Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Nikola Čalkovská

Analytické hodnocení vybraných léčiv v biologickém materiálu

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Studijní program: Farmacie

2016

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a patřičně citovány.

Tato práce nebyla použita pro získání stejného nebo jiného titulu.

V Hradci Králové dne 13. 5. 2016 Nikola Čalkovská

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce, doc. PharmDr. Petře Kovaříkové, Ph.D. za její ochotu, vedení, velkou trpělivost a cenné rady, které mi v průběhu vypracování diplomové práce věnovala. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Reimerové za pomoc a rady při vypracování této práce.

Tato práce byla financována grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 344615 a SVV 260291).

Obsah

Obsah 4
Seznam zkratek 7
Abstrakt 8
Abstrakt 9
Úvod 10
Teoretická část 12
1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 12
2.1. Schéma kapalinového chromatografu 13
2.1.1. Vysokotlaká čerpadla 13
2.1.2. Degasser 13
2.1.3. Autosampler 14
2.1.4. Kolona 14
2.1.5. Detektory 15
2.2. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) 16
2. Hmotnostní spektrometrie 18
2.1. Ionizace molekul 18
2.1.1. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmoshperic Pressure Chemical Ionisation - APCI) 19
2.1.2. Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI) 19
2.2. Analyzátory 19
2.2.1. Kvadrupól 20
2.2.2. Iontová past 21
2.2.3. Analyzátor doby letu 21
2.2.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) 21
2.3. Detekční módy 22
2.3.1. Chromatogram celkového iontového proudu (*Total Ion Current* – TIC) 22
2.3.2. Sken celého spektra (Full Scan) 22
2.3.3. Sken vybraného iontu (*Selective Ion Monitoring* – SIM) 22
2.3.4. Některé typy záznamů v tandemové hmotnostní spektrometrii 22
2.4. Detektory 23
3. Úprava vzorků biologického materiálu 23
3.1. Extrakce kapalina-kapalina (liquid liquid extaction - LLE) 23
3.2. Extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE) 24
3.3. Precipitace proteinů 25
4. Sobuzoxan 25
4.1. Inhibitory topoizomerázy II s interkalační aktivitou 25

4.2. Působení sobuzoxanu 26
4.3. Chemická charakteristika analyzovaných látek 28
Cíl práce 29
Experimentální část 30
5. Použité chemikálie, materiál, přístroje a pomůcky 30
5.1. Chemikálie 30
5.2. Chromatografický materiál 31
5.3. Přístroje 32
5.4. Pomůcky 33
6. Příprava roztoků 33
6.1. Příprava zásobních roztoků 33
6.2. Příprava standardních roztoků 33
7. Nastavení MS detekce 34
7.1. Iontová past 34
8. Vývoj chromatografických podmínek 37
8.1. Výběr stacionární fáze a mobilní fáze 37
8.2. Optimalizace složení mobilní fáze: 37
8.2.1. Izokratické metody pro HPLC-MS/MS 37
8.2.2. Gradientové metody pro HPLC-MS/MS. 37
8.3. Metody pro UHPLC-MS/MS 39
8.4. Výběr vnitřního standardu (IS) 40
8.5. Hodnocení linearity UHPLC-MS/MS metody 42
9. Úprava biologického materiálu 42
9.1. Plasma 42
9.1.1. Precipitace 43
9.1.2. Odstranění fosfolipidů 43
9.2. Buněčné medium 43
9.3. Ověření linearity v plazmě a buněčném mediu 43
9.3.1. Linearita stanovení v plasmě 43
9.3.2. Linearita stanovení v buněčném médiu 44
9.4. Stabilita sobuzoxanu v buněčném médiu 44
Výsledky a diskuze 45
10. Příprava roztoků 45
11. Nastavení MS detekce 45
12. Vývoj chromatografických podmínek 46
12.1. Výběr vnitřních standardů 49
12.2. Ověření linearity UHPLC-MS/MS metody 49

13. Úprava biologických roztoků 52
13.1. Ověření linearity UHPLC-MS/MS metody pro stanovení analytů v biologickém materiálu 53
13.2. Stabilita SBZ v buněčném médiu 57
Závěr 58
Seznam obrázků 59
Seznam tabulek 60
Citovaná literatura 61

Seznam zkratek

ACN - Acetonitril

ADR - 2,2´-{(1-propan-1,2diyl)bis[(2-amino-2oxoethyl)imino]}dioctová kyselina

ADR-IS - 1,2-diaminopropan-N,N,N´,N´-tetraoctová kyselina

DEX - Dexrazoxan

EDTAm - EDTA-diamid

eV - Elektronvolt

GK-450 - 4,4´-(propan-1,2-diyl)bis(1-bemzylpiperazin-2,6-dion)

H305 - 2,2´-{(1-oxoethan-1,2-diyl)bis[(2-amino-2-oxoethyl)imino]}dioctová kyselina

HPLC - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC – UV - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickým detektorem

ICRF-154 - 1,1-ethyl-3,5-dioxopiperazin

kV - Kilovolt

m/z - Poměru hmotnost a náboj

MPa - Megapascal

MS - Hmotnostní spektrometrie

MS/MS - Tandemová hmotnostní spektrometrie

SBZ - Sobuzoxan

SBZet - Bis(N1-ethyloxykarbonyloxymethyl-2,6-dioxopiperazin)

SBZpr - Bis(N1 –propyloxykarbonyloxymethyl-2,6-dioxopiperazin)

SRM - Sledování rozpadu iontu

UHPLC - Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Abstrakt

Bisdioxopiparaziny byly syntetizovány pro léčbu nádorů s významným antiproliferativním působením, ale mají nízkou biologickou dostupnost po perorálním podání. Proto byl vyvinut sobuzoxan. Byl připraven jako proléčivo bisdioxopiperazinu ICRF-154 pro zvýšení jeho biodostupnosti a usnadnění perorálního podání při léčbě lymfomů a leukémie. Předpokládá se, že je v těle metabolizován na aktivní metabolit ICRF-154, které by mohl být následně přeměněn na otevřený analog EDTA-diamid. Během preklinických výzkumů bisdioxopiperzinů bylo objeveno, že snižují nežádoucí účinky (kardiotoxcitu) antacyklinů. Největší kardioprotektivní potenciál má dexrazoxan, který je už 20 let používán v klinické praxi jako kadioprotektivum. Přesný mechanismus účinku antiproliferativního a kardioprotektivního působení, ale stále není objasněn. Proto bylo cílem této práce vyvinout UHPLC-MS/MS metodu umožňující současnou analýzu sobuzoxanu a jeho předpokládaných metabolitů, která by pomohla při studiu bioaktivace sobuzoxanu v srdečních buňkách, v buněčném médiu a plazmě.

Pro analýzu sobuzoxanu, ICRF-154 a EDTAm z plazmy a buněčného média byla vytvořena UHPLC-MS/MS metoda s gradientovou elucí. Pro separaci analytů byla použita chromatografická kolona Zorbax Sb-Aq (100 mm, 1,8 μm, Agilent) a jako mobilní fáze byl použit methanol a 1 mM mravenčan amonný. Analyty byly po ionizaci elektrosprejem detekovány pomocí trojitého kvadrupólu, na kterém byly nastaveny nejintenzivnější SRM přechody. Linearita metody byla ověřena pomocí pracovních roztoků v různém koncentračním rozmezí pro každý analyt. Následně byla také linearita testována v plazmě a buněčném médiu v jednotných koncentracích 2,5 až 150 μM pro sobuzoxan, ICRF-154 i EDTAm. Analýzy byly komplikovány různou polaritou analytů a špatnou rozpustností ICRF-154. ICRF-154 bylo rozpustné pouze v kyselině mravenčí, která snižovala ionizaci EDTAm. Následně byla testována stabilita sobuzoxanu v buněčném médiu, kde bylo zjištěno, že koncentrace sobuzoxanu klesala velmi rychle. Pro extrakci analytů z plazmy byla použita precipitace proteinů methanolem. Buněčné médium nebylo žádným způsobem upravováno, jen bylo naředěno 90% methanolem.

Vyvinutá metoda bude dále optimalizována pro použití při analýze srdečních buněk a plazmy a bude plně validována. Následně bude využita pro analýzu vzorků z pilotní studie bioaktivace sobuzoxanu.

Abstract

Bisdioxopiperazines have been synthesized for the treatment of tumors with a significant antiproliferative effect. However, they have low bioavailability after oral administration. Consequently, sobuzoxane has been developed. It has been prepared as a prodrug of bisdioxopiperazine ICRF-154 to increase its bioavailability and ease the oral administration for the treatment of lymphomas and leukemias. It is assumed that sobuzoxane is metabolized to an active metabolite of ICRF-154, and then supposedly converted to open analog EDTA-diamide. During preclinical researches of bisdioxopiperazines it has been discovered that they reduce the adverse effects (cardiotoxicity) of anthracyclines. Dexrazoxane has the greatest cardioprotective potential, so it has been used for 20 years as cardioprotective drug. The exact mechanism of antiproliferative and cardioprotective effects has not been fully understood yet. Therefore, the aim of this work is to develop UHPLC-MS / MS method which enables the simultaneous analysis of sobuzoxane and it is anticipated metabolites, which would help in studying bioactivation of sobuzoxane in cardiac cells, in cell medium, and in plasma.

There was developed UHPLC-MS/MS method with gradient elution for the analysis of sobuzoxan, ICRF-154 and EDTAm in plasma and cell medium. For the separation of analytes was used chromatographic column Zorbax Sb-Aq (100 mm, 1,8 μm, Agilent) and as a mobile phase was used methanol and 1 mM ammonium formate. After the electrospray ionization the analytes were detected using triple quadrupole with the most intensive SRM transitions. The linearity of this method was verified with the use of working solutions with different concentration for every analyte. After that, the linearity was tested in plasma and cell medium in uniform concentrations 2,5 – 150 μM for sobuzoxane, ICRF-154 and EDTAm. The analyzes were difficult because of the different polarities of analytes and poor solubility of ICRF-154. This substance was only soluble in the formic acid, which decreased ionization of EDTAm. Then the stability of subozoxane in cell medium was tested, and there was a discovery that the concentration of subozoxane was falling very quickly. For the extraction of analytes from plasma was used precipitation of proteins with methanol. The cell medium was not adjusted, it was only diluted with 90% methanol.

The developed method should be further optimized for the use in the analysis of cardiac cells and fully validated. Subsequently, it shall be used to analyze samples from the pilot study bioactivation sobuzoxane.

Úvod

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) je velmi oblíbená metoda pro svoji rychlost analýzy, účinnost separace a nízkou spotřebu rozpouštědel. Při tomto typu separace jsou použity chromatografické kolony s částicemi menšími, než jsou 2 μm. Tím dochází ke zvýšení tlaku v celém systému, který musí být navržen tak, aby byl schopen při vysokém tlaku účinně separovat analyty. UHPLC je hojně využívána při analýze léčivých látek v biologickém matriálu ke kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení.

Hmotnostní spektrometrie (MS) je moderní detekční technika, jejíž hlavní součástí je hmotnostní analyzátor, který rozděluje ionizované molekuly analytů podle jejich poměru hmotnosti a náboje. MS je využívána k identifikaci analytů a pro jejich kvantitativní stanovení. Při spojení UHPLC-MS vzniká metoda s vysokou citlivostí a selektivitou, umožňující analýzu nízkých koncentrací látek v biologickém materiálu (např. plazmě nebo buněčném médiu), což umožňuje její široké uplatnění při farmakokinetickém výzkumu.

Sobuzoxan byl syntetizován jako proléčivo bisdioxopiperazinů - ICRF-154, pro zvýšení biologické dostupnosti po perorálním podání. Předpokládá se tedy, že sobuzoxan je v těle aktivován na ICRF-154, které je pravděpodobně dále metabolizováno na EDTA-diamid. Je pravděpodobné, že aktivní metabolit ICRF-154 je inhibitor topoizomerázy II s antiproliferativním účinkem. Protože ICRF-154 je strukturně podobné dexrazoxanu, který je již registrován jako kardioprotektivum, předpokládá se, že by mohl také působit jako ochrana proti kardiotoxicitě antracyklinových cytostatik. I přes tento předpokládaný účinek je o sobuzoxanu a jeho ochraně myokardu před antracyklinovou toxicitou publikováno jen velmi málo studií.

Sobuzoxan je registrovaný a klinicky užívaný v Japonsku pro léčbu lymfomů, leukémií a různých typů nádorů. Známá je jen jedna metoda pro analýzu sobuzoxanu a ICFR-154 v plazmě. Tato HPLC-UV metoda byla vyvinuta již v roce 1991, ale bohužel neumožňuje současné stanovení sobuzoxanu a ICRF-154 v plazmě, ani jiném biologickém materiálu (buněčném médiu, srdečních buňkách a jiných tkáních). Navíc se tato metoda nezabývá stanovením EDTAm.

Proto se tato práce zabývá vývojem moderní UHPLC-MS/MS metody pro současné stanovení sobuzoxanu a jeho předpokládaných metabolitů (degradačních produktů) v plasmě a buněčném médiu. Tato metoda by následně mohla být využita pro analýzu při pilotních

zkouškách stability v plazmě a buněčném médiu, které by pomohly objasnit mechanismu bioaktivace sobuzoxanu.

Teoretická část

1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografické metody patří do skupiny separačních metod, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a stacionární fází pak může být pevná látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze protéká tímto sorbentem. Nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*-HPLC). Při tomto uspořádání je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku (1).

Aby byla umožněna distribuce analytu mezi stacionární a mobilní fázi, musí existovat fázové rozhraní. Při separaci pak dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografický systém se v ideálním případě může blížit rovnováze. Distribuci složek mezi dvě fáze pak lze pospat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D (1).

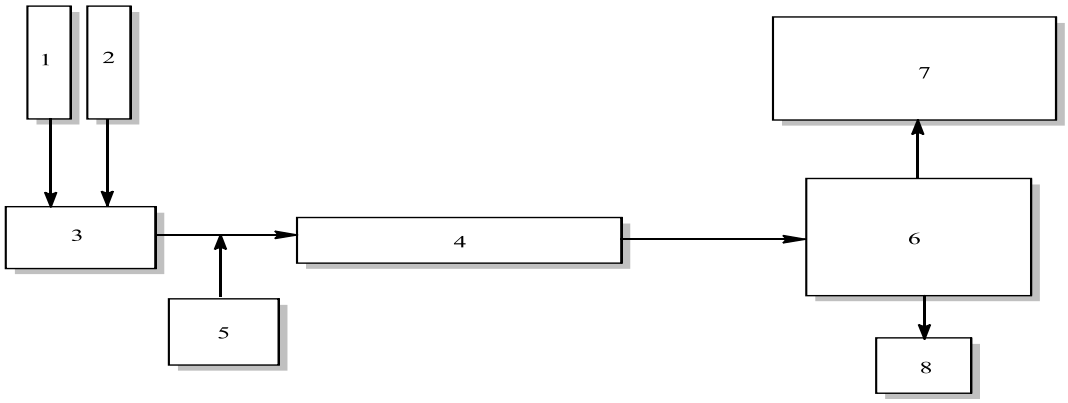
$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (1)$$

Kde c_s je koncentrace složky ve stacionární fázi a c_m je koncentrace složky v mobilní fázi (1).

Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty pro danou látku, tím delší dobu setrvají její molekuly ve stacionární fázi, a tím větší je její retence. Pro dělení jednotlivých látek kapalinovou chromatografií je tedy nutné, aby se lišily svými distribučními konstantami (1).

2.1. Schéma kapalinového chromatografu

Na obrázku 1 je uvedeno schéma kapalinové chromatografu.



Obrázek 1: Schéma HPLC: 1, 2 - zásobníky mobilní fáze, 3 - vysokotlaké čerpadlo, 4 - kolona, 5 - autosampler, 6 - detektor, 7 - počítač, 8 – odpad (1)

2.1.1. Vysokotlaká čerpadla

Čerpadla nasávají mobilní fázi přes filtr, aby nedošlo k poškození chromatografické kolony mechanickými nečistotami. Pro překonání odporu na koloně musí být kapalina čerpána pod tlakem (se snižující se velikostí částic na chromatografické koloně roste odpor, který musí kapalina překonat). Musí pracovat spolehlivě a přesně při tlacích do 100 MPa. Při těchto tlacích musí zůstat inertní i při použití agresivních mobilních fází, proto jsou vyráběny z nerezové oceli. Analytická HPLC čerpadla dosahují průtoků od 0,1 ml do 1,5 ml za minutu (2) (3).

