the Childhood Health Assessment Questionnaire [32] and the Westergren erythrocyte sedimentation rate (ESR). For at least 6–8 weeks prior to the MTX assessment, patients were treated with a stable dose of oral ($n = 14$) or subcutaneous ($n = 24$) MTX previously titrated according to clinical effect; the mean dose of methotrexate was 13.76 mg/m². Blood samples were taken 1 day prior to administration of the next MTX dose in order to exclude possible interference from free MTX. The response to therapy was routinely assessed according to the ACR pediatric definition of improvement [31]. MTX-GLs erythrocyte concentrations in samples from patients with JIA ranged from <30 nmol/l to 217 nmol/l (mean MTX-GLs 94.7 nmol/l). A significant correlation was found between

MTX-GLs concentration and MTX dose ($p = 0.013$, $\rho = 0.40$, Spearman correlation). Differences in the kinetics of MTX-GLs accumulation between patients with various clinical response and possible contribution of MTX-GLs assessment to optimization and monitoring of MTX therapy will be studied further.

Conclusion

The main benefit of our method over recently published alternative methods [21–23] is the use of isocratic elution with a short analysis time that avoids the need for time consuming reequilibration of chromatographic conditions before each subsequent run. The column used for all separations (Phenomenex Gemini C18) showed excellent stability and robustness; no deterioration in its performance has been observed after more than 1500 injections of extracts of biological samples. Long term stability of the column and relatively low flow rate of mobile phase containing only 11% (v/v) of organic modifier makes this method cost-effective and environmentally friendly, without production of excessive waste volumes and hence suitable for clinical laboratory use. The duration of enzymatic hydrolysis of samples has been reduced to 6 h while preserving acceptable precision and accuracy of the method. The sample deproteination is simple, rapid and cheap. Optimization of derivatization conditions in the photoreactor is recommended as sensitivity of detection can differ due to differences in coil irradiation geometry and the power of the UV lamp used in different photoreactors.

Results from the pilot study show that MTX-GLs concentration in erythrocytes is dose dependent and an extended clinical study is being

carried out to evaluate the possible usefulness of MTX-Gls assessment in optimization of MTX therapy and in drug monitoring.

Acknowledgements

The study was supported by the Czech Ministry of Education grant no. MSM 0021620820. Technical assistance of Mrs Hana Krupičková is highly appreciated.

References

- Wallace CA. The use of methotrexate in childhood rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 381–391. DOI 10.1002/1529-0131(199803)41:3<381::AID-ART2>3.0.CO;2-3
- Giannini EH, Brewer EJ, Kuzmina N, et al. Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis: results of the USA–USSR double-blind, placebo-controlled trial. *N Eng J Med* 1992; 326: 1043–1049.
- Woo P, Southwood TR, Prieur AM, et al. Randomized, placebo-controlled, crossover trial of low-dose oral methotrexate in children with extended oligoarticular or systemic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1849–1857. DOI 10.1002/1529-0131(200008)43:8<1849::AID-ANR22>3.0.CO;2-F
- Ruperto N, Murray KJ, Gerloni V, et al. A randomized trial of parenteral methotrexate comparing an intermediate dose with a higher dose in children with juvenile idiopathic arthritis who failed to respond to standard doses of methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2191–2201. DOI 10.1002/art.20288
- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriola B, Straub RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 729–735. DOI 10.1136/ard.60.8.729
- Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res* 2002; 4: 266–273. DOI 10.1186/ar419
- Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 739–755.
- Riksen NP, Barrera P, van den Broek PH, van Riel PL, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans *in vivo*. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 465–470. DOI 10.1136/ard.2005.048637
- Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J, Chabner BA. Inhibition of phosphoribosyl-aminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4881–4885.
- Baggott JE, Vaughn WH, Hudson BB. Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. *Biochem J* 1986; 236: 193–200.
- Baggott JE, Morgan SL, Koopman WJ. The effect of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate on rat adjuvant arthritis and on urinary aminoimidazole carboxamide excretion. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1407–1410. DOI 10.1002/1529-0131(199808)41:8<1407::AID-ART9>3.0.CO;2-H
- Ravelli A, Martini A. Methotrexate in juvenile idiopathic arthritis: Answers and questions. *J Rheumatol* 2000; 27: 1830–1833.
- Wallace CA, Sherry DD, Mellins ED, Aiken RP. Predicting remission in juvenile rheumatoid arthritis with methotrexate treatment. *J Rheumatol* 1993; 20: 118–122.
- Hillson JL, Furst DE. Pharmacology and pharmacokinetics of methotrexate in rheumatic disease: Practical issues in treatment and design. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 757–778.
- Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, et al. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 1998; 101: 295–300. DOI 10.1172/JCI1554
- Dolezalova P, Krijt J, Chladek J, Nemcova D, Hoza J. Adenosine and methotrexate polyglutamate concentrations in patients with juvenile arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 74–79. DOI 10.1093/rheumatology/keh401
- Albertioni F, Rask C, Eksborg S, et al. Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma. *Clin Chem* 1996; 42: 39–44.
- Yu Z, Westerlund D. Ion-pair chromatography of methotrexate in a column-switching system using an alkyl-diol silica precolumn for direct injection of plasma. *J Chromatogr A* 1996; 742: 113–120. DOI 10.1016/0021-9673(96)00257-9
- Kamen BA, Winick N. Analysis of methotrexate polyglutamate derivatives *in vivo*. *Methods Enzymol* 1986; 122: 339–346.
- Schroder H, Heinsvig EM. Enzymatic assay for methotrexate in erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45: 657–659.
- Dervieux T, Orentas Lein D, Marcelletti J, et al. HPLC Determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2003; 49: 1632–1641. DOI 10.1373/49.10.1632
- Kuo CY, Wu HL, Kou HS, Chiou SS, Wu DC, Wu SM. Simultaneous determination of methotrexate and its eight metabolites in human whole blood by capillary zone electrophoresis.

- J Chromatogr A* 2003; 1014: 93–101. DOI 10.1016/S0021-9673(03)00776-3
23. Li H, Luo W, Zeng Q, Lin Z, Luo H, Zhang Y. Method for the determination of blood methotrexate by high performance liquid chromatography with online post-column electrochemical oxidation and fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2007; 845: 164–168. DOI 10.1016/j.jchromb.2006.07.026
 24. Hayashi H, Fujimaki C, Tsuboi S, Matsuyama T, Daimon T, Itoh K. Application of fluorescence polarization immunoassay for determination of methotrexate-polyglutamates in rheumatoid arthritis patients. *Tohoku J Exp Med* 2008; 215: 95–101. DOI 10.1620/tjem.215.95
 25. Salamoun J, Frantisek J. Determination of methotrexate and its metabolites 7-hydroxymethotrexate and 2,4-diamino-N¹⁰-methylptericoic acid in biological fluids by liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr* 1986; 378: 173–181.
 26. Salamoun J, Smrz M, Kiss F, Salamounova A. Column liquid chromatography of methotrexate and its metabolites using a post-column photochemical reactor and fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 419: 213–223.
 27. Dervieux T, Furst D, Lein DO, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphism in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2766–2774. DOI 10.1002/art.20460
 28. Blakley RL. *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*. North-Holland: Amsterdam, 1969.
 29. CDER (Center for Drug Evaluation and Research) and CVM (Center for Veterinary Medicine) Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, May 2001, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>.
 30. Balis FM, Mirro J, Reaman GH, et al. Pharmacokinetics of subcutaneous methotrexate. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1882–1886
 31. Giannini EH, Ruperto N, Ravelli A, Lovell DJ, Felson DT, Martini A. Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1202–1209. DOI 10.1002/art.1780400703
 32. Dolezalova P, Ruperto N, Nemcova D, et al. Paediatric Rheumatology International Trials Organization. The Czech version of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ). *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19 (4 Suppl 23): S45–S49.

677TT Genotype Is Associated with Elevated Risk of Methotrexate (MTX) Toxicity in Juvenile Idiopathic Arthritis: Treatment Outcome, Erythrocyte Concentrations of MTX and Folates, and MTHFR Polymorphisms

JANA TUKOVÁ, JAROSLAV CHLÁDEK, MILOŠ HROCH, DANA NĚMCOVÁ, JOZEF HOZA,
and PAVLA DOLEŽALOVÁ

ABSTRACT. Objective. To investigate whether methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms and erythrocyte concentration of methotrexate (EMTX) could serve as predictors of methotrexate (MTX) efficacy and toxicity in patients with juvenile idiopathic arthritis (JIA).

Methods. Genetic analyses and EMTX and folate assessment were performed in 69 patients with JIA aged 2.5–19.6 years (30 male) treated with MTX using a dose-escalation protocol and classified as full responders (disease inactivity; $n = 51$) or nonresponders ($< 30\%$ improvement in pediatric American College of Rheumatology-30 criteria while receiving ≥ 15 mg/m²/week parenteral MTX for at least 3 months; $n = 18$).

Results. Nonresponders were treated with the higher median MTX dose (17.2 vs 12.6 mg/m²/week; $p < 0.0001$) and accumulated more EMTX (217 vs 106 nmol/l; $p < 0.02$) and erythrocyte folates (763 vs 592 nmol/l; $p = 0.052$) than responders. Analysis of MTHFR allele and genotype frequencies in relation to response failed to detect association. The frequency of any adverse effect was 29.4% in responders and 33.3% in nonresponders ($p = 0.77$). The frequency of 677T allele was elevated in patients with adverse effects (52.4% vs 20.9%; OR 3.88, 95% CI 1.8–8.6, $p < 0.002$). The probability of any adverse effect was significantly higher in patients with 677TT compared to the 677CC genotype (OR 55.5, 95% CI 2.9–1080, $p < 0.001$).

Conclusion. MTHFR genotyping may have a predictive value for the risk of MTX-associated toxicity in patients with JIA. Despite the lack of therapeutic effect, nonresponders accumulated adequate concentrations of EMTX. (First Release July 1 2010; J Rheumatol 2010;37:2180–6; doi:10.3899/jrheum.091427)

Key Indexing Terms:

JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS
ERYTHROCYTE

METHOTREXATE
EFFICACY

MTHFR
TOXICITY

From the Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, Charles University in Prague, 1st Medical School, Prague; and Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic.

Supported by the Ministry of Education (grant MSM 0021620820) and the Ministry of Health (grant IGA MH CR No. NE6681-3/2001), Czech Republic.

J. Tuková, MD, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, Charles University in Prague, 1st Medical School; J. Chládek, PhD, Associate Professor of Pharmacology; M. Hroch, MSc, Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove; D. Němcová, MD; J. Hoza, MD, PhD, Associate Professor of Paediatrics; P. Doležalová, MD, PhD, Associate Professor of Paediatrics, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, Charles University in Prague, 1st Medical School.

Address correspondence to Dr. P. Doležalová, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, Charles University in Prague, 1st Medical School, Ke Karlovu 2, 128 00 Prague 2, Czech Republic.

E-mail: dolezalova.pavla@vfn.cz

Accepted for publication April 21, 2010.

Over the last 2 decades low-dose weekly methotrexate (MTX) has been commonly used in the treatment of juvenile idiopathic arthritis (JIA)¹. Although its efficacy and safety in children and adolescents with JIA have been documented in multiple clinical trials^{2,3}, interpatient variability of efficacy and variety of side effects remain a clinical concern. About 10% of children fail to improve while receiving MTX⁴ and 10% to 76% exhibit some common side effects⁵. Dose and route of administration need to be tailored individually in order to achieve early and sustained therapeutic effect^{4,6}.

Plasma concentration of the parent drug is not useful for MTX therapeutic monitoring due to its short plasma half-life. It has been postulated that long-acting polyglutamylated intracellular MTX metabolites (EMTX) mediate most of the antiinflammatory effects of MTX. EMTX may reflect its pharmacokinetic variability as well as bioavailability^{7,8}.

A growing body of evidence is now available to support an important contribution of various genetic polymorphisms in MTX xenobiotic metabolic pathways to interpatient variability in therapeutic response as well as toxicity. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with regeneration of reduced folates. It mediates synthesis of 5-methyltetrahydrofolate, the carbon donor required for methionine synthesis. Two relatively common single-nucleotide polymorphisms (SNP), C677T and A1298C, have been studied in the MTHFR gene^{9,10,11,12,13,14,15,16,17,18}. Several studies in adults with rheumatoid arthritis (RA) treated with MTX investigated associations between C677T and A1298C polymorphisms and clinical variables of disease outcome and/or toxicity, with inconsistent results^{9,11,12,13,14,16,17,18,19}. Studies evaluating a possible role of EMTX for therapeutic monitoring have been inconclusive^{7,8,20}.

We aimed to combine assessment of EMTX and MTHFR polymorphisms in JIA patients with clearly defined response status in order to evaluate their possible predictive value for the efficacy and toxicity of MTX treatment.

MATERIALS AND METHODS

Patients and study protocol. Patients were recruited prospectively from the pediatric rheumatology outpatient clinic population of the Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, 1st Medical School, Charles University in Prague, between 2005 and 2008. The study was approved by the local research ethics committee and informed consent was obtained from the patients and/or their legal guardians.

To be eligible patients must have had a definitive diagnosis of JIA according to the International League of Associations for Rheumatology criteria^{21,22,23} and documented disease activity with MTX therapy for at least 3 months prior to recruitment. Only patients within extreme ends of the response spectrum (full responders and nonresponders) were enrolled.

For the purpose of this study, responders were defined as having achieved disease inactivity on medication with MTX monotherapy according to Wallace, *et al*²⁴. Criteria for inactive disease included no active arthritis; no fever, rash, serositis, splenomegaly, or generalized lymphadenopathy attributable to JIA; no active uveitis; normal erythrocyte sedimentation rate (ESR) or CRP; and physician's global assessment of disease activity indicating clinical disease quiescence²⁴.

Using the American College of Rheumatology (ACR) Pediatric 30 (ACR Pedi30) definition of improvement^{24,25,26,27}, therapeutic efficacy was assessed monthly during the dose escalation and at 3-monthly intervals while patients received a stable dose. In nonresponders, at least 3 of any 6 JIA core set variables did not improve by a minimum of 30% and no more than 1 of the remaining variables improved by more than 30%²⁴. Core set outcome variables included number of joints with active arthritis, joints with limited range of motion, physician's global assessment of disease activity [10 cm visual analog scale (VAS)], parent's global assessment of the child's overall well-being (10 cm VAS), disability index of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ), and ESR^{28,29,30}. To qualify as a nonresponder, the patient must have been treated with a minimum of 15 mg/m²/week MTX subcutaneously for at least 3 months⁴.

Before entering the study, patients were treated with MTX using a standard dose-escalation department protocol. Over the first 3–6 months, initial weekly MTX dose of 7.5–10 mg/m² orally was titrated according to efficacy and toxicity evaluations up to the weekly dose of around 15 mg/m² (maximum 20–25 mg). Patients with persistent disease activity taking oral MTX and requiring more than 10 mg/m² were switched to subcutaneous

administration⁶. MTX injections were chosen as an initial treatment modality in polyarthritis patients with high disease activity and in small children (usually below 4 years of age). In addition to MTX, most patients received once-weekly folic acid (5–10 mg/week, 24–48 hours after MTX), and were allowed to take one nonsteroidal anti-inflammatory drug, usually ibuprofen.

Toxicity was prospectively monitored at each visit by routine questioning and laboratory tests (full blood count, liver function tests). MTX toxic effects of any grade were defined as those related to the gastrointestinal tract (stomatitis, nausea, vomiting, abdominal pain/discomfort), liver function (alanine and/or aspartate aminotransferase equal to or above twice the upper normal limit), bone marrow suppression (any cytopenia), and other (alopecia, behavioral changes, headache, nodulosis).

MTX concentration in erythrocytes. In patients who had been treated a minimum of 3 months and received a stable MTX dose for at least 8 weeks, venous blood samples were drawn just before weekly administration of MTX. Samples were collected into standard EDTA-coated tubes and processed within 1 hour. Erythrocytes were separated, washed in ice-cold 0.9% NaCl, and hemolyzed as described³¹. Hematocrit of the suspension of washed erythrocytes was measured with a hematology analyzer (Celltac E; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) using the calculation: EMTX = (MTX concentration in the hemolysate)/hematocrit. Plasma samples and erythrocyte suspensions were stored no longer than 1 month at –20°C before analysis. Plasma MTX and EMTX were determined by high-performance liquid chromatography methods using fluorimetric detection after post-column derivatization in a photochemical reactor as described^{32,33}. During sample preparation, all MTX polyglutamates were hydrolyzed to MTX. Thus, EMTX concentration represented the sum of all polyglutamates in the erythrocyte.

Folate concentration in erythrocytes. Erythrocyte concentration of folates was measured on the Elecsys analyzer using an automated electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA), including RBC Folate Hemolyzing Reagent and Elecsys Folate II kit (Roche, Prague, Czech Republic).

Genotype analysis. Genomic DNA was extracted from white blood cells. The A1298C and C677T polymorphisms of the MTHFR gene were analyzed by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method as described^{34,35}. The rheumatologists evaluating the efficacy and safety of MTX (PD, DN, JH) were blinded to the results of genotyping and EMTX and folate analysis.

Statistical analysis. Differences between responders and nonresponders were assessed using Mann-Whitney U test or chi-square test. Allele and genotype frequencies were compared by 2-sided Fisher exact test. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated for the chance of response and the risk of overall adverse effects of MTX therapy. Univariate and multivariate logistic regression models were used to analyze the influence of 677C>T and 1298A>C polymorphisms on the frequencies of response and adverse effects. In these models, the numbers of 677T and 1298C alleles (0, 1, or 2) for each patient served as independent variables. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. Calculations were performed using Statistica 8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS

Stratification of patients according to treatment response. A total of 69 Caucasian children were enrolled. Based on the treatment efficacy assessment, 51 patients (74%) were classified as full responders and 18 (26%) as nonresponders. Their demographic and disease characteristics were similar (Table 1). Only 4 patients with persistent oligoarthritis had a history of chronic uveitis (all responders).

In nonresponders, disease activity persisted despite treatment with subcutaneous MTX at a 37% higher dose than in responders (*p* < 0.0001), who received the drug orally (*n* =

Table 1. Patient and treatment characteristics.

| Characteristic | Response to MTX Therapy | | p |
|---|-------------------------|-------------------|----------|
| | Responders | Nonresponders | |
| No. | 51 | 18 | — |
| ILAR subtype*, n | 26, 15, 7, 1, 1, 1 | 13, 1, 2, 2, 0, 0 | |
| Male/female | 20/31 | 10/8 | 0.28 |
| Age, yrs** | 8.2 (2.8–19.6) | 9.8 (2.5–17.1) | 0.54 |
| Body surface area, m ² ** | 0.96 (0.57–1.93) | 1.06 (0.57–1.79) | 0.55 |
| Disease duration [†] , yrs** | 2.2 (0.5–17.0) | 1.9 (0.7–4.2) | 0.31 |
| MTX therapy duration [†] , yrs** | 1.4 (0.3–11.5) | 1.3 (0.5–4.1) | 0.93 |
| ESR ^{††} , mm/h** | 37 (3–116) | 28 (2–140) | 0.034 |
| Active joints ^{††} , n** | 6 (2–40) | 6 (2–59) | 0.87 |
| Joints with limited motion ^{††} , n** | 6 (2–40) | 7 (2–59) | 0.63 |
| Route of MTX administration [†] (oral/subcutaneous) | 24/27 | 0/18 | < 0.0001 |
| Weekly MTX dose [†] , mg/m ² ** | 12.6 (7.4–20.0) | 17.2 (11.8–24.2) | < 0.0001 |
| Folic acid supplementation, n (%) | 44 (82.3) | 17 (94.4) | 0.67 |
| Weekly dose of folic acid, mg** | 10 (5–10) | 10 (10–10) | 0.12 |

[†] At the time of sampling. ^{††} Before initiation of MTX. * Polyarticular, oligoarticular persistent, oligoarticular extended, systemic, enthesopathic, psoriatic. ** Median (range).

24) or subcutaneously (n = 27). The majority of patients from both groups took folic acid and its weekly dose did not differ between the groups (Table 1). Only 12 patients (all nonresponders) received other medication at the time of the study (corticosteroids n = 11, sulfasalazine n = 1, etanercept n = 1, cyclosporine n = 1).

MTX toxicity. Mild to moderate toxicity was noted in a total of 21 patients (30.4%). Gastrointestinal complaints (mucosal, nausea, vomiting, abdominal pain) were recorded in 16, hepatopathy in 3, and alopecia in 2 patients. Other adverse effects (bone marrow suppression, behavioral changes, nodulosis) were not seen. The frequency of overall adverse effects was 29.4% in responders (15/51) and 33.3% in nonresponders (6/18) (p = 0.77).

EMTX and folate concentration in erythrocytes. Measurements of EMTX/erythrocyte folate were available for 51/40 responders and 13/14 nonresponders. The median EMTX concentrations in nonresponders [217 (interquartile range, IQR, 91.4–354) nmol/l] were 2-fold higher than those in responders [106 (IQR 65.3–168) nmol/l] (p < 0.02; Figure 1A). Nonresponders tended to have higher concentrations of erythrocyte folates compared to responders [763 (IQR 583–935) nmol/l vs 592 (487–751) nmol/l, respectively; p = 0.052; Figure 1B].

Association of MTX efficacy/toxicity and MTHFR polymorphisms. Results of the MTHFR SNP analysis were available in all 18 nonresponders and in 46/51 (90.2%) responders. Allele and genotype frequencies are summarized in Table 2.

Full clinical response was achieved in 4/8 (50%) carriers of the 677TT compared to 19/25 (76%) carriers of 677CT and to 23/31 (74.2%) carriers of 677CC genotype. Patients with 677TT genotype had 2.9-times lower probability of response in comparison to patients with the reference geno-

type 677CC. However, this difference was not significant (OR 0.35, 95% CI 0.07–1.73, p = 0.22). The frequency of T allele among MTX responders was 29.3% and among nonresponders 38.9% (OR 0.65, 95% CI 0.29–1.46, p = 0.30; Table 2). Full response was achieved in the following numbers of polymorphic allele carriers: 4/6 (66.7%) with 1298CC, 22/29 (75.9%) with 1298AC, and 20/29 (70%) with 1298AA genotypes. The probability of response did not differ among different genotypes (Table 2). The frequency of C allele among MTX responders and nonresponders was 30.4% and 30.6%, respectively (OR 0.99, 95% CI 0.43–2.30, p = 0.99; Table 2). In univariate and multivariate regression analyses, the presence of neither 677T nor 1298C allele was associated with an altered response rate (data not shown).

Adverse effects (any type) occurred in all 8 carriers of the homozygous 677TT genotype (100%), in 6/25 (24%) carriers of 677CT, and in 7/31 (22.6%) carriers of 677CC. All 677TT homozygotes had combined genotype 677TT/1298AA. The probability of any adverse effect was significantly and markedly elevated in patients with 677TT genotype, compared to the reference genotype 677CC (OR 55.5, 95% CI 2.9–1080, p < 0.001). Frequency of T allele was significantly higher in patients with adverse effects than in those without (52.4% vs 22.1%, respectively; OR 3.88, 95% CI 1.8–8.6, p < 0.002; Table 2). Using this unadjusted OR, the false-positive report probability of detecting a conservative OR of 2 was 13%, 62%, and 94%, respectively, for the high (0.1), moderate (0.01), and low (0.001) prior probabilities of true association. In contrast to the MTHFR C677T genotype, association between the A1298C genotype and adverse effects was much weaker. Adverse effects were detected in 2/6 (33.3%) of 1298CC, in 6/29 (20.7%) of 1298AC, and in 13/29 (44.8%) of 1298AA genotype carri-

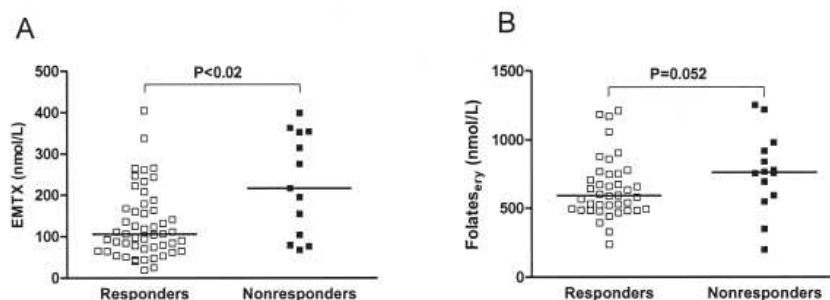


Figure 1. EMTX (A) and erythrocyte folates (B) in patients with JIA according to the therapy response. Horizontal lines are medians.