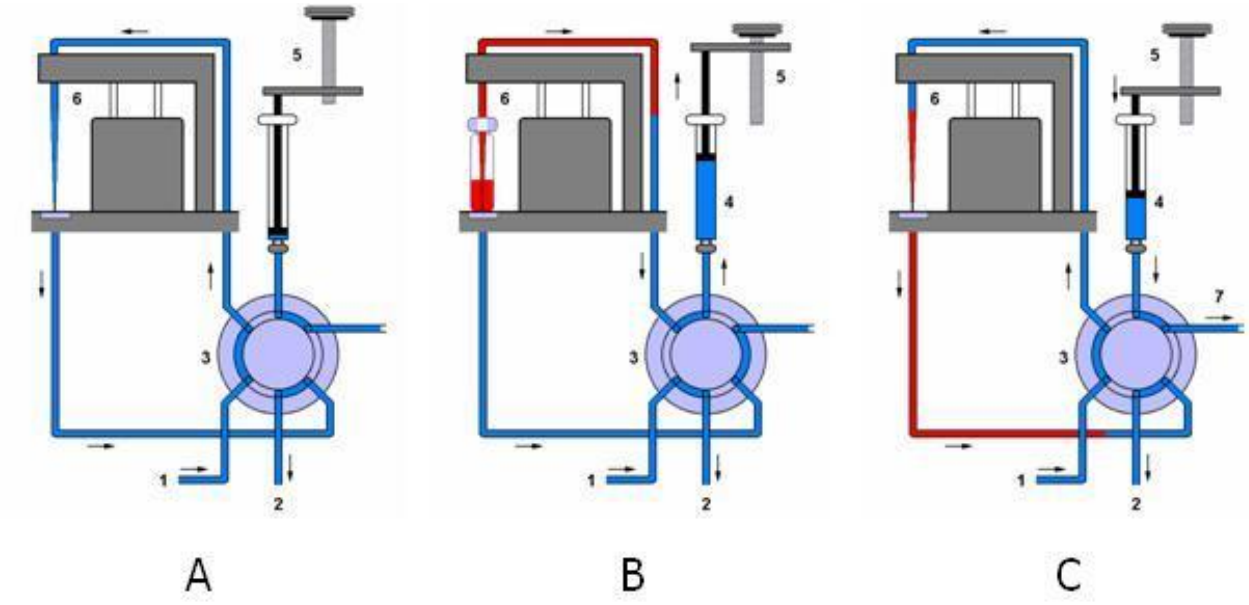
2.1.2. Degasser

Degasser je umístěn před vysokotlakým čerpadlem. Zde dochází k odplynění mobilní fáze pro minimalizaci problémů s citlivostí detekce, opakovatelností jak retenčních časů, tak dávkovaného objemu vzorku a nestabilitě provozu čerpadel. Odplynění může být provedeno pomocí ultrazvukových vibrací, pomocí helia, které probublává přes mobilní fázi, anebo filtrací přes filtr s jemnými póry (2) (3).

Pro částečné odstranění tlakových pulsů je možné zapojit dvě čerpací hlavy, které pracují v opačných fázích. Čerpadla vhánějí mobilní fázi do tlumiče pulzů, kde dochází k stlačení vnitřní části a tím dochází k utlumení tlakových pulzů (2) (3).

2.1.3. Autosampler

Automatické dávkovače jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené pryžovým septem. Zásobníky se vzorky jsou temperovány na 0-50°C a chráněny před světlem. Vzorek je dávkován (v objemech 5 až 50 µl) pomocí vícecestných ventilů, většinou jsou používány šesticestné ventily, kdy mobilní fáze protéká přes dávkovací jehlu, čímž je zajištěn kontinuální oplach jehly (obrázek 2A). Po přepnutí ventilu dochází k naplnění jehly na požadovaný objem přes krokový motor, který ovládá píst injekční stříkačky dávkovače (obrázek 2B). V tomto kroku mobilní fáze neprotéká přes dávkovací jehlu. Při dávkování dojde opět k přepnutí ventilu, čímž dochází ke změně toku mobilní fáze tak, že spolu se vzorkem prochází dávkovací jednotkou (obrázek 2C) a následně je injekční stříkačka je vyprázdněna do odpadu. Celý princip dávkování je ukázán na obrázku 2 (4) .



Obrázek 2 (4): Schéma šesticestného dávkovače: 1- čerpadlo, 2 - kolona, 3 – šesticestný ventil, 4 - píst injekční stříkačky, 5 – krokový motor, 6 – dávkovací jednotka, 7 – odpad (4)

2.1.4. Kolona

K analytickým účelům jsou dnes používány kolony o vnitřním průměru 2,1 až 4,6 mm, délce 5 až 25 cm, plněné náplněmi o velikosti částic 2 až 5 µm. Částice menší jak 2 µm se v HPLC nepoužívají, protože se zvyšuje odpor kolony, který musí mobilní fáze překonat a k tomu nejsou HPLC přístroje přizpůsobeny. Kolona je složena z kovového pláště, který je

uzavřen porézní kovovou fritou. Ta zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem a koncovou hlavicí, ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (1).

Materiál, ze kterého je zhotoven kovový plášť musí mít tyto vlastnosti:

1) Musí odolávat vysokým tlakům a to až 100 MPa
2) Materiál musí odolávat chemickému působení mobilní fáze
3) Vnitřní povrch pláště musí být dokonale hladký (1)

Kolona je naplněna stacionární fázi, kde dochází k vlastnímu separačnímu procesu. Na stacionární fázi jsou kladeny určité požadavky, které by měla splňovat. Měla by být tepelně stabilní, nesmí reagovat s mobilní fází a nesmí docházek k vymývání stacionární fáze. Nejrozšířenějším sorbentem je silikagel, který má polární charakter. Silanové skupiny mu udělují slabě kyselý charakter, proto je nutné, aby mobilní fáze měla rozmezí pH mezi 1,5 –7, aby nedošlo k zhroucení silanových skupin. Silikagel je často používán jako základ stacionárních fází, kdy jsou jeho hydroxylové skupiny modifikovány příslušnou chemickou reakcí s vhodnými organickými sloučeninami (např. alkyly, dioly, fenyly a aminopropyly, kyanopropyly atd.) na jejichž charakteru závisí selektivita připravené fáze. Dalšími sorbenty, které se využívají jako stacionární fáze, jsou oxidy (oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý), polymery a grafitový uhlík. Jejich výhodou je, že mají chemickou stabilitu v celém rozsahu pH a že je lze používat za vysokých teplot (1).

Jeden z nejvyužívanějších způsobů separace je retence na reverzních fázích, která se dá využít pro separaci různě polárních molekul. Kdy jsou látky s nižší polaritou více zadržovány, než látky s vyšší polaritou. Při tomto typu separace je mobilní fáze obvykle polární směs vodné složky s organickými rozpouštědly, která jsou mísitelná s vodou. Stacionární fáze má nepolární charakter, nejčastěji jsou to dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrchovém nosiči (např. silikagel, kovové oxidy). Při tomto typu separace vnikají mezi analytem a absorbentem nespecifické mezimolekulové interakce, které jsou mnohem slabší než polární interakce mezi mobilní fází a analytem. Polární interakce zeslabují nespecifické interakce mezi molekulami analytů a stacionární fází. Ulehčují tak, návrat molekul analytu do polární mobilní fáze (1).

2.1.5. Detektory

Detektory slouží ke snímání přítomnosti sloučenin v mobilní fázi při průchodu detektorem a poskytují elektrický signál (5).

Na detektor jsou kladeny tyto požadavky:

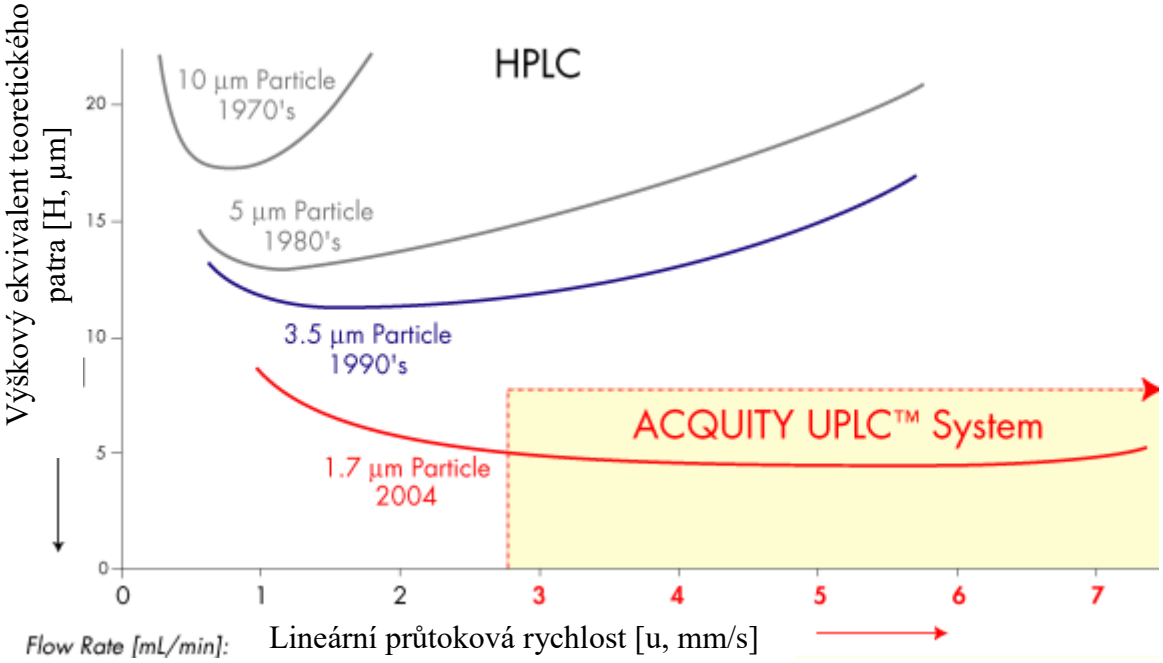
- možnost detekce všech přítomných komponentů (univerzálnost)
- vysoká odezva a linearita detektoru
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- co nejmenší mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón
- umožnit gradientovou eluci (1)

Mezi detektory používané v HPLC patří spektrofotometrický, fluorescenční, elektrochemický, vodivostní, hmotnostní spektrometr a další.

2.2. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

UHPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatogrpahy*) je HPLC metoda, ve které mají částice stacionární fáze velikost menší, jak 2 μm. Nevýhodou takto malých částic je, že se zvyšuje zpětný tlak kolony, který je třeba překonat nad 100 MPa. Proto musí být systém navržen tak, aby čerpadlo dokázalo pracovat při vysokém tlaku. Autosampler by měl být schopen rychlého a přesného nástřiku i při nízkém objemu. Kolona by měla mít menší průměr vnitřní části 2,1 mm a odolávat vysokému tlaku. Detektor by měl být dostatečně rychlý pro sběr dat s vysokou citlivostí a nízkou mezí detekce (6) (7).

Princip UHPLC je tedy založen na stacionární fázi skládající se z částic menších než 2 μm, čímž se mění průtoková rychlost mobilní fáze, aby byla zachována účinnost separace, která je vyjádřena jako výškový ekvivalent teoretického patra H přímo úměrný druhé odmocnině velikosti částic. Celý proces popisuje van Deemterova křivka na obrázku 3, kdy minimum van Deemterovy křivky odpovídá nejnižší dosažené hodnotě H, tedy optimální účinnosti za daných podmínek (1).



Obrázek 3: van Deemterova křivka (4)

Výhody

- Vyšší účinnost a rychlost separace
- Vyšší citlivost – ostřejší píky
- Nižší spotřeba rozpouštědla

Nevýhody

- Vyšší cena přístrojů, náhradních dílů a kolon
- Nelze využít všechny typy detektorů
- Omezený počet stacionárních fází

Možnost využití

- Analýzy komplexních směsí
- Analýza velkého množství sloučenin
- Při spojení s hmotnostním spektrometrem získání lepšího spektra (zvýšený poměr signálu k šumu) (1)

2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, při které dochází k ionizaci molekul analyzované látky a následně k rozdělení a identifikaci kladných nebo záporných iontů v plynné fázi v závislosti na poměru hmotnosti a náboje (m/z). Informace, které dostaneme o analyzované molekule, jsou kvalitativní (určení molekulové hmotnosti, informace o struktuře) a kvantitativní (s použitím vnitřního standardu) (8) (9) (10).

Všechny hmotnostní spektrometry se skládají ze tří základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor částic (8) (9) (10).

Spojení HPLC/MS se využívá pro analýzu vzorků z biologického materiálu, protože obsahuje mnoho komponentů. Spojení separační techniky se specifickým detektorem je velice výhodné pro zvýšení citlivosti a selektivity metody (1).

Ve spojení HPLC/MS se mobilní fáze stává součástí ionizačního procesu, proto nelze použít jakékoliv rozpouštědlo, ale jen určitý typ. Nejvhodnějšími rozpouštědly jsou těkavá rozpouštědla (acetonitril, methanol) s malým přídavkem těkavých aditiv (do 1%), protože při zvýšené koncentraci dochází k soupeření o náboj při procesu ionizace, a tím ke snížení signálu ionizovaných molekul analytu (1).

2.1. Ionizace molekul

Při spojení HPLC s MS musí dojít k převedení analyzované látky do plynné fáze a odstranění velkého množství mobilní fáze. Při tomto spojení je také problém s tím, že ionizace molekul probíhá ve vakuu, kdežto separace molekul v HPLC probíhá za atmosférického tlaku. Tento problém byl vyřešen navržením speciálních ionizačních technik pro spojení hmotnostní spektrometrie a kapalinové chromatografie, kdy ionizace probíhá taktéž za atmosférického tlaku (11).

Nejvyužívanějšími technikami pro ionizaci v HPLC/MS jsou chemická ionizace za atmosférického tlaku, ionizace elektrosprejem a fotoionizace za atmosférického tlaku. Všechny techniky patří mezi „měkké“ ionizační techniky, což znamená, že při ionizaci dochází ke vzniku protonovaných nebo deprotonovaných molekul a ne k fragmentaci molekul, jako u tvrdých ionizačních technik (1) (11).

2.1.1. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmoshperic Pressure Chemical Ionisation - APCI)

Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku je mobilní fáze, která vystupuje z chromatografické kolony čerpána do kapiláry. Na konci této kapiláry dochází k rozprášení eluátu pneumatickým zmlžovačem. Vzniklý aerosol je rychle odpařen při vysoké teplotě (až 600 °C). Vložením napětí na výbojovou jehlu dochází ke vzniku koronárního výboje, jímž jsou nejdříve ionizovány molekuly mobilní fáze přítomné v plynné fázi, protože jsou ve velkém přebytku. Následně jsou ionizovány molekuly analytu ion-molekulárními reakcemi s reakčním plynem (ionty vzniklé z mobilní fáze). Tato technika je vhodná pro malé (M_R do 1500) organické molekuly (11) (14).

2.1.2. Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI)

Ionizace probíhá aplikací vysokého napětí (2 - 5 kV) na kapiláru, do které vstupuje mobilní fáze s analyty, takže malé kapičky vznikající na výstupu z kapiláry nesou vlivem vysokého elektrického pole kladný nebo záporný náboj podle polarity vloženého napětí na kapiláru. Tvorba aerosolu je podporovaná koaxiálně proudícím zmlžujícím plynem. Rozpouštědlo je z nabitých kapiček během velmi krátkého času postupně odpařováno proudem plynu a zvýšenou teplotou, čímž se zvyšuje jejich povrchový náboj. Coulombické odpuzování v jistém okamžiku překoná povrchové napětí a dochází k explozi nabité kapičky za vniku menších kapiček, mezi kterými je distribuován původní náboj. Následně dochází ke vzniku iontů dvěma mechanizmy - buď vznikne zbytkový náboj (odpaření rozpouštědla z nabité kapičky za vzniku iontů), nebo vypařením iontů (povrchové napětí vytrhne ion analytu z kapičky) (8) (9) (12).

K ionizaci touto metodou jsou vhodné středně polární i iontové látky s malou i velkou molekulovou hmotností (8).

2.2. Analyzátory

Po ionizaci putují ionizované molekuly do analyzátoru, kde dojde k jejich separaci dle poměru hmotnost a náboj (m/z) v elektrickém nebo magnetickém poli, či jejich kombinaci, aby mohly být poté detekovány. Separace na rozdíl od ionizace probíhá ve vysokém vakuu (13).

Mezi hlavní charakteristiky analyzátoru patří:

- rozlišovací schopnost (rozlišení) – schopnost analyzátoru poskytnout rozlišené signály pro ionty s podobnou m/z
- správnost určení m/z - míra schopnosti analyzátoru určit správnou hodnotu m/z
- hmotnostní rozsah – rozsah m/z hodnot, přes který analyzátor může zaznamenat spektra
- dynamický rozsah - rozmezí koncentrací, v nichž je odezva (lineárně) závislá na koncentraci
- rychlost – rychlost záznamu spekter (14)

Mezi dvě běžné kategorie hmotnostní spektrometrie patří hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) a hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením (LRMS). Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením mohou měřit hmotnost tak přesně, že jsou detekovány nepatrné rozdíly v hmotnosti mezi dvěma sloučeninami, které by se zdály být identické při detekci hmotnostními spektrometry s nízkým rozlišením (18).

Mezi nejčastěji analyzátory, ve spojení HPLC/MS, patří kvadrupól, iontová past a analyzátor doby letu.

2.2.1. Kvadrupól

Kvadrupól se skládá ze čtyř kovových tyčí paralelně uspořádaných do čtverce. Na dvě protilehlé tyče je vždy přivedeno stejnosměrné napětí kladné a na druhé dvě záporné a na všechny čtyři tyče je superponováno střídavé napětí. Ionty jsou směřovány do středu kvadrupólu kde začínají kmitat. V určitém poměru stejnosměrného a střídavého napětí, jsou stabilní pouze ionty s určitým poměrem m/z, které projdou kvadrupólem až k detektoru. Ostatní nestabilní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu (13) (16).

Kvadrupól se hodí spíše pro kvantitativní stanovení. (13).

Trojitý kvadrupól

Velmi populární díky cenové dostupnosti, vysoké citlivosti, specificitě a robustnosti při analýze složitých biologických matric. V principu jsou zde umístěny tři kvadrupóly za sebou, prostřední z nich (q2) slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem, který způsobuje

kolizní excitaci vybraných iontů kvadrupólovým analyzátorem Q1 a jejich následnou fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí Q3 (9) (16).

2.2.2. Iontová past

Tento typ analyzátoru je typ kvadrupólu, který se skládá z 2 kruhových elektrod, na které je dáno střídavé napětí a prostor mezi nimi je uzavřen 2 dalšími elektrodami, na které je přiváděno stejnosměrné napětí. Ionty, které vstoupí do pasti otvorem ve vstupní elektrodě, jsou „uvězněny“ v elektromagnetickém poli, díky vhodným poměrům stejnosměrného a střídavého napětí. Postupnou změnou napětí jsou ionty vypuzovány výstupním otvorem koncové elektrody (13) (16).

Tento typ analyzátoru je vhodný jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní hodnocení (13).

2.2.3. Analyzátor doby letu

Tento analyzátor je založen na tom, že všechny ionizované molekuly jsou urychleny napěťovým pulzem do letové trubice. Měříme čas potřebný k průletu iontu letovou trubicí až k detektoru. Ionty s menším poměrem m/z letí rychleji než ty s větším poměrem m/z při stejné kinetické energii (13) (16).

Nejrychlejší MS analyzátor s vysokým hmotnostním rozsahem a vysokou citlivostí (13).

2.2.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Jde o kombinaci hmotnostních analyzátorů, ve které první hmotnostní analyzátor (MS1) provádí výběr prekurzorového iontu. Vybraný ion podléhá kolizně indukované disociaci (CID) a dochází k jeho fragmentaci, druhý hmotnostní analyzátor (MS2) provádí hmotnostní analýzu produktových iontů. Tato uspořádaní nacházejí značné uplatnění při identifikaci látek v komplexních směsích, pro kvantifikaci látek ve vzorcích nebo při fragmentačních experimentech, především ve spojení s měkkými technikami, kde v iontovém zdroji získáváme pouze molekulární ion. Nejčastější spojení v tandemové hmotnostní spektrometrii je trojitý kvadrupól, kvadrupól spojený s analyzátorem doby letu nebo iontovou cyklotronovou rezonancí a iontová past spojená s iontovou cyklotronovou rezonancí nebo orbitrapem (1) (9).

2.3. Detekční módy

2.3.1. Chromatogram celkového iontového proudu (*Total Ion Current* – TIC)

Je to signál hmotnostního spektra v závislosti na intenzitě. V každém bodě TIC lze získat kvalitativní informaci v podobě spektra, ze záznamu lze také kdykoliv extrahovat chromatogram určitého iontu, který slouží k rozlišení koelucí nebo iontů chromatografického pozadí (1).

2.3.2. Sken celého spektra (Full Scan)

Měření hmotnostního spektra v plném jeho rozsahu m/z. Podává kompletní informace o iontech vzniklých z analyzované látky (1).

2.3.3. Sken vybraného iontu (*Selective Ion Monitoring* – SIM)

Selektivní záznam jednoho nebo více vybraných iontů z celého spektra, slouží k zvýšení citlivosti hmotnostního analyzátoru pro daný ion (1).

2.3.4. Některé typy záznamů v tandemové hmotnostní spektrometrii

Sken produktových iontů

MS1 propouští ion s definovanou hodnotou m/z, který je následně fragmentován v kolizní cele (CID). MS2 pracuje v režimu skenování v definovaném rozsahu m/z. Všechny vzniklé fragmenty jsou zaznamenávány detektorem. Získáváme kompletní informaci o fragmentaci vybraného iontu. Tento typ spektra je využíván k objasnění struktury analytu (1) (9).

Sken prekurzorových iontů

MS1 pracuje v režimu skenování m/z, čili postupně propouští do kolizní cely ionty se zvyšující se hodnotou m/z, kde jsou následně fragmentovány. MS2 po celou dobu propouští pouze jeden specificky fragment, který je detekován. Tento sken je používán pro identifikaci strukturně blízkých látek ve směsi (9).

Sledování rozpadu iontu

V tomto módu (*Selected Reaction Monitoring* - SRM) MS1 slouží k výběru iontu prekurzoru, který je v kolizní cele fragmentován za podmínek optimální kolizní energie pro nejintenzivnější produktový ion, který je vybrán pomoci MS2. Kvalitativní parametr

definovaný dvěma hodnotami m/z odpovídající prekurzorovému a produktovému iontu se nazývá hmotnostní přechod. SRM je velmi selektivní a současně mimořádně citlivý mód, který se používá pro kvantifikaci. Další výhodou je vysoká rychlost měření, proto je možné během analýzy pomocí SRM měřit až stovky analýz, což je poněkud nepřesně označováno, jako (*Multiple reaction monitoring* - MRM) (1) (9).

2.4. Detektory

Ionty, které prošly hmotnostním analyzátorem, mohou být elektricky detekovány. Výběr detektorů je založen na požadované citlivosti detekce a rychlosti. Dále je určen dalšími požadavky pro konkrétní aplikace, jako je například tepelná a chemická stabilita (16) (17).

3. Úprava vzorků biologického materiálu

Před vlastní analýzou je nutné odstranit balastní látky z biologického matriálu (plazma, sérum, moč, tkáňové extrakty), protože analyt je obsažen v minimálním množství oproti endogenním látkám (proteiny, lipidy, soli atd.), které snižují citlivost a selektivitu metody pro daný analyt. Dalším důvodem je také reakce mezi mobilní fází a balastními látkami, kdy vznikají nerozpustné komplexy (př. precipitované proteiny), které mohou ucpat chromatografickou kolonu (15).

3.1. Extrakce kapalina-kapalina (liquid liquid extaction - LLE)

LLE je metoda používaná pro separaci směsi do dvou nemísitelných rozpouštědel. Ve většině LLE se jedná o vodný roztok (biologický vzorek) a organické rozpouštědlo. Pří této extrakci se analyty rozdělují do těchto fází na základě své polarity.

Distribuce dle Nernstovy rovnice, kde KD je distribuční konstanta, Co je koncentrace analytu v organické fázi a C_{AQ} je koncentrace analytu ve vodné fázi (18).

$$KD = Co / C_{AQ} \quad (17)$$

Pro extrakci je také důležité, jestli je extrahovaný analyt neutrální, nebo jestli je kyselý či bazický. Pokud má kyselou nebo bazickou povahu, musí dojít k úpravě pH, aby byla potlačena ionizace a látka mohla ochotněji projít do organického rozpouštědla. Proto jestli jde

o kyselou látku, musí být pH o dvě hodnoty nižší, než je hodnota pKa analytu a pokud je analyt zásaditý, musí být pH o dvě hodnoty vyšší než je pKa analytu (15) (18).

Při provedení LLE tedy dochází k úpravě pH vzorku, pokud je to potřeba. Následně je přidáno rozpouštědlo, které se nemísí s vodou, celá soustava je po určitou dobu třepána. Vrstvy jsou od sebe odděleny pomocí centrifugace. Organická vrstva, která obsahuje analyt, je odpařena. Zbytek po odpaření je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle (v mobilní fázi) a analyzován. Pro větší výtěžnost je zapotřebí extrakci opakovat (15).

Výhodou LLE je, že je to jednoduchá a relativně efektivní technika (výtěžnost až 90%). Mezi nevýhody patří velká spotřeba rozpouštědla (není to ekonomické, ani ekologické), časová náročnost a možná tvorba emulze při třepání dvou nemísitelných rozpouštědel (18).

3.2. Extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE)

Extrakce na pevné fázi částečně nahradila klasickou extrakci kapalina-kapalina. Principem je zadržování organických molekul na stacionární fázi, která je umístěna ve formě sloupce v malé kolonce. Hlavním cílem SPE je dosáhnout izolace, zakoncentrování a čistoty vzorku v jednom kroku. Toho může být dosaženo vhodným výběrem typu sorbentu, nebo jejich kombinací (18) (20).

Proto se při výběru sorbentu využívá specifických interakcí vyplývajících z polarity analytu, iontové povahy analytu nebo přítomnosti specifických funkčních skupin. Při SPE se používají tyto stacionární fáze:

A) Reverzní fáze zahrnuje polární nebo mírně polární vzorek (mobilní fáze) a nepolární stacionární fázi. Extrahovaný analyt je nepolární. Jako reverzní fáze pro SPE jsou využívány sorbenty na bázi oxidu křemičitého s vázanými alkyly (C18, C8) nebo fenylem. Dále je využíván grafitový uhlík a polymery.

B) Normální fáze zahrnují mírně polární až nepolární vzorek (mobilní fáze) a polární stacionární fáze. Extrahovaný analyt je polární. Polární stacionární fáze je silikagel samotný nebo s navázanými polárními skupinami (CN, NH_2, OH)

C) Iontově výměnná SPE slouží k izolaci sloučenin, které jsou ve vodném vzorku (mobilní fáze) záporně nabité (anionty), které mohou být izolovány pomocí kvartérních aminů vázáných na povrchu oxidu křemičitého. Nebo kladně nabité (kationty), které jsou izolovány pomocí sulfonových kyselin navázaných na oxidu křemičitém (18) (19).

Při provedení extrakce nejdříve kolonku propláchneme předepsaným rozpouštědlem, aby došlo k aktivaci stacionární fáze pro interakci s analytem. Následně propláchneme vhodným rozpouštědlem, čímž je upraveno prostředí kolonky pro vzorek. Pak naneseme vzorek do kolonky. Při tomto kroku dochází k absorpci analytu na stacionární fázi. Po tomto kroku dojde opět k promytí kolonky vhodným rozpouštědlem, aby došlo k vymytí zbytků biologické matrice z kolonky. Potom už jen promýváme kolonku elučním rozpouštědlem, aby došlo k desorpci analytu do eluátu (20).

Výhodou je práce s menšími objemy vzorků, jednoduché provedení (rychlé a levné), snadná automatizace. Nevýhodou je, že nejsou na trhu vhodné kolonky – nespecifická izolace analytu (18).

3.3. Precipitace proteinů

Toto je velmi jednoduchá technika pro extrakci analytu z matrice, která je založena na precipitaci (srážení) proteinů vhodným činidlem (rozpouštědlem). Mezi vhodná rozpouštědla patří organická rozpouštědla, jako je acetonitril nebo methanol, silné kyseliny (chloristá, trifluroctová, trichloroctová atd), soli vícemocných iontů (síran zinečnatý nebo měďnatý, hydroxid barnatý atd). Po přidání těchto rozpouštědel dochází ke k precipitaci proteinů. Následně je vzorek centrifugován po dostatečně dlouhou dobu, až jsou všechny vysrážené složky biologické matrice na dně a je oddělen čirý supernatant, který je přefiltrován a analyzován (15) (18).

Precipitace se používá pro odstranění proteinů z plazmy, séra a moči. Metoda je rychlá a jednoduchá. Nevýhodou ale zůstává, že odstraní pouze proteiny a také možná vazba analytu na precipitát (15).

4. Sobuzoxan

4.1. Inhibitory topoizomerázy II s interkalační aktivitou

Topoizomerázy jsou nukleární enzymy, které mají zásadní význam pro hladký průběh replikace. Dvojspirála DNA prodělává torzi kolem vlastní osy, což může vést k překroucení a indukci zlomu v jednom či obou řetězcích dvoušroubovice DNA. Topoizomeráza I se váže na jeden řetězec DNA, který rozpojí, uvolní nadměrnou torzi a přerušený řetězec opět spojí, což umožní kontinuitu replikačního procesu. Topoizomeráza II se váže na oba řetězce

dvoušroubovice, působí jejich přerušení a opětovné spojení. Umožní tak separaci chromozomů při mitóze (21).

Mezi inhibitory topoizomerázy II patří antracykliny (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin a idarubicin), které se používají k léčbě lymfomů, leukémií, karcinomu prsu, ovarií, močového měchýře, plic a dalších. Dalším mechanizmem účinku těchto léčiv je interkalace, kdy se molekula cytostatika vmezeří mezi dvojšroubovici DNA, kde se naváže vodíkovými můstky a inhibuje replikaci a transkripci (22) (23).

Antracyklinová cytostatika mají velký kardiotoxický účinek, který vzniká působením kyslíkových nebo hydroxylových radikálů, jenž vnikají při metabolizaci antracyklinů.
Po opakovaném podávání antracyklinů pak postupně dochází destrukci cardiocytů, která vede k těžkému poškození funkce srdce (23).

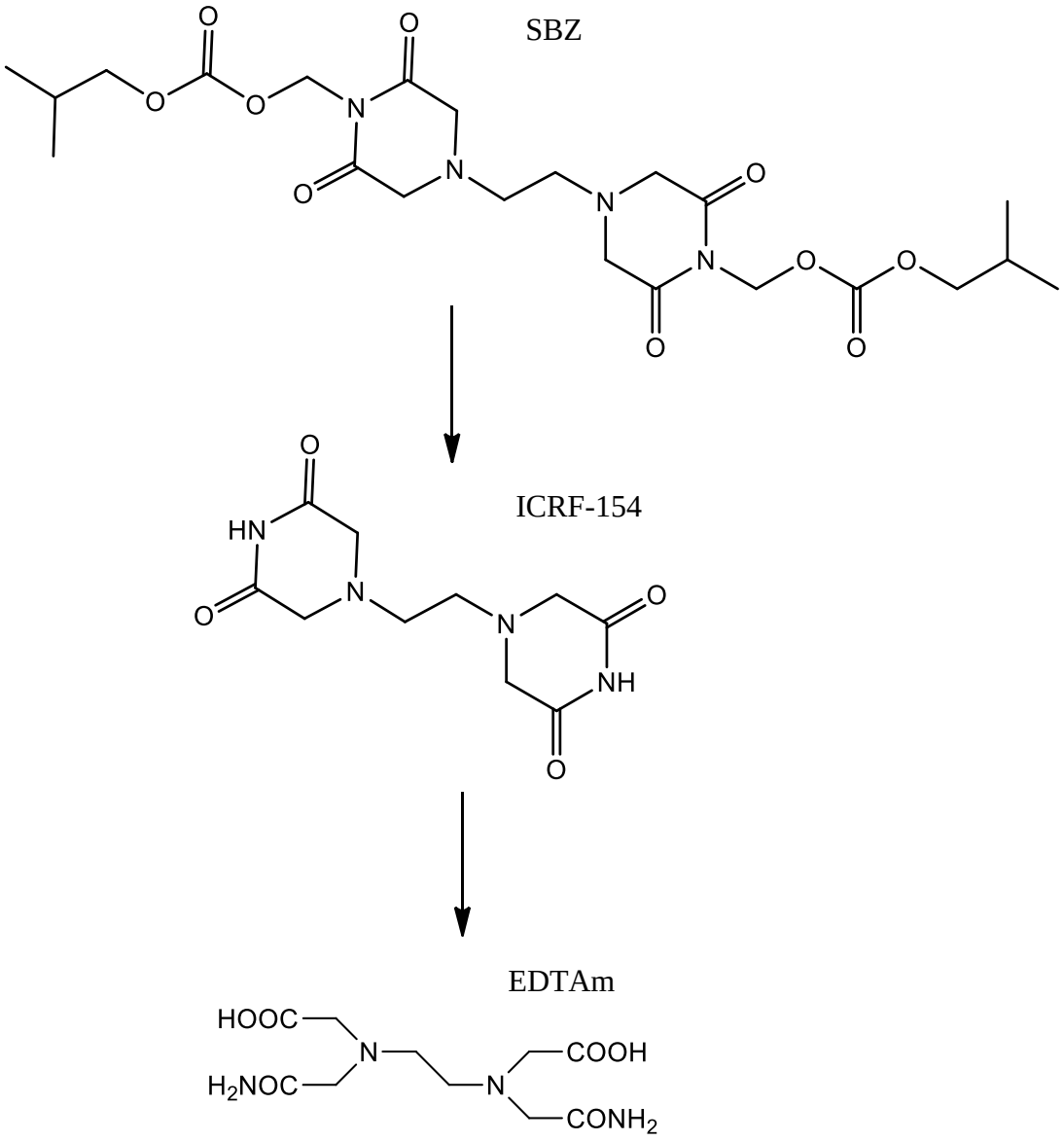
4.2. Působení sobuzoxanu

Sobuzoxan je derivátem bisdioxopiperazinu, který patří do skupiny inhibitorů topoizomerázy. Byl vyvinut pro perorální podání, protože předcházející léčiva odvozená od bisdioxopiperazinu se špatně absorbovala z gastrointestinálního traktu. Sobuzoxan je proléčivo, které se v buňce zřejmě aktivuje, za odštěpení formaldehydu, oxidu uhličitého a jiných molekul na účinnou látku 1,1-ethyl-3,5-dioxopiperazin (ICRF-154), které je inhibitorem topoizomerásy II. Dá se předpokládat, že ICRF-154 by mohl být v organismu dále metabolizován na 2,2´-{(1-ethan- 1,2diyl)bis[(2-amino-2oxoethyl)imino]}dioctovou kyselinu (EDTA-diamid). Schéma předpokládané metabolické přeměny sobuzoxanu je uvedeno na obrázku 4. Pro klinické užití, léčbu leukémie, lymfomů a některých nádorů, je sobuzoxan schválen v Japonsku. Bylo také objeveno, že při současné terapii s antracykliny zvyšuje tvorbou duktů (antracyklinu a DNA), čímž je urychlena apoptóza nádorových buněk, což následně vede ke snížení dávek těchto cytostatik, nebo se dá také využít při snížené odpovědi na léčbu antracykliny. Dosud není jasné, jestli se inhibice topoizomerásy II účastní pouze ICRF-154 nebo i sobuzoxan (24) (25).