Table 2. The MTHFR polymorphisms and genotypes in relation to patients' responses to MTX and occurrence of side effects.

| MTHFR Polymorphism | All Patients, n (%) | Response to MTX Therapy | | OR (95% CI) | Overall Side Effects | | OR (95% CI) |
|--------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|------------------|----------------------|-----------|-------------------|
| | | Responders, n (%) | Nonresponders, n (%) | | Yes, n (%) | No, n (%) | |
| 677C>T alleles | | | | | | | |
| T | 41 (32.0) | 27 (29.3) | 14 (38.9) | 0.65 (0.29–1.46) | 22 (52.4) | 19 (22.1) | 3.88* (1.8–8.6) |
| C | 87 (68.0) | 65 (70.7) | 22 (61.1) | — | 20 (47.6) | 67 (77.9) | — |
| 1298A>C alleles | | | | | | | |
| C | 39 (30.4) | 28 (30.4) | 11 (30.6) | 0.99 (0.43–2.30) | 9 (21.4) | 30 (34.9) | 0.51 (0.22–1.20) |
| A | 89 (69.6) | 64 (69.6) | 25 (69.4) | — | 33 (78.6) | 56 (65.1) | — |
| 677C>T genotype | | | | | | | |
| TT | 8 (12.5) | 4 (8.7) | 4 (22.2) | 0.35 (0.07–1.73) | 8 (38.1) | 0 (0) | 55.5** (2.9–1080) |
| CT | 25 (39.1) | 19 (41.3) | 6 (33.3) | 1.10 (0.32–3.73) | 6 (28.6) | 19 (44.2) | 1.08 (0.31–3.76) |
| CC | 31 (48.4) | 23 (50.0) | 8 (44.4) | — | 7 (33.3) | 24 (55.8) | — |
| 1298A>C genotype | | | | | | | |
| CC | 6 (9.4) | 4 (8.7) | 2 (11.1) | 0.90 (0.14–5.85) | 2 (9.5) | 4 (9.3) | 0.62 (0.097–3.9) |
| AC | 29 (45.3) | 22 (47.8) | 7 (38.9) | 1.41 (0.44–4.51) | 6 (28.6) | 23 (53.5) | 0.32 (0.10–1.02) |
| AA | 29 (45.3) | 20 (43.5) | 9 (50.0) | — | 13 (61.9) | 16 (37.2) | — |

Fisher exact test: * $p < 0.002$, ** $p < 0.001$ compared with CC (or C) as reference genotype (allele).

ers. The probability of any adverse effect tended to be lower in homozygotes or heterozygotes for 1298C allele as compared to homozygous carriers of 1298A allele, but the differences did not reach statistical significance. The frequency of C allele among patients with and without adverse effects was 21.4% and 34.9%, respectively (OR 0.51, 95% CI 0.22–1.20, $p = 0.15$; Table 2). In both univariate (OR 1.46, 95% CI 1.15–1.74, $p < 0.005$) and multivariate (OR 1.46, 95% CI 1.10–1.96, $p < 0.01$) regression analyses, only MTHFR 677T allele was confirmed as a factor strongly associated with an increased frequency of overall adverse effects.

DISCUSSION

We investigated relationships between the 2 common SNP of the MTHFR gene, C677T and A1298C, and the efficacy and safety of MTX in children and adolescents with JIA. The ACR Pedi30 nonresponders and responders with inactive disease were selected among the MTX-treated patients.

MTHFR SNP were detected and MTX and folate polyglutamates in erythrocytes were assayed after the patients had been treated at sufficient length with a stable, sufficiently high dose of MTX. To our knowledge, this is the first study in JIA children simultaneously evaluating the contribution of pharmacogenetic and metabolic markers to MTX efficacy and toxicity.

Significantly increased risk of overall MTX side effects was found in carriers of the 677T allele. Further, all homozygotes for this variant, which is associated with a decreased activity of MTHFR, experienced adverse effects, as compared to 22.6% of homozygotes for the wild-type 677C allele. This represents a 55-fold elevated risk for adverse effects in homozygotes for the mutated allele. Observed adverse effects included gastrointestinal complaints, elevation of aminotransferases, and alopecia. In addition, compared to the carriers of 677TT genotype, patients with the reference genotype 677CC had a 3-fold higher chance to achieve the full clinical response to MTX.

However, this difference was not statistically significant. Separate examination of the A1298C polymorphism in relation to the effects of MTX showed no association.

Evaluating possible false positivity of this finding due to the limited number of patients we applied the concept of false-positive report probability (FPRP), as suggested by Wacholder, *et al*³⁶ and introduced to the field of MTX genetic association studies by Lee and colleagues³⁷. The high to moderate probability level set-up appears justified: in a metaanalysis of 8 studies in adults an increased risk of MTX toxicity was found in carriers of the MTHFR C677T SNP (OR 1.71, 95% CI 1.32–2.21)³⁸. Our estimates of the FPRP are similar to those retrospectively determined by Dervieux³⁹ for the study of Wessels, *et al*¹⁴, and lower compared to the studies of Dervieux, *et al*¹⁰. Therefore, our finding of association of the C677T SNP and adverse effects of MTX in patients with JIA is noteworthy, and in accord with conclusions of recent studies of different SNP in adults with RA treated with MTX^{10,14,39}.

One previous study in MTX-treated children with JIA investigated the influence of MTHFR SNP on treatment outcome and toxicity⁴⁰. In that retrospective study, the probability of improvement was higher in carriers of the 1298C allele, whereas no association was found for the C677T SNP polymorphism. In agreement with our findings, heterozygotes for the 677T genotype exhibited adverse effects more frequently than homozygotes for the wild-type allele. Pharmacogenetic studies in adult patients with RA have provided inconsistent conclusions. This may be explained in part by different study design and outcome measures, coadministered drugs, patient ethnicity, etc. According to recent reviews^{38,41}, clinical data in adults support possible association between the C677T variant and increased MTX toxicity.

During treatment, pharmacologically active MTX polyglutamates with up to 5 glutamic acid residues accumulate in cells⁴². Polyglutamylation enhances intracellular retention of the drug and facilitates its affinity for several folate-dependent enzymes⁴³. These metabolites have a longer half-life than MTX itself, enabling once weekly dosing. The steady-state EMTX level could be an indicator of longterm MTX exposure. It is influenced by several factors, including bioavailability of MTX, elimination kinetics, and patient compliance. Under well controlled conditions of prospective clinical studies, the steady-state concentration of EMTX correlated strongly with the area under the concentration-time curve (AUC) of plasma MTX, reflecting its bioavailability, as shown in patients with RA⁷ and psoriasis⁴⁴. Nevertheless, weak to moderate correlation of EMTX with MTX dose was found^{45,46}. Circulating erythrocytes lack folylpolyglutamate synthetase and MTX polyglutamates are mainly formed in bone marrow progenitor cells. Therefore, EMTX may reflect MTX polyglutamate concentrations in immunocompetent cells, e.g., lymphocytes, and work as a bioindicator of the effect⁴⁷.

Most studies with adult RA patients suggest that higher EMTX concentration is associated with better response^{7,8,10,11,48}. Hornung, *et al*⁷ monitored clinical effect during the followup period (52 weeks) using preliminary ACR core criteria (no response, 20%, 50% improvement). Patients with RA classified as responders had a significantly higher mean steady-state EMTX, but significantly higher dose at the same time. Since the correlation between the dose and EMTX was found, the MTX dose might have affected EMTX concentration in nonresponders who were underdosed⁷. In adults with RA, 2- to 3-fold higher concentrations of EMTX were found in responders and partial responders as compared to nonresponders⁸. However, MTX was administered orally and mean doses used in all 3 groups were similar and low (≤ 11.2 mg/week). Nonresponders might have achieved response if treated parenterally with a higher MTX dose⁸. Dervieux, *et al* used a dose-escalation protocol in adults with RA receiving oral MTX, and found approximately 20% lower accumulation of EMTX in patients with the lower than median improvement in the Disease Activity Score-28 as compared to the better responders¹⁰. Moreover, 3 nonresponders had 33% lower EMTX concentrations compared to responders. In another study with adult patients, the probability of a good response was 20% to 30% lower in patients with EMTX level below 60 nmol/l^{10,11,48}.

Kristensen, *et al*²⁰ investigated the relationship between EMTX and clinical and laboratory measures in children with JIA. The study design did not allow a cross-sectional analysis of the relation between EMTX and disease measures, and patients served as their own controls. Within the 3-month interval, spontaneous fluctuation in disease activity did not reflect intraindividual changes in EMTX²⁰. In our study, the dose-escalation protocol allowed switching from oral to subcutaneous administration, which resulted in an exclusive use of the subcutaneous route in nonresponders, who received 37% higher MTX dose than responders. Nonresponders also presented higher EMTX levels, suggesting that exposure to MTX was maximized and that the lack of response was associated with pharmacodynamic factors rather than pharmacokinetics. Our assay for EMTX did not allow us to separately quantify concentrations of individual polyglutamates. Therefore we were not able to evaluate the proportion of longer-chain polyglutamates that might better reflect efficacy of MTX, as shown in adult patients¹⁰. Moreover, route of administration contributed to the pattern of polyglutamation of MTX in children with JIA in a recent study⁴⁹. A higher proportion of long-chain (3 to 5) polyglutamates was observed in patients treated subcutaneously, and, conversely, a higher proportion of short-chain (1 + 2) derivatives was found in patients treated orally⁴⁹.

Concentration of erythrocyte folates is one of the important factors in MTX therapeutic response. In our study, patients classified as nonresponders tended to have higher

concentrations of erythrocyte folates compared to full responders. Importantly, results of large cross-sectional studies in adults also established that increased erythrocyte folates were associated with high disease activity^{10,50}.

Evaluation of relationships between MTHFR gene SNP (C677T and A1298C) and MTX efficacy and safety in children with JIA under simultaneous control for both antifolate and folate status revealed that carriers of the 677T allele have a 3.9-fold increased risk for adverse effects of MTX. This elevation may be attributed to a 55-fold augmented risk in patients carrying 677TT, which almost exclusively combines with 1298AA genotype. Nonresponders to the dose-escalation protocol had EMTX concentrations twice as high as those of responders and a similar rate of adverse effects. We found no significant relationship between EMTX and treatment efficacy. Analysis of MTHFR allele and genotype frequencies in relation to response failed to detect any significant association. The significance of our results is limited by small patient numbers, thus estimation of MTHFR 677/1298 haplotype distributions and statistical evaluation of their influence could not be done. This area definitely deserves further investigation.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Jana Chrzová of the Haematology Laboratory, as well as the helpfulness of clinic and inpatient department nursing staff.

REFERENCES

- Cassidy JT, Petty RE. Juvenile rheumatoid arthritis. In: Cassidy JT, Petty RE, editors. Textbook of pediatric rheumatology. Philadelphia: WB Saunders; 2001:218-321.
- Woo P, Southwood TR, Prieur AM, Doré CJ, Grainger J, David J, et al. Randomized, placebo-controlled, crossover trial of low-dose oral methotrexate in children with extended oligoarticular or systemic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1849-57.
- Giannini EH, Brewer EJ, Kuzmina N, Shaikov A, Maximov A, Vorontsov I, et al. Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis: Results of the U.S.A.-U.S.S.R. double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1992;326:1043-9.
- Ruperto N, Murray KJ, Gerloni V, Wulfraat N, de Oliveira SK, Falcini F, et al. A randomized trial of parenteral methotrexate comparing an intermediate dose with a higher dose in children with juvenile idiopathic arthritis who failed to respond to standard doses of methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004;50:2191-201.
- Wallace CA. The use of methotrexate in childhood rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1998;3:381-91.
- Tuková J, Chládek J, Némcová D, Chládková J, Doležalová P. Methotrexate bioavailability after oral and subcutaneous administration in children with juvenile arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:1047-53.
- Hornung N, Ellingsen T, Attermann J, Stengaard-Pedersen K, Poulsen JH. Patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate (MTX): concentrations of steady-state erythrocyte MTX correlate to plasma concentrations and clinical efficacy. *J Rheumatol* 2008;35:1709-15.
- Angelis-Stoforidis P, Vajda FJE, Christophidis N. Methotrexate polyglutamate levels in circulating erythrocytes and polymorphs correlate with clinical efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:313-20.
- Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K, Herczynska M, Drozdziak M. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2007;8:1551-9.
- Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Caldwell J, et al. Pharmacogenetic and metabolite measurements are associated with clinical status in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: results of a multicentered cross sectional observational study. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1180-5.
- Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3095-103.
- Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002;12:183-90.
- Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1227-31.
- Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum* 2006;54:1087-95.
- Ede AE, Laan RFJM, Blom HJ, Huizinga TWJ, Haagsma CJ, Giesendorf BAJ, et al. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Arthritis Rheum* 2001;44:2525-30.
- Weisman MH, Furst D, Park GS, Kremer J, Smith K, Wallace DJ, et al. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:607-12.
- Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, et al. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008;35:572-9.
- Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, Aggarwal A, Misra R. Correlation between methotrexate efficacy and toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J Med Res* 2006;124:521-6.
- Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, et al. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1213-8.
- Kristensen A, Nielsen S, Pedersen FK, Marek Z. Erythrocyte-methotrexate and disease activity in children treated with oral methotrexate for juvenile chronic arthritis. *Scand J Rheumatol* 2000;29:187-9.
- Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P, et al. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 1998;25:1991-4.
- Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004;31:390-2.
- Cassidy JT, Levinson JE, Bass JC, Baum J, Brewer EJ Jr, Fink CW, et al. A study of classification criteria for a diagnosis of juvenile

- rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986;29:274-81.
24. Wallace CA, Ruperto N, Giannini EH. Preliminary criteria for clinical remission for select categories of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2004;31:2290-4.
 25. Ruperto N, Ravelli A, Falcini F, Lepore L, De Sanctis R, Zulian F, et al. Performance of the preliminary definition of improvement in juvenile chronic arthritis patients treated with methotrexate. Italian Pediatric Rheumatology Study Group. *Ann Rheum Dis* 1998;57:38-41.
 26. Albornoz MA. ACR formally adopts improvement criteria for juvenile arthritis (ACR Pediatric 30). *ACR News* 2002;21:3.
 27. Giannini EH, Ruperto N, Ravelli A, Lovell DJ, Felson DT, Martini A. Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1202-9.
 28. Ruperto N, Giannini EH. Redundancy of conventional articular response variables used in juvenile chronic arthritis clinical trials. *Ann Rheum Dis* 1996;55:73-5.
 29. Singh G, Athreya BH, Fries JF, Goldsmith DP. Measurement of health status in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:1761-9.
 30. Ruperto N, Ravelli A, Pistorio A, Malattia C, Cavuto S, Gado-West L, et al. Cross-cultural adaptation and psychometric evaluation of the Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ) and the Child Health Questionnaire (CHQ) in 32 countries. Review of the general methodology. *Clin Exp Rheumatol* 2001;4 Suppl 23:1-9.
 31. Schroder H, Heinsvig E-M. Enzymatic assay for methotrexate in erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:657-9.
 32. Chladek J, Martínková J, Šimková M, Vanecková J, Koudelková V, Nozicková M. Pharmacokinetics of low doses of methotrexate in patients with psoriasis over the early period of treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;53:437-44.
 33. Hroch M, Tůková J, Dolezalova P, Chladek J. An improved high-performance liquid chromatography method for quantification of methotrexate polyglutamates in red blood cells of children with juvenile idiopathic arthritis. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30:138-48.
 34. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
 35. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
 36. Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:434-42.
 37. Lee YC, Cui J, Costenbader KH, Shadick NA, Weinblatt ME, Karlson EW. Investigation of candidate polymorphisms and disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology* 2009;48:613-7.
 38. Fisher MC, Cronstein BN. Metaanalysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *J Rheumatol* 2009;36:539-45.
 39. Dervieux T. Methotrexate pharmacogenomics in rheumatoid arthritis: introducing false-positive report probability. *Rheumatology* 2009;48:597-8.
 40. Schmeling H, Biber D, Heins S, Horneff G. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on efficacy and toxicity of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:1832-6.
 41. De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer* 2009;45:1333-51.
 42. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:3299-308.
 43. Hillson JL, Furst DE. Pharmacology and pharmacokinetics of methotrexate in rheumatic disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1997;23:757-78.
 44. Chladek J, Grim J, Martinkova J, Simkova M, Vaneckova J. Low-dose methotrexate pharmacokinetics and pharmacodynamics in the therapy of severe psoriasis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:247-8.
 45. Dolezalova P, Krijt J, Chladek J, Nemcova D, Hoza J. Adenosine and methotrexate polyglutamate concentrations in patients with juvenile arthritis. *Rheumatology* 2005;44:74-9.
 46. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Frampton C, James J, et al. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2009;60:2248-56.
 47. Schroder H. In vivo methotrexate kinetics and metabolism in human hematopoietic cells. Clinical significance of methotrexate concentrations in erythrocytes. *Dan Med Bull* 1990;37:22-40.
 48. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2766-74.
 49. Becker ML, van Haandel L, Gaedigk R, Lasky A, Hoeltzel M, Stobaugh J, et al. Analysis of intracellular methotrexate polyglutamates in juvenile idiopathic arthritis: Effect of route of administration upon intracellular methotrexate polyglutamate variability. *Arthritis Rheum* 2010 Feb 26. [Epub ahead of print]
 50. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, James J, Frampton C, et al. Methotrexate polyglutamate concentrations are not associated with disease control in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. *Arthritis Rheum* 2010;62:359-68.

3.3 HPLC determination of arginases inhibitor N-(omega)-hydroxy-nor-L-arginine using core-shell particle column and LC-MS/MS identification of principal metabolite in rat plasma

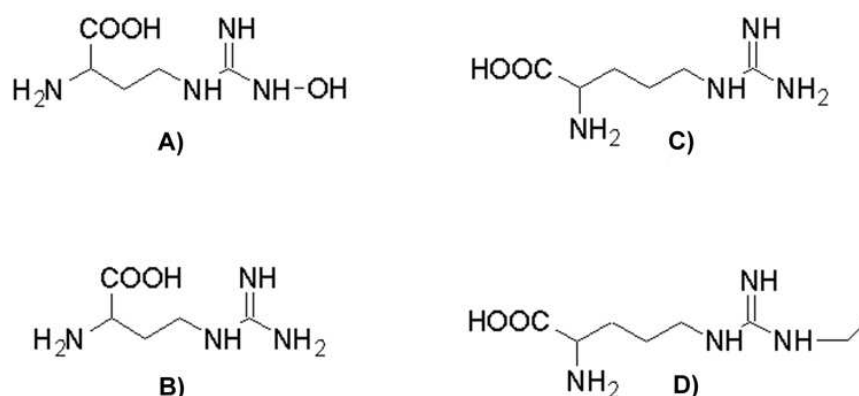
Miloš Hroch, Zuzana Havlínová, Milan Nobilis, Jaroslav Chládek

Journal of Chromatography B, accepted (2011),

DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.11.022

3.3.1 Komentář k metodě:

Poslední prací diskutovanou v tomto textu je metoda pro stanovení **N-(ω)-hydroxy-nor-L-argininu (nor-NOHA)**. Látka patří svým zařazením mezi selektivní inhibitory argináz, které jsou v poslední době velmi pozorně sledovány vzhledem k mnoha pozitivním efektům při experimentální terapii některých závažných patologických stavů jako je astma, hypertenze, diabetes nebo ateroskleróza. Pro vývoji metody byla zvolena kolona s moderní stacionární fází na bázi „core-shell“ sorbentu, **Kinetex C18**. Hlavním důvodem vývoje byla nutnost zjištění základních farmakokinetických parametrů při pilotních experimentech na laboratorních zvířatech. V literatuře zcela chybí popis farmakokinetiky nor-NOHA i jeho biotransformace, stejně tak jako metoda pro stanovení této látky.

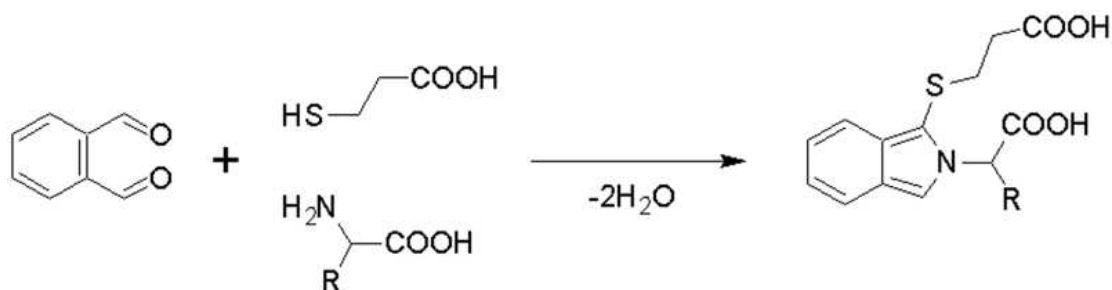


Obrázek 38. Struktury látek. N-(ω)-hydroxy-nor-L-arginin (A), nor-L-arginin (B), L-arginin (C), N-(ω)-ethyl-L-arginin (D)

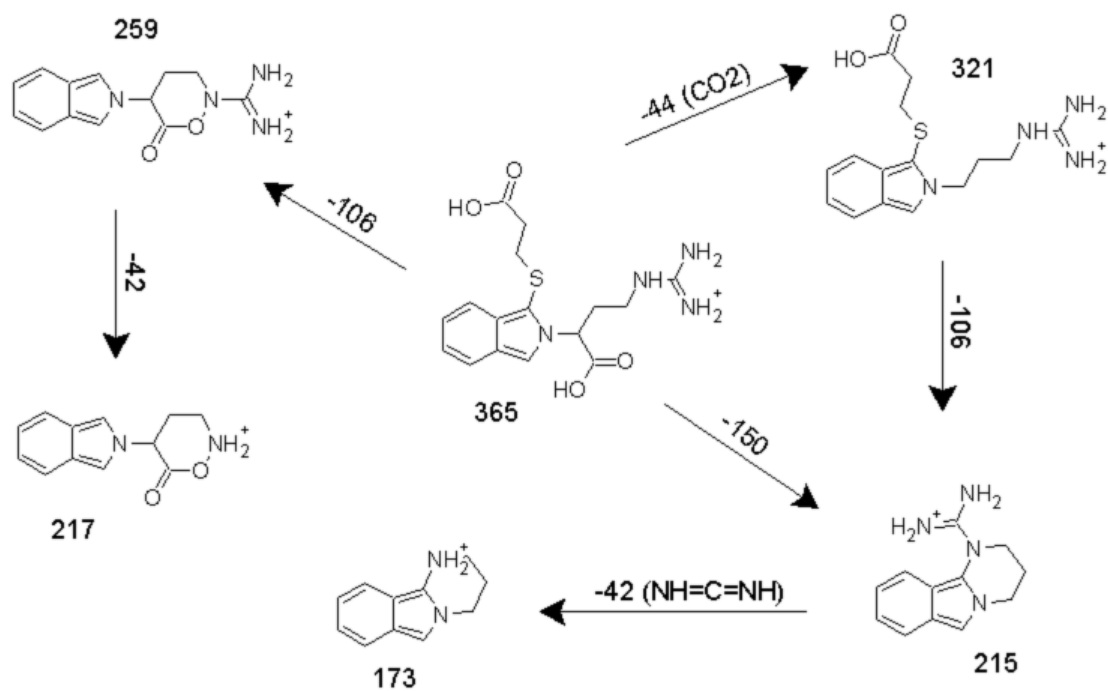
Metoda byla vyvíjena s ohledem na separaci nor-NOHA, argininu a neznámého metabolitu, který byl později na našem pracovišti identifikován jako nor-L-arginin. Jako vnitřního standardu bylo při vývoji metody použito N-(ω)-ethyl-L-argininu. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi polární nízkomolekulární nefluoreskující látky bez chromoforu a jako takové je problematické je detekovat a separovat na reverzní fázi, byla při vývoji zvolena citlivá fluorescenční detekce po předchozí derivatizaci aminokyseliny o-ftalaldehydem (OPA). Derivatizační reakce je uvedena na *Obrázku 39*.

Chromatografická separace byla vyvíjena tak, aby byla kompatibilní s hmotnostně spektrometrickou detekcí, tzn. nebyly používány netěkavé pufrý jako aditiva mobilní fáze. Pro účely kvantifikace byla používána výhradně fluorescenční detekce díky své citlivosti a dobrému lineárnímu dynamickému rozsahu. Hmotnostní spektrometr typu iontová past, LCQ Fleet (Thermo Scientific, Waltham, USA), byl v této práci využit pro identifikaci metabolitu, který byl pozorován v chromatogramech (HPLC-FLD) měřených ze vzorků po intravenózní aplikaci nor-NOHA.

Látka byla na základě svého fragmentačního chování a srovnáním s autentickým standardem určena jako nor-L-arginin, vznikající eliminací hydroxylové skupiny z molekuly nor-NOHA. Navrženo bylo pravděpodobné fragmentační schéma isoindolového derivátu nor-NOHA po derivatizaci o-ftalaldehydem (*Obr. 40*), nicméně pro jeho potvrzení by musely být stanoveny přesné hmoty a elementární složení, měřením na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením, ke kterému momentálně nemáme přístup.