Při preklinických studiích bisdioxopiperazinů došlo k objevení ochrany tkání (zejména myokardu) před působením antracyklinů. Jako kardioprotektivum je zatím schválen jen dexrazoxan (derivát bisdioxopierazinů), který je v těle matbolizován na ADR-925. Tomuto metabolitu je zatím připisován kardioprotektivní účinek, kdy dochází k chelataci kovů (volného železa), které následně nemůže tvořit komplex s antracykliny za vzniku kyslíkových radikálů, které poškozují srdce. Nové studie naznačují možnost jiného mechanizmu účinku - inhibice β topoizomerásy II, která je specifická pro srdce, parentní látkou (dexrazoxanem). I přesto, že

je dexrazoxan tak dlouho používán, není znám přesný mechanizmus kardioprotekce a navíc panují obavy, že snižuje účinek antracyklinů (24) (25).

Proto že je ICRF-154 strukturně podobný s dexrazoxanem a EDTA- diamid s ADR-925, dá se předpokládat, že mechanismus účinku kardioprotekce bude podobný, možná i stejný (24) (25).



Obrázek 4: Metabolismus sobuzoxanu (24) (25)

4.3. Chemická charakteristika analyzovaných látek

Sobuzoxan

Chemický název: Bis(N1-isobutyloxykarbonyloxymethyl-2,6-dioxopiperazin)

Sumární vzorec: $C_{22}H_{34}N_4O_{10}$

Relativní molekulová hmotnatost: 528,55

ICRF-154 (kódové označení dané substance)

Chemický název: 1,1-ethyl-3,5-dioxopiperazin

Sumární vzorec: $C_{10}H_{14}N_4O_4$

Relativní molekulová hmotnatost: 254,24

EDTA-diamid

Chemický název: 2,2´-{(1-ethan-1,2diyl)bis[(2-amino-2oxoethyl)imino]} dioctová kyselina

Sumární vzorec: $C_{10}H_{22}N_4O_6$

Relativní molekulová hmotnatost: 294,31

Chemické struktury analyzovaných látek jsou uvedeny na obrázku 4.

Cíl práce

Cílem této práce je vyvinout UHPLC-MS/MS metodu pro současnou analýzu sobuzoxanu a jeho předpokládaných metabolitů (rozkladných produktů), ověřit linearitu metody pro stanovení těchto analytů v biologickém materiálu a v pilotním experimentu hodnotit stabilitu sobuzoxanu v buněčném médiu za fyziologicky relevantních podmínek.

Experimentální část

5. Použité chemikálie, materiál, přístroje a pomůcky

5.1. Chemikálie

1,1-ethyl-3,5-dioxopiperazin (ICRF-154), Sigma Aldrich, Německo

1,2-diaminopropan-N,N,N´,N´-tetraoctová kyselina (ADR-IS) Sigma Aldrich, Česká republika

2,2´-{(1-ethan- 1,2diyl)bis[(2-amino-2oxoethyl)imino]}dioctová kyselina, EDTA-diamid (EDTAm), syntetizována na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze, Česká republika

Acetonitril LC-MS čistoty, Merck, Německo

2,2´-{(1-propan-1,2diyl)bis[(2-amino-2oxoethyl)imino]}dioctová kyselina (ADR), syntetizována na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci králové Univerzity Karlovy Praze, Česká republika

Amoniak, Sigma Aldrich, Česká republika

Bis(N1-ethyloxykarbonyloxymethyl-2,6-dioxopiperazin) (SBZet), syntetizován na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci králové Univerzity Karlovy v Praze, Česká republika

Bis(N1-isobutyloxykarbonyloxymethyl-2,6-dioxopiperazin), sobuzoxan (SBZ), syntetizován na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy, Česká republika

Bis(N1 –propyloxykarbonyloxymethyl-2,6-dioxopiperazin) (SBZpr), syntetizován na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci králové Univerzity Karlovy v Praze, Česká republika

Buněčné médium, Dulbeccova modifikace Eaglova media, Lonza, Švýcarsko

Čištěná voda připravená reverzní osmózou (Millipore purification system), Merck-Milipore, Německo

1,1´-propyl-3,5-dioxopiperazin, dexrazoxan (DEX), syntetizována na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci králové Univerzity Karlovy v Praze, Česká republika

Draselná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny, Sigma Aldrich, Česká republika

4,4´-(propan-1,2-diyl)bis(1-bemzylpiperazin-2,6-dion) (GK-450), syntetizován na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci králové Univerzity Karlovy v Praze, Česká republika

2,2´-{(1-oxoethan-1,2-diyl)bis[(2-amino-2-oxoethyl)imino]}dioctová kyselina (H305), syntetizována na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci králové Univerzity Karlovy v Praze, Česká republika

Králičí plazma, Zooservis Dvůr Králové nad Labem, Česká republika

Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich, Česká republika

Methanol LC-MS čistoty, Sigma Aldrich, Česká republika

Mravenčan amonný, Fluka Analytical, Německo

U veškerých substancí připravených na Katedře anorganické a organické chemie byla prokázána totožnost pomocí NMR a MS.

5.2. Chromatografický materiál

Kolony

Hypercarb (3x100 mm, 3 μm,), Thermo Scientific, Massachusetts, USA

Zorbax Sb-Aq (3x150 mm, 3,5 μm), Agilent, Kalifornie, USA

Zorbax Sb-Aq (3x100 mm, 1,8 μm,), Agilent, Kalifornie, USA

Synergi 4u Polar – RP (3x150 mm nebo 75 mm, 4 μm), Phenomenex, Kalifornie USA

Předkolona:

Acquity UPLC ® BEH C18 1.7μm VanGuard (2,1x5 mm 1,7 μm), Waters, Irsko

5.3. Přístroje

Chromatografické systémy:

1/HPLC-MS/MS

Hmotnostní spektrometr LCQ Advance MAX, Thermo Finnigan (Massachusetts, USA) s iontovou pastí (ESI^+ ionizace) spojený s HPLC Shimadzu prominence sestavou (Shimadzu, Japonsko).

HPLC sestava Shimadzu Prominence -20A3 degasser, dvě LC-20AD pumpy, SIL-20AC auto sampler, CTO-20AC column oven, CBM 20A komunikační modul připojený k PC. Chromatografický program Thermo Finnigan Xcalibur software, Thermo Finnigan (Massachusetts, USA)

2/ UHPLC-MS/MS

Trojitý kvadrupól LCMS-8030, Shimadzu, Japonsko spojen s UHPLC Nexera X_2 (Shimadzu, Japonsko).

UHPLC sestava Nexera X_2 Shimadzu – degasser 20 A_5 , dvě 2C- 30 AD pumpy, CTO - 30A column oven. Chromatografický program LabSolutions (Shimadzu, Japonsko).

Další přístroje:

Analytické váhy, Kern, Česká republika

Ultrazvuková lázeň K10, Kraintek, Slovenská republika

Centrifuga, Thermo Finnigan, Massachusetts, USA

Vortex Wizard, Scientifica, Itálie

Thermomixer comfort, Eppendorf, Německo

Phree Phospholipid Removal Plates,Phenomenex, Kalifornie USA

5.4. Pomůcky

Aparatura pro filtrování mobilní fáze s filtry (0,22 μm), Sigma Aldrich, Česká republika

Laboratorní sklo

Skleněné vialky pro HPLC

Automatické mikropipety, Eppendorf, Německo

Eppedorfky 1,5 ml se šroubovacím uzávěrem

Filtry pro filtrování plazmy (4 mm, 0,2 μm), Whatman, Velká Británie

6. Příprava roztoků

6.1. Příprava zásobních roztoků

Jako zásobní roztoky pro analýzu byly používány roztoky o koncentraci 1,6 mM (EDTAm a ADR-IS), 1,1 mM (SBZ, SBZ_{pr} a GK-450), 3,3 mM (H305 a ADR), 2,2 mM (ADR), 3,7 mM (DEX), 4 mM (ICRF-154) a 160 μM (ICRF-154). Byly připraveny rozpuštěním příslušné substance v potřebném množství (nejčastěji 1 ml) 50% roztoku acetonitrilu (EDTAm), 50% roztoku methanolu, 100% acetonitrilu (SBZ, SBZpr, SBZet), 100% methanolu (DEX), zředěném amoniaku (ADR-IS) nebo 100% kyselině mravenčí (4 mM ICRF-154). Dále byly všechny roztoky umístěny do ultrazvukové lázně na 20 sekund až 15 minut k jejich dokonalému rozpuštění. Roztok ICRF-154 o koncentraci 160 μM byl připraven jako nasycený roztok ve vodě a jeho koncentrace byla zjišťována pomocí kalibrační křivky. Roztoky byly skladovány při teplotě 5°C.

6.2. Příprava standardních roztoků

Tyto roztoky byly připravovány v čas potřeby odebráním potřebného množství zásobního roztoku. Toto množství zásobního roztoku bylo naředěno 90% methanolem. Tyto roztoky byly používány při vývoji chromatografických metod a k optimalizaci precipitace.

7. Nastavení MS detekce

Pro ionizaci separovaných látek byl využit elektrosprej nastavený v pozitivním módu. K detekci ionizovaných molekul byly použity dva analyzátory - iontová past a trojitý kvadrupól. Pro kvantitativní stanovení byl použit v obou případech SRM mód.

7.1. Iontová past

Teplota zdroje: 200 ˚C

Průtoky plynů: zmlžující plyn 50 arbitrární jednotka

sušící plyn 20 arbitrární jednotka

Napětí na kapiláře: 4 kV

Optimalizované SRM přechody, pro iontovou past jsou uvedeny v tabulce 1.

Substance	SRM přechody	Kolizní energie
EDTAm	$[M+H^+]$: m/z 291 → m/z 273	35%
	$[M+Na^+]$: m/z 313 → m/z 269	35%
	$[M+K^+]$: m/z 329 → m/z 285	35%
ADR	$[M+H^+]$: m/z 305 → m/z 173	35%
	$[M+Na^+]$: m/z 327 → m/z 238	36%
	$[M+K^+]$: m/z 343 → m/z 299	34%
ADR-IS	$[M+H^+]$: m/z 305 → m/z 173	34%
	$[M+K^+]$: m/z 343 → m/z 299	34%
SBZ	$[M+H^+]$: m/z 515 → m/z 483	35%
	$[M+NH^+_4]$: m/z 532 → m/z 341	32%
	$[M+Na^+]$: m/z 537 → m/z 407	32%
SBZet	$[M+H^+]$: m/z 459 → m/z 369	35%
	$[M+NH^+_4]$: m/z 476 → m/z 369	35%
	$[M+Na^+]$: m/z 481 → m/z 23	32%
GK-450	$[M+H^+]$: m/z 450 → m/z 246	35%
ICRF-154	$[M+H^+]$: m/z 255 → m/z 141	35%
DEX	$[M+H^+]$: m/z 269 → m/z 155	32%

Tabulka 1: Optimalizované SRM přechody pro iontovou past

Vnitřní standardy H305 a SBZpr nebyly ještě syntetizovány, proto tady nejsou uvedeny.

7.2. Trojitý kvadrupól

Teplota zdroje: 250˚C

Průtoky plynů: zmlžující plyn 3 l/min

sušící plyn 15 l/min

Napětí na kapiláře: 4,5 kV

Optimalizované SRM přechody, pro trojitý kvadrupól, jsou uvedeny v tabulce 2.

Substance	SRM přechody	Kolizní energie
EDTAm	$[M+H^+]$: m/z 291 → m/z 159	-17 eV
	$[M+Na^+]$: m/z 313 → m/z 78	-45 eV
	$[M+K^+]$: m/z 329 → m/z 165	-25 eV
ADR	$[M+H^+]$: m/z 305 → m/z 173	-15 eV
H305	$[M+H^+]$: m/z 305 → m/z 145	-16 eV
SBZ	$[M+H^+]$: m/z 515 → m/z 341	-25 eV
	$[M+NH^+_4]$: m/z 532 → m/z 341	-20 eV
	$[M+Na^+]$: m/z 537 → m/z 363	-30 eV
SBZet	$[M+H^+]$: m/z 459 → m/z 369	-30 eV
	$[M+NH^+_4]$: m/z 476 → m/z 369	-15 eV
	$[M+Na^+]$: m/z 481 → m/z 23	-30 eV
SBZpr	$[M+NH^+_4]$: m/z 509 → m/z 465	-13 eV
GK-450	$[M+H^+]$: m/z 449 → m/z 24	-20 eV
	$[M+Na^+]$: m/z 471 → m/z 23	-30 eV
ICRF-154	$[M+H^+]$: m/z 255 → m/z 141	-15 eV
DEX	$[M+H^+]$: m/z 269 → m/z 155	-13 eV

Tabulka 2: Optimalizované SRM přechody pro trojitý kvadrupól

Nebyl zde zkoušen ADR-IS, jako vnitřní standard pro EDTAm, protože nedošlo k oddělení píků ADR-IS a EDTAm při separaci na HPLC-MS.

8. Vývoj chromatografických podmínek

8.1. Výběr stacionární fáze a mobilní fáze

Pro analýzu byly testovány tyto kolony: Zorbax Sb-Aq (pro HPLC), Zorbax Sb-Aq (pro UHPLC), Synergi 4u Polar-RP, Hypercarb.

8.2. Optimalizace složení mobilní fáze

Byly zkoušeny různé poměry vodné a organické fáze. Jako vodná složka byly testovány různé koncentrace mravenčanu amonného od 0,1 mM do 2 mM (bez úpravy pH). Jako organická složky mobilní fáze byly zkoušeny methanol a acetonitril v různých poměrech vodné a organické složky. Byly testovány následující izokratické a následně i gradientové metody.

8.2.1. Izokratické metody pro HPLC-MS/MS

Na koloně Zorbax Sb-Aq (pro HPLC) a Synergi 4u Polar-RP byly testovány izokratické metody s průtokem 0,15 ml/min a 0,3 ml/min a nástřiku 5 µl, při teplotě na koloně, která byla 25 °C. Jako mobilní fáze byl použit mravenčan amonný a methanol v poměru od 80:20 (v/v) do 70:30 (v/v) pro EDTAm, ADR a ADR-IS. Od 30:70 (v/v) do 10:90 (v/v) pro ICRF-154 od 70:30 (v/v) do 40:60 (v/v) pro SBZ, SBZet a GK -450 30:70 (v/v) do 10:90 (v/v).

Na koloně Hypercarb byly testovány metody s průtokem 0,3 ml/min a nástřiku 10 µl, při teplotě na koloně 25°C. Jako mobilní fáze byl použit 0,2 mM mravenčan amonný a acetonitril v poměru 70:30 (v/v) pro EDTAm, ADR a ADR-IS, pro ICRF-154 a DEX od 50:50 (v/v) do 30:70 (v/v), pro SBZ, GK-450 a SBZet v poměru 10:90 (v/v) nebo 5:95 (v/v).

SBZpr, jako vnitřní standard pro SBZ, byl testován až na trojitém kvadrupólu.

8.2.2. Gradientové metody pro HPLC-MS/MS.

Na koloně Synergi 4u Polar-RP byly testovány gradienty s průtokem 0,2 ml/min, nástřiku 5 µl, při teplotě na koloně 25°C. Jako mobilní fáze byl použit mravenčan amonný a methanol.

Na koloně Zorbax Sb-Aq (3x150 mm, 3,5 µm, Agilent) byly testovány gradienty s průtokem 0,2 ml/min, nástřikem 5 µl, při teplotě na koloně 25°C. Jako mobilní fáze byl použit mravenčan amonný a methanol.

Na obou kolonách byly zkoušeny, gradienty které jsou uvedeny v tabulce 3.

	Čas (min)	Koncentrace organické fáze (%)
Gradient 1:	0-3,7	20
	3,7-3,8	20-50
	3,8-9	50
	9-9,1	50-85
	9,1-22	85
	22,1-30	20
Gradient 2:	0-10	10-90
	10,1-18	90
	18,1-28	10
Gradient 3:	0-8	30-95
	8,1-18	95
	18,1-25	30

Tabulka 3: Gradienty, testované na kolonách Synergi 4u Polar-RP a Zorbax Sb-*Aq*

Na koloně Hypercarb byly testovány gradienty s průtokem 0,3 ml/min, nástřikem 10 µl, při teplotě na koloně 25°C. Jako mobilní fáze byl použit mravenčan amonný a acetonitril. Na této koloně byly testovány gradienty uvedené v tabulce 4.

	Čas (min)	Koncentrace organické fáze (%)
Gradient 1:	0,1-5	30
	5,1-12	90
	12,1-18	30
Gradient 2:	0-4	30
	4,1-12	95
	12,1-18	30
Gradient 3:	0-4	35
	4,1-12	95
	12,1-18	35

Tabulka 4: Gradienty testované na koloně Hypercarb

8.3. Metody pro UHPLC-MS/MS

Po přechodu na UHPLC/MS/MS byly na koloně Zorbax Sb-Aq (pro UHPLC) znovu testovány různé koncentrace mravenčanu amonného od 0,1 mM do 2 mM. 1 mM mravenčan amonný byl dále testován jako součást mobilní fáze pří izokratických i gradientových metodách, protože při jeho použití došlo k oddělení analyzovaných substancí a byla zde nejvyšší citlivost detektoru pro dané analyty.

Izokratické metody s 1 mM mravenčanem amonným a methanolem byly nastaveny v poměru od 80:20 (v/v) do 70:30 (v/v) pro EDTAm, ADR a ADR-IS. Od 30:70 (v/v) do 10:90 (v/v) pro ICRF-154 od 70:30 (v/v) do 40:60 (v/v) pro SBZ, SBZet a GK-450 30:70 (v/v) do 10:90 (v/v). S průtokem 0,3 ml/min, nástřikem 5 µl a teplotou na koloně 30°C.