Obrázek 39. Schéma reakce o-ftalaldehydu s primární aminoskupinou aminokyseliny v přítomnosti 3-merkaptopropionové kyseliny za vzniku fluoreskujícího derivátu s isoindolovou strukturou.



| [M+H] ⁺ (m/z) | MS ² (m/z) | MS ³ (m/z) | MS ⁴ (m/z) |
|-----------------------------|---|---|---|
| 365 | [365 → 321] [365 → 259] [365 → 215] | [365 → 321 → 215] [365 → 259 → 217] [365 → 215 → 173] | [365 → 259 → 217 → 160] [365 → 215 → 173 → 145] - |

Obrázek 40. Pravděpodobný fragmenční mechanismus isoindolového derivátu nor-L-argininu.

Problémy s obecně známou krátkodobou stabilitou OPA derivátů byly v našem případě vyřešeny automatickou on-line derivatizací vzorku v autosampleru, která navíc zkrátila přípravu vzorku a omezila riziko vzniku chyb při pipetování. Zajímavým jevem, který bych rád ještě nakonec zmínil v tomto krátkém komentáři k publikované metodě je omezená stabilita nor-NOHA při styku s kovovým povrchem. Na tuto skutečnost jsme narazili při ověřování opakovatelnosti nástřiku z jedné vialky. Po dvaceti nástřicích jsme zjistili pokles koncentrace analytu na 83% původní hodnoty. Tento jev se neopakoval při stejném počtu nástřiků z různých vialek. Z tohoto důvodu jsme provedli experiment, kde byl vzorek rozdělen do dvou vialek a poté bylo postupně nástřikováno z jedné a poté z druhé vialky (n=2x20). Výsledkem byly dvě překrývající se křivky se stejnou směrnici i posunem na ose y. Na základě tohoto chování jsme usoudili, že dochází buď k adsorpci látky na kovový materiál nástřikové jehly, nebo přímo k rozkladu. Podobné chování nebylo pozorováno u argininu ani N-(ω)-ethyl-L-argininu (vnitřní standard). Další detaily k vyvinuté metodě lze nalézt v příloženém článku.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

HPLC determination of arginases inhibitor *N*-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine using core-shell particle column and LC-MS/MS identification of principal metabolite in rat plasma

Miloš Hroch^{a,*}, Zuzana Havlínová^a, Milan Nobilis^b, Jaroslav Chládek^a^a Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic^b Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2011

Accepted 11 November 2011

Available online xxx

Keywords:

N-(ω)-Hydroxy-nor-L-arginine

nor-L-Arginine

Core-shell column

Pharmacokinetics

OPA-derivatization

HPLC

ABSTRACT

For the purpose of *in vivo* pharmacokinetic studies, an HPLC method was developed and validated for the quantification of *N*-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine, L-arginine and *N*-(ω)-ethyl-L-arginine (internal standard) in rat plasma. Sample processing involved a solid-phase extraction on the Waters MCX cartridges and on-line pre-column derivatization of the analytes with *o*-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid. Separation of the derivatives was carried out on a core-shell Kinetex C18 column in a gradient elution mode with a mobile phase consisting of methanol and water (pH= 3.00 adjusted with formic acid). Fluorimetric detection with the excitation/emission wavelengths of 235/450 nm was used. The method was validated according to the FDA guidelines and applied to pilot pharmacokinetic experiments. An unknown metabolite was extracted from the plasma of Wistar rats after a single bolus of *N*-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine (*i.v.* 10 mg kg⁻¹). The metabolite was identified as nor-L-arginine using mass spectrometry. Validated method was successfully used for pilot pharmacokinetic experiment on rats.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Arginases compete with nitric oxide synthases (NOS) for a common substrate L-arginine (ARG). Overexpression of arginases reduces the synthesis of nitric oxide (NO), while inhibition results in an increased NO formation [1]. An increased expression and activity of arginases have been found in many pathological states [2–5]. Arginase inhibitors decrease blood pressure and improve the reactivity of resistance vessels in adult spontaneously hypertensive rats [6]. In animal models of asthma, arginase inhibition protects against allergen-induced airway obstruction, hyperresponsiveness and inflammation [7]. Moreover, airway remodelling in chronic allergic asthma is attenuated [8]. If compared to healthy subjects, patients with asthma have significantly higher arginase expression in bronchoalveolar lavage cells and in the airway epithelium [9]. Patients who present with acute asthma exacerbation have higher serum arginase activity and lower levels of arginine as compared with healthy subjects [10]. Moreover, arginase activity is related to airflow abnormalities in severe asthma [11]. Arginase inhibitors thus have therapeutic potential in several NO-dependent smooth muscle disorders, including

asthma and hypertension. *N*-(ω)-Hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), a more potent analogue of *N*-(ω)-hydroxy-L-arginine (NOHA), is an inhibitor of arginases with no affinity towards NOS [12]. An increasing number of published studies address the positive effects of nor-NOHA in various diseases [6,13–15] which strongly contrasts with the absence of analytical methods and pharmacokinetic data in the literature, unlike methods for arginine and its other derivatives [16–19]. The aim of this work was to develop and validate a liquid chromatographic method for nor-NOHA assessment in the rat plasma. Stationary phase Kinetex C18 with the core-shell particle technology was chosen for the method development. Recently, this kind of columns has become popular in pharmaceutical analysis and bioanalysis [20–25], owing to the fast separation of analytes with excellent efficiency [26–32]. Sensitive and selective fluorescence method of amino acid analysis was utilized with *o*-phthalaldehyde (OPA) on-line derivatization and separation of isoindoles derivatives [33–37]. Fluorimetry is the primary detection technique. However, chromatographic conditions are compatible with mass-spectrometry (MS). The method also enables simultaneous quantification of ARG. The LC-MS mode was used for the identification of a putative metabolite of nor-NOHA found in the plasma of Wistar rats after *i.v.* administration of the compound. The metabolite was identified as nor-L-arginine (nor-ARG).

* Corresponding author. Tel.: +420 495816340; fax: +420 495513022.
E-mail addresses: hrochm@lfhk.cuni.cz, hroch.m@volny.cz (M. Hroch).

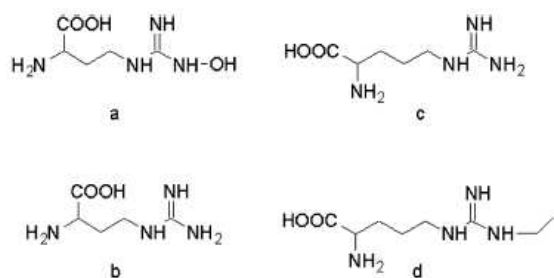


Fig. 1. Chemical structures of *N*-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine (a), nor-L-arginine (b), L-arginine (c) and *N*-(ω)-ethyl-L-arginine (d).

2. Experimental

2.1. Reagents

N-(ω)-Hydroxy-nor-L-arginine was purchased from Bachem (Basel, Switzerland), *N*-(ω)-ethyl-L-arginine (NMEA, an internal standard) was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) and nor-L-arginine (nor-ARG) was obtained from IS Chemical Technology (Shanghai, China). Chemical structures of compounds under the study are presented in Fig. 1. Hydrochloric acid and sodium hydroxide were obtained from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). L-Arginine, boric acid, potassium acetate, formic acid, 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) and *o*-phthalaldehyde were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic) and gradient grade methanol from Fisher Scientific (Pardubice, Czech Republic). Water was purified with the MilliQ system (Millipore, Milford, MA, USA). OPA reagent was prepared by dissolving of 20.1 mg *o*-phthalaldehyde in 1 ml of methanol. The solution was transferred to a 10 ml volumetric flask, filled with borate buffer (0.2 mol l⁻¹, pH=9.5) and 10 μ l of 3-MPA was added. Before use, reagent was held in a dark at room temperature for 90 min [34,38], then was transferred to the fridge (4 °C) and used at longest for two days [39]. All chemicals used in the study were of analytical-reagent grade or best available purity. Drug-free rat plasma for the method development and validation was acquired from sacrificed animals.

2.2. Instrumentation and chromatographic conditions

All analyses were performed on a 1100 series Agilent liquid chromatograph (Palo Alto, CA, USA) composed of a degasser, quaternary pump, light-tight autosampler unit set at 7 °C, thermostated column compartment held at 50 °C and a fluorescence detector set at the excitation/emission wavelengths of 235/450 nm, with photomultiplier gain 11. Chromatographic separation was carried out on a Kinetex C18 core-shell column 100 mm \times 3 mm ID, 2.6 μ m (Phenomenex, Torrance, CA, USA), protected with disposable in-line filter CrudCatcher (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase flowing at a rate of 0.85 ml min⁻¹ consisted of water, adjusted with formic acid at pH=3.00 (solvent A) and methanol (solvent B). The gradient elution program was as follows: from 5% to 39% (v/v) of solvent B in 9.4 min; 39% to 5% (v/v) of solvent B in 0.1 min, equilibration at 5% (v/v) of solvent B for 3.5 min. During the equilibration, on-line derivatization of the next sample was accomplished simultaneously. Injection program used Agilent ChemStation (Palo Alto, CA, USA) software statements in the following order: DRAW 1.5 μ l from sample, DRAW 1.5 μ l from vial 1 (OPA reagent), MIX 3.0 μ l (in air, max. speed, 8 times), WAIT 0.4 min, INJECT. The time of sample analysis was 13 min including column re-equilibration. The mobile phase was filtered through a 0.22 μ m Durapore filter (Millipore, Milford, MA, USA) and vacuum degassed prior to use. Data processing was handled by means of

Agilent ChemStation software (Palo Alto, CA, USA). For the identification of an unknown metabolite, a quadrupole ion trap LCQ Fleet mass spectrometric detector (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray (ESI) interface was used. Detector was coupled with 1200 Series Agilent HPLC (Palo Alto, CA, USA) composed of degasser, quaternary pump, cooled autosampler and column compartment. Chromatographic conditions were identical to that described above for fluorescence detection.

2.3. On-line derivatization

With the aim to achieve the optimum response of the fluorescence signal a special attention was paid to the optimization of the injector program used for the on-line derivatization as well as to the composition of the OPA reagent. The parameters under evaluation were the concentrations of OPA (the range of 1.9–30 mmol l⁻¹), 3-MPA (the range of 5.75–184 mmol l⁻¹) and, of borate buffer (the range of 50–400 mmol l⁻¹), the number of mixing cycles in the injection loop and, the time delay after mixing of the sample with the OPA reagent.

2.4. Development of separation conditions

Chromatographic conditions were selected to allow a rapid and efficient separation of the OPA derivatives of nor-NOHA, nor-ARG, ARG and NMEA (internal standard–IS) from plasma components. A critical pair of nor-NOHA and nor-ARG derivatives was the most difficult task. The use of non-volatile buffers was avoided during the method development in order to enable mass spectrometric detection. Several chromatographic parameters were optimized including the type of organic modifier (methanol, ACN), the flow rate (0.6–0.85 ml min⁻¹), the gradient program, the column length (150 vs. 100 mm) and, the temperature of the column compartment (35–50 °C). The decision criteria included selectivity of the assay, sufficient chromatographic resolution of the critical pair ($R_s > 1.5$), short runtime (<15 min) and, the back-pressure <400 bar due to the limitations of the Agilent 1100 HPLC system.

2.5. Preparation of calibration standards and quality control samples

Stock standard solutions of nor-NOHA (40 and 30 mmol l⁻¹), ARG (20 and 15 mmol l⁻¹) and NMEA (1 mmol l⁻¹) were prepared by dissolving of each pure substance in 0.01 mol l⁻¹ hydrochloric acid. From the standard solution 40 mmol l⁻¹ were prepared auxiliary stock solutions by consecutive dilution with hydrochloric acid (0.01 mol l⁻¹) to concentrations 0.20–0.50–1.0–2.0–10–20–40 mmol l⁻¹. The calibration standards of nor-NOHA were prepared from auxiliary stock solutions by a 20-fold dilution with blank rat plasma (standards L1–L7). Calibration standards of ARG were obtained using standard additions of 5–12.5–25–50–250–500–1000 μ mol l⁻¹ to rat plasma containing 122.4 μ mol l⁻¹ of endogenous ARG (standards L1–L7). ARG endogenous concentration was calculated from linear regression equations of calibration curves ($n=7$) with standard additions of ARG as mentioned above. Calibration curves were extrapolated to zero response ($y=0$) and concentration of ARG was ascertained from absolute value of intercept on the concentration axis (x). Quality control samples of nor-NOHA in blank rat plasma were prepared at concentrations of 30, 300 and 1500 μ mol l⁻¹ (QC1, QC2 and QC3, respectively). Standard additions of 15, 150 and 750 μ mol l⁻¹ ARG to rat plasma with a basal concentration of 122.4 μ mol l⁻¹ were performed to prepare QC1, QC2 and QC3, respectively. The calibration standards and QC samples were divided to 200 μ l aliquots and kept frozen at –80 °C for a maximum of two weeks.

2.6. Solid-phase extraction of analytes from rat plasma

Samples of frozen plasma were thawed at room temperature and subjected to a solid-phase extraction (SPE) on the Oasis MCX cartridges (30 mg, 1 ml, Waters, Milford, MA, USA) filled with a mixed mode sorbent (reversed phase and strong cation exchanger). The sorbent was wetted twice with 1 ml of methanol and washed twice with 1 ml of ultrapure water. Two hundred microliters of plasma was mixed with 600 μl of phosphate buffer (0.05 mol l⁻¹, pH = 7.4) and 50 μl of IS ($c = 1 \text{ mmol l}^{-1}$) and the mixture was loaded on the SPE cartridge. The cartridge was washed once with 1 ml of hydrochloric acid (0.1 mol l⁻¹) and 1 ml of methanol. The analytes were eluted from the air-dried sorbent using 1 ml of the elution agent composed of potassium acetate (0.5 M, pH = 7.4) and methanol (40:60, v/v). The eluates were evaporated to dryness in a thermoblock (30 min, 35 °C) under a gentle stream of nitrogen and reconstituted in 200 μl of ultrapure water. After vortex mixing for 15 s and centrifugation (14,000 \times g, 5 min), the samples were transferred into vials with glass inserts and placed to the autosampler for on-line derivatization and analysis. Total volume of the sample taken for on-line derivatization was 1.5 μl .

2.7. Method validation

The optimal chromatographic conditions acquired in the course of method development were applied throughout the validation process. The method was evaluated for selectivity, linearity, the lower limit of quantification (LLOQ), precision, accuracy, extraction recovery and sample stability, using recommendations of the FDA Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation [40]. For all tests performed during the method validation, pooled blank plasma from fourteen rats was used.

2.7.1. Selectivity

The selectivity of the HPLC method was tested by comparing the blank, drug-free rat plasma from 14 different animals to the samples of calibration standard L3 and standard fortified with nor-NOHA, ARG and NMEA (IS) to the final concentration of 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$, prepared in ultrapure water. Peak purity test was also performed for ARG because the amino acid is a common constituent of many biological matrices and blank plasma is unavailable. This test was based on the continuous measurement of the excitation or emission spectra during a chromatographic run. For this purpose, two runs for each blank plasma ($n = 14$) were carried out. First, the excitation spectra were recorded over the range of 220–400 nm and second, scanning of the emission spectra was performed in the range of 360–550 nm. Evaluation of the tests was undertaken with a “Peak purity test” function available in ChemStation software with a threshold value set at 990 [41,42]. Mass spectrometric data across ARG peak in blank samples were also acquired for confirmation of fluorimetric peak purity measurement. Peak purity function supported by ChemStation software utilizes statistical approach for computation of the spectra similarity within a chromatographic peak. Two exactly identical spectra have similarity factor equal to 1000. Values of similarity factor higher than 995 indicate that the spectra are very similar and can be assumed as identical. Detailed description of aforementioned peak purity function is in Refs. [41,42].

2.7.2. Linearity and LLOQ

Calibration curves were constructed using a weighted ($1/y^2$) least-square linear regression of the relationship between the peak areas ratios (the analyte to IS) and the concentrations of calibration standards. Each of the seven concentration levels was analyzed seven-times. The calibration ranged from 10 to 2000 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (nor-NOHA) and from 127.4 to 1127.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (ARG – final

concentration). LLOQ was defined as the lowest concentration determined with acceptable precision and accuracy, i.e. with the relative standard deviation (RSD) below 20% and the relative error (RE) within $\pm 20\%$ of the true value. For the purpose of LLOQ determination, seven parallel samples were spiked with nor-NOHA to the final concentration of 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ and with standard addition of ARG 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ to the plasma with ARG basal concentration 122.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

2.7.3. Precision and accuracy

The intra- and inter-day accuracy and precision were assessed by conducting a replicate analysis of the QC samples at three concentration levels. Intra-day precision was measured at three concentration levels, each level in septuplicate. To determine the inter-day precision, the QC samples were analyzed over three different days at three concentration levels, each level in triplicate. The precision and the accuracy were expressed as the relative standard deviation (RSD) and relative error (RE), respectively.

2.7.4. Recovery

Relative recoveries (R%) of analytes were evaluated by comparing the results of replicate analyses ($n = 5$) of the plasma QC samples prepared at three concentration levels with those prepared by spiking the post-extracted plasma samples to the same concentrations. Recovery for NMEA (IS) was evaluated at the concentrations of 100, 200 and 400 $\mu\text{mol l}^{-1}$ in the same manner as for the QC samples. Relative recovery of analytes was calculated according to the following equation [43]:

$$R\% = \frac{\text{response of analytes spiked to plasma before extraction}}{\text{response of analytes spiked to plasma after extraction}} \times 100$$

2.7.5. Stability

Long-term and short-term stability, post processing stability and freeze–thaw stability were assessed by replicate analyses ($n = 5$) of the low and high QC samples prepared in rat plasma. Long-term stability samples were stored at -80°C , measured after 4 weeks and compared with freshly prepared samples. Short-term stability of the plasma at 25 °C was assessed after standing over 1 h before sample processing and analysis. Post-processing stability was measured by analyzing the low and high QC samples immediately after processing as well as after 24 h standing in the autosampler thermostated at 7 °C. The freeze–thaw stability was determined after each of three freezing–thawing cycles.

2.8. Pilot pharmacokinetic experiment

Male Wistar rats ($n = 5$) weighing from 310 to 410 g (Biotest, Konárovice, Czech Republic) were used in a preliminary pharmacokinetic experiment to verify the performance of the new chromatographic method. Animals were housed under controlled environmental conditions (12-h light–dark cycle, temperature $22 \pm 1^\circ\text{C}$) with a commercial food diet and water freely available. All experiments were approved in accordance with Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication, 1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic. A bolus dose of 10 mg kg⁻¹ nor-NOHA was administered intravenously under the anesthesia induced by pentobarbital (50 mg kg⁻¹, i.p.) and samples of blood were collected into the EDTA KE Monovette tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at various time intervals during the 2 h post-dosing. Blood samples were immediately cooled in a water bath (5 min, 10 °C) and plasma was separated by centrifugation (1000 \times g, 10 min, 4 °C). Samples were stored at -80°C until analysis.

2.9. Identification of the metabolite using mass spectrometry

In the course of preliminary pharmacokinetic experiments with nor-NOHA in rats, an unknown peak was found in the OPA-derivatized plasma extracts, with the kinetics related to that of nor-NOHA. We assumed that the peak belongs to a metabolite or degradation product of nor-NOHA emerging in vivo. Therefore, it was tested whether or not the origin of the compound is artificial, i.e. caused by nor-NOHA decomposition in vitro during sample processing. Within the framework of this testing, short-term stability was also evaluated (see Section 2.7.5). Blank rat blood was spiked with nor-NOHA and ARG to final concentrations of 301.8 and 150.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$, respectively, and the volume was divided into five aliquots. The first aliquot was immediately processed and analyzed. From the second and third aliquots, plasma was prepared immediately and held at 25 °C and 4 °C for 1 and 2 h, before sample processing and analysis. The fourth and fifth aliquots were held at 25 °C and 4 °C for 1 and 2 h, respectively, and then plasma was separated, processed and analyzed. After this preliminary test, the compound was characterized by means of mass spectrometry. Full scan MS¹-ESI spectra and MSⁿ-ESI in the positive mode were recorded with the ion source and ion optics settings as follows: spray voltage 4 kV, capillary voltage 35 V, capillary temperature 250 °C, sheath gas 50 AU (arbitrary units), auxiliary gas 30 AU, RF lens offset -7.5 V, lens(0) -4.5 V, multipole(0) offset -5 V, gate lens -52 V, multipole(1) offset -13.5 V, multipole RF 465 V_{p-p}, front lens -86 V, trap offset -10 V. Confirmation of the proposed structure was carried out with authentic standard of nor-ARG.

3. Results and discussion

3.1. Development of chromatographic conditions

Preliminary experiments were done using an Agilent Zorbax XDB-C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with optimized mobile phase consisting of acetonitrile-methanol-phosphate buffer (0.05 mol l⁻¹, pH = 6.5) in a gradient mode. Despite the fact that validation was successful, the runtime >35 min was found unsatisfactory. Such long runtime caused problems with post-processing instability of the analytes, especially during the analysis of large analytical batches. Another limitation was the phosphate buffer used in the mobile phase and impossibility to use the method in LC-MS mode for nor-NOHA metabolite identification, as this demand rose throughout the study.

During the last two years, columns with shell-type stationary phases have become popular owing to a fast and efficient separation with excellent efficiency [26–28,31]. Therefore, this new stationary phase technology was chosen in the present study also. Isocratic separation on a Kinetex C18 (150 mm × 3 mm ID, 2.6 μm) column gave disappointing results. The critical pair of OPA derivatives of nor-NOHA and nor-ARG showed insufficient resolution and NMEA (IS) eluted in the runtime exceeding 60 min. For a gradient elution, acetonitrile and methanol were tested as organic modifiers. Acetonitrile gave a low back-pressure profile but separation of the aforementioned critical pair remained problematic. Optimum chromatographic separation of all analytes and interferences was achieved with methanol. A 150 mm long Kinetex C18 column offered good separation, however with a runtime exceeding 17 min. A shorter, 100 mm column was therefore tested and was found to be sufficient for baseline separation of all OPA derivatives with the significantly shorter runtime of 13 min. Column temperature and flow rate were conformed to an acceptable value of the back-pressure and sufficient resolution of the critical pair. Kinetex C18 (100 mm × 3 mm ID, 2.6 μm) column was finally used in the present study. Parameters of the resulting method are presented

Table 1

Chromatographic performance data valid for standard unmodified Agilent 1100 series liquid chromatograph equipped with Kinetex C18 (100 mm × 3 mm ID, 2.6 μm) column.

| Compound | Reduced ret. time t_R (min) | Peak width at half height $W_{1/2}$ (min) | Resolution R_s |
|--------------|-------------------------------|---|------------------|
| Unknown peak | 6.033 | 0.0499 | – |
| nor-NOHA | 6.345 | 0.0643 | 3.3 |
| nor-ARG | 6.522 | 0.0589 | 2.0 |
| Unknown peak | 7.053 | 0.0765 | 4.6 |
| ARG | 7.483 | 0.0594 | 4.8 |
| NMEA (IS) | 8.975 | 0.0599 | 16.2 |

in Section 2.2. Chromatographic performance data were computed by means of Agilent ChemStation software and are summarized in Table 1. Resolution was computed for consecutive peaks. Data for observed interferences are also included.

3.2. Derivatization and injector program

OPA and 3-MPA in borate buffer (0.2 mol l⁻¹, pH = 9.5) were used for derivatization. OPA reagent composition used through the study was as follows: OPA 15 mmol l⁻¹, 3-MPA 11.5 mmol l⁻¹. Injector program settings are described in Section 2.2. 3-MPA was a preferred donor of a thiol group given the reported higher stability of the derivatives [44,45]. Data acquired during the optimization of the injector program are presented in Fig. 2. Peak areas of the analytes to IS were used for computation and results were normalized to a highest value in the dataset.

Based on the results presented in Fig. 2, an attention should be paid to OPA and 3-MPA concentrations. On the other hand, the concentration of borate buffer influences the fluorescence response of OPA derivatives only slightly. An optimum composition was as follows: 15 mmol l⁻¹ OPA and 11.5 mmol l⁻¹ 3-MPA in borate buffer (0.2 mol l⁻¹, pH 9.5). The count of mixing cycles during the on-line derivatization is the most important instrumental parameter to optimize while the delay time in the injector loop after mixing has only a marginal influence on the fluorescence intensity.

3.3. Solid-phase extraction of analytes from rat plasma

Solid phase extraction on the Waters MCX cartridges resulted in clean extracts and a high recovery of the analytes. The procedure recommended in the Oasis MCX cartridge brochure [46] was tested first, but alkaline ammonia solution used in the elution step completely decomposed nor-NOHA. Similar behavior was described by others for NOHA [47]. To prevent the decomposition of nor-NOHA during the sample processing, alkaline solutions (pH > 8) has to be avoided. Therefore, various elution agents were investigated each composed of methanol and organic or inorganic salt (potassium acetate, potassium phosphate, potassium chloride, ammonium chloride). The best results were achieved with a solution containing potassium acetate (c = 0.5 mol l⁻¹, pH = 7.4) and methanol (40:60, v/v). This solution was used through the study.

3.4. Results of validation

3.4.1. Selectivity

Selectivity was investigated using blank and spiked samples of rat plasma (nor-NOHA, nor-ARG and NMEA) and by means of a peak purity test and LC-MS (ARG). Baseline resolution was achieved for all analytes. Samples of blank rat plasma ($n = 14$) were found free of interfering peaks of endogenous compounds at the retention times of nor-NOHA, nor-ARG and NMEA (IS) (Fig. 3).

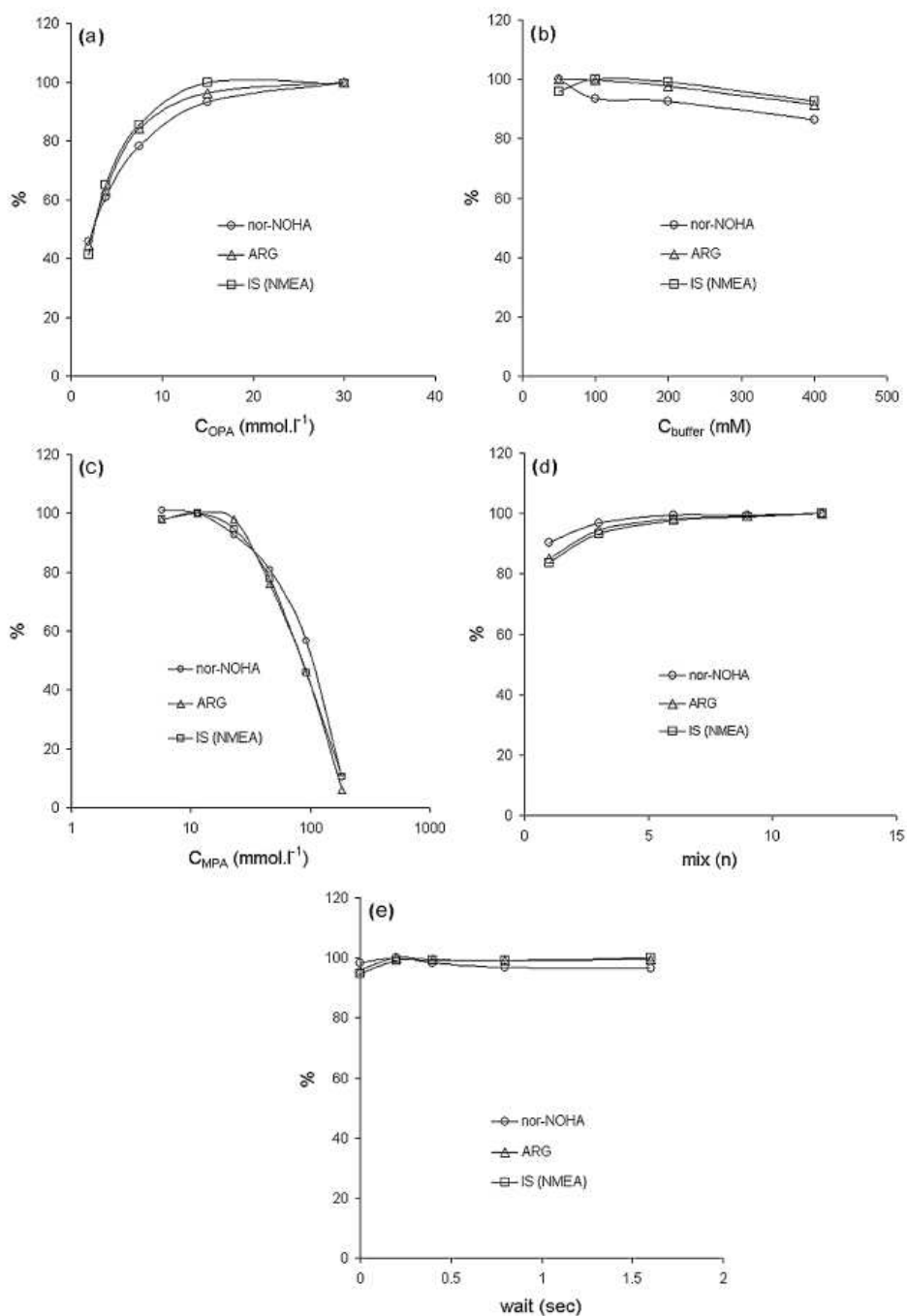


Fig. 2. Influence of derivatization parameters on the fluorescence response. Concentrations of the components of the derivatization reagent: o-phthalaldehyde (a), borate buffer (b) and 3-mercaptopropionic acid (c). Instrumental parameters: the count of mixing cycles after aspiration of a sample and OPA reagent (d), the time interval between mixing of a sample with OPA reagent and injection (e).

The peak purity test demonstrated that similarity factors of the ARG OPA spectra of all samples of rat plasma ($n=14$) were higher than 997.2 and 996.2 with the mean (SD) values of 998.4 (0.5129) and 999.0 (0.6111) for excitation end emission spectra,

respectively. Inasmuch as the aforementioned peak purity test is not able to detect interference with exactly the same retention time and peak shape as that of ARG OPA, results of the peak purity test were also confirmed with the help of the mass spectra recorded

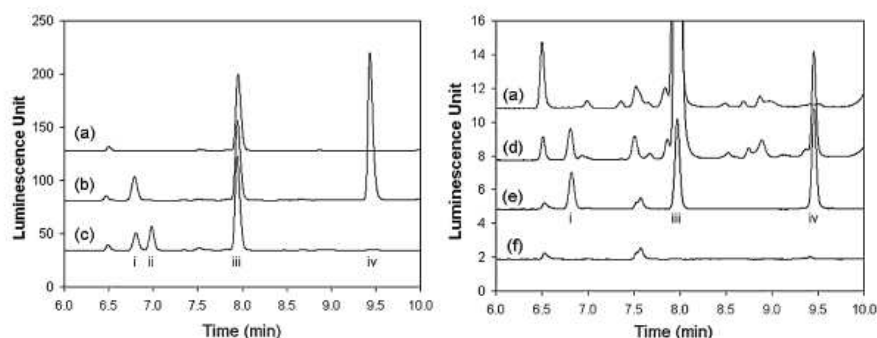


Fig. 3. Representative chromatograms of blank rat plasma (a), plasma fortified with $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ nor-NOHA, $147 \mu\text{mol l}^{-1}$ ARG (final concentration) and $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ NMEA (b), rat plasma withdrawn 5 min after nor-NOHA bolus (10 mg kg^{-1} i.v.) (c), plasma fortified with nor-NOHA and NMEA ($5 \mu\text{mol l}^{-1}$ each compound) (d), water fortified with nor-NOHA, ARG and NMEA ($5 \mu\text{mol l}^{-1}$ each compound) (e), water used for sample reconstitution (f). Peak identification: nor-NOHA $t_R = 6.8$ min (i), nor-ARG $t_R = 7.0$ min (ii), ARG $t_R = 7.9$ min (iii), NMEA $t_R = 9.4$ min (iv).

across the ARG OPA peak in all samples of rat plasma ($n = 14$). Results demonstrated the ability of the method to unequivocally assess the analytes of interest in a complex matrix of rat plasma.

3.4.2. Linearity of calibration and LLOQ

Least-squares linear regression with different weights (no weighting, $1/x$, $1/x^2$, $1/y$ and $1/y^2$) was tested. The best results were achieved using a weighted ($1/y^2$) least-squares linear regression. The calibration curve of nor-NOHA and ARG OPA derivatives were linear within the concentration ranges of $10\text{--}2000$ and $5\text{--}1000 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively. The mean (\pm SD) regression equations of calibration curves ($n = 7$) were: $y = 0.001047(\pm 0.00008624)x + 0.001086(\pm 0.0007810)$ ($r^2 > 0.998$) and $y = 0.002886(\pm 0.0003632)x + 0.3532(\pm 0.07832)$ ($r^2 > 0.997$) for nor-NOHA-OPA and ARG OPA, respectively.

Lower limit of quantification $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ for nor-NOHA and ARG, respectively was confirmed with the measurement of accuracy and precision, where limits given by FDA [40] were fulfilled. The method proved to be linear over the range demanded for analysis of samples from pharmacokinetic experiment on rats (see Section 3.5) with sufficient quantification limits.

3.4.3. Precision and accuracy

The data of the intra and inter-day precision and accuracy are shown in Table 2. For all QC samples were the relative standard deviations better than 11% and assayed concentrations between 90 and 110% of the true values. Precision and accuracy of the present method met the criteria of the FDA Guidance for the Bioanalytical Method Validation [40].

Table 2

Precision, accuracy, LLOQ and recovery results of the method for nor-NOHA and ARG determination. Mean unspiked plasma (a), spike added (b), mean spiked plasma (c) and spike found (d).

| Analyte | a ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | b ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | c ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | d ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | RSD (%) | RE (%) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|--------|
| <i>Inter day n = 15</i> | | | | | | |
| nor-NOHA | – | 30.18 | – | 31.55 | 7.20 | 4.54 |
| nor-NOHA | – | 301.8 | – | 302.4 | 10.80 | 0.21 |
| nor-NOHA | – | 1509 | – | 1644 | 6.00 | 8.98 |
| ARG | 122.4 | 15.05 | 138.1 | 15.73 | 7.71 | 4.52 |
| ARG | 122.4 | 150.5 | 279.3 | 156.9 | 2.21 | 4.25 |
| ARG | 122.4 | 752.3 | 913.3 | 790.9 | 5.70 | 5.13 |
| <i>Intra day n = 5</i> | | | | | | |
| nor-NOHA | – | 30.18 | – | 29.88 | 5.67 | –0.99 |
| nor-NOHA | – | 301.8 | – | 325.9 | 3.70 | 8.00 |
| nor-NOHA | – | 1509 | – | 1522 | 0.19 | 0.85 |
| ARG | 122.4 | 15.05 | 15.43 | 14.55 | 9.81 | –3.32 |
| ARG | 122.4 | 150.5 | 136.8 | 135.9 | 5.06 | –9.70 |
| ARG | 122.4 | 752.3 | 759.2 | 758.3 | 1.43 | 0.80 |
| <i>LLOQ n = 7</i> | | | | | | |
| nor-NOHA | – | 5.03 | – | 5.56 | 12.35 | 10.54 |
| ARG | 122.4 | 5.02 | – | 5.49 | 15.86 | 9.44 |
| <i>Recovery n = 5</i> | | | | | | |
| nor-NOHA | – | 30.18 | – | 29.40 | 97.4 \pm 3.7 | |
| nor-NOHA | – | 301.8 | – | 309.0 | 102.4 \pm 2.5 | |
| nor-NOHA | – | 1509 | – | 1396 | 92.5 \pm 4.8 | |
| ARG | 122.4 | 15.05 | 136.3 | 13.84 | 91.98 \pm 2.6 | |
| ARG | 122.4 | 150.5 | 261.8 | 139.4 | 92.64 \pm 3.4 | |
| ARG | 122.4 | 752.3 | 888.6 | 766.1 | 101.84 \pm 2.9 | |
| NMEA | – | 103.1 | – | 90.62 | 87.90 \pm 3.26 | |
| NMEA | – | 206.2 | – | 177.8 | 86.24 \pm 3.22 | |
| NMEA | – | 412.4 | – | 363.0 | 88.02 \pm 2.50 | |

Table 3
Stability of nor-NOHA and ARG in rat plasma. Mean unspiked plasma (a), spike added (b), mean spiked plasma (c), and spike found (d).

| Analyte | Matrix | Time | Temp. | a ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | b ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | c ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | d ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | RSD (%) | RE (%) |
|--|-------------|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------|--------|
| Short term stability ($n=5$) | | | | | | | | | |
| nor-NOHA | Plasma | 1 h | 25 °C | – | 30.18 | – | 29.12 | 4.07 | –3.51 |
| ARG | Plasma | 1 h | 25 °C | 104.2 | 15.05 | 118.4 | 14.20 | 2.95 | –5.65 |
| nor-NOHA | – | 0h ^a | – | – | 301.8 | – | 291.0 | 3.08 | –3.57 |
| nor-NOHA | Plasma | 1 h | 4 °C | – | 301.8 | – | 319.9 | 0.54 | 6.01 |
| nor-NOHA | Plasma | 1 h | 25 °C | – | 301.8 | – | 304.6 | 2.57 | 0.91 |
| nor-NOHA | Plasma | 2 h | 4 °C | – | 301.8 | – | 243.2 | 6.81 | –19.42 |
| nor-NOHA | Plasma | 2 h | 25 °C | – | 301.8 | – | 226.4 | 3.28 | –24.99 |
| nor-NOHA | Whole blood | 1 h | 4 °C | – | 301.8 | – | 308.8 | 1.06 | 2.31 |
| nor-NOHA | Whole blood | 1 h | 25 °C | – | 301.8 | – | 307.8 | 1.01 | 1.98 |
| nor-NOHA | Whole blood | 2 h | 4 °C | – | 301.8 | – | 250.3 | 4.88 | –17.07 |
| nor-NOHA | Whole blood | 2 h | 25 °C | – | 301.8 | – | 241.1 | 4.04 | –20.11 |
| ARG | – | 0h ^a | – | 104.2 | 150.5 | 256.0 | 151.8 | 2.93 | 0.84 |
| ARG | Plasma | 1 h | 4 °C | 104.2 | 150.5 | 254.3 | 150.1 | 0.39 | –0.30 |
| ARG | Plasma | 1 h | 25 °C | 104.2 | 150.5 | 251.7 | 147.5 | 0.55 | –1.98 |
| ARG | Plasma | 2 h | 4 °C | 104.2 | 150.5 | 260.4 | 156.2 | 0.07 | 3.77 |
| ARG | Plasma | 2 h | 25 °C | 104.2 | 150.5 | 260.2 | 156.0 | 0.87 | 3.67 |
| ARG | Whole blood | 1 h | 4 °C | 104.2 | 150.5 | 249.5 | 145.3 | 1.22 | –3.48 |
| ARG | Whole blood | 1 h | 25 °C | 104.2 | 150.5 | 248.9 | 144.7 | 0.53 | –3.86 |
| ARG | Whole blood | 2 h | 4 °C | 104.2 | 150.5 | 257.5 | 153.3 | 0.59 | 1.85 |
| ARG | Whole blood | 2 h | 25 °C | 104.2 | 150.5 | 248.4 | 144.2 | 0.93 | –4.17 |
| Stability in the autosampler ($n=5$) | | | | | | | | | |
| nor-NOHA | – | 24 h | 7 °C | – | 30.18 | – | 28.23 | 5.47 | –6.47 |
| nor-NOHA | – | 24 h | 7 °C | – | 1509 | – | 1517 | 0.55 | 0.53 |
| ARG | – | 24 h | 7 °C | 122.4 | 15.05 | 136.1 | 13.72 | 4.45 | –8.81 |
| ARG | – | 24 h | 7 °C | 122.4 | 752.3 | 1518 | 765.9 | 0.14 | 1.81 |
| Freeze–thaw stability (3 cycles, -80 °C to 25 °C , $n=5$) | | | | | | | | | |
| nor-NOHA | 1 cycle | – | – | – | 30.18 | – | 29.70 | 2.37 | –1.59 |
| nor-NOHA | 1 cycle | – | – | – | 1509 | – | 1440 | 4.14 | –4.57 |
| nor-NOHA | 2 cycle | – | – | – | 30.18 | – | 29.10 | 2.10 | –3.58 |
| nor-NOHA | 2 cycle | – | – | – | 1509 | – | 1254 | 5.85 | –16.91 |
| nor-NOHA | 3 cycle | – | – | – | 30.18 | – | 31.8 | 2.91 | 5.37 |
| nor-NOHA | 3 cycle | – | – | – | 1509 | – | 1395 | 0.94 | –7.55 |
| ARG | 1 cycle | – | – | 122.4 | 15.05 | 137.41 | 15.00 | 1.74 | –0.33 |
| ARG | 1 cycle | – | – | 122.4 | 752.3 | 856.91 | 734.5 | 1.49 | –2.37 |
| ARG | 2 cycle | – | – | 122.4 | 15.05 | 137.91 | 15.50 | 1.41 | 2.99 |
| ARG | 2 cycle | – | – | 122.4 | 752.3 | 837.51 | 715.1 | 0.97 | –4.94 |
| ARG | 3 cycle | – | – | 122.4 | 15.05 | 138.01 | 15.60 | 0.99 | 3.65 |
| ARG | 3 cycle | – | – | 122.4 | 752.3 | 822.31 | 699.9 | 0.25 | –6.97 |
| Long term stability ($n=5$) | | | | | | | | | |
| nor-NOHA | – | 4 weeks | -80 °C | – | 30.18 | – | 28.641 | 1.85 | –5.10 |
| nor-NOHA | – | 4 weeks | -80 °C | – | 1509 | – | 1460 | 2.95 | –3.25 |
| ARG | – | 4 weeks | -80 °C | 122.4 | 15.05 | 136.51 | 14.097 | 1.18 | –6.33 |
| ARG | – | 4 weeks | -80 °C | 122.4 | 752.3 | 805.42 | 683.01 | 3.24 | –9.21 |

^a Immediately processed sample.

3.4.4. Recovery

Extraction recoveries of nor-NOHA, ARG and NMEA from rat plasma are shown in Table 2. For all compounds under study, the extraction recoveries were high, reproducible and consistent over the tested concentration range.

3.4.5. Stability

Detailed data are presented in Table 3. The samples of rat plasma containing nor-NOHA and ARG were found to be stable at least for 30 days in a freezer at -80 °C . The stability of nor-NOHA in the plasma at higher temperatures is limited: the concentration decreases of 25% (at 25 °C) and 19% (at 4 °C) occurred after 2 h of standing. In whole blood, similar decreases of nor-NOHA concentration were observed after 2 h: 20% at 25 °C and 17% at 4 °C . Throughout the study samples of whole blood and plasma were, therefore, processed within 1 h of thawing or collection. Freeze–thaw stability was also lower for nor-NOHA. A significant concentration decrease was found after the second freeze–thaw cycle (Table 3). Post-processing stability in the autosampler was sufficient for at least 24 h if the samples were held at 7 °C (Table 3), giving the possibility to analyze large batches (up to 110 samples per day).

Interesting phenomenon of nor-NOHA instability was observed after repeated injections of the same sample from a single vial. A

continuous decrease in the concentration down to 83% of the initial value was detected after 20 injections. This phenomenon was not observed if the same sample was injected once from each of 20 different vials. It was assumed that the effect was caused by nor-NOHA decomposition or adsorption with the metal of the injector needle. In order to verify this assumption, the aliquots of the same sample (QC1) were transferred into two vials and serial injections ($n=20$) were carried out from the first vial and, afterwards, from the second one. Interestingly, two overlapping curves starting at 100% of the initial nor-NOHA concentration were obtained. Thus, prolonged contact of nor-NOHA-containing samples with metal surfaces has to be avoided. This kind of behavior was not observed for ARG and NMEA (IS).

3.5. Application of the method to a pilot pharmacokinetic experiment

The validated HPLC method was found to be suitable for nor-NOHA quantification in the samples of rat plasma collected from Wistar rats ($n=5$) after a single dose *i.v.* administration of 10 mg kg^{-1} nor-NOHA. The plasma profiles of nor-NOHA observed are shown in Fig. 4a. As mentioned in Section 2.9, the peak of an unknown compound, which was later identified as nor-ARG, was found in the OPA-derivatized extracts of the plasma collected

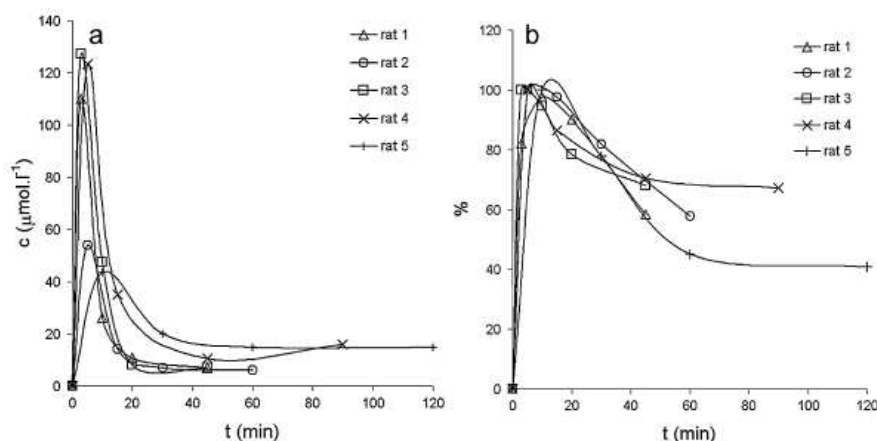


Fig. 4. Mean plasma concentration–time profiles of nor-NOHA (a) and nor-ARG in relative units (b) after an i.v. bolus of 10 mg kg^{-1} nor-NOHA to five Wistar rats.

during the pharmacokinetic experiment. As the authentic standard of nor-ARG of quality suitable for precise weighting was not available, the relative concentrations of nor-ARG are expressed in percent of the maximum observed concentration set to 100% (Fig. 4b). Plasmatic concentrations of the ARG were in the range of $81\text{--}226 \mu\text{mol l}^{-1}$.

3.6. LC-MS identification of the unknown metabolite

All measured chromatograms of the plasma and blood extracts spiked with nor-NOHA and ARG were inspected for the peak of the metabolite at $t_R = 7.0 \text{ min}$. This peak was not found in any chromatogram providing the evidence that the compound is not

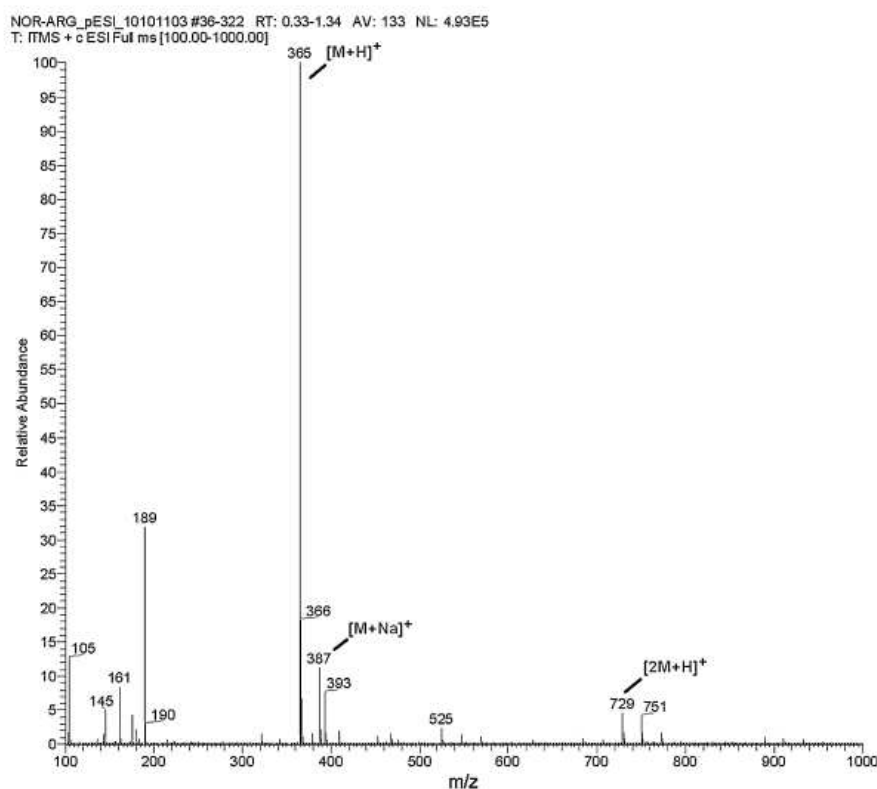


Fig. 5. Full scan MS spectra acquired during a continual infusion of *N*-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine (1 mmol l^{-1}) to the mobile phase (A:B, 70:30, v/v). Parent mass $[M+H]^+$ at m/z 365, sodium adduct $[M+Na]^+$ at m/z 387 and dimer $[2M+H]^+$ at m/z 729. Peak at m/z 189 belongs to background contamination.