Následně byly sestaveny gradienty, které byly testovány s těmito podmínkami na koloně Zorbax SB-Aq (pro UHPLC). Průtok 0,3 ml/min, nástřikem 5 µl, teplota na koloně 30°C. Jako mobilní fáze byl použit 1 mM mravenčan amonný a methanol a měl eluční profil uvedený v tabulce 5.

	Čas (min)	Koncentrace organické fáze (%)
Gradient:	0-3,5	30-90
	3,51-7	90
	7,01-13	30

Tabulka 5: Vyvinutý gradientový profil pro UHPLC-MS/MS analýzu

Pro analýzu z biologického materiálu bylo nutné gradient poupravit přidáním izokratické části, gradient je uveden v tabulce 6.

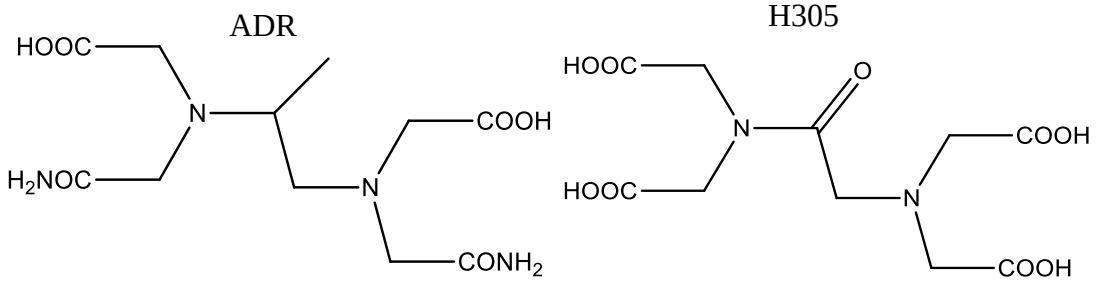
	Čas (min)	Koncentrace organické fáze (%)
Gradient:	0-1,5	5
	1,51-5	5-90
	5,1-8,5	90
	8,51-13	5

Tabulka 6: Vyvinutý gradientový profil pro UHPLC-MS/MS analýzu z biologického materiálu

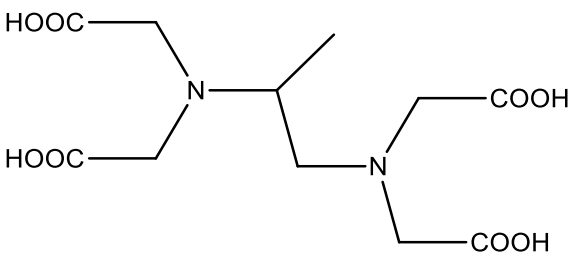
8.4. Výběr vnitřního standardu (IS)

Ze strukturně podobných a dostupných substancí byly pro EDTAm testovány ADR, ADR-IS a H305, pro SBZ byly testovány GK-450, SBZet a SBZpr, pro ICRF-154 byl testován DEX.

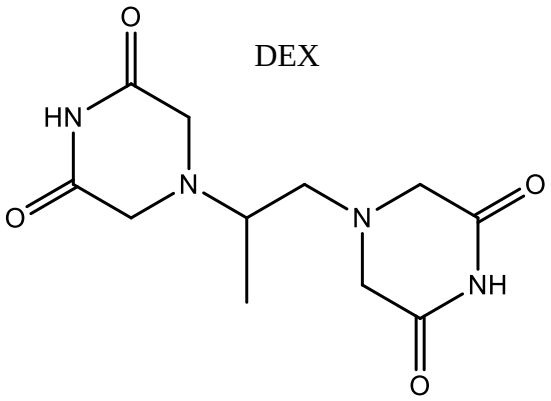
Na obrázku 5 jsou zobrazeny chemické struktury substancí, které byly testovány jako vnitřní standardy.



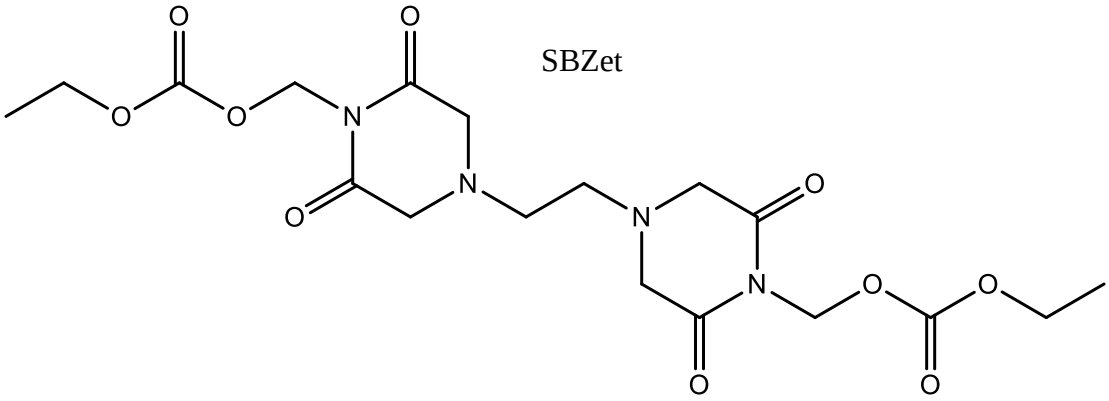
ADR-IS



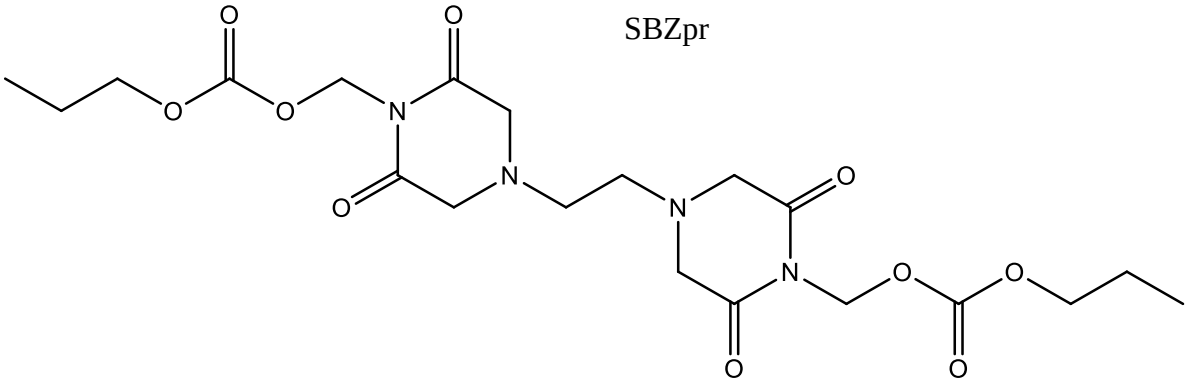
DEX

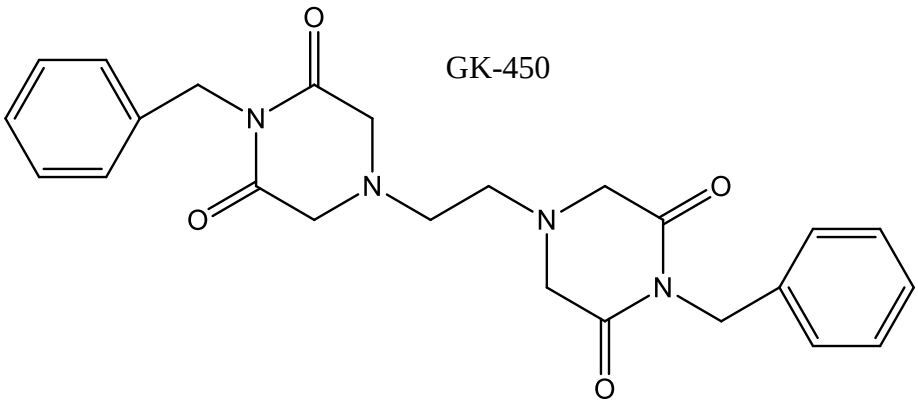


SBZet



SBZpr





Obrázek 5:Testované vnitřní standardy

8.5. Hodnocení linearity UHPLC-MS/MS metody

Linearita byla měřena pomocí gradientu v tabulce 5.

Pracovní vzorky byly připraveny naředěním zásobních roztoků do 90% methanolu v následujících koncentracích:

pro EDTAm: 0,03 µM, 0,08 µM, 0,16 µM, 0,33 µM, 0,66 µM, 1 µM, 1,67 µM, 2,5 µM, 3,3 µM

pro ICRF: 0,04 µM, 0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM, 0,8 µM, 1,2 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM

pro SBZ: 0,02 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM, 0,6 µM, 1 µM, 1,5 µM, 2 µM

Jako vnitřní standardy byly testovány pro H305 (EDTAm) v koncentraci 0,5 µM, DEX (ICRF-154) v koncentraci 0,2 µM a SBZpr (SBZ) v koncentraci 0,5 µM.

9. Úprava biologického materiálu

9.1. Plasma

K prázdné králičí plazmě (100 µl) byly přidány takové objemy zásobních roztoků, aby výsledná koncentrace byla 5 µM pro SBZ, ICRF-154 a EDTAm. Vnitřní standardy byly přidány v takových objemech, aby výsledná koncentrace byla 2,7 µM pro SBZpr (SBZ), 4,4 µM pro DEX (ICRF-154) a 3,3 µM pro ADR (EDTAm). Byly připravovány dva typy vzorků - jeden pro SBZ a ICRF-154 a druhý pro EDTAm, protože byl použit zásobní roztok ICRF-154, který obsahuje kyselinu.

9.1.1. Precipitace

K „spikované“ plazmě bylo přidáno 900 µl methanolu, vzorek byl protřepán na vortexu a poté centrifugován 10 min na 10 000 otáček/min při 25°C. Poté bylo odebráno maximální možné množství supernatantu a přefiltrováno přes filtr (velikost póru 0,22µm) do vialky. Takto připravený vzorek byl analyzován.

9.1.2. Odstranění fosfolipidů

Pro zkoušku odstranění fosfolipidů bylo k „spikované“ plazm, přidáno 500 µl methanolu. Vše bylo promícháno na vortexu a centrifugováno po dobu 5 minut při 13 000 otáčkách /min při teplotě 25°C. Následně bylo odebráno asi 400 µl supernatantu a bylo přeneseno do kolonky pro odstranění fosfolipidů (Phree Phospholipid Removal Plates) a přefiltrováno do vialky. Takto upravený vzorek byl použit pro analýzu.

9.2. Buněčné medium

K prázdnému buněčnému médiu (100 µl) byly přidány takové objemy zásobních roztoků, aby výsledná koncentrace analytů byla 5 µM pro SBZ, ICRF-154 a EDTAm, 2,7 µM pro SBZpr, 4,4 µM pro DEX a 3,3 µM pro ADR. Následně bylo odebráno 20µl „spikovného“ buněčného média a bylo naředěno 90% methanolem, anebo 90% methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí na výsledný objem 1 ml. Byl použit nasycený roztok ICRF-154.

9.3. Ověření linearity v plazmě a buněčném mediu

9.3.1. Linearita stanovení v plasmě

K daným objemům plazmy byly vždy přidány takové objemy zásobních roztoků, aby výsledný objem byl 100 µl a výsledná koncentrace pro EDTAm, ICRF-154 a SBZ byla 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM a 150µM. U vnitřních standardů byla výsledná koncentrace 33 µM pro H305 (EDTAm), 45 µM pro DEX (ICRF-154) a 28 µM pro SBZpr (SBZ). Všechny vzorky byly precipitovány 900 µl methanolu, centrifugovány a přefiltrovány do vialky. Byly připraveny dvě kalibrační řady, jedna pro EDTAm a druhá pro SBZ a ICRF-154.

9.3.2. Linearita stanovení v buněčném médiu

K daným objemům buněčného média byly vždy přidány takové objemy zásobních roztoků, aby výsledný objem byl 100 µl a výsledné koncentrace pro EDTAm a SBZ byly 2,5 µM, 5 µM 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM a 150 µM. Následně bylo vše protřepáno a odebráno 20 µl „spikovaného" buněčného média. K tomuto objemu média byly přidány různé objemy zásobních roztoků tak, aby výsledné koncentrace pro ICRF-154 byla 2,5 µM, 5 µM 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM a 150 µM. Vnitřní standardy byly přidány v konstantních objemech tak, aby výsledná koncentrace byla pro ADR 1,7 µM, pro DEX 0,9 µM a pro SBZ_{pr} 0,1 µM. Následně bylo vše zředěno 90% methanolem, nebo 90% methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí na výsledný objem 1 ml a opět bylo vše protřepáno. Takto byly vytvořeny dvě kalibrační řady, jedna s 90% methanolem a druhá s 90% methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí. Pro přípravu byl použit nasycený roztok ICRF-154.

9.4. Stabilita sobuzoxanu v buněčném médiu

100 µl zásobního roztoku SBZ o koncentraci 0,5 mg/ml bylo napipetováno do 900 µl buněčného média, aby výsledná koncentrace v médiu byla 100 µM a vše bylo inkubováno po dobu 24 hodin při 37˚C v termomixu za mírného třepání. Ve stanovených časových intervalech (0 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod, 5 hod, 6 hod a 24 hod) bylo vždy odebráno 20 µl média, ke kterému byl přidán takový objem vnitřního standardu SBZpr, aby výsledná koncentrace byla 0,4 µM. Následně bylo vše zředěno 980 µl 90% methanolu nebo 90% methanolu s 0,1 % kyselinou mravenčí. Stabilita byla vyjádřena jako pokles koncentrace SBZv čase.

Výsledky a diskuze

10. Příprava roztoků

Při přípravě zásobních roztoků bylo nejprve nutné vyřešit nízkou rozpustnost ICRF-154. Bylo zjištěno, že je tato látka rozpustná pouze v 100% kyselině mravenčí. Přítomnost této kyseliny ve vzorku však snižovala signál pro EDTAm, což bylo systematicky ověřeno analýzou vzorků EDTAm a H305 (IS) (5 μg/ml) se zvyšující se koncentrací kyseliny. Protože EDTAm nelze analyzovat spolu s ICRF-154, které bylo rozpuštěno v kyselině, byl připraven nasycený roztok ICRF-154 ve vodě, který signál EDTAm neovlivňuje.

Při přípravě pracovních roztoků byly zkoušeny různé koncentrace methanolu. Bylo zjištěno, že pro separaci analytů nejvíce vyhovoval 90% methanol, proto jím byly pracovní roztoky ředěny, pokud mobilní fáze obsahovala methanol a pufr.

Jestliže byl součástí mobilní fáze acetonitril a pufr, byly vzorky ředěny 20% methanolem, protože se zvýšila citlivost při této koncentraci methanolu.

11. Nastavení MS detekce

Pro spojení HPLC-MS/MS byl jako ionizační zdroj použit elektrosprej, protože je vhodný pro ionizaci látek s různou polaritou. Prvotní metody pro analýzu separovaných iontů byly provedeny na iontové pasti, kde byly pomocí full-scanu vybrány SRM přechody s největší intenzitou signálu. Posléze byly analyty testovány na UHPLC z důvodu rychlejší a účinnější separace a vyšší citlivosti. UHPLC byl, jako vhodnější detektor, zvolen trojitý kvadrupól, protože podává rychlou analýzu separovaných iontů, je selektivní pro daný iont a je vhodný pro kvantitativní stanovení. Pomocí full-scanu byly opět vybrány nejvyšší SRM přechody. Na základě publikované práce (26) bylo vyzkoušeno použití 5x jednoho SRM přechodu pro zvýšení citlivosti. Ke zvýšení citlivosti detektoru došlo jen u EDTAm u ICRF-154 a EDTAm nebylo zvýšení citlivosti tak patrné. Oba detektory byly pro všechny analyty laděny pouze v pozitivním módu, protože zde měli větší intenzitu signálu. SRM přechody použité pro UHLPLC-MS/MS analýzy jsou uvedeny v tabulce 7.

Substance	SRM přechody	Kolizní energie
EDTAm	$[M+H^+]$: m/z 291 → m/z 159	-17 eV
H305	$[M+H^+]$: m/z 305 → m/z 145	-16 eV
SBZ	$[M+NH^+_4]$: m/z 532 → m/z 341	-20 eV
SBZpr	$[M+NH^+_4]$: m/z 509 → m/z 465	-13 eV
GK-450	$[M+H^+]$: m/z 449→ m/z 24	-20 eV
ICRF-154	$[M+H^+]$: m/z 255 → m/z 141	-15 eV
DEX	$[M+H^+]$: m/z 269 → m/z 155	-13 eV

Tabulka 7:Optimalizované SRM přechody pro trojitý kvadrupól

12. Vývoj chromatografických podmínek

Při výběru stacionární fáze bylo nutné brát v potaz různou polaritu analytů, proto byly pro separaci testovány tři různé kolony s reverzní fází, která je nejvíce používaná pro složité směsi látek s různou polaritou. Nejdříve byly zkoušeny izokratické metody na koloně Zorbax Sb-Aq (pro HPLC), jejíž stacionární fáze obsahuje alkyly navázané na silikagel, které jsou důležité pro absorpci hydrofilních látek. Tato kolona je stabilní i při použití vysokého procenta pufru v mobilní fázi. Další testovanou kolonou byla Synergi 4u Polar – RP, obsahující na silikagelu étericky vázanou fenylovou skupinu, která má schopnost vázat vysoce polární látky, jež nelze rozdělit na kolnách obsahující alkylovou fázi. Poslední testovaná kolona byla Hypercarb, jejíž stacionární fáze je složena z grafitového uhlíku, který je vhodný pro separaci strukturně podobných a polárních látek.

Jako vodná část v mobilní fázi byly testovány různé koncentrace pufru při různých izokratických podmínkách. Následně byla zvolena taková koncentrace pufru, která poskytovala nejlepší separaci a ionizaci stanovovaných substancí. Pro iontovou past byl vybrán 2mM

mravenčan amonný. Po přechodu na kvadrupól byly znovu zkoušeny různé izokratické podmínky, jako mobilní fáze byl zvolen 1 mM mravenčan amonný a methanol. Tato kombinace poskytovala nejlepší separaci (oddělení píků až na základní linii, přijatelná symetrie píků) a citlivost detektoru.

Po provedení izokratických metod na kolonách uvedených v předchozím odstavci bylo zjištěno, že na kolonách Zorbax Sb-Aq a Synergi 4u Polar – RP bylo docíleno oddělení píků analytu a vnitřního standardu a zvýšení citlivosti při použití 2 mM mravenčanu amonného a methanolu v poměru 70:30 (v/v) pro EDTAm, ADR a ADR-IS, 45:55 (v/v) pro ICRF-154 a DEX, 10:90 (v/v) pro SBZ, GK-450, SBZet. Na koloně Hypercarb, byl testován pufr o koncentraci 0,2 mM, protože při jeho použití byla zvýšena citlivost. Jako organická složka mobilní fáze byl použit acetonitril z důvodu lepší symetrie a oddělení píků. Vhodné poměry pufru a acetonitrilu pro analýzu jsou tyto 65:35 (v/v) pro EDTAm, ADR a ADR-IS, 55:45 (v/v) pro ICRF-154 a DEX a 5:95 (v/v) pro SBZ, GK-450 a SBZet.

Na všech kolonách byl problém s nízkou intenzitou signálu EDTAm, pravděpodobně kvůli chelatačním vlastnostem. Tento problém byl částečně vyřešen promytím kolony před použitím 2mM roztokem EDTA a methanolem 80:20 (v/v). Kolona byla promývána 2 mM EDTA po dobu minimálně 2 hodin a následně byla promyta mobilní fází po dobu minimálně 2 hodiny.

Jelikož se dané analyty eluují v různých poměrech mobilní fáze. Byly vytvořeny gradientové metody, které byly opět vyzkoušeny na všech třech kolonách.

Na koloně Synergi 4u Polar – RP byly postupně použity 3 různé gradienty. Jejich finální úpravy jsou uvedeny v experimentální části (kapitola 8.2.2, tabulky 3).

V prvním skokovém gradientu s tímto profilem (0-3,7 min. 20% methanolu, 3,7-3,8 min 20-50% methanolu, 3,8-9 min 50% methanolu, 9-9,1 min 50-85% methanolu, 9,1-22min 85% methanolu, 22,1-30min 85% methanolu) byly příliš dlouhé eluční časy nejdelší měl SBZ. Proto bylo vyzkoušeno postupné zvyšovaní organické fáze v následujícím gradientu 2 (0-10 min 10-90% methanolu, 10,1-18 min 90% methanolu, 18,1-28 min 10% methanolu), čímž došlo ještě k většímu prodloužení retenčních časů. Následně bylo vyzkoušeno opět postupné zvyšovaní organické fáze v gradientu 3 (0-8 min 30-95% methanolu, 8,1-18 min 95% methanolu, 18,1-25 min 30% methanolu). Tímto zvýšením bylo docíleno velkého zkrácení retenčních časů ICRF-154, DEX, SBZ a GK-450. Při této separaci byly od sebe analyty odděleny, ale čas separace 25 min je nevyhovující, protože je požadována rychlá analýza.

Na koloně Zorbax Sb-Aq (pro HPLC)byly vyzkoušeny ty samé gradienty. Pro srovnání separace a retenčních časů 1 až 3 gradientu s gradienty na koloně Synergi 4u Polar – RP. Na koloně Zorbax Sb-Aq (pro HPLC) byl zkrácen hlavně eluční čas SBZ (asi o 4 minuty) a tedy i celkový čas analýzy, protože SBZ se eluuje, jako poslední analyt. Při separaci na této koloně měla také EDTAm nejvyšší intenzitu signálu.

Na koloně Hypercarb byly vyzkoušeny gradienty uvedené v experimentální části (kapitola 8.2.2. tabulka 4), jako součást mobilní fáze tady byl použit ACN a 0,2 mM pufr, protože při jejich kombinaci dochází k lepší separaci a ionizaci analytů. I přesto, že na této koloně došlo ke zkrácení retenčních časů všech složek, což se dá očekávat, protože tato kolona je kratší než předchozí dvě kolony. Kolona Hypercarb však nelze použít, protože dochází k vysokému zadržení SBZ na koloně, který je postupně vymýván. Pro kontrolu zadržení SBZ na koloně byl připraven pracovní roztok SBZ o koncentraci 0,2 µM naředěný 20% methanolem, který byl analyzován a následně bylo několikrát za sebou (3x) nastříknuto jen čisté rozpouštědlo (ACN). Tím bylo prokázáno, že se SBZ zadržuje na koloně a k jeho eluci dochází během dalších analýz.

Kolona Zorbax Sb-Aq (pro HPLC) poskytovala nejlepší podmínky pro separaci analytů s různou strukturou, proto byla pro UHPLC-MS/MS analýzu vybrána kolona stejného typu Zorbax Sb-Aq (pro UHPLC).

Na UHPLC byly znovu testovány různé izokratické metody, aby bylo potvrzeno v jakých poměrech organické a vodné fáze se analyty eluují. Následně byl použit gradient 3, (kapitola 8.2.2. tabulka 3), ve kterém měly analyty vysokou citlivost, linearitu a opakovatelnost. U gradientu 3 byly upraveny časy, ve kterých docházelo ke změně poměru organické a vodné fáze, navíc zde došlo ke snížení organické fáze z 95% na 90%.

Vyvinutý gradient byl použit pro další analýzu a je uveden v experimentální části (část 8.3. tabulka 5).

Pro separaci látek z biologického materiálu bylo nutné, aby byla na začátek použita izokratická část, protože H305 má retenční čas právě v té době, kdy dochází k eluci balastních látek z biologického materiálu. Gradient má tento profil 0-1,5 min 5% methanolu, 1,51-5 min 5-90% methanolu, 5,01-8,5 min 90% methanolu, 8,51-13 min 5% methanolu. To však nepomohlo, proto bylo testováno ADR jako vnitřní standard pro EDTAm při analýzách z biologického materiálu.

12.1. Výběr vnitřních standardů

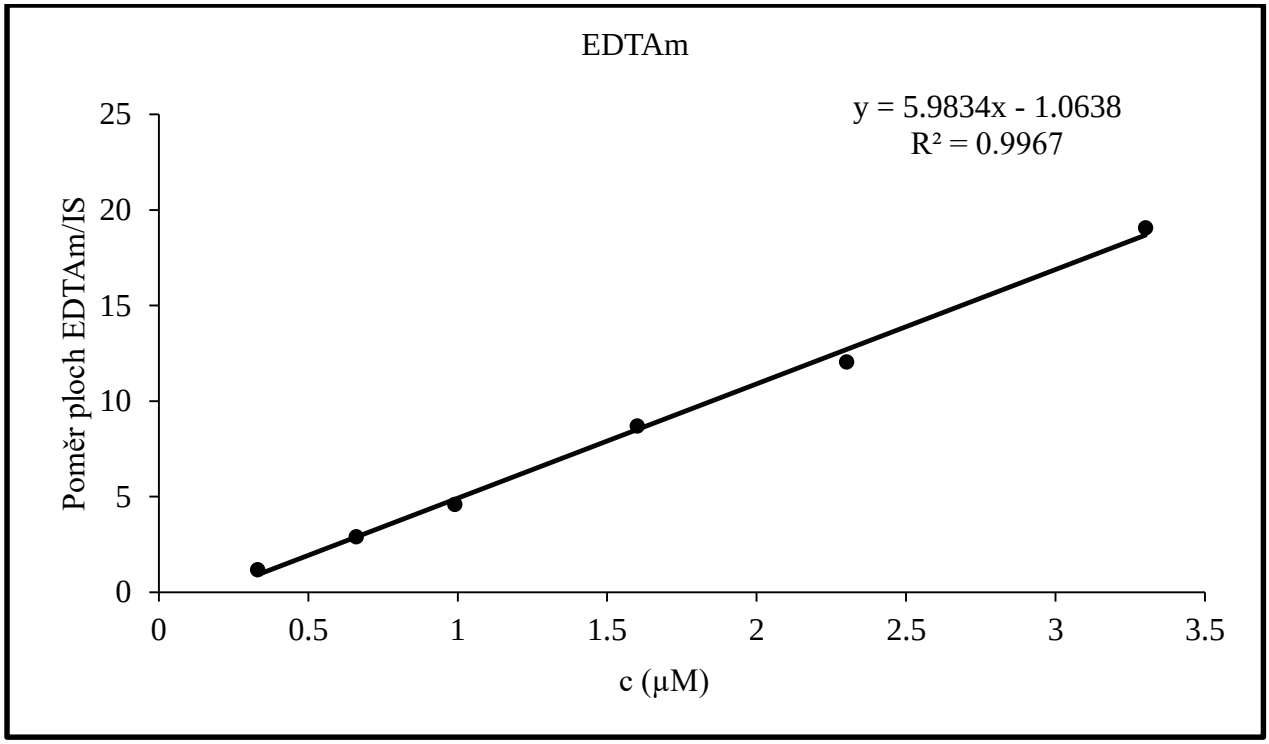
Výběr vnitřních standardů byl proveden pro každý analyt zvlášť na základě podobnosti ve struktuře, fyzikálně-chemických vlastnostech a chování při analýze. Pro ICRF-154 byl testován DEX. Jako vnitřní standardy pro SBZ byl nejdříve zkoušen GK-450, ale z důvodu dostupnosti a větší strukturní podobnosti byl testován SBZet. Následně byl testován SBZpr, který je svou strukturou nejvíce podobný SBZ. Pro EDTAm byly testovány ADR a ADR-IS na iontové pasti a ADR a H305 na trojitém kvadrupólu. ADR-IS nebylo na trojitém kvadrupólu zkoušeno, protože jeho retenční čas částečně koleuloval s píkem EDTAm.

H305 bylo lépe separováno od EDTAm než ADR. Proto bylo použito H305 k ověření linearity metody (UHPLC-MS/MS metoda), ale při zkouškách linearity v biologickém materiálu byl jeho retenční čas blízko látkám, které obsahuje biologická matrice, proto bylo pro tyto analýzy testováno ADR.

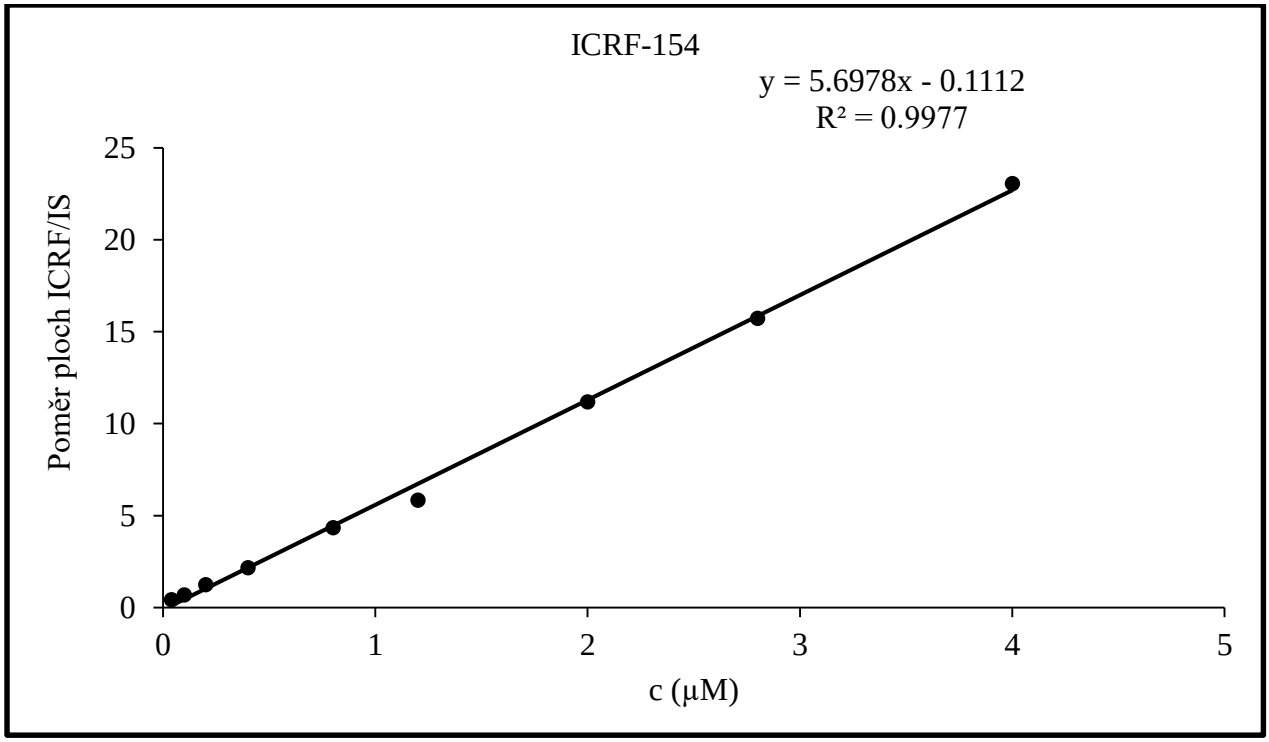
12.2. Ověření linearity UHPLC-MS/MS metody

Pro další vývoj metody bylo zapotřebí ověřit, zda je metoda v daném koncentrační rozmezí lineární. Což bylo testováno na koloně Zorbax Sb-Aq (UHPLC) a gradientem uvedeném v experimentální části (kapitola 8.3. tabulka 5). U všech analytů byl potvrzen lineární průběh intenzity signálu, který byl počítán jako poměr plochy píku analyzované látky a jejího vnitřního standardu s koeficientem determinace $R^2 \geq 0{,}996$. Kalibrační přímky jsou uvedeny pro každý analyt zvlášť na obrázcích 6 až 8.

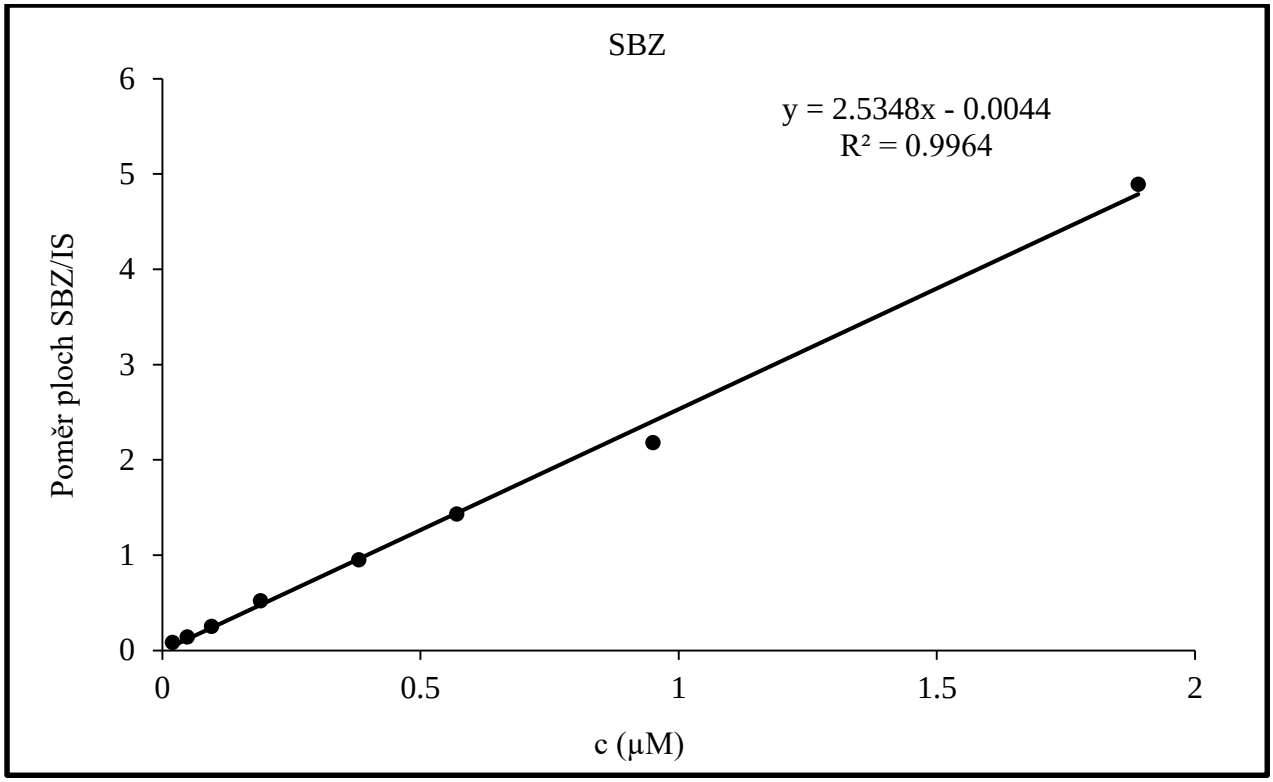
Linearita byla měřena současně pro všechny analyty (ve směsi), proto bylo nutné k přípravě standardních roztoků použít nasycený roztok ICFR-154 o koncentraci 175 μM. Použitý roztok ICRF-154 obsahuje vodu, která nesnižuje signál EDTAm tak, jako kyselina obsažená v zásobním roztoku ICRF-154 o koncentraci 4 mM.