Table 4

Mass spectrometric data and retention times for an unknown metabolite and nor-ARG authentic standard. Rat plasma after 10 mg kg⁻¹ nor-NOHA *i.v.* bolus (a), nor-ARG authentic standard prepared in blank rat plasma (b), a continual infusion of 8 μl min⁻¹ nor-ARG (1 mmol l⁻¹) to the flow of the mobile phase consisting of water (pH = 3.00 adjusted with HCOOH) and methanol (70:30, v/v) (c).

| | Compound | <i>t</i> _R ^a (min) | [M+H] ⁺ (<i>m/z</i>) | MS ² (<i>m/z</i>) | MS ³ (<i>m/z</i>) | MS ⁴ (<i>m/z</i>) |
|-----|-------------------------|--|-----------------------------------|---|---|---|
| (a) | Unknown | 7.15 | 365 | [365 → 321] [365 → 259] [365 → 215] | [365 → 259 → 217] – – | – – – |
| (b) | nor- <i>L</i> -Arginine | 7.12 | 365 | [365 → 321] [365 → 259] [365 → 215] | [365 → 259 → 217] – – | – – – |
| (c) | nor- <i>L</i> -Arginine | – | 365 | [365 → 321] [365 → 259] [365 → 215] | [365 → 321 → 215] [365 → 259 → 217] [365 → 215 → 173] | [365 → 259 → 217 → 160] [365 → 215 → 173 → 145] – |

^a Valid for Agilent 1200 Series liquid chromatograph connected to Thermo LCQ Fleet mass detector.

emerging artificially, i.e. during sample processing. Instead, its formation occurred *in vivo*, after nor-NOHA administration to rats. For the purpose of metabolite identification, LC–MS analysis of the biological sample was carried out in the ESI positive mode, with detector settings according to Section 2.9. MS¹ spectra were measured during chromatographic separations over the *m/z* ranges of 100–1000. For this purpose, plasma was prepared and processed from whole blood withdrawn at 5 min after *i.v.* administration of 10 mg kg⁻¹ nor-NOHA. A full scan TIC profile was inspected for the peaks of nor-NOHA, the metabolite and ARG OPA derivatives. Expected masses derived from theoretical structure were found: nor-NOHA-OPA (*m/z* 381) and ARG OPA (*m/z* 379). Mass of the unknown metabolite was found at *m/z* 365. In the second stage, MSⁿ from the parent mass *m/z* 365 were carried out during the chromatography. The MS² product ion mass spectra showed predominant peaks at *m/z* 321, 259 and most intensive peak at *m/z* 215. MS³ product ion spectra from the mass *m/z* 215 showed only one peak at *m/z* 173 (Table 4). Based on the measured mass of the metabolite-OPA derivative, its fragmentation behavior and, the well-known reaction mechanism of the derivatization reaction [33,36], we propose that the unknown compound matches nor-*L*-arginine (Fig. 1b). As the next step, an authentic standard of nor-ARG was used to spike rat plasma. After sample processing and derivatization with OPA, the derivative was characterized by its retention time under the given chromatographic conditions and by MS and MSⁿ data (Table 4). Parent mass [M+H]⁺ at *m/z* 365 with sodium adduct [M+Na]⁺ at *m/z* 387 and dimer [2M+H]⁺ at *m/z* 729 were observed.

Mass spectra from MS¹ (Fig. 5) to the MS⁴ were measured during an infusion of the nor-ARG OPA derivative (1 mmol l⁻¹ in ultra-pure water) at a volume rate of 8 μl min⁻¹ to the mobile phase flowing at a rate of 0.85 ml min⁻¹ with the following composition: 70:30, solvent A:solvent B (v/v). Detector settings are listed in Section 2.9. Measured data presented in Table 4 clearly demonstrate that the unknown compound found in rat plasma after nor-NOHA administration is nor-*L*-arginine.

4. Conclusion

In this study, the development and validation of a chromatographic method for the determination of arginase inhibitor nor-NOHA in rat plasma was described for the first time. The method enables simultaneous quantification of ARG. Effective baseline separation of the analytes was achieved. Other advantages of the method include short runtime and compatibility with both fluorimetric and mass-spectrometric detectors. On-line derivatization with OPA performed in the autosampler as a part of the injection sequence was beneficial for two reasons: a negative influence of post-processing instability of the OPA derivatives was avoided and a less laborious sample preparation was achieved. The method

was also used in the LC–MS mode for determination of a putative metabolite of nor-NOHA, identified as nor-ARG. A room for improvement is seen in the use of small 4 μl detection flow cell instead of standard 8 μl cell for even better resolution and also downscaling of the sample volume, inasmuch as the injected volume is less than 1% of the sample volume available after SPE extraction.

Acknowledgement

Study was supported with grant of Ministry of Education; grant number MSM 0021620820.

References

- [1] H. Maarsingh, T. Pera, H. Meurs, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 378 (2008) 171.
- [2] C.R. Morris, S.M. Morris Jr., W. Hagar, J. Van Warmerdam, S. Claster, D. Kepka-Lenhart, L. Machado, F.A. Kuypers, E.P. Vichinsky, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 168 (2003) 63.
- [3] T.W. Hein, C. Zhang, W. Wang, C.I. Chang, N. Thengchaisri, L. Kuo, FASEB J. 17 (2003) 2328.
- [4] M.J. Romero, D.H. Platt, H.E. Tawfik, M. Labazi, A.B. El-Remessy, M. Bartoli, R.B. Caldwell, R.W. Caldwell, Circ. Res. 102 (2008) 95.
- [5] S. Ryoo, G. Gupta, A. Benjo, H.K. Lim, A. Camara, G. Sikka, J. Sohi, L. Santhanam, K. Soucy, E. Tудay, E. Baraban, M. Ilies, G. Gerstenblith, D. Nyhan, A. Shoukas, D.W. Christianson, N.J. Alp, H.C. Champion, D. Huso, D.E. Berkowitz, Circ. Res. 102 (2008) 923.
- [6] T. Bagnost, A. Berthelot, M. Bouhaddi, P. Laurant, C. Andre, Y. Guillaume, C. Demougeot, J. Hypertens. 26 (2008) 1110.
- [7] H. Maarsingh, A.B. Zuidhof, I.S. Bos, M. van Duin, J.L. Boucher, J. Zaagsma, H. Meurs, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 178 (2008) 565.
- [8] H. Maarsingh, B.G. Dekkers, A.B. Zuidhof, I.S. Bos, M.H. Menzen, T. Klein, G. Flik, J. Zaagsma, H. Meurs, Eur. Respir. J. 38 (2011) 318.
- [9] N. Zimmermann, N.E. King, J. Laporte, M. Yang, A. Mishra, S.M. Pope, E.E. Muntel, D.P. Witte, A.A. Pegg, P.S. Foster, Q. Hamid, M.E. Rothenberg, J. Clin. Invest. 111 (2003) 1863.
- [10] C.R. Morris, M. Poljakovic, L. Lavriša, L. Machado, F.A. Kuypers, S.M. Morris, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170 (2004) 148.
- [11] A. Lara, S.B. Khatri, Z. Wang, S.A.A. Comhair, W. Xu, R.A. Dweik, M. Bodine, B.S. Levison, J. Hammel, E. Bleecker, W. Busse, W.J. Calhoun, M. Castro, K.F. Chung, D. Curran-Everett, B. Gaston, E. Israel, N. Jarjour, W. Moore, S.P. Peters, W.G. Teague, S. Wenzel, S.L. Hazen, S.C. Erzurum, N.H.L.B.I. Sever, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 178 (2008) 673.
- [12] J.P. Tenu, M. Lepoivre, C. Moali, M. Broilo, D. Mansuy, J.L. Boucher, Nitric Oxide-Biol. Ch. 3 (1999) 427.
- [13] G. Jeyabalan, J.R. Klune, A. Nakao, N. Martik, G. Wu, A. Tsung, D.A. Geller, Nitric Oxide-Biol. Ch. 19 (2008) 29.
- [14] K.M. Reid, A. Tsung, T. Kaizu, G. Jeyabalan, A. Ikeda, L. Shao, G. Wu, N. Murase, D.A. Geller, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292 (2007) G512.
- [15] P. Beranova, K. Chalupsky, A.L. Kleschyov, C. Schott, J.L. Boucher, D. Mansuy, T. Munzel, B. Muller, J.C. Stoclet, Eur. J. Pharmacol. 516 (2005) 260.
- [16] P. Markowski, I. Baranowska, J. Baranowski, Anal. Chim. Acta 605 (2007) 205.
- [17] H.M. Mao, W. Wei, W.J. Xiong, Y. Lu, B.G. Chen, Z. Liu, Clin. Biochem. 43 (2010) 1141.
- [18] W.Z. Zhang, D.M. Kaye, Anal. Biochem. 326 (2004) 87.
- [19] C.E. Jones, C.J. Darcy, T. Woodberry, N.M. Anstey, Y.R. McNeil, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 878 (2010) 8.
- [20] E.G. Karageorgou, V.F. Samanidou, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1893.
- [21] P. Marhol, R. Gazak, P. Bednar, V. Kren, J. Sep. Sci. 34 (2011) 2206.

- [22] V. Jimenez, R. Companyo, J. Guiteras, *Talanta* 55 (2011) 596.
- [23] V.F. Samanidou, E.G. Karageorgou, *Drug Test Anal.* 3 (2011) 234.
- [24] C.F. Clavijo, K.L. Hoffman, J.J. Thomas, B. Carvalho, L.F. Chu, D.R. Drover, G.B. Hammer, U. Christians, J.L. Galinkin, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 715.
- [25] L.J. Cai, J. Zhang, X.M. Wang, R.H. Zhu, J. Yang, Q.Z. Zhang, W.X. Peng, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 1308.
- [26] F. Gritti, C.A. Sanchez, T. Farkas, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3000.
- [27] F. Gritti, I. Leonardis, D. Shock, P. Stevenson, A. Shalliker, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1589.
- [28] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1604.
- [29] A. Fanigliulo, D. Cabooter, G. Bellazzi, D. Tramarin, B. Allieri, A. Rottigni, G. Desmet, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3655.
- [30] S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 482.
- [31] S. Fekete, J. Fekete, *Talanta* 84 (2011) 416.
- [32] J.O. Omamogho, J.D. Glennon, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1547.
- [33] M. Roth, *Anal. Chem.* 43 (1971) 880.
- [34] I. Molnar-Perl, I. Bozor, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 37.
- [35] D. Kutlan, P. Presits, I. Molnar-Perl, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 235.
- [36] Y. Mengerink, D. Kutlan, F. Toth, A. Csampai, I. Molnar-Perl, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 99.
- [37] I. Molnar-Perl, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1241.
- [38] I. Molnar-Perl, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 283.
- [39] T. Teerlink, R.J. Nijveldt, S. de Jong, P.A. van Leeuwen, *Anal. Biochem.* 303 (2002) 131.
- [40] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.
- [41] Agilent Technologies Inc., <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2180-90024_spectra_ebook.pdf> (accessed 09/2011).
- [42] Agilent Technologies, Inc., <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-8647EN.pdf>> (accessed 09/2011).
- [43] S. Bansal, A. DeStefano, *AAPS J.* 9 (2007) E109.
- [44] T. Teerlink, P.A. van Leeuwen, A. Houdijk, *Clin. Chem.* 40 (1994) 245.
- [45] H. Godel, T. Graser, P. Foldi, P. Pfaender, P. Furst, *J. Chromatogr.* 297 (1984) 49.
- [46] Waters Corporation, <<http://www.younglin.com/brochure.pdf/waters/MCXbr98.pdf>> (accessed 09/2011).
- [47] P. Vetrovsky, J.C. Stoclet, G. Entlicher, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28 (1996) 1311.

4. Závěr

Přístup k vývoji chromatografických bioanalytických metod se řídí zcela specifickými pravidly, částečně odlišnými od klasické farmaceutické analýzy, či analýzy vzorků životního prostředí. Je to dáno zejména komplexností biologické matrice a její náchylnosti ke snadné degradaci. Stanovované látky jako farmaka, jejich metabolity, či endogenní organismu vlastní látky často obsahují ve své molekule funkční skupiny, vazby, či strukturní motivy, které snadno ve vzorku podléhají degradačním reakcím, čímž dochází jak ke kvalitativním, tak i kvantitativním změnám v zastoupení sledovaného analytu/ů. Pro získání relevantních dat ať už v základním výzkumu, či při využití metod v klinické praxi je z tohoto důvodu zcela nezbytné věnovat náležitou pozornost nejenom vývoji citlivé, selektivní a robustní chromatografické metody, ale i metodě odběru, skladování a úpravy vzorku před analýzou. Jistá specifika bioanalýzy vyplývají i ze skutečnosti, že mnoho farmak využívaných v terapii je odvozeno od endogenních tělu vlastních látek, což může v některých případech představovat komplikaci při vývoji metody z hlediska její selektivity.

První diskutovaná práce se zabývá stanovením cytostatika 5-fluorouracilu a jeho metabolitu, 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu. Klíčem k úspěchu při zavádění této metody bylo nalezení vhodného typu reverzní stacionární fáze, pro separaci halogenovaných derivátů odvozených od pyrimidinu. Jednalo se o jejich separaci mezi sebou navzájem a oddělení od endogenních interferencí, zejména se zřetelem na endogenní nukleobáze uracil a dihydrouracil, vzhledem k jejich vzájemné strukturní podobnosti. Separace na reverzní fázi byla navíc ztížena vysokou polaritou 5-fluorouracilu a 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu.

Nejobtížnějším úkolem však bylo nalezení vhodného typu SPE sorbentu pro dostatečné přečištění plasmy v níž stanovení probíhalo. Vysoká kvalita úpravy vzorku byla nutná vzhledem k využití UV/VIS detekce v krátkovlnné oblasti okolo 210 nm a požadovaném nízkém LLOQ.

Pro separaci bylo zkoušeno několik chemicky vázaných stacionárních fází a typů sorbentů různých výrobců. Jako optimální byla shledána fáze s pentafluorofenylovou modifikací. Kolona s pentafluorofenylovou náplní byla zvolena záměrně vzhledem k odlišné selektivitě v porovnání s oktadecylovou fází.

Pentafluorofenylová modifikace stacionární fáze nebyla ještě donedávna příliš masivně v laboratořích užívána přesto, že je již řadu let k dispozici. Nicméně vzhledem ke svým unikátním vlastnostem pro určité typy separací lze pozorovat rostoucí trend v jejím používání. Testovány byly jak klasické plně porézní sorbenty, tak kolony s „*core-shell*“ technologií. Jak se však ukázalo, v kvalitě stacionárních fází různých výrobců jsou diametrální rozdíly. Testováním se prokázalo, že technologie moderních kolon s „*core-shell*“ sorbenty na konvenčních chromatografických systémech s limitem tlaku 40 MPa má své limity použitelnosti a pro některé typy separací ještě nedospěla do stádia, aby bylo možné analyzovat velmi komplikované vzorky bez selektivní detekce jakou je např. hmotnostní spektrometrie.

Z našeho pohledu je limitem zavedené metody čas analýzy jednoho vzorku, který se včetně ekvilibrace kolony pohybuje okolo 22 minut. Pokud by nebyl kladen požadavek na stanovení všech uvedených metabolitů, z nichž některé se při nízkých dávkách užívaných ve studii v plasmě neobjevily, ale pouze hlavního metabolitu 5-fluoro-5,6-dihydrouracilu a 5-fluorouracilu, bylo by možné čas analýzy zkrátit až na polovinu. Metoda také vyžaduje velmi precizní přípravu vzorku, všech používaných činidel a mobilní fáze vzhledem k minimalizaci potenciálních interferencí během chromatografie, jejichž výskyt je silně závislý jak na změnách pH mobilní fáze, tak i na změně pH činidel používaných při přípravě vzorku. Hlavní cestou potencionální úpravy metody bude pravděpodobně další zlepšení přípravy vzorku před analýzou, případně hledání nových stacionárních fází, které budou vhodné k separaci látek s velmi velkým rozsahem polarity.

Další diskutovaná práce se zabývá stanovením polyglutamátů metotrexátu v erythrocytech. Pro vývoj chromatografické metody byla zvolena kolona s oktadecylovou modifikací a hybridní technologií stacionární fáze (*Kap. 1.8.2*). V době vývoje metody byly hybridní fáze relativní novinkou a pro naše účely byla kolona vybrána zejména s ohledem na její velmi dobrou životnost. Separace sice neprobíhá v extrémní oblasti pH, nicméně je využívána mobilní fáze s obsahem peroxidu vodíku a vysokou koncentrací vody. V tomto prostředí kolona vyniká výbornou dlouhodobou stabilitou a reprodukovatelností retenčních časů. Z hlediska současného vývoje lze konstatovat, že limitem metody vzhledem k počtu stanovovaných látek je čas analýzy, který činí cca 12 minut. S použitím technologií dostupných v dnešní době, jako jsou např. „*core-shell*“ sorbenty by pravděpodobně bylo možné docílit výrazného snížení této doby a dosáhnout vyšší propustnosti metody a úspory rozpouštědel na konvenčních chromatografech jaké jsou užívány i v naší laboratoři.

Poslední práce podrobněji diskutována v tomto textu je metoda pro stanovení N-(ω)-hydroxy-nor-L-argininu (nor-NOHA). Tato látka má velký terapeutický potenciál pro léčbu některých závažných patologických stavů, mezi něž můžeme zařadit např. astma, diabetes, hypertenzi nebo aterosklerózu. Pro vývoji metody byla zvolena moderní stacionární fáze na bázi „*core-shell*“ sorbentu. Jak bylo zmíněno již v komentáři k metodě, hlavním důvodem vývoje byla nutnost zjištění základních farmakokinetických parametrů při pilotních experimentech na laboratorních zvířatech, vzhledem k absenci jakýchkoliv kinetických dat pro tuto látku.

Dále byl identifikován produkt biotransformace nor-NOHA, který byl určen jako nor-L-arginin, vznikající eliminací hydroxylové skupiny z molekuly nor-NOHA. Ve spolupráci s Ing. Robertem Jirásko, Ph.D. z katedry Analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, bylo na základě námi dodaných podkladů navrženo pravděpodobné fragmentační schéma se strukturami fragmentů při MS² – MS³.

Prostor pro zlepšení této metody leží zejména v oblasti úpravy vzorku, konkrétně zmenšení měřítka. V současné době je pro úpravu bráno 200 μ l vzorku plasmy, avšak pro samotný nástřik na kolonu je zapotřebí pouze 1.5 μ l výsledného přečištěného extraktu. Zmenšení objemu vzorku v případě studií na malých laboratorních zvířatech jakými jsou např. potkani, by mělo velký význam z hlediska možnosti zvýšení četnosti vzorkování během *in-vivo* experimentu, bez nežádoucích efektů vyplývajících z odběrů relativně velkého objemu krve z krevního oběhu potkana.

V úvahu přichází například využití SPE v 96-jamkovém uspořádání, které nejenže přináší snížení spotřeby vzorku a činidel, ale navíc zrychluje přípravu vzorku. Tento postup nebyl prozatím testován vzhledem k tomu, že naše laboratoř není na technologii 96-jamkového uspořádání vybavena (SPE manifold, autosampler). Určitého zlepšení ve smyslu rozlišení píků by bylo možné také docílit zmenšením detekční cely fluorescenčního detektoru ze standardního objemu 8 μ l na 4 μ l. Nicméně práce je určena k využití na konvenčním nemodifikovaném chromatografickém systému a dokladuje možnosti technologie „*core shell*“ sorbentů na běžně dostupných přístrojích, které jsou k dispozici v mnoha laboratořích. V tomto smyslu je nutno podotknout, že ani při zlepšení rozlišení použitím menší cely by nebylo možné dosáhnout výrazně kratšího času analýzy, vzhledem k tlakovému limitu našeho chromatografického systému (40 MPa) při zvýšení průtoku.

5. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Ing. Miloš Hroch

Konzultant: Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Název rigorózní práce: Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení endogenních a exogenních látek pro transportní a metabolické studie

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem a validací chromatografických metod v bioanalýze léčiv a jejich metabolitů. Práce přináší v teoretické části seznámení se základy problematiky bioanalýzy s využitím kapalinové chromatografie. Zvláštní zřetel je kladen na novější trendy, zejména v oblasti stacionárních fází. V praktické části je čtenář podrobněji seznámen s vývojem a validací několika bioanalytických metod s využitím vysokoučinné kapalinové chromatografie.

První metoda se týká stanovení 5-fluorouracilu a jeho metabolitů. Využito je separace na koloně Luna PFP(2) s gradientovou elucí a UV/VIS detekcí. Diskutována jsou zejména specifika stanovení těchto velmi polárních špatně detekovatelných látek. Vyvinutá a validovaná metoda je používána pro TDM onkologických pacientů léčených s karcinomem rekta.

Další diskutovaná metoda se zabývá stanovením polyglutamátů metotrexátu v erythrocytech s využitím isokratické eluce na hybridní koloně Gemini C18 a fluorescenční detekcí po post-kolonové derivatizaci/fotooxidaci analytu. Vyvinutá a validovaná metoda je používána pro TDM pacientů léčených s vybranými autoimunitními poruchami.

Poslední metodou diskutovanou v této disertační práci je metoda stanovení selektivního inhibitoru argináz, N-(ω)-hydroxy-nor-L-argininu (nor-NOHA), v potkaní plasmě. Pro separaci byla použita kolona Kinetex C18 s moderní technologií „*core-shell*“ sorbentů. Využito je gradientové eluce s fluorescenční detekcí po on-line derivatizaci látky o-ftalaldehydem. Pomocí metody LC/MS/MS byl rovněž identifikován produkt biotransformace nor-NOHA, nor-L-arginin. Metoda byla využita k pilotnímu farmakokinetickému experimentu na potkanech, vzhledem k absenci kinetických údajů v literatuře.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Ing. Miloš Hroch

Consultant: Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Title of thesis: Development and validation of HPLC methods for transport and metabolic studies

The presented PhD thesis deals with the development and validation of chromatographic methods in bioanalysis of drugs and their metabolites. The work provides a theoretical introduction to the field of bioanalysis, using methods of liquid chromatography. Attention was paid to recent trends in the area, particularly with respect to the new types of stationary phases. In the experimental part of the thesis, reader is introduced to a development and validation of several bio-analytical methods using high performance liquid chromatography.

The first method concerns with a determination of 5-fluorouracil and its metabolites by HPLC with gradient elution and UV/VIS detection on a column Luna PFP (2). Discussed are mainly specifics for the assay of this group of polar and poorly detectable compounds. The developed and validated method is being used for TDM of patients with rectal cancer.

Another discussed method deals with a determination of methotrexate polyglutamates in erythrocytes using isocratic elution on a hybrid column Gemini C18 and fluorescence detection after post-column derivatization/photo-oxidation of the analyte. The developed and validated method is used for TDM of patients who suffer from certain autoimmune diseases.

The last method discussed in the thesis is a method for an assay of a selective arginase inhibitor, N-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine in rat plasma. For the separation was used Kinetex C18 column with core-shell technology. Gradient elution and fluorescence detection is used after on-line derivatization of substances with o-phthaldialdehyde. Biotransformation product of N-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine was identified as nor-L-arginine by means of LC/MS/MS. The method was used for pilot pharmacokinetic experiment in rats, due to the absence of data about kinetics of this compound in the literature.

6. Přehled použité literatury

- [1] S. Ahuja, S. Scypinski, Handbook of modern pharmaceutical analysis, Academic Press, San Diego, CA, 2001.
- [2] S. Ahuja, M. W. Dong, Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Elsevier Academic Press, 2005.
- [3] G. Evans, A handbook of bioanalysis and drug metabolism, CRC Press, Boca Raton, 2004.
- [4] R. F. Venn, Principles and practice of bioanalysis, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [5] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, P. K. Moore, Pharmacology, 5 ed., Churchill Livingstone, 2003.
- [6] P. L. Bonate, D. Howard, Pharmacokinetics in drug development : clinical study design and analysis, AAPS Press, Arlington, VA, 2004.
- [7] P. L. Bonate, D. Howard, Pharmacokinetics in drug development / regulatory and developmental paradigms, AAPS Press, Arlington, VA, 2004.
- [8] P. Bonate, Pharmacokinetics in drug development, Springer, New York, 2011.
- [9] D. Hauschke, V. Steinijans, I. Pigeot, Bioequivalence studies in drug development : methods and applications, Wiley, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
- [10] S. H. Y. Wong, I. Sunshine, Handbook of analytical therapeutic drug monitoring and toxicology, CRC Press, Boca Raton, 1997.
- [11] M. E. Burton, Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics : principles of therapeutic drug monitoring, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2006.
- [12] A. Dasgupta, Handbook of drug monitoring methods : therapeutics and drugs of abuse, Humana; Springer distributor, Totowa, N.J. London, 2008.
- [13] A. Dasgupta, Advances in chromatographic techniques for therapeutic drug monitoring, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2010.
- [14] Q. A. Xu, T. L. Madden, Analytical methods for therapeutic drug monitoring and toxicology, Wiley, Hoboken, N.J., 2011.
- [15] K. H. Yuen, Therapeutic drug monitoring : approaches to individualizing dosage regimens, Penerbit Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, 1995.