Obrázek 6:Kalibrační přímka pro EDTAm

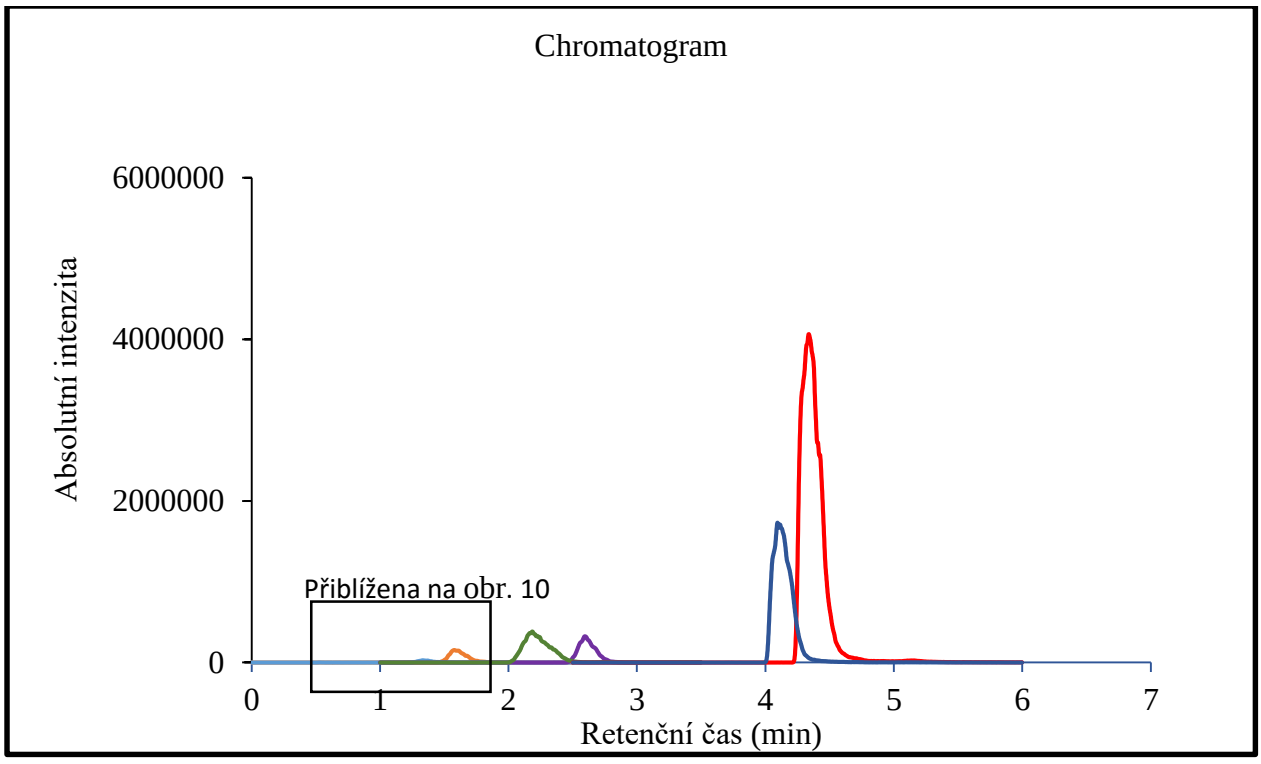


Obrázek 7:Kalibrační přímka pro ICRF-154

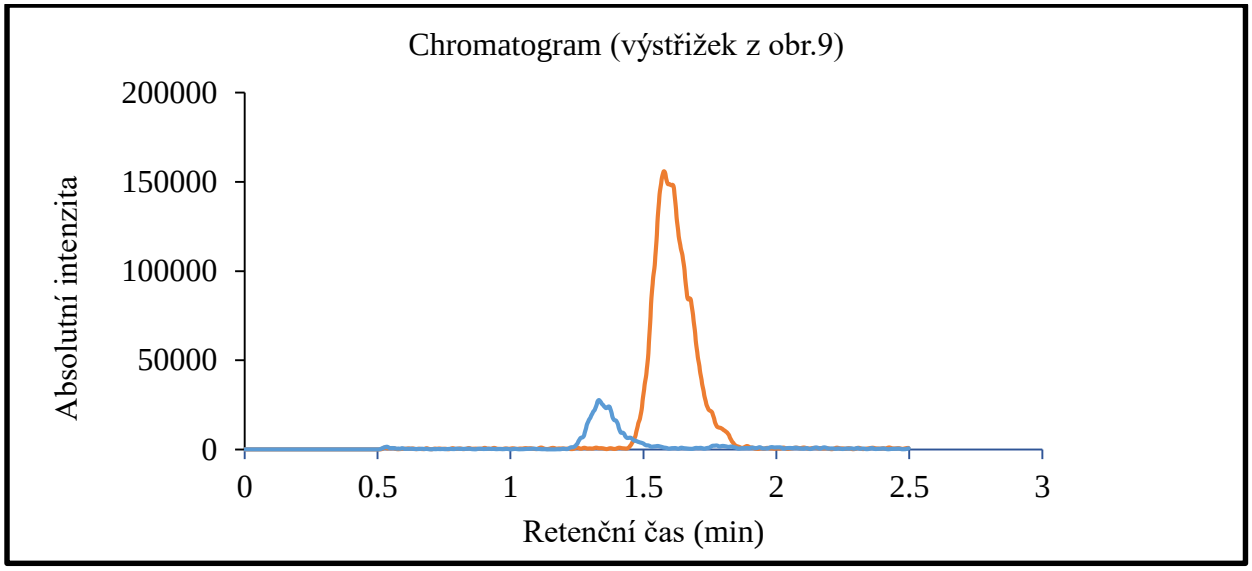


Obrázek 8:Kalibrační přímka pro SBZ

Na obrázku 9 jsou uvedeny chromatogramy pro separované analyty, pro EDTAm a H305 musel být chromatogram přiblížen (obrázek 10), protože má nízkou intenzitu signálu.



Obrázek 9: Chromatografický záznam separovaných substancí EDTAm (1,7 min), H305 (1,4 min), ICRF-154 (2,4 min), DEX (2,8 min), SBZpr (4,1 min), SBZ (4,5 min)



Obrázek 10: Zvětšený chromatografický záznam pro EDTAm (1,7 min), H305 (1,4 min)

13. Úprava biologických roztoků

Protože celý vývoj metody je zaměřen na analýzu z biologického materiálu, bylo zapotřebí vyvinout metodu extrakce z biologického materiálu.,

V rámci mojí diplomové práce byla provedena precipitace proteinů methanolem a odstranění fosfolipidů pomocí kolonky Phree Phospholipid Removal Plates,Phenomenex. Při precipitaci proteinů nedošlo ke vzniku precipitátu ve vzorku obsahující ICRF-154, které bylo rozpuštěno v kyselině. Pravděpodobným důvodem neochoty precipitovtat, byla asi přítomnost kyseliny, ve které je ICRF rozpuštěno. Pro precipitaci bylo použito 100 µl „spikované“ plazmy a 900 µl methanolu, je však možné, že při změně poměru objemů plazmy a methanolu by precipitace proběhla, ale to však nebylo testováno.

Z toho plyne, že v následující práci bude potřebné metodu extrakce analytů z plazmy dále optimalizovat, zejména s ohledem na extrakci ICRF-154. Například již zmiňovanou změnou poměrů plazmy a methanolu.

Pro odstranění fosfolipidů byly použity speciální kolonky, které umožňují odstranit proteiny a fosfolipidy v jediném kroku, protože obsahují dvojí filtr jeden pro zadržení proteinů a druhý pro zadržení fosfolipidů. Fosfolipidy mohou snižovat citlivost metody pro analyty, protože jsou v plazmě obsaženy ve velké koncentraci. Metoda odstranění fosfolipidů však

nebyla úspěšná, protože docházelo ke snížení ploch píků všech separovaných složek, což může být zapříčiněno absorpcí analytů na dvojím filtru.

Protože buněčné médium obsahuje jen nízké procento proteinů, nemusí být upraveno a lze jen naředit, v našem případě bylo ředěno 90% methanolem.

13.1. Ověření linearity UHPLC-MS/MS metody pro stanovení analytů v biologickém materiálu

Ověřování linearity bylo provedeno v plazmě a buněčném médiu.

Při pokusech ověření linearity v plazmě nebylo docíleno požadovaných výsledků. U všech analytů byla pozorována nízká citlivost, opakovatelnost nástřiků a v nižších koncentracích nebylo detekováno EDTAm. Což pravděpodobně zapříčiněno špatným extrakčním postupem při izolaci analytů, proto se musí nejdříve optimalizovat postup extrakce, aby mohla být ověřována linearita z plazmy.

Médium bylo pouze naředěno, což je možný důvod, proč bylo testování linearity úspěšně provedeno. Linearita byla ověřována v koncentračním rozmezí od 2,5 až 150 μM pro EDTAm, ICRF-154 a SBZ. Pro ověření, zda analyty interferují s pozadím buněčného média, bylo analyzováno i prázdné buněčné médium. Při těchto analýzách bylo objeveno, že doposud používaný H305 (vnitřní standard pro EDTAm) interferuje s pozadím buněčného média. Proto byla přidána na začátek tohoto gradientu izokratická část s 5% methanolu to však nepomohlo, a proto je při analýzách z biologického materiálu testováno ADR, jako vnitřní standard pro EDTAm. Gradient použitý pro tyto analýzy je popsán v experimentální části (kapitola 8.3. tabulka 6).

Pří ověřování linearity, byl pro naředění buněčného média použit 90% methanol a 90% methanol s 0,1% kyselinou mravenčí, aby bylo evidentní, zda kyselina ovlivňuje signály všech analytů. Kalibrační křivka byla stejně, jako při ověřování linearity metody, vyhodnocena pomocí Excelu metodou lineární regrese. Lineární průběh byl opět počítán z poměru ploch píků analyzované látky a jejího vnitřního standardu, koeficienty determinace se lišily v závislosti na použitém rozpouštědle a jsou uvedeny v tabulce 8.

Na obrázku 11 jsou znázorněny dvě kalibrační přímky pro ICRF-154, ze kterých je patrné že kyselina ovlivňuje separaci a ionizaci ICRF-154, jen z minimální části. Z toho vyplývá, že pokud by se podařilo rozpustit ICRF-154 v jiném rozpouštědle, než je kyselina

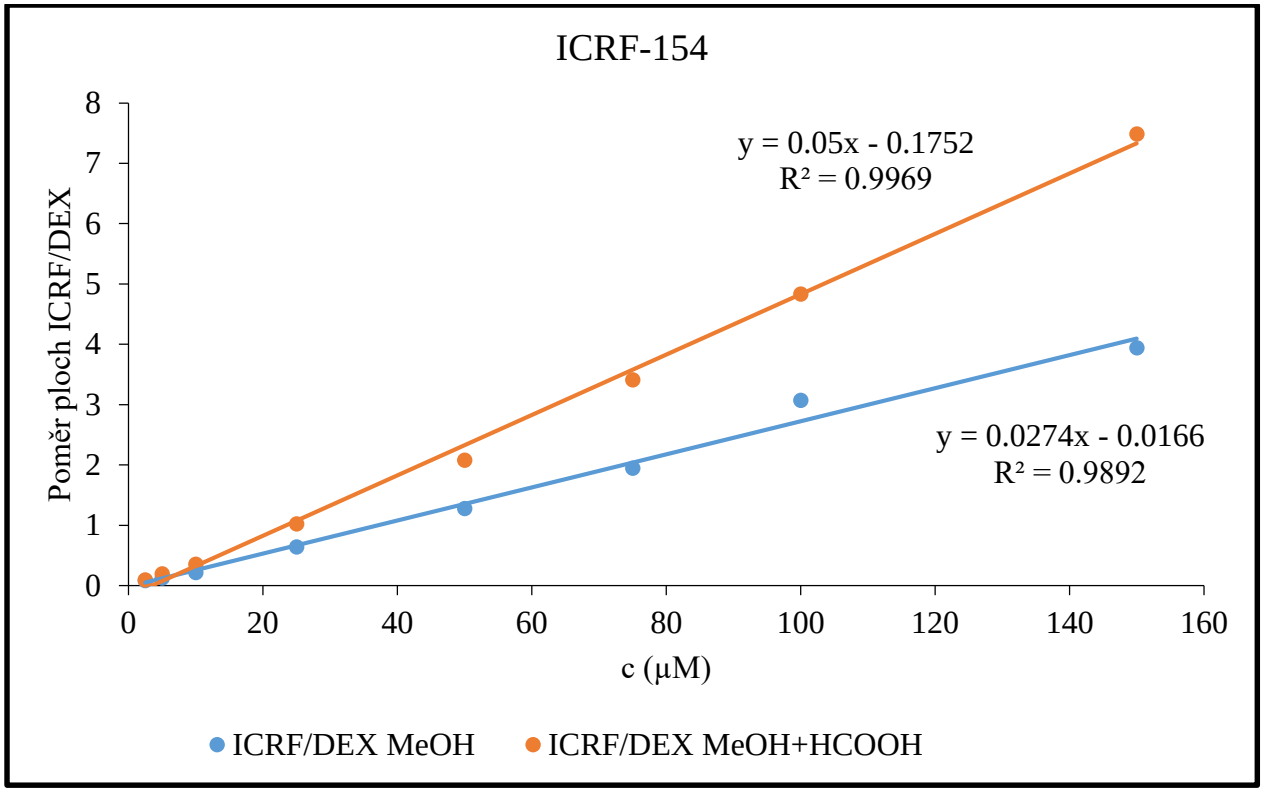
mravenčí, nemělo by to ovlivnit signál ICRF-154. Pro tyto analýzy byl proto použit nasycený roztok ICRF-154 ve vodě.

Na obrázku 12 jsou uvedeny dvě kalibrační přímky pro SBZ, kde je vidět, že pokud je médium naředěno 90% methanolem s kyselinou, linearita intenzity signálu SBZ „vyšla lépe“ korelační koeficient má hodnotu blíže 1 a body leží na přímce, než pokud je ředěn pouze 90% methanolem. Z rozdílu korelačních koeficientů pro SBZ v tabulce 10 tedy plyne, že pro analýzu SBZ je použití malého procenta kyseliny vhodné, z důvodu větší stability sobuzoxanu v mírně kyselém prostředí.

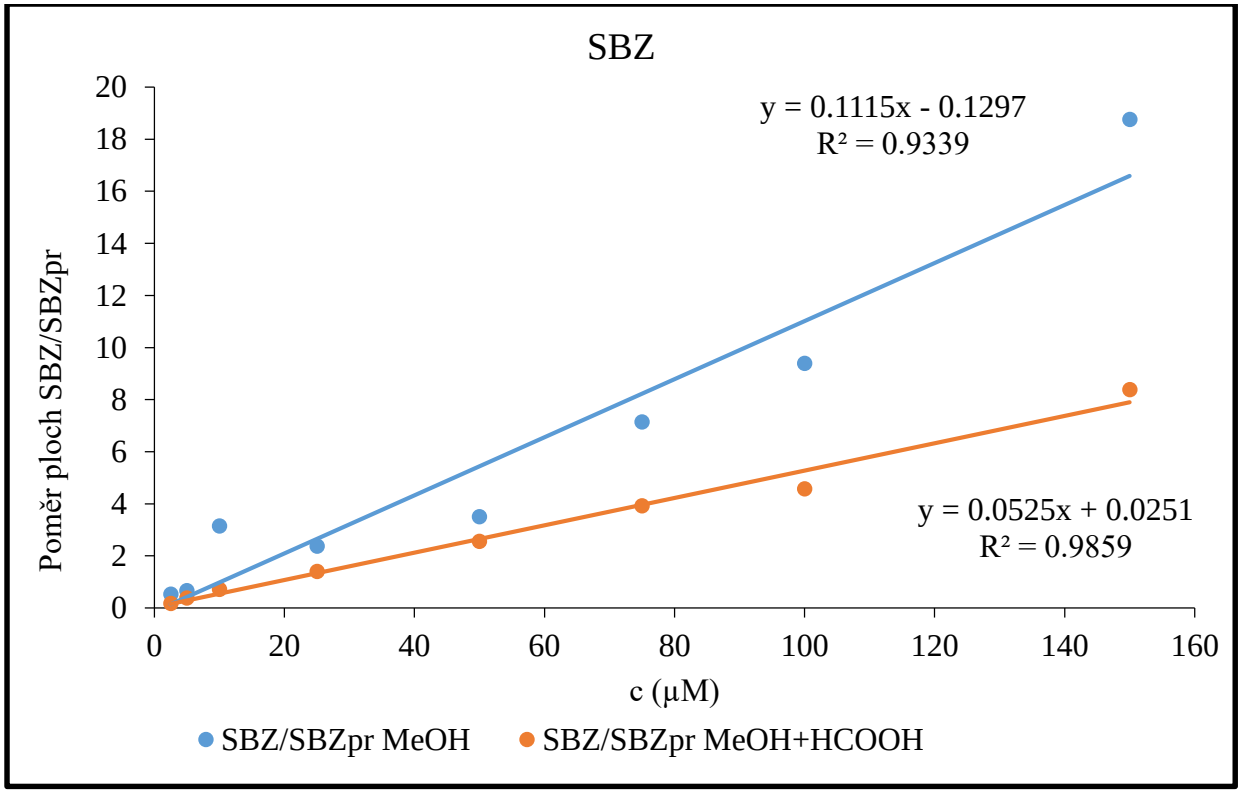
Na obrázcích nejsou uvedeny kalibrační přímky pro EDTAm, protože neměli lineární charakter. Pokud byl pro přípravu použit 90% methanol s kyselinou, dalo se očekávat, že kyselina bude potlačovat signál EDTAm, což je možný důvod proč body leží mimo přímku. Ale při použití 90% methanolu, není přesně znám důvod, proč křivka neměla lineární charakter (body leží mimo přímku), je však možné, že látky obsažené v buněčném médiu potlačují signál EDTAm.