- [16] H. Lüllmann, K. Mohr, Farmakologie a toxikologie, Academia, 2004.
- [17] U. D. Neue, HPLC columns : theory, technology, and practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [18] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, second ed., Wiley-Interscience, 1997.
- [19] J. A. Koropchak, C. L. Heenan, L. B. Allen, Direct comparison of evaporative light-scattering and condensation nucleation light-scattering detection for liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 736 (1996) 11-19
- [20] C. S. Young, J. W. Dolan, Success with evaporative light-scattering detection, *Lc Gc N Am*, 21 (2003) 120
- [21] C. S. Young, J. W. Dolan, Success with evaporative light-scattering detection, part II: Tips and techniques, *Lc Gc N Am*, 22 (2004) 244
- [22] S. Almeling, U. Holzgrabe, Use of evaporative light scattering detection for the quality control of drug substances: Influence of different liquid chromatographic and evaporative light scattering detector parameters on the appearance of spike peaks, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2163-2170
- [23] L. B. Allen, J. A. Koropchak, Condensation Nucleation Light-Scattering - a New Approach to Development of High-Sensitivity, Universal Detectors for Separations, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 841-844
- [24] L. B. Allen, J. A. Koropchak, B. Szostek, Condensation Nucleation Light-Scattering Detection for Conventional Reversed-Phase Liquid-Chromatography, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 659-666
- [25] R. W. Dixon, D. S. Peterson, Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 2930-2937
- [26] T. Vehovec, A. Obreza, Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 1549-1556
- [27] B. Zhang, X. Li, B. Yan, Advances in HPLC detection - towards universal detection, *Anal Bioanal Chem*, 390 (2008) 299-301
- [28] R. T. Williams, J. W. Bridges, Fluorescence of Solutions - Review, *J Clin Pathol*, 17 (1964) 371
- [29] R. E. Ardrey, Liquid chromatography-mass spectrometry : an introduction, J. Wiley, New York, 2003.

- [30] B. N. Pramanik, A. K. Ganguly, M. L. Gross, *Applied electrospray mass spectrometry*, Marcel Dekker, New York, 2002.
- [31] K. Wanner, G. Höfner, *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry: Applications in Drug Discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [32] R. Ekman, *Mass spectrometry : instrumentation, interpretation, and applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 2009.
- [33] R. B. Cole, *Electrospray and MALDI mass spectrometry : fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*, 2nd ed., Wiley, Hoboken, N.J., 2010.
- [34] C. C. Chan, M. S. Bolgar, S. A. Miller, A. B. Attygalle, Desorption Ionization by Charge Exchange (DICE) for Sample Analysis under Ambient Conditions by Mass Spectrometry, *J Am Soc Mass Spectr*, 21 (2010) 1554-1560
- [35] S. J. Gaskell, *Electrospray: Principles and practice*, *J Mass Spectrom*, 32 (1997) 677-688
- [36] D. C. Taflin, T. L. Ward, E. J. Davis, Electrified Droplet Fission and the Rayleigh Limit, *Langmuir*, 5 (1989) 376-384
- [37] R. Bonfiglio, R. C. King, T. V. Olah, K. Merkle, The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, *Rapid Commun Mass Sp*, 13 (1999) 1175-1185
- [38] S. Souverain, S. Rudaz, J. L. Veuthey, Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures, *Journal of Chromatography A*, 1058 (2004) 61-66
- [39] P. J. Taylor, Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Clin Biochem*, 38 (2005) 328-334
- [40] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects, *J Chromatogr B*, 877 (2009) 2198-2207
- [41] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M. C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3929-3937
- [42] I. Marchi, V. Viette, F. Badoud, M. Fathi, M. Saugy, S. Rudaz, J. L. Veuthey, Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4071-4078

- [43] D. B. Robb, M. W. Blades, Effects of solvent flow, dopant flow, and lamp current on dopant-assisted atmospheric pressure photoionization (DA-APPI) for LC-MS. Ionization via proton transfer, *J Am Soc Mass Spectr*, 16 (2005) 1275-1290
- [44] L. G. Song, D. S. Cho, D. Bhandari, S. C. Gibson, M. E. McNally, R. M. Hoffman, K. D. Cook, Liquid chromatography/dopant-assisted atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the analysis of non-polar compounds, *Int J Mass Spectrom*, 303 (2011) 173-180
- [45] K. K. Murray, R. K. Boyd, M. N. Eberlin, G. J. Langley, L. Li, Y. Naito, J. C. Tabet, IUPAC standard definitions of terms relating to mass spectrometry, *Abstr Pap Am Chem S*, 229 (2005) U123-U123
- [46] S. C. Habicht, P. Duan, N. R. Vinueza, M. K. Fu, H. I. Kenttamaa, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry utilizing ion-molecule reactions and collision-activated dissociation for the identification of N-oxide drug metabolites, *J Pharmaceut Biomed*, 51 (2010) 805-811
- [47] H. Frauendorf, R. Herzsuh, Application of high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry for identification of carboxylic acids containing several carboxyl groups from aqueous solutions, *Eur Mass Spectrom*, 4 (1998) 269-278
- [48] M. Holcapek, P. Jandera, Interpretation of electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectra of 10-formyl-7,8-dihydrofolic acid and 5-formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroic acid, *Rapid Commun Mass Sp*, 13 (1999) 1423-1426
- [49] M. Thevis, W. Schanzer, Effect of the location of hydrogen abstraction on the fragmentation of diuretics in negative electrospray ionization mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectr*, 14 (2003) 658-670
- [50] Z. Tozuka, H. Kaneko, T. Shiraga, Y. Mitani, M. Beppu, S. Terashita, A. Kawamura, A. Kagayama, Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)(n) fragmentation in an electrospray ion trap, *J Mass Spectrom*, 38 (2003) 793-808
- [51] M. Holcapek, R. Jirasko, M. Lisa, Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3908-3921
- [52] S. L. Zhou, K. D. Cook, Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-way-round or right-way-round?, *J Am Soc Mass Spectr*, 11 (2000) 961-966

- [53] R. E. March, An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry, *J Mass Spectrom*, 32 (1997) 351-369
- [54] D. J. Douglas, A. J. Frank, D. M. Mao, Linear ion traps in mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev*, 24 (2005) 1-29
- [55] W. F. Smyth, P. Brooks, A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science, *Electrophoresis*, 25 (2004) 1413-1446
- [56] E. Stokvis, H. Rosing, J. H. Beijnen, Liquid chromatography-mass spectrometry for the quantitative bioanalysis of anticancer drugs, *Mass Spectrom Rev*, 24 (2005) 887-917
- [57] W. F. Smyth, Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry, *J Chromatogr B*, 824 (2005) 1-20
- [58] W. F. Smyth, V. Rodriguez, Recent studies of the electrospray ionisation behaviour of selected drugs and their application in capillary electrophoresis-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1159 (2007) 159-174
- [59] M. Holcapek, L. Kolarova, M. Nobilis, High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites, *Anal Bioanal Chem*, 391 (2008) 59-78
- [60] A. Roux, D. Lison, C. Junot, J. F. Heilier, Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review, *Clin Biochem*, 44 (2011) 119-135
- [61] H.J. Butt, K. Graf, M. Kappl, *Physics and chemistry of interfaces*, 2nd., rev. and enl. ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [62] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 3rd ed., Academic Press, Burlington, MA, 2011.
- [63] G. B. Cox, The Influence of Silica Structure on Reversed-Phase Retention, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 353-367

- [64] P. Jandera, Correlation of Retention and Selectivity of Separation in Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography with Interaction Indexes and with Lipophilic and Polar Structural Indexes, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 437-467
- [65] L. C. Sander, S. A. Wise, Shape Selectivity in Reversed-Phase Liquid-Chromatography for the Separation of Planar and Nonplanar Solutes, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 335-351
- [66] R. M. Smith, Functional-Group Contributions to the Retention of Analytes in Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 381-415
- [67] N. Tanaka, K. Kimata, K. Hosoya, H. Miyanishi, T. Araki, Stationary-Phase Effects in Reversed-Phase Liquid-Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 265-287
- [68] A. Tchaplá, S. Heron, E. Lesellier, H. Colin, General View of Molecular Interaction Mechanisms in Reversed-Phase Liquid-Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 81-112
- [69] K. Valko, L. R. Snyder, J. L. Glajch, Retention in Reversed-Phase Liquid-Chromatography as a Function of Mobile-Phase Composition, *Journal of Chromatography A*, 656 (1993) 501-520
- [70] G. Guiochon, F. Gritti, Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1099 (2005) 1-42
- [71] G. Guiochon, F. Gritti, Effect of the density of the C-18 surface coverage on the adsorption mechanism of a cationic compound and on the silanol activity of the stationary phase in reversed phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1132 (2006) 51-66
- [72] G. Guiochon, F. Gritti, Heterogeneity of the adsorption mechanism of low molecular weight compounds in reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 5823-5834
- [73] G. Guiochon, F. Gritti, Adsorption mechanisms and effect of temperature in reversed-phase liquid chromatography. Meaning of the classical Van't Hoff plot in chromatography, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 4642-4653

- [74] G. Guiochon, F. Gritti, Adsorption mechanism in reversed-phase liquid chromatography - Effect of the surface coverage of a monomeric C-18-silica stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1115 (2006) 142-163
- [75] J. I. Siepmann, J. L. Rafferty, L. Zhang, M. R. Schure, Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective, *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 6551-6558
- [76] M. R. Euerby, P. Petersson, W. Campbell, W. Roe, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis, *Journal of Chromatography A*, 1154 (2007) 138-151
- [77] C. M. Bell, L. C. Sander, J. C. Fetzer, S. A. Wise, Synthesis and characterization of extended length alkyl stationary phases for liquid chromatography with application to the separation of carotenoid isomers, *Journal of Chromatography A*, 753 (1996) 37-45
- [78] C. M. Bell, L. C. Sander, S. A. Wise, Temperature dependence of carotenoids on C-18, C-30 and C-34 bonded stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 757 (1997) 29-39
- [79] J. J. Pesek, M. T. Matyska, G. B. Dawson, A. Wilsdorf, P. Marc, M. Padki, Cholesterol bonded phase as a separation medium in liquid chromatography - Evaluation of properties and applications, *Journal of Chromatography A*, 986 (2003) 253-262
- [80] M. R. Euerby, A. P. McKeown, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available perfluorinated stationary phases for reversed-phase liquid chromatography using Principal Component Analysis, *J Sep Sci*, 26 (2003) 295-306
- [81] P. Hemstrom, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J Sep Sci*, 29 (2006) 1784-1821
- [82] M. R. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis, *Journal of Chromatography A*, 1088 (2005) 1-15
- [83] S. Eksborg, Lagerstr.Po, R. Modin, G. Schill, Ion-Pair Chromatography of Organic Compounds, *J Chromatogr*, 83 (1973) 99-110

- [84] S. Eksborg, G. Schill, Ion-Pair Partition Chromatography of Organic Ammonium-Compounds, *Analytical Chemistry*, 45 (1973) 2092-2100
- [85] G. Schill, High-Performance Ion-Pair Chromatography, *J Biochem Bioph Meth*, 18 (1989) 249-270
- [86] W. Melander, C. Horvath, *Ion-Pair Chromatography: Theory and Biological and Pharmaceutical Applications*, Marcel Dekker Inc, 1985.
- [87] A. Bartha, J. Stahlberg, Electrostatic Retention Model of Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 668 (1994) 255-284
- [88] P. W. Carr, Y. Mao, Separation of selected basic pharmaceuticals by reversed-phase and ion-exchange chromatography using thermally tuned tandem columns, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 4478-4485
- [89] C. J. Venkatramani, Y. Zelechok, Two-dimensional liquid chromatography with mixed mode stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 1066 (2005) 47-53
- [90] T. Marunouchi, M. Ono, T. Nakajima, Y. Ito, T. Aketo, Simultaneous determination of active ingredients in an ophthalmic solution by isocratic tandem-mode HPLC connected reverse phase column and strong cation exchange column, *J Pharmaceut Biomed*, 40 (2006) 331-337
- [91] M. D. Lantz, D. S. Risley, J. A. Peterson, Simultaneous resolution and detection of a drug substance, impurities, and counter ion using a mixed-mode HPLC column with evaporative light scattering detection, *J Liq Chromatogr R T*, 20 (1997) 1409-1422
- [92] G. Guiochon, P. G. Stevenson, J. N. Fairchild, Retention mechanism divergence of a mixed mode stationary phase for high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1822-1827
- [93] J. T. Eleveld, H. A. Claessens, J. L. Ammerdorffer, A. M. Vanherk, C. A. Cramers, Evaluation of Mixed-Mode Stationary Phases in Liquid-Chromatography for the Separation of Charged and Uncharged Oligomer-Like Model Compounds, *Journal of Chromatography A*, 677 (1994) 211-227
- [94] U. D. Neue, C. H. Phoebe, K. Tran, Y. F. Cheng, Z. L. Lu, Dependence of reversed-phase retention of ionizable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity, *Journal of Chromatography A*, 925 (2001) 49-67
- [95] B. Dejaegher, D. Mangelings, Y. V. Heyden, Method development for HILIC assays, *J Sep Sci*, 31 (2008) 1438-1448
- [96] B. Dejaegher, Y. V. Heyden, HILIC methods in pharmaceutical analysis, *J Sep Sci*, 33 (2010) 698-715

- [97] A. J. Alpert, Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic-Acids and Other Polar Compounds, *J Chromatogr*, 499 (1990) 177-196
- [98] Y. Guo, S. Gaiki, Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1074 (2005) 71-80
- [99] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Anal Chim Acta*, 692 (2011) 1-25
- [100] W. Zhang, Fluorocarbon stationary phases for liquid chromatography applications, *J Fluorine Chem*, 129 (2008) 910-919
- [101] D. S. Bell, A. D. Jones, Solute attributes and molecular interactions contributing to "U-shape" retention on a fluorinated high-performance liquid chromatography stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1073 (2005) 99-109
- [102] A practical Guide to HILIC, A tutorial and application book, SeQuant AB (2006)
- [103] P. Jandera, Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts, *J Sep Sci*, 31 (2008) 1421-1437
- [104] K. Irgum, P. Hemstrom, Hydrophilic interaction chromatography, *J Sep Sci*, 29 (2006) 1784-1821
- [105] W. Y. Jian, R. W. Edom, Y. D. Xu, N. D. Weng, Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis, *J Sep Sci*, 33 (2010) 681-697
- [106] M. A. Strege, Hydrophilic interaction chromatography electrospray mass spectrometry analysis of polar compounds for natural product drug discovery, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 2439-2445
- [107] C. R. Mitchell, Y. Bao, N. J. Benz, S. H. Zhang, Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes, *J Chromatogr B*, 877 (2009) 4133-4139
- [108] H. Small, *Ion chromatography*, Plenum Press, New York, 1989.
- [109] J. Weiss, D. Jensen, Modern stationary phases for ion chromatography, *Anal Bioanal Chem*, 375 (2003) 81-98
- [110] J. J. Kirkland, M. A. Vanstraten, H. A. Claessens, High Ph Mobile-Phase Effects on Silica-Based Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Columns, *Journal of Chromatography A*, 691 (1995) 3-19

- [111] J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. vanStraten, H. A. Claessens, Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 762 (1997) 97-112
- [112] H. A. Claessens, M. A. vanStraten, J. J. Kirkland, Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 728 (1996) 259-270
- [113] Y. F. Cheng, T. H. Walter, Z. L. Lu, P. Iraneta, B. A. Alden, C. Gendreau, U. D. Neue, J. M. Grassi, J. L. Carmody, J. E. O'Gara, R. P. Fisk, Hybrid organic-inorganic particle technology: Breaking through traditional barriers of HPLC separations, *Lc Gc N Am*, 18 (2000) 1162
- [114] K. D. Wyndham, J. E. O'Gara, T. H. Walter, K. H. Glose, N. L. Lawrence, B. A. Alden, G. S. Izzo, C. J. Hudalla, P. C. Iraneta, Characterization and evaluation of C18HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles, *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 6781-6788
- [115] J. E. O'Gara, K. D. Wyndham, Porous hybrid organic-inorganic particles in reversed-phase liquid chromatography, *J Liq Chromatogr R T*, 29 (2006) 1025-1045
- [116] J. Nawrocki, M. P. Rigney, A. McCormick, P. W. Carr, Chemistry of Zirconia and Its Use in Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 657 (1993) 229-282
- [117] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C. V. McNeff, A. McCormick, P. W. Carr, Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *Journal of Chromatography A*, 1028 (2004) 31-62
- [118] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P. W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *Journal of Chromatography A*, 1028 (2004) 1-30
- [119] T. S. Kephart, P. K. Dasgupta, Hot eluent capillary liquid chromatography using zirconia and titania based stationary phases, *Anal Chim Acta*, 414 (2000) 71-78
- [120] R. Kucera, J. Sochor, J. Klimes, J. Dohnal, Use of the zirconia-based stationary phase for separation of ibuprofen and its impurities, *J Pharmaceut Biomed*, 38 (2005) 609-618
- [121] V. Zizkovsky, R. Kucera, J. Klimes, Potential employment of non-silica-based stationary phases in pharmaceutical analysis, *J Pharmaceut Biomed*, 44 (2007) 1048-1055

- [122] V. Zizkovsky, R. Kucera, J. Klimes, J. Dohnal, Titania-based stationary phase in separation of ondansetron and its related compounds, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 83-91
- [123] R. Kalafut, R. Kucera, J. Klimes, J. Sochor, An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase, *J Pharmaceut Biomed*, 49 (2009) 1150-1156
- [124] C. J. Dunlap, C. V. McNeff, D. Stoll, P. W. Carr, Zirconia stationary phases for extreme separations, *Anal Chem*, 73 (2001) 598A-607A
- [125] T. Teutenberg, J. Tuerk, M. Hozhauser, S. Giegold, Temperature stability of reversed phase and normal phase stationary phases under aqueous conditions, *J Sep Sci*, 30 (2007) 1101-1114
- [126] R. M. Smith, R. J. Burgess, Superheated water - A clean eluent for reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal Commun*, 33 (1996) 327-329
- [127] B. Yan, J. Zhao, J. S. Brown, J. Blackwell, P. W. Carr, High-temperature ultrafast liquid chromatography, *Anal Chem*, 72 (2000) 1253-1262
- [128] S. M. Fields, C. Q. Ye, D. D. Zhang, B. R. Branch, X. J. Zhang, N. Okafo, Superheated water as eluent in high-temperature high-performance liquid chromatographic separations of steroids on a polymer-coated zirconia column, *Journal of Chromatography A*, 913 (2001) 197-204
- [129] J. Randon, S. Huguet, A. Piram, G. Puy, C. Demesmay, J. L. Rocca, Synthesis of zirconia monoliths for chromatographic separations, *Journal of Chromatography A*, 1109 (2006) 19-25
- [130] D. C. Hoth, J. G. Rivera, L. A. Colon, Metal oxide monolithic columns, *J Chromatogr A*, 1079 (2005) 392-396
- [131] G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 1168 (2007) 101-168; discussion 100
- [132] K. I. Hadjiivanov, D. G. Klissurski, Surface chemistry of titania (anatase) and titania-supported catalysts, *Chem Soc Rev*, 25 (1996) 61
- [133] J. J. Pesek, M. T. Matyska, S. Larrabee, HPLC retention behavior on hydride-based stationary phases, *J Sep Sci*, 30 (2007) 637-647
- [134] J. Soukup, P. Jandera, Hydrosilated silica-based columns: The effects of mobile phase and temperature on dual hydrophilic-reversed-phase separation mechanism of phenolic acids, *J Chromatogr A*, In Press (2011)

- [135] J. E. Sandoval, J. J. Pesek, Synthesis and Characterization of a Hydride-Modified Porous Silica Material as an Intermediate in the Preparation of Chemically Bonded Chromatographic Stationary Phases, *Analytical Chemistry*, 61 (1989) 2067-2075
- [136] J. H. Knox, P. Ross, Carbon-based packing materials for liquid chromatography - Structure, performance, and retention mechanisms, *Advances in Chromatography*, Vol 37, 37 (1997) 73-119
- [137] P. Ross, J. H. Knox, Carbon-based packing materials for liquid chromatography: Applications, *Advances in Chromatography*, Vol 37, 37 (1997) 121-162
- [138] C. West, C. Elfakir, M. Lafosse, Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3201-3216
- [139] T. P. Weber, P. T. Jackson, P. W. Carr, Chromatographic Evaluation of Porous Carbon Clad Zirconia Microparticles, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 3042-3050
- [140] C. Paek, A. V. McCormick, P. W. Carr, Preparation and evaluation of carbon coated alumina as a high surface area packing material for high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 6475-6483
- [141] K. Gaudin, P. Millet, F. Fawaz, P. Olliaro, N. J. White, C. Cassus-Coussere, U. Agbahoungha, J. P. Dubost, Investigation of porous graphitic carbon at high-temperature liquid chromatography with evaporative light scattering detection for the analysis of the drug combination artesunate-Azithromycin for the treatment of severe malaria, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 75-81
- [142] F. F. Cantwell, B. Ells, Y. Wang, Influence of solvent uptake and swelling by poly(styrene-divinylbenzene) column packings on sample sorption rate and band broadening in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 835 (1999) 3-18
- [143] L. Novakova, H. Vlckova, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Anal Chim Acta*, 656 (2009) 8-35
- [144] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles, *J Chromatogr A*, doi:10.1016/j.chroma.2011.09.050 (2011)
- [145] Y. Fintschenko, A. van den Berg, Silicon microtechnology and microstructures in separation science, *Journal of Chromatography A*, 819 (1998) 3-12

- [146] K. Huikko, R. Kostianen, T. Kotiaho, Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications, *Eur J Pharm Sci*, 20 (2003) 149-171
- [147] J. Pihl, M. Karlsson, D. T. Chiu, Microfluidic technologies in drug discovery, *Drug Discov Today*, 10 (2005) 1377-1383
- [148] N. V. Lavrik, L. T. Taylor, M. J. Sepaniak, Nanotechnology and chip level systems for pressure driven liquid chromatography and emerging analytical separation techniques: A review, *Anal Chim Acta*, 694 (2011) 6-20
- [149] S. Hjerten, J. L. Liao, R. Zhang, High-Performance Liquid-Chromatography on Continuous Polymer Beds, *J Chromatogr*, 473 (1989) 273-275
- [150] F. Svec, J. M. J. Frechet, Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid-Chromatography Separation Media, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 820-822
- [151] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 3498-3501
- [152] K. Cabrera, D. Lubda, H. M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, A new monolithic-type HPLC column for fast separations, *Hrc-J High Res Chrom*, 23 (2000) 93-99
- [153] K. Cabrera, Applications of silica-based monolithic HPLC columns, *J Sep Sci*, 27 (2004) 843-852
- [154] T. Ikegami, N. Tanaka, Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations, *Curr Opin Chem Biol*, 8 (2004) 527-533
- [155] S. Dai, C. D. Liang, G. Guiochon, A graphitized-carbon monolithic column, *Analytical Chemistry*, 75 (2003) 4904-4912
- [156] J. Randon, J. F. Guerrin, J. L. Rocca, Synthesis of titania monoliths for chromatographic separations, *Journal of Chromatography A*, 1214 (2008) 183-186
- [157] Y. Vander Heyden, A. M. van Nederkassel, A. Aerts, A. Dierick, D. L. Massart, Fast separations on monolithic silica columns: method transfer, robustness and column ageing for some case studies, *J Pharmaceut Biomed*, 32 (2003) 233-249
- [158] J. Henion, N. Barbarin, D. B. Mawhinney, R. Black, High-throughput selected reaction monitoring liquid chromatography-mass spectrometry determination of methylphenidate and its major metabolite, ritalinic acid, in rat plasma employing monolithic columns, *J Chromatogr B*, 783 (2003) 73-83

- [159] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, J. L. Veuthey, New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches, *Anal Bioanal Chem*, 397 (2010) 1069-1082
- [160] K. C. Saunders, A. Ghanem, W. B. Hon, E. F. Hilder, P. R. Haddad, Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review, *Anal Chim Acta*, 652 (2009) 22-31
- [161] J. L. Veuthey, D. T. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *J Sep Sci*, 29 (2006) 1836-1848
- [162] S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete, Efficiency of the new sub-2 μ m core-shell (KinetexTM) column in practice, applied for small and large molecule separation, *J Pharmaceut Biomed*, 54 (2011) 482-490
- [163] A. Felinger, Diffusion time in core-shell packing materials, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 1939-1941
- [164] S. Fekete, J. Fekete, Fast gradient screening of pharmaceuticals with 5 cm long, narrow bore reversed-phase columns packed with sub-3 μ m core-shell and sub-2 μ m totally porous particles, *Talanta*, 84 (2011) 416-423
- [165] R. J. Maggs, Role of Temperature in Liquid-Solid Chromatography - Some Practical Considerations, *J Chromatogr Sci*, 7 (1969) 145
- [166] Y. Yang, Stationary phases for high-temperature liquid chromatography, *Lc Gc Eur*, 16 (2003) 37-41
- [167] T. Greibrokk, T. Andersen, High-temperature liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1000 (2003) 743-755
- [168] S. Heinisch, J. L. Rocca, Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 642-658
- [169] R. Berta, M. Babjak, M. Gazdag, A study of some practical aspects of high temperature liquid chromatography in pharmaceutical applications, *J Pharmaceut Biomed*, 54 (2011) 458-462
- [170] D. V. McCalley, S. M. C. Buckenmaier, M. R. Euerby, Rationalisation of unusual changes in efficiency and retention with temperature shown for bases in reversed-phase high-performance liquid chromatography at intermediate pH, *Journal of Chromatography A*, 1060 (2004) 117-126
- [171] J. W. Dolan, Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 965 (2002) 195-205

- [172] R. M. Smith, Superheated water chromatography - A green technology for the future, *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008) 441-455
- [173] S. Heinisch, M. Albert, G. Cretier, D. Guillarme, J. L. Rocca, Some advantages of high temperature for the separation of pharmaceutical compounds with mass spectrometry detection, *J Sep Sci*, 28 (2005) 1803-1811
- [174] J. L. Veuthey, D. Guillarme, R. Russo, S. Rudaz, C. Bicchi, Chromatographic performance of silica-based stationary phases in high temperature liquid chromatography: Pharmaceutical applications, *Curr Pharm Anal*, 3 (2007) 221-229
- [175] L. Pereira, S. Aspey, H. Ritchie, High temperature to increase throughput in liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry with a porous graphitic carbon stationary phase, *J Sep Sci*, 30 (2007) 1115-1124
- [176] P. W. Carr, J. D. Thompson, A study of the critical criteria for analyte stability in high-temperature liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 1017-1023
- [177] I. S. Krull, Z. Deyl, H. Lingeman, General Strategies and Selection of Derivatization Reactions for Liquid-Chromatography and Capillary Electrophoresis, *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 659 (1994) 1-17
- [178] I. S. Krull, M. E. Szulc, A. J. Bourque, F. X. Zhou, J. Yu, R. Strong, Solid-Phase Derivatization Reactions for Biomedical Liquid-Chromatography, *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 659 (1994) 19-50
- [179] T. Fukushima, N. Usui, T. Santa, K. Imai, Recent progress in derivatization methods for LC and CE analysis, *J Pharmaceut Biomed*, 30 (2003) 1655-1687
- [180] K. R. Anumula, Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates, *Anal Biochem*, 350 (2006) 1-23
- [181] S. Uchiyama, Y. Inaba, N. Kunugita, Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 879 (2011) 1282-1289
- [182] I. Molnar-Perl, Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents, *J Chromatogr B*, 879 (2011) 1241-1269

- [183] K. Kusmierk, G. Chwatko, R. Glowacki, P. Kubalcyk, E. Bald, Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis, *J Chromatogr B*, 879 (2011) 1290-1307
- [184] S. M. Gao, Z. P. Zhang, H. T. Karnes, Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives, *J Chromatogr B*, 825 (2005) 98-110
- [185] H. Inoda, T. Nishiyama, T. Yoshikado, Y. Suwanai, T. Santa, Compounds having thiourea moiety as derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS): synthesis of derivatization reagents for carboxylic acids, *Biomed Chromatogr*, 25 (2011) 635-640
- [186] T. Santa, Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 25 (2011) 1-10
- [187] Y. Iwasaki, Y. Nakano, K. Mochizuki, M. Nomoto, Y. Takahashi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, A new strategy for ionization enhancement by derivatization for mass spectrometry, *J Chromatogr B*, 879 (2011) 1159-1165
- [188] R. M. Smith, Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques, *Journal of Chromatography A*, 1000 (2003) 3-27
- [189] Y. Chen, Z. P. Guo, X. Y. Wang, C. G. Qiu, Sample preparation, *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008) 191-219
- [190] P. L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, *Biomed Chromatogr*, 25 (2011) 199-217
- [191] Harvard Apparatus, Guide to Equilibrium Dialysis, <http://www.nestgrp.com/pdf/Ap1/EqDialManual.pdf>.
- [192] Z. Deyl, M. Uhrová, Chromatografické a elektromigrační metody pro analýzu biologických vzorků, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Pardubice, 1996.
- [193] R. A. Biddlecombe, S. Pleasance, Automated protein precipitation by filtration in the 96-well format, *Journal of Chromatography B*, 734 (1999) 257-265
- [194] J. J. Liu, M. Jiang, G. Li, L. Xu, M. J. Xie, Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices, *Anal Chim Acta*, 679 (2010) 74-80

- [195] M. Rezaee, Y. Yamini, S. Shariati, A. Esrafil, M. Shamsipur, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1511-1514
- [196] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2342-2357
- [197] D. Han, K. H. Row, Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology, *Molecules*, 15 (2010) 2405-2426
- [198] Q. X. Zhou, H. H. Bai, G. H. Xie, J. P. Xiao, Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction, *Journal of Chromatography A*, 1177 (2008) 43-49
- [199] M. T. Pena, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 6356-6364
- [200] Q. X. Zhou, X. G. Zhang, G. H. Xie, J. P. Xiao, Temperature-controlled ionic liquid-dispersive liquid-phase microextraction for preconcentration of chlorotoluron, diethofencarb and chlorbenzuron in water samples, *J Sep Sci*, 32 (2009) 3945-3950
- [201] D. Li, Q. L. Yang, Z. M. Wang, R. Su, X. Xu, H. Q. Zhang, Determination of fluoroquinolones in blood by matrix solid-phase dispersion extraction and CE, *J Sep Sci*, 34 (2011) 822-829
- [202] A. Craig, T. An, Increase bioanalytical assay speed via phospholipid removal using HybridSPE-precipitation technology, *The Reporter*, 26 (2008) 7-9
- [203] A. Craig, T. An, M. Ye, M. Charles, Introducing HybridSPE-precipitation technology for pharmaceutical bioanalytical sample preparation, *The Reporter*, 26 (2008) 4-6
- [204] E. Caro, R. M. Marce, F. Borrull, P. A. G. Cormack, D. C. Sherrington, Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *Trac-Trend Anal Chem*, 25 (2006) 143-154
- [205] S. Wei, B. Mizaikoff, Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations, *J Sep Sci*, 30 (2007) 1794-1805
- [206] M. Lasakova, P. Jandera, Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction, *J Sep Sci*, 32 (2009) 799-812

- [207] R. Lucena, B. M. Simonet, S. Cardenas, M. Valcarcel, Potential of nanoparticles in sample preparation, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 620-637
- [208] C. S. Wu, F. K. Liu, F. H. Ko, Potential role of gold nanoparticles for improved analytical methods: an introduction to characterizations and applications, *Anal Bioanal Chem*, 399 (2011) 103-118
- [209] F. E. Regnier, B. He, S. Lin, J. Busse, Chromatography and electrophoresis on chips: critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science, *Trends Biotechnol*, 17 (1999) 101-106
- [210] M. De Pra, W. T. Kok, P. J. Schoenmakers, Topographic structures and chromatographic supports in microfluidic separation devices, *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008) 560-572
- [211] R. Luttge, *Microfabrication for industrial applications*, Elsevier, Boston, MA, 2011.
- [212] J. L. Glajch, J. J. Kirkland, *Method Development in High-Performance Liquid-Chromatography Using Retention Mapping and Experimental-Design Techniques*, *J Chromatogr*, 485 (1989) 51-63
- [213] J. W. Dolan, L. R. Snyder, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, D. L. Saunders, L. Van Heukelem, T. J. Waeghe, Simultaneous variation of temperature and gradient steepness for reversed-phase high-performance liquid chromatography method development - I. Application to 14 different samples using computer simulation, *Journal of Chromatography A*, 803 (1998) 1-31
- [214] P. Haber, T. Baczek, R. Kaliszan, L. R. Snyder, J. W. Dolan, C. T. Wehr, Computer simulation for the simultaneous optimization of any two variables and any chromatographic procedure, *J Chromatogr Sci*, 38 (2000) 386-392
- [215] I. Molnar, Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software, *Journal of Chromatography A*, 965 (2002) 175-194
- [216] Y. N. Chen, E. C. Tan, E. Luna, R. A. Reed, Evaluation of ChromSword: An automated HPLC method development tool, *Abstr Pap Am Chem S*, 230 (2005) U289-U289
- [217] M. Kalina, ChromSword - Development of methods and separation simulation for HPLC, *Chem Listy*, 91 (1997) 269-271

- [218] W. Y. Li, H. T. Rasmussen, Strategy for developing and optimizing liquid chromatography methods in pharmaceutical development using computer-assisted screening and Plackett-Burman experimental design, *Journal of Chromatography A*, 1016 (2003) 165-180
- [219] T. P. I. R. Smith, S. Guhan, K. Taksen, M. Vavra, D. Myers, M. T. W. Hearn, Intelligent automation of high-performance liquid chromatography method development by means of a real-time knowledge-based approach, *Journal of Chromatography A*, 972 (2002) 27-43
- [220] G. A. Shabir, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *Journal of Chromatography A*, 987 (2003) 57-66
- [221] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration, 2001, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
- [222] Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2011, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
- [223] F. T. Peters, H. H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review, *Accredit Qual Assur*, 7 (2002) 441-449
- [224] S. Bansal, A. DeStefano, Key elements of bioanalytical method validation for small molecules, *Aaps J*, 9 (2007) E109-E114
- [225] E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation, *Journal of Chromatography A*, 1158 (2007) 111-125
- [226] P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation, *J Chromatogr B*, 877 (2009) 2224-2234
- [227] N. R. Srinivas, Bioanalytical assay validation parameters revisited: perspectives on stability studies, *Biomed Chromatogr*, 23 (2009) 1031-1033
- [228] J. S. de Bono, C. J. Twelves, The oral fluorinated pyrimidines, *Invest New Drug*, 19 (2001) 41-59

- [229] A. Wadhawan, R. Stephens, R. Adams, Intermittent therapy in the palliative treatment of metastatic colorectal cancer, *Expert Rev Anticanc*, 9 (2009) 125-134
- [230] B. M. Wolpin, J. A. Meyerhardt, H. J. Mamon, R. J. Mayer, Adjuvant treatment of colorectal cancer, *Ca-Cancer J Clin*, 57 (2007) 168-185
- [231] P. A. Patel, Evolution of 5-fluorouracil-based chemoradiation in the management of rectal cancer, *Anti-Cancer Drug*, 22 (2011) 311-316
- [232] D. W. Kufe, J. F. Holland, E. Frei, American Cancer Society., *Cancer medicine* 6, 6th ed., BC Decker, Hamilton, Ont. ; Lewiston, NY, 2003.
- [233] E. Gamelin, R. Delva, J. Jacob, Y. Merrouche, J. L. Raoul, D. Pezet, E. Dorval, G. Piot, A. Morel, M. Boisdron-Celle, Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: Results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol*, 26 (2008) 2099-2105
- [234] M. W. Saif, A. Choma, S. J. Salamone, E. Chu, Pharmacokinetically Guided Dose Adjustment of 5-Fluorouracil: A Rational Approach to Improving Therapeutic Outcomes, *J Natl Cancer I*, 101 (2009) 1543-1552
- [235] P. Compagnon, L. Thiberville, N. Moore, C. Thuillez, C. Lacroix, Simple high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of 5-fluorouracil in human plasma, *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 677 (1996) 380-383
- [236] M. Jung, G. Berger, U. Pohlen, S. Pauser, R. Reszka, H. J. Buhr, Simultaneous determination of 5-fluorouracil and its active metabolites in serum and tissue by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 702 (1997) 193-202
- [237] S. M. Guichard, I. Mayer, D. I. Jodrell, Simultaneous determination of capecitabine and its metabolites by HPLC and mass spectrometry for preclinical and clinical studies, *J Chromatogr B*, 826 (2005) 232-237
- [238] M. R. Dhananjeyan, J. D. Liu, C. Bykowski, J. A. Trendel, J. G. Sarver, H. Ando, P. W. Erhardt, Rapid and simultaneous determination of capecitabine and its metabolites in mouse plasma, mouse serum, and in rabbit bile by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1138 (2007) 101-108
- [239] F. Palmisano, F. Berardi, M. Delena, A. Guerrieri, V. Lorusso, P. G. Zambonin, Simultaneous Determination of 5'-Deoxy-5-Fluorouridine, 5-Fluorouracil and Its Main Metabolites in Body-Fluids by Hplc, *Chromatographia*, 33 (1992) 413-417

- [240] R. A. Coe, R. A. Earl, T. C. Johnson, J. W. Lee, Determination of 5-fluorouracil in human plasma by a simple and sensitive reversed-phase HPLC method, *J Pharmaceut Biomed*, 14 (1996) 1733-1741
- [241] E. Gamelin, M. BoisdronCelle, A. Turcant, F. Larra, P. Allain, J. Robert, Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic analysis of halogenopyrimidines in plasma, *Journal of Chromatography B*, 695 (1997) 409-416
- [242] J. M. Joulia, F. Pinguet, P. Y. Grosse, C. Astre, F. Bressolle, Determination of 5-fluorouracil and its main metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study, *Journal of Chromatography B*, 692 (1997) 427-435
- [243] W. Wattanatorn, H. L. McLeod, J. Cassidy, K. E. Kendle, High-performance liquid chromatographic assay of 5-fluorouracil in human erythrocytes, plasma and whole blood, *Journal of Chromatography B*, 692 (1997) 233-237
- [244] L. K. House, J. Ramirez, M. J. Ratain, Simultaneous determination of 5-fluorouracil and uracil by high-performance liquid chromatography using four serial columns, *Journal of Chromatography B*, 720 (1998) 245-250
- [245] K. Wang, M. Nano, T. Mulligan, E. D. Bush, R. W. Edom, Derivatization of 5-fluorouracil with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for determination by liquid chromatography mass spectrometry, *J Am Soc Mass Spectr*, 9 (1998) 970-976
- [246] J. Giraldez, J. Escoriaza, A. Aldaz, E. Calvo, Simple and sensitive determination of 5-fluorouracil in plasma by high-performance liquid chromatography - Application to clinical pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B*, 736 (1999) 97-102
- [247] W. J. Loos, P. de Bruijn, L. van Zuylen, J. Verweij, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, Determination of 5-fluorouracil in microvolumes of human plasma by solvent extraction and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 735 (1999) 293-297
- [248] F. Casale, R. Canaparo, E. Muntoni, L. Serpe, G. P. Zara, C. D. Pepa, E. Berno, M. Costa, M. Eandi, Simultaneous HPLC determination of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma of cancer patients, *Biomed Chromatogr*, 16 (2002) 446-452
- [249] L. Zufia, A. Aldaz, C. Castellanos, J. Giraldez, Determination of 5-fluorouracil and its prodrug tegafur in plasma and tissue by high-performance liquid chromatography in a single injection: Validation for application in clinical pharmacokinetic studies, *Ther Drug Monit*, 25 (2003) 221-228

- [250] J. Ciccolini, C. Mercier, M. F. Blachon, R. Favre, A. Durand, B. Lacarelle, A simple and rapid high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for 5-fluorouracil (5-FU) assay in plasma and possible detection of patients with impaired dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity, *J Clin Pharm Ther*, 29 (2004) 307-315
- [251] I. A. Alsarra, M. N. Alarifi, Validated liquid chromatographic determination of 5-fluorouracil in human plasma, *J Chromatogr B*, 804 (2004) 435-439
- [252] A. Guerrieri, F. Palmisano, P. G. Zambonin, M. Delena, V. Lorusso, Solid-Phase Extraction of Fluoropyrimidine Derivatives on a Copper-Modified Strong Cation-Exchanger - Determination of Doxifluridine, 5-Fluorouracil and Its Main Metabolites in Serum by High-Performance Liquid-Chromatography with Ultraviolet Detection, *J Chromatogr-Biomed*, 617 (1993) 71-77
- [253] C. Minoia, G. Micoli, R. Turci, M. Arpellini, Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 750 (2001) 25-32
- [254] A. Salvador, L. Millerioux, A. Renou, Simultaneous LC-MS-MS analysis of capecitabine and its metabolites (5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil) after off-line SPE from human plasma, *Chromatographia*, 63 (2006) 609-615
- [255] J. Escoriaza, A. Aldaz, E. Calvo, J. Giraldez, Simple and sensitive determination of 5-fluorouracil in plasma by high-performance liquid chromatography - Application to clinical pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B*, 736 (1999) 97-102
- [256] M. Simmaco, A. M. Lostia, L. Lionetto, C. Ialongo, G. Gentile, A. Viterbo, P. Malaguti, I. Paris, L. Marchetti, P. Marchetti, A. De Blasi, A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of 5-Fluorouracil Degradation Rate by Intact Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Ther Drug Monit*, 31 (2009) 482-488
- [257] B. Royer, D. Montange, M. Berard, M. Demarchi, P. Muret, S. Piedoux, J. P. Kantelip, An APCI LC-MS/MS method for routine determination of capecitabine and its metabolites in human plasma, *J Mass Spectrom*, 45 (2010) 670-677

- [258] L. D. Vainchtein, H. Rosing, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, A new, validated HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of the anti-cancer agent capecitabine and its metabolites: 5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil, in human plasma, *Biomed Chromatogr*, 24 (2010) 374-386
- [259] M. E. Black, K. M. Serve, J. A. Yanez, C. M. Remsberg, N. M. Davies, Development and validation of a rapid and sensitive HPLC method for the quantification of 5-fluorocytosine and its metabolites, *Biomed Chromatogr*, 24 (2010) 556-561
- [260] M. Zhou, J. Chen, Determination of eniluracil and 5-fluorouracil in human plasma by LC-MS/MS, *Bioanalysis*, 2 (2010) 2011-2017
- [261] G. L. Amidon, Y. Tsume, C. J. Provoda, The achievement of mass balance by simultaneous quantification of floxuridine prodrug, floxuridine, 5-fluorouracil, 5-dihydrouracil, alpha-fluoro-beta-ureidopropionate, alpha-fluoro-beta-alanine using LC-MS, *J Chromatogr B*, 879 (2011) 915-920
- [262] M. A. Serdar, E. Sertoglu, M. Uyanik, S. Tapan, O. Akin, M. Cihan, Determination of 5-fluorouracil and dihydrofluorouracil levels by using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for evaluation of dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme activity, *Cancer Chemoth Pharm*, 68 (2011) 525-529
- [263] M. Breda, S. Baratte, A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices, *Anal Bioanal Chem*, 397 (2010) 1191-1201
- [264] Y. H. Jang, L. C. Sowers, T. Cagin, W. A. Goddard, First principles calculation of pK(a) values for 5-substituted uracils, *J Phys Chem A*, 105 (2001) 274-280
- [265] R. Deporte, M. Amiand, A. Moreau, C. Charbonnel, L. Champion, High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrouracil/uracil ratio in plasma, *J Chromatogr B*, 834 (2006) 170-177
- [266] J. E. Kosovec, M. J. Egorin, S. Gjurich, J. H. Beumer, Quantitation of 5-fluorouracil (5-FU) in human plasma by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Sp*, 22 (2008) 224-230
- [267] B. A. Chabner, C. J. Allegra, G. A. Curt, N. J. Clendeninn, J. Baram, S. Koizumi, J. C. Drake, J. Jolivet, Polyglutamation of Methotrexate - Is Methotrexate a Prodrug, *J Clin Invest*, 76 (1985) 907-912

- [268] C. J. Allegra, J. C. Drake, J. Jolivet, B. A. Chabner, Inhibition of Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide Transformylase by Methotrexate and Dihydrofolic Acid Polyglutamates, *P Natl Acad Sci USA*, 82 (1985) 4881-4885
- [269] J. E. Baggott, W. H. Vaughn, B. B. Hudson, Inhibition of 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribotide Transformylase, Adenosine-Deaminase and 5'-Adenylate Deaminase by Polyglutamates of Methotrexate and Oxidized Folates and by 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Riboside and Ribotide, *Biochem J*, 236 (1986) 193-200
- [270] A. V. Ramanan, P. Whitworth, E. M. Baidam, Use of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis, *Arch Dis Child*, 88 (2003) 197-200
- [271] L. Stamp, R. Roberts, M. Kennedy, M. Barclay, J. O'Donnell, P. Chapman, The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis - are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics?, *Biomed Pharmacother*, 60 (2006) 678-687
- [272] M. L. Becker, C. D. Rose, R. Q. Cron, D. D. Sherry, W. B. Bilker, E. Lautenbach, Effectiveness and Toxicity of Methotrexate in Juvenile Idiopathic Arthritis: Comparison of 2 Initial Dosing Regimens, *J Rheumatol*, 37 (2010) 870-875
- [273] T. Dervieux, D. O. Lein, J. Marcelletti, K. Pischel, K. Smith, M. Walsh, R. Richerson, HPLC determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis, *Clin Chem*, 49 (2003) 1632-1641
- [274] J. Salamoun, J. Frantisek, Determination of Methotrexate and Its Metabolites 7-Hydroxymethotrexate and 2,4-Diamino-N-10-Methylpteroic Acid in Biological-Fluids by Liquid-Chromatography with Fluorometric Detection, *J Chromatogr*, 378 (1986) 173-181
- [275] J. Salamoun, M. Smrz, F. Kiss, A. Salamounova, Column Liquid-Chromatography of Methotrexate and Its Metabolites Using a Postcolumn Photochemical Reactor and Fluorescence Detection, *J Chromatogr-Biomed*, 419 (1987) 213-223
- [276] M. Hroch, J. Tukova, P. Dolezalova, J. Chladek, An Improved High-performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Methotrexate Polyglutamates in Red Blood Cells of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis, *Biopharm Drug Dispos*, 30 (2009) 138-148

- [277] L. van Haandel, M. L. Becker, J. S. Leeder, T. D. Williams, J. F. Stobaugh, A novel high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for improved selective and sensitive measurement of methotrexate polyglutamation status in human red blood cells, *Rapid Commun Mass Sp*, 23 (2009) 3693-3702
- [278] G. Chen, J. P. Fawcett, M. Mikov, I. G. Tucker, Simultaneous determination of methotrexate and its polyglutamate metabolites in Caco-2 cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Pharmaceut Biomed*, 50 (2009) 262-266
- [279] S. Goodman, Measuring methotrexate polyglutamates, *Clin Exp Rheumatol*, 28 (2010) S24-S26
- [280] J. Tukova, J. Chladek, M. Hroch, D. Nemcova, J. Hoza, P. Dolezalova, 677TT Genotype Is Associated with Elevated Risk of Methotrexate (MTX) Toxicity in Juvenile Idiopathic Arthritis: Treatment Outcome, Erythrocyte Concentrations of MTX and Folates, and MTHFR Polymorphisms, *J Rheumatol*, 37 (2010) 2180-2186

7. Přehled publikační činnosti

7.1 *Publikace v časopisech s IF a rozhodujícím podílem na vypracování*

M. Hroch, J. Tukova, P. Dolezalova, J. Chladek: An Improved High-performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Methotrexate Polyglutamates in Red Blood Cells of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis, *Biopharm Drug Dispos*, 30 (2009) 138-148 (IF=1.246)

M. Hroch, Z. Havlíňová, M. Nobilis, J. Chládek: HPLC determination of arginases inhibitor N-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine using core-shell particle column and LC-MS/MS identification of principal metabolite in rat plasma, *J Chromatogr B*, in press (IF=2.976)

7.2 *Publikace ostatní s podílem na analytické části práce*

M. Hroch, J. Chladek, M. Simkova, J. Vaneckova, J. Grim, J. Martinkova: A pilot study of pharmacokinetically guided dosing of oral methotrexate in the initial phase of psoriasis treatment, *J Eur Acad Dermatol*, 22 (2008) 19-24 (IF=2.276)

L. Fuksa, E. Breckova, J. Cermanova, **M. Hroch**, J. Chladek, G. Kolouchova, J. Malakova, J. Martinkova, F. Staud, S. Micuda, Amiodarone modulates pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rats, *Biopharm Drug Dispos*, 29 (2008) 289-299 (IF=1.542)

J. Chladek, M. Simkova, J. Vaneckova, **M. Hroch**, J. Chladkova, J. Martinkova, J. Vavrova, M. Beranek, The effect of folic acid supplementation on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate during the remission-induction period of treatment for moderate-to-severe plaque psoriasis, *Eur J Clin Pharmacol*, 64 (2008) 347-355 (IF=2.497)

S. Micuda, E. Brcakova, L. Fuksa, J. Cermanova, J. Osterreicher, **M. Hroch**, J. Mokry, J. Pejchal, J. Martinkova, F. Staud, P-glycoprotein function and expression during obstructive cholestasis in rats, *Eur J Gastroen Hepat*, 20 (2008) 404-412 (IF=2.080)

O. Popelova, M. Sterba, T. Simunek, Y. Mazurova, I. Guncova, **M. Hroch**, M. Adamcova, V. Gersl, Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo, *J Pharmacol Exp Ther*, 326 (2008) 259-269 (IF=4.309)

T. Simunek, M. Sterba, O. Popelova, H. Kaiserova, M. Adamcova, **M. Hroch**, P. Haskova, P. Ponka, V. Gersl, Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone, *Brit J Pharmacol*, 155 (2008) 138-148 (IF=4.902)

E. Brcakova, L. Fuksa, J. Cermanova, G. Kolouchova, **M. Hroch**, P. Hirsova, J. Martinkova, F. Staud, S. Micuda, Alteration of Methotrexate Biliary and Renal Elimination during Extrahepatic and Intrahepatic Cholestasis in Rats, *Biol Pharm Bull*, 32 (2009) 1978-1985 (IF=1.810)

O. Popelova, M. Sterba, P. Haskova, T. Simunek, **M. Hroch**, I. Guncova, P. Nachtigal, M. Adamcova, V. Gersl, Y. Mazurova, Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death, *Brit J Cancer*, 101 (2009) 792-802 (IF=4.346)

O. Pozler, **M. Hroch**, J. Malý, M. Beránek, B. Černá, P. Dědek, J. Chládek, Farmakokinetika azathioprinu v prvních týdnech léčby Chronovy choroby a ulcerózní kolitidy u dětí a adolescentů, *Folia gastroenterol hepatol*, 7(3-4) (2009), 112-118

J. Cermanova, L. Fuksa, E. Brcakova, **M. Hroch**, O. Kucera, G. Kolouchova, P. Hirsova, J. Malakova, F. Staud, J. Martinkova, Z. Cervinkova, S. Micuda, Up-regulation of renal Mdr1 and Mrp2 transporters during amiodarone pretreatment in rats, *Pharmacol Res*, 61 (2010) 129-135 (IF=3.612)

L. Fuksa, E. Brcakova, G. Kolouchova, P. Hirsova, **M. Hroch**, J. Cermanova, F. Staud, S. Micuda, Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats, *Toxicology*, 267 (2010) 165-171 (IF=3.641)

O. Pozler, J. Chladek, J. Maly, **M. Hroch**, P. Dedek, M. Beranek, P. Krasnicanova, Steady-state of azathioprine during initiation treatment of pediatric inflammatory bowel disease, *J Crohns Colitis*, 4 (2010) 623-628 (IF=2.628)

E. Prochazka, T. Soukup, **M. Hroch**, L. Fuksa, E. Brcakova, J. Cermanova, G. Kolouchova, K. Urban, J. Mokry, S. Micuda, Methotrexate released in vitro from bone cement inhibits human stem cell proliferation in S/G2 phase, *Int Orthop*, 34 (2010) 137-142 (IF=1.561)

J. Tukova, J. Chladek, **M. Hroch**, D. Nemcova, J. Hoza, P. Dolezalova, 677TT Genotype Is Associated with Elevated Risk of Methotrexate (MTX) Toxicity in Juvenile Idiopathic Arthritis: Treatment Outcome, Erythrocyte Concentrations of MTX and Folates, and MTHFR Polymorphisms, *J Rheumatol*, 37 (2010) 2180-2186 (IF=3.551)

O. Kucera, T. Garnol, H. Lotkova, P. Stankova, Y. Mazurova, **M. Hroch**, R. Bolehovsk, T. Rousar, Z. Cervinkova, The Effect of Rat Strain, Diet Composition and Feeding Period on the Development of a Nutritional Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats, *Physiol Res*, 60 (2011) 317-328 (IF=1.646)

Karasova-Zdarova J, Chladek J, **Hroch M**, Josef F, Hnidkova D, Kuca K., Pharmacokinetic study of two acetylcholinesterase reactivators, trimedoxime and newly synthesized oxime K027, in rat plasma. *J Appl Toxicol*. 2011 Jun 30. doi: 10.1002/jat.1699. (IF=2.320)

J. Martínková, **M. Hroch**, J. Grim, Poznámky k inovacím v cytostatické terapii 5-fluorouracilem. *Klin. farmakol. farm.* 25(2) (2011) 87-91

7.3 Odborná sdělení

Hroch M., Chládek J., Němec V., Pavelcová M., Tuková J., Němcová D., Doležalová P., Bočkayová E. Metodické aspekty vyšetření koncentrací metotrexátu v erytrocytech u pacientů s psoriázou a juvenilní reumatoidní artritidou. *7. pardubické setkání dětských revmatologů a revmatologických sester*, 21.4.2006, Pardubice, Česká republika (**ústní sdělení**)

Hroch M., Chládek J., Němec V., Pavelcová M., Tuková J., Němcová D., Doležalová P., Bočkayová E.: Metodické aspekty vyšetření koncentrací metotrexátu v erytrocytech u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou. *56. Farmakologické dny*. Bratislava 6.-8. 9. 2006, Slovenská republika. (**poster**)

Hroch M., Chládek J., Němec V., Bočkayová E., Pavelcová M., Tuková J., Němcová D., Doležalová P.: Metodické aspekty vyšetření koncentrací metotrexátu v erytrocytech u pacientů s psoriázou a juvenilní reumatoidní artritidou, *56. Farmakologické dny*. Bratislava 6.-8. 9. 2006, Slovenská republika. (**abstrakt**)

Hroch M., Pozler O., Chládek J., Malý J., Dědek P., Havlínová Z.: Imunosupresiva v klinické praxi - Terapeutické monitorování 6-merkaptopurinu u dětí s Crohnovou chorobou. *58. Farmakologické dny*, 3.-5.9.2008, Praha, Česká republika (**ústní sdělení**)

M. Hroch, J. Grim, J. Chládek, O. Slanař, J. Martínková: 5-fluorouracil dose individualization in patients with colorectal cancer, *XIII. Vědecká konference LF a FN HK*, Hradec Králové, 21.1.2009 (**abstrakt**)

Hroch M., Beránek M., Chládek J., Pozler O., Malý J.: Results of thiopurine methyltransferase phenotyping and genotyping in children with Crohn disease. *59. Farmakologické dny*, 2.-4.9.2009, Bratislava, Slovenská republika (**poster**).

8. Řešené granty

Název grantu: *Compliance léčby azathioprinem u dětí a dospívajících s nespecifickými střevními záněty*

Financováno: Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví ČR

Identifikátor: NR/9255-3/2007

Období řešení: 2007-2009

Hlavní řešitel: Doc. MUDr. Oldřich Pozler, CSc. (Dětská klinika FNHK)

Spoluřešitel: Ing. Miloš Hroch (Univerzita Karlova, LFHK)

Zapojení do řešení: Jako spoluřešitel. Zavedení metody a analýza vzorků

Poznámka: Tým řešitelů tohoto grantu byl v roce 2010 vybrán mezi 15 nejlepšimi a nominován na cenu ministra zdravotnictví.

Název grantu: *Individuální predikce dávkového režimu 5-fluorouracilu v léčbě kolorektálního karcinomu*

Financováno: Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví ČR

Identifikátor: NS/9693-4/2008

Období řešení: 2009-2011

Hlavní řešitel: MUDr. Jiří Grim, Ph.D. (Onkologická klinika FNHK)

Spoluřešitel: Prof. MUDr. Jiřina Martínková, CSc. (Univerzita Karlova, LFHK)

Zapojení do řešení: Jako člen týmu spoluřešitele. Vývoj a validace metody diskutované v předkládané práci, analýza vzorků.

Název grantu: *Pilotní studie neinvazivního monitorování hepatotoxicity v průběhu dlouhodobé farmakokineticky řízené léčby psoriázy metotrexátem a kyselinou listovou*

Financováno: Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví ČR

Identifikátor: NS/10364-3

Období řešení: 2009-2011

Hlavní řešitel: Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D. (Univerzita Karlova, LFHK)

Zapojení do řešení: Jako člen týmu řešitele. Analýza vzorků metodou diskutovanou v předkládané disertační práci.

| | |
|----------------------------|--|
| Název grantu: | <i>Neinvazivní stanovení prozánětlivých ukazatelů oxidačního stresu u ozářených jako indikátor obdržené dávky záření. Ochranný efekt acetyl-L-karnitinu.</i> |
| Financováno: | Ministerstvo obrany ČR |
| Identifikátor: | OVUOFVZ200806 - RONSDOZ |
| Období řešení: | 2008-2011 |
| Hlavní řešitel: | prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc. (Univerzita obrany, FVZ HK) |
| Spoluřešitel: | doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D. (Univerzita Karlova, LFHK) |
| Zapojení do řešení: | Jako člen týmu spoluřešitele. Analýza malondialdehydu v biologickém materiálu jako markeru oxidativního stresu. |

9. Seznam použitých zkratk

| | |
|------------------|--|
| ADME | Absorpce – Distribuce – Metabolismus – Exkrece |
| ANP | Aqueous Normal Phase (chromatography) |
| APCI | Atmospheric Pressure Chemical Ionization |
| API | Atmospheric Pressure Ionization |
| ARG | Arginin |
| CAD | Charged Aerosol Detector |
| CID | Collision Induced Dissociation |
| CIU | 5-Chlorouracil |
| CNLSL | Condensation Nucleation Light Scattering Detector |
| DAPCI | Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization |
| DESI | Desorption Electrospray Ionization |
| DLLME | Dispersive Liquid-Liquid Microextraction |
| DPX | Disposable Pipette Extraction |
| dSPE | Dispersive Solid Phase Extraction |
| EI | Electron - Impact |
| ELSD | Evaporative Light Scattering Detector |
| EMA | European Medicines Agency |
| ESI | Electrospray Ionization |
| FAB | Fast Atom Bombardment |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FdUrd | 5-Fluoro-2'-deoxyuridin |
| FLD | Fluorescenční detekce/detektor |
| FU | 5-Fluorouracil |
| FUH ₂ | 5-Fluoro-5,6-dihydrouracil |
| FUrd | 5-Fluorouridin |
| HETP | Height Equivalent to a Theoretical Plate |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HTLC | High Temperature Liquid Chromatography |
| ICH | International Conference on Harmonization |
| IEC | Ion Exchange Chromatography |
| IND | Investigational New Drug (žádost o zkoumání nového léčiva) |

| | |
|--------------------|---|
| IPC | Ion Pair Chromatography |
| LC | Liquid Chromatography |
| LC-MS | Liquid Chromatography - Mass Spectrometry |
| LLE | Liquid – Liquid Extrakce |
| LLOQ | Lower Limit of Quantification |
| LOD | Limit of Detection |
| MALDI | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization |
| MF | Mobilní fáze |
| MFA | Mobilní fáze A |
| MFB | Mobilní fáze B |
| MIP | Molecularly imprinted polymers |
| MRM | Multiple Reaction Monitoring |
| MS | Mass Spectrometry |
| MSD | Mass Spectrometry Detector/Detection |
| MTX | Metotrexát |
| MTXGl _n | Polyglutamáty metotrexátu |
| NDA | New Drug Application |
| NMEA | N-(ω)-Ethyl-L-arginin |
| NOHA | N-(ω)-Hydroxy-L-arginin |
| nor-ARG | nor-L-Arginin |
| nor-NOHA | N-(ω)-Hydroxy-nor-L-arginin |
| NP | Normal Phase |
| NPLC | Normal phase Liquid Chromatography |
| NSAID | Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs |
| OPA | o-Ftalaldehyd |
| PDA | Photodiode Array |
| PEEK | Polyether Ether Keton |
| PFP | Pentafluorofenyl |
| PGC | Porous Graphitic Carbon |
| RE | Relativní chyba (Relative Error) |
| RP | Reversed Phase |
| RPLC | Reversed Phase Liquid Chromatography |
| RSD | Relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation) |

Seznam použitých zkratk

| | |
|--------|--|
| SAALE | Salting-out Assisted LLE |
| SIM | Selective Ion Monitoring |
| SPE | Solid Phase Extraction |
| SPME | Solid Phase Microextraction |
| SRM | Selected Reaction Monitoring |
| TDM | Therapeutic drug monitoring |
| TIC | Total Ion Current |
| UHPLC | Ultra High Performance Liquid Chromatography |
| ULOQ | Upper Limit of Quantification |
| UV/VIS | Ultraviolet/Visible |

Přílohy

Posterové prezentace uvedené v *Kapitole 7.3*

Results of thiopurine methyltransferase phenotyping and genotyping in children with Crohn disease



Hroch M.¹, Beránek M.², Chládek J.¹, Pozler O.², Malý J.²

1) Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, 2) Fakultní nemocnice Hradec Králové

BACKGROUND

The thiopurine drugs azathioprine and 6-mercaptopurine (6-MP) are well-established in the Crohn disease treatment. Key metabolic pathway of 6-MP biotransformation is via thiopurine methyltransferase (TPMT). Due to genetic polymorphism of TPMT, approximately 10% of patients with decreased TPMT activity are at an increased risk of severe myelosuppression which can be life threatening in 0.3% of individuals homozygous for alleles coding inactive TPMT.

Aim of our work is to identify patients with TPMT deficiency by means of genotype and phenotype assessment and optimize pharmacotherapy to decrease the risk of severe myelosuppression.

METHODS

Phenotyping

Chromatographic (HPLC) method was established for TPMT activity determination. Volume 100 μ L of RBCs was treated with 20 μ L 6 mM 6-mercaptopurine and 20 μ L 1.5 mM S-adenosylmethionine for 90 min at 37 °C. Enzymatically formed 6-methylmercaptopurine was measured in three aliquots detracted in 30-60-90 min of incubation. Activity was determined from slope of concentration vs. time curve.

Genotyping

The TPMT genotyping (*1 wild-type, *2, *3A, *3B, and *3C alleles) was performed on DNA samples extracted from peripheral blood cells. Each reaction was composed from 2 μ L of LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes, 3 mmol/L MgCl₂, 1 μ L of LightSNIP Reagent Mix, and 50 ng of genomic DNA. The alleles *3A, *3B and *3C were examined using initial denaturation 95 °C (10 min) and 50 cycles of 95 °C (10 s), 60 °C (10 s), 72 °C (15 s). After amplification, melting analysis was performed by denaturation at 95 °C (30 s), annealing at 40 °C (2 min), and slow heating to 75 °C with a ramp rate of 0.2 °C/s.

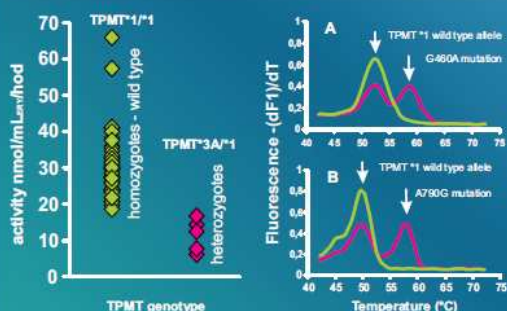


Fig. 1) Distribution of thiopurine methyltransferase activity in red blood cells in relation to TPMT genotype in group of 57 children

Fig. 2) Melting temperature analysis of G460A (A) and A719G (B) TPMT alleles. Patient 1 (green lines) was a wild-type homozygote, patient 2 (red lines) was a TPMT *3A heterozygote carrying both examined mutations



Fig. 4) Human thiopurine methyltransferase

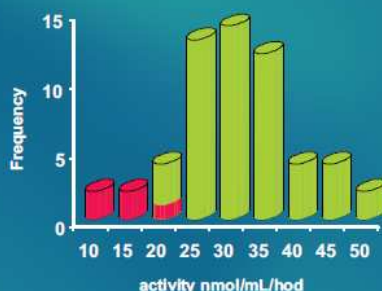


Fig. 3) Frequency distribution histogram of erythrocyte TPMT activity in group of 57 children. Homozygotes for wild type allele TPMT*1/*1 (green). Heterozygotes for mutant allele TPMT*3A/*1 (red).

RESULTS AND CONCLUSION

In the group of 57 children, the TPMT activity was in the range of 6.2 - 66.1 nmol/mL_{ery}/h with the mean value of 28.4 nmol/mL_{ery}/h. No patient had undetectable TPMT activity.

52 children (91.2 %) were homozygotes for wild type allele TPMT*1/*1 and 5 (8.8 %) were heterozygotes for mutant allele TPMT*3A/*1 which corresponds to patients with TPMT activity <17 nmol/mL_{ery}/h.

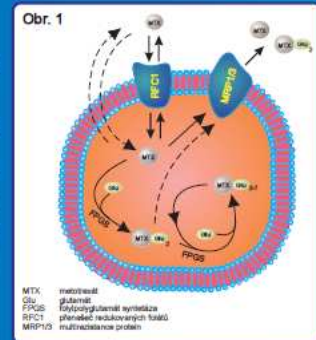
Both methods for genotyping and phenotyping correlate and are reliable for identification of patients with decreased activity of TPMT. Results are consistent with data published for Caucasian population.

Metodické aspekty vyšetření koncentrací metotrexátu v erythrocytech u pacientů s psoriázou a juvenilní idiopatickou artritidou

Chládek J., Hroch M., Němec V., Pavelcová M., Tuková J., Němcová D., Doležalová P., Bočkovayová E., Šimková M., Vaněčková V. Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové, 1. lékařská fakulta UK Praha, Krajská nemocnice Pardubice

Úvod

Při farmakoterapii psoriázy a juvenilní idiopatické artritidy (JIA) má důležité místo metotrexát (MTX) podávaný v monoterapii nebo v kombinaci s jinými léčivými. Protizánětlivý a imunosupresivní účinek MTX se rozvíjí v důsledku: A) inhibice enzymů folátového cyklu dihydrofolát reduktázy (DHFR) a metylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR), B) thymidylát syntetázy (THS), C) 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid transformylázy (AICAR), D) kompetice s foláty o přenašeče redukovaných folátů (RFC). Zásadní význam má intracelulární kumulace MTX ve formě polyglutamátů (PGMTX) a vzájemný vztah koncentrací polyglutamátů folátů a MTX v buňce. Obrázek 1 popisuje transport a metabolismus MTX v erythrocytu, který je modelem pro intracelulární kumulaci MTX. Studie provedené u dospělých nemocných s revmatoidní artritidou prokázaly vliv genového polymorfismu MTHFR na účinek a nežádoucí účinky MTX. Upozorňují také na přínos zjištění genového polymorfismu MTHFR a koncentrací PGMTX v erythrocytech (1,2,3,4,5,6).

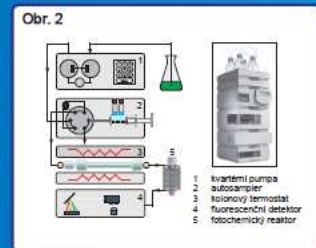


Cíl práce

V našich dřívějších studiích jsme stanovovali PGMTX v erythrocytech (ERY) enzymaticky na spektrofotometru (7). Principem enzymatické metody je inhibice DHFR in vitro (8), která se projevuje sníženou rychlostí redukce dihydrofolátu na tetrahydrofolát a oxidace NADPH na NADP⁺ (optický test). In vitro inhibiční aktivita PGMTX v ERY zjištěná touto metodou těsně koreluje se změnami PASI (Psoriasis Area and Severity Index) u nemocných s psoriázou (9). Cílem naší práce bylo zavést a ověřit dokonalejší postup s využitím metody HPLC, popsané v recentní práci a využívané v klinických studiích zatím jediného pracoviště (10). Důvod pro zavedení nové metody je i fakt, že enzym DHFR přestal být v ČR dostupný.

Experimentální část

PGMTX obsažené v hemolýzátním erythrocytátu, jsou štěpeny γ -glutamyl hydrolyzou v lidské plazmě, která je ke vzorku přidávána. Po šestihodinové inkubaci při 37°C je vzorek deproteinován kyselinou trichloroctovou a vzniklý MTX je stanoven metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí. Chromatografická separace probíhá izokraticky na koloně s reverzní fází C18 (Phenomenex Gemini 110A) v systému acetonitril-acetátový pufr (11:89, v/v, pH=5.5) s přídavkem peroxidu vodíku (0,25 ml/l). Po eluci je MTX postkolonově derivatizován UV světlem v fotochemickém reaktoru a fotolytický produkt je detekován fluorescenčním detektorem (excitace 375 nm / emise 463 nm). Kalibrace je prováděna v rozmezí koncentrací 12,5 - 100 nmol.l⁻¹ na triglutamát-MTX. Kalibrační závislost a typické chromatogramy kalibračních standardů jsou uvedeny na obrázku 3.

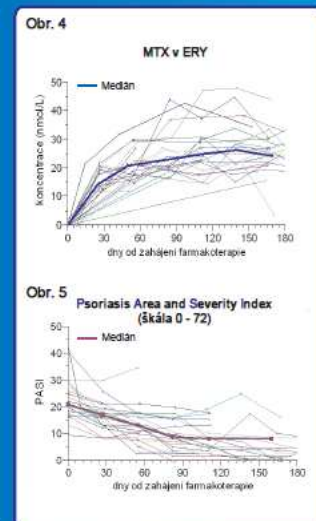
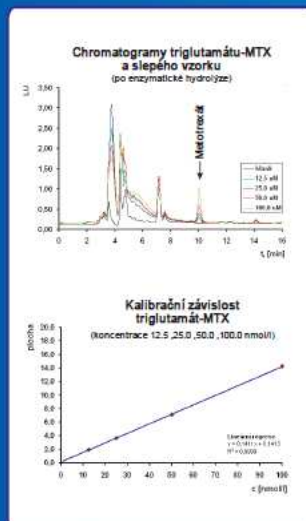


Výsledky

První skupina vzorků byla získána od nemocných s JIA (n=15), kterým byl MTX podáván v průměrné dávce 0,27 mg/kg p.o. Druhá skupina vzorků byla od nemocných s psoriázou (7 mužů, 17 žen, 48±10 let), kterým byl MTX podáván v dávce 7,5 - 22,5 mg/týden p.o., dělené do 3 dávek po 12 h. Ustálené hladiny PGMTX v ERY nemocných s psoriázou byly navozeny za 3-4 měsíce (obrázek 4). Tomu odpovídal i časový profil změn tíže onemocnění (PASI, obrázek 5). Četnost dosažení terapeutického úspěchu (pokles PASI o 50% resp. 75%) byla 18/24 res. 12/24 nemocných. Hladiny PGMTX v ERY responderů a non-responderů se však nelišily. Medián (rozsah) ustálených koncentrací PGMTX v ERY nemocných s JIA byl 19,4 (1,3-33,1 nmol/l).

Závěr

Popsaná metoda je ekonomická a vhodná pro rychlé stanovení koncentrací MTX v řádu desítek až stovek nmol/l, bez nutnosti složité přípravy vzorku. Na rozdíl od in vitro měření inhibiční aktivity PGMTX v ERY, výsledky HPLC stanovení koncentrací PGMTX nepredikují terapeutický účinek MTX u nemocných s psoriázou. Mohly by být využity pouze ke kontrole "compliance".



- 1) Derle T., Furst D., Lein D.O., Cappis R., Smith K., Walsh M., Kremer J., Arthritis Rheum. 2004 Sep; 50(9):2766-74
- 2) Derle T., Furst D., Lein D.O., Cappis R., Smith K., Caldwell J., Kremer J., Ann. Rheum. Dis. 2005 Aug; 64(8):1160-5
- 3) Angelis-Stavridis P., Valda F.J., Christopoulos N., Clin Exp Rheumatol. 1999 May; 17(3):313-20.
- 4) Weisels J.A.M., Viles-Bouwsira J.K., Heijmans B.T., Staggem P.E., Arthritis Rheum. 2006 Sep; 54(4):1067-95
- 5) Weisens M.H., Furst D.E., Park G.S., Kremer J.M., Wallace D.J., Carlswe J.R., Derleux T., Arthritis Rheum. 2006 Sep; 54(2):607-612
- 6) Schmittling H., Biber D., Heins S., Homel G., J. Rheumatol. 2005 Sep; 32(9):1632-5.
- 7) Doležalová P., Kříž J., Chládek J., Němcová D., Hoza J., J. Rheumatology (Oxford). 2005 Jan; 44(1):74-9
- 8) Schroder H., Helmwig E.M., Scand J. Clin. Lab. Invest. 1965 Nov; 45(7):57-9
- 9) Chládek J., Gím J., Maršálková J., Šimková M., Váncoková J., Štáta. Clin. Pharmacol. Toxicol. 2003 Mar; 96(3):247-248
- 10) Derle T., Lein D.O., Marcellini J., Paschel K., Smith K., Walsh M., Robinson R., Clin. Chem. 2003 Oct; 49(10):1632-41

projekt hrazen z grantu Ministerstva zdravotnictví IGA MFF7947-3/2004