A) ředěno 90% methanolem	B) ředěno 90% methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí
EDTAm: R^2 =0,9727	EDTAm: R^2 =0,8485
ICRF-154: R^2 =0,9892	ICRF-154: R^2 =0,9969
SBZ: R^2 =0,9339	SBZ: R^2 =0,9859

Tabulka 8:Tabulka s koeficienty determinace pro EDTAm, ICRF-154, SBZ

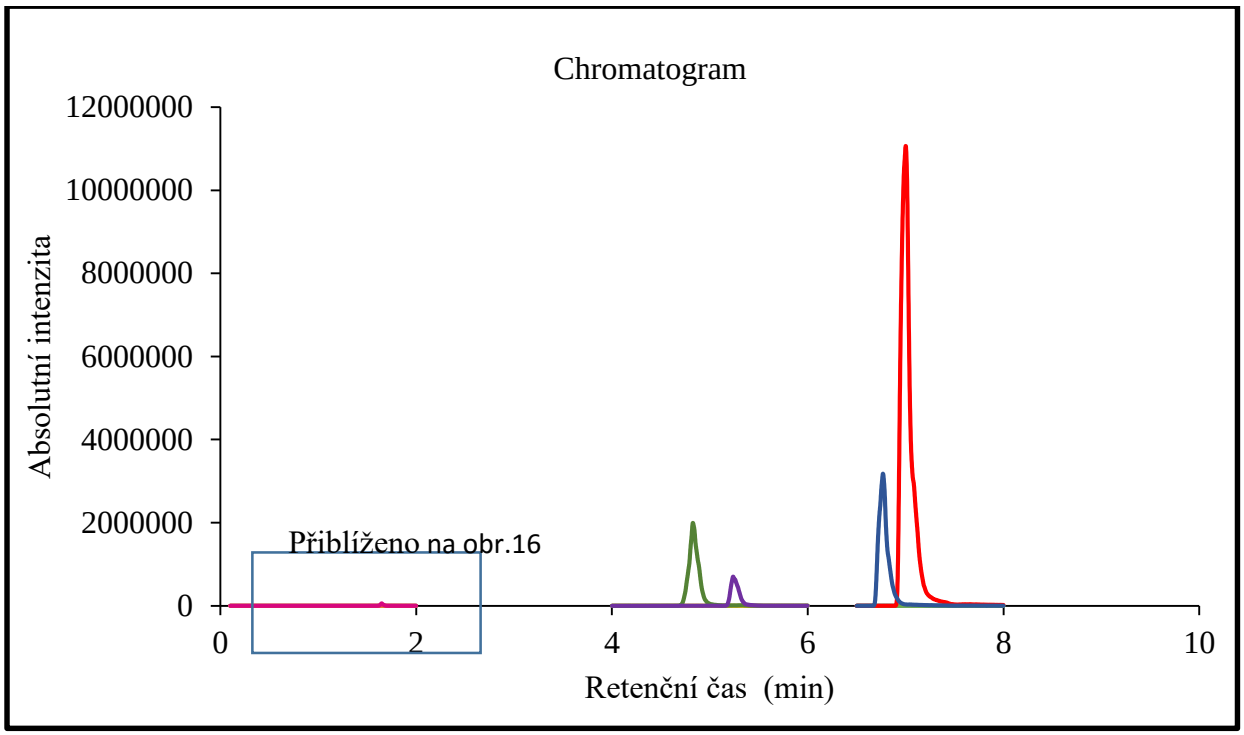


Obrázek 11:Kalibrační přímka pro ICRF-154 při analýze z buněčného média ředěného 90% methanolem nebo 90% methanolem s 0,01% kyselinou mravenčí

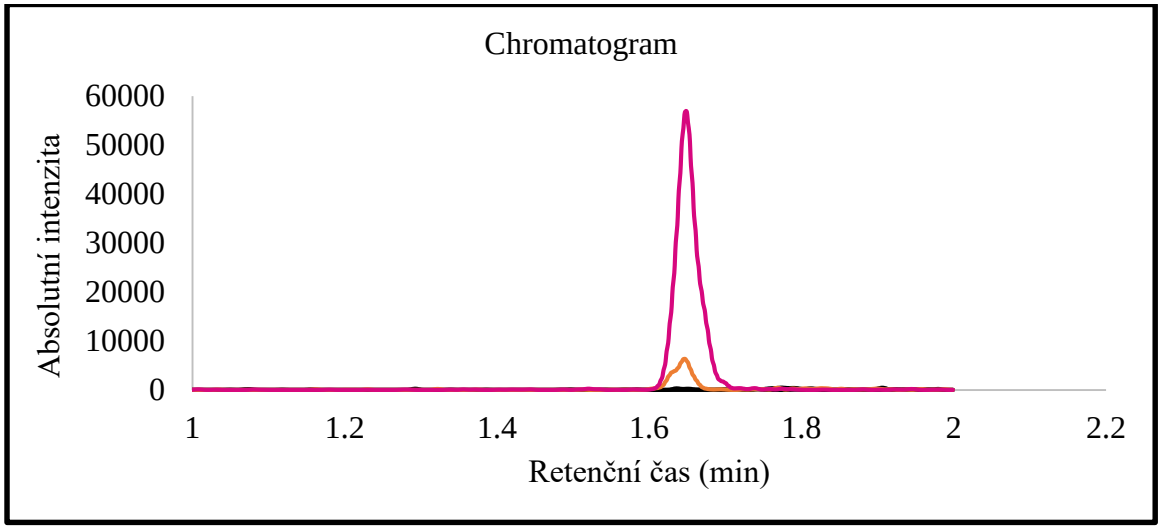


Obrázek 12:Kalibrační přímka pro SBZ při analýze z buněčného média ředěného 90% methanolem nebo 90% methanolem s 0,01% kyselinou mravenčí

Na obrázku 13 a 14 jsou uvedeny chromatogramy z analýzy buněčného média. Na obrázku 13 je intenzita signálu EDTAm velmi malá oproti intenzitě signálu ICRF a SBZ, proto byl chromatogram přiblížen na obrázku 14.



Obrázek 13: Chromatografický záznam EDTAm (1,63 min), ADR (1,65 min), ICRF-154 (4,8 min), DEX (5,2 min), SBZ (7,0 min), SBZpr (6,75 min)



Obrázek 14: Přiblížený chromatografický záznam EDTAm (1,63 min), ADR (1,65 min)

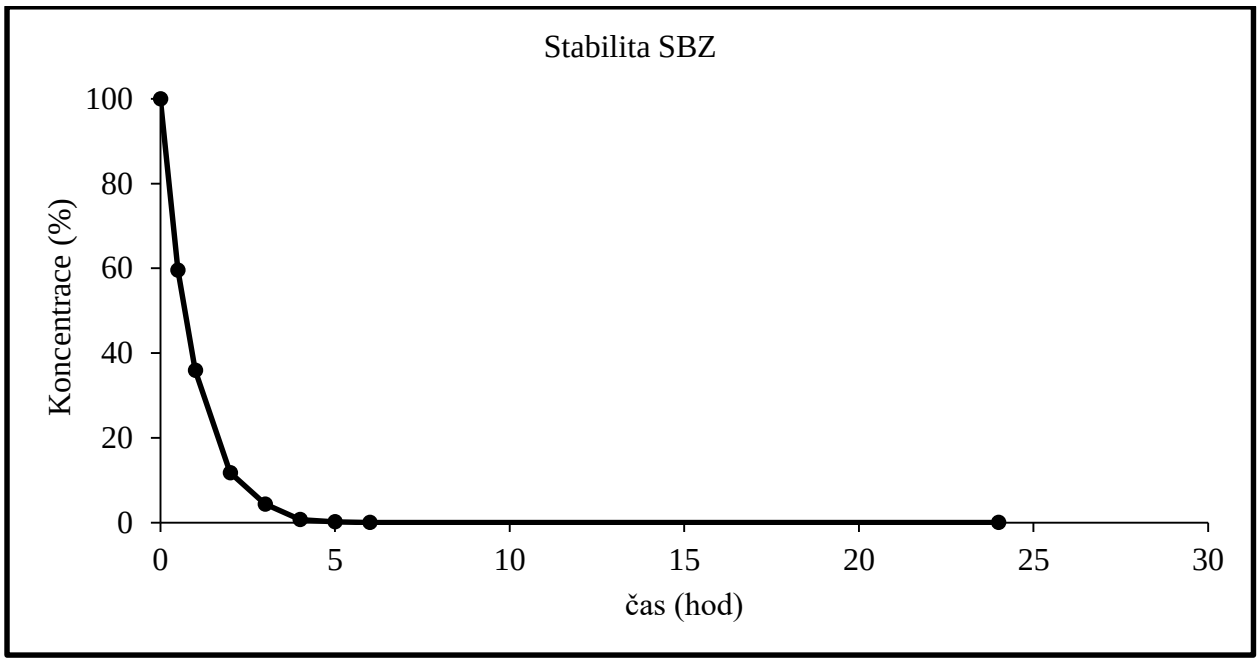
13.2.Stabilita SBZ v buněčném médiu

Stabilita je vlastnost léčiva zachovat si svoji původní strukturu po určitou dobu v daném prostředí. V našem případě byla stabilita testována pouze v buněčném médiu, protože zde byla ověřena linearita metody. Stabilita byla hodnocena jako pokles koncentrace sobuzoxanu v čase.

Koncentrace SBZ klesala velmi rychle, za tři hodiny klesla na 5% z původního množství. Pokles koncentrace SBZ v buněčném médiu po naředění methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí, je znázorněn na obrázku 15.

V případě kdy bylo médium pro analýzu naředěno jen 90% methanolem, došlo nejdříve k poklesu koncentrace SBZ a následně k jejímu zvýšení.

EDTAm a ICRF-154 nebylo v buněčném médiu detekováno v žádném čase. Důvod proč k detekci nedošlo, není znám.



Obrázek 15: Stabilita SBZ v buněčném médiu (naředěno 90% methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí)

Závěr

Pro analýzu sobuzoxanu, ICRF-154 a EDTA-diamidu z biologického materiálu byla vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda na koloně Zorbax Sb-Aq (100 mm, 1,8 μm, Agilent). Jako mobilní fáze byl použit methanol a 1 mM mravenčan amonný s následujícím profilem: 0-1,5 min 5% methanolu, 1,51-5 min 5-90% methanolu, 5,1-8,5 90% methanolu a 8,51-13 min 5% methanolu. Jako vhodný detektor byl vybrán trojitý kvadrupól, na kterém byly pro kvantifikaci nastaveny vybrané SRM z nejintenzivnějších iontů ve spektru.

Bylo zjištěno, že kyselina, obsažená v zásobním roztoku ICRF-154, potlačuje ionizaci EDTAm, proto byla EDTAm analyzována odděleně od ICRF-154 a SBZ. Pokud byly analyty testovány současně, při analýzách byl použit nasycený roztok ICRF-154 ve vodě. Rozpustností ICRF-154 by bylo vhodné se zabývat, aby mohlo dojít k analýze všech analytů současně.

Jako vnitřní standard pro EDTAm bylo zatím vybráno ADR, i když jeho retenční čas je velmi blízko EDTAm, ale díky různých SRM přechodů mohou být ADR i EDTAm separovány a detekovány.

V této práci byly vyzkoušeny, pro izolaci analytů, pouze metody precipitace proteinů a odstranění fosfolipidů z plazmy. Bylo by vhodné se zabývat extrakcí těchto látek z plazmy, ale i dalších biologických matric. Protože izolace analytů z biologického materiálu je velmi důležitá pro další analýzu SBZ a jeho předpokládaných metabolitů.

I přesto, že linearita metody byla hodnocena, jak v plazmě, tak buněčném médiu stabilita byla hodnocena jen v buněčném médiu, protože kalibrační přímka v plazmě neměla lineární charakter, což je možný následek nevhodného postupu izolace analytů z plazmy. Při ověřování stability bylo objeveno, že se koncentrace SBZ velmi rychle snižuje, ale nedošlo k detekci ICRF-154 ani EDTAm.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma HPLC 13
Obrázek 2: Schéma šesticestného dávkovače 14
Obrázek 3: van Deemterova křivka 17
Obrázek 4: Metabolismus sobuzoxanu 27
Obrázek 5:Testované vnitřní standardy 42
Obrázek 6:Kalibrační přímka pro EDTAm 50
Obrázek 7:Kalibrační přímka pro ICRF-154 50
Obrázek 8:Kalibrační přímka pro SBZ 51
Obrázek 9: Chromatografický záznam separovaných substancí EDTAm, H305, ICRF-154, DEX, SBZpr a SBZ 51
Obrázek 10: Zvětšený chromatografický záznam pro EDTAm a H305 52
Obrázek 11:Kalibrační přímka pro ICRF-154 při analýze z buněčného média ředěného 90% methanolem nebo 90% methanolem s 0,01% kyselinou mravenčí 55
Obrázek 12:Kalibrační přímka pro SBZ při analýze z buněčného média ředěného 90% methanolem nebo 90% methanolem s 0,01% kyselinou mravenčí 55
Obrázek 13: Chromatografický záznam separovaných substamcí EDTAm, ADR, ICRF-154, DEX, SBZ a SBZpr 56
Obrázek 14: Přiblížený chromatografický záznam EDTAm a ADR 56
Obrázek 15: Stabilita SBZ v buněčném médiu (naředěno 90% methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí) 57

Seznam tabulek

Tabulka 1: Optimalizované SRM přechody pro iontovou past 35
Tabulka 2: Optimalizované SRM přechody pro trojitý kvadrupól 36
Tabulka 3: Gradienty, testované na kolonách Synergi 4u Polar-RP a Zorbax Sb-*Aq* 38
Tabulka 4: Gradienty testované na koloně Hypercarb 39
Tabulka 5: Vyvinutý gradientový profil pro UHPLC-MS/MS analýzu..... 40
Tabulka 6: Vyvinutý gradientový profil pro UHPLC-MS/MS analýzu z biologického materiálu 40
Tabulka 7:Optimalizované SRM přechody pro trojitý kvadrupól 46
Tabulka 8:Tabulka s koeficienty determinace pro EDTAm, ICRF-154, SBZ 54

Citovaná literatura

1) Nováková L., Douša M., et al.,. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I a II.* Praha, Nováková L., Douša M., 2013.
2) Scott R.P.W. Liquid Chromatography - The Mobile Phase Supply System 1, *Liquid Chromatography-Online*, http://chromatography-online.org/Basic-HPLC/Gradient-Programmer/High-Pressure/rs_3_4.php (8.4.2016).
3) McMaster, Marvin C., *LC/MS: A practical user's guide*, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2005.
4) Douša M. *HPLC.cz* http://www.hplc.cz. (5.4.2016).
5) Kupiec T., Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography, *International Journal of Pharmaceutical Compouding*, 8, 223-227, 2004.
6) Roge A. B., Firke S. N., Dhane R. M., Gunjkar V.J., Vadvalkar S. M.,Novel Achievement of HPLC: UPLC, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3, 1423-1429, 2011.
7) Seelam, Sharath Chandra., Switch from HPLC to UPLC: A Novel Achievement in Liquid Chromatography Techniq, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 38, 237-246, 2013.
8) Robert, Ardrey E. *Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction*, Huddersfield, UK, John Wiley & Sons Ltd, 2003.
9) Friedecký K., Lemr D., Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klinická biochemie a metabolismus*, 3, 152-157, 2012.
10) Český lékopis 2009 - doplněk 2013 (Pharmacopoea Bohemica), Grada Publishing, Praha 2009.
11) Holčapek M., Jandera P.,SPOJENI KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ, *Asociace českých chemických společností*, 92, 278- 286, 1998.
12) Pitt, James J., Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry, *The Clinical Biochemist Reviews*, 30, 19-34, 2009.
13) Hoffmann de E., Stroobant V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third Edition,* Southern Gate, England: John Wiley & Sons, Ltd 2007.
14) Holčapek M., Ionizační techniky. *Mass spectrometry group.* http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf. (15. 3. 2016).

15) Kovaříková P.,Stariat J., Využití HPLC v analýze léčiv v biologickém matriálu, úprava vzorku, *Moodle/ Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze.* http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/251418/mod_resource/content/8/Lekce%208_Bioanalýza%2C%20úprava%20vzorku.pdf. (20. 4. 2016).
16) Holčapek M., Hmotnostní analyzátory, *Mass spectrometry group*, http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf. (16. 3. 2016).
17) Neetu, Khatri., A Review On Mass Spetrometry Detectors, *International Research Journal Of Pharmacy*, 3, 33-42, 2012.
18) Chris P Schaller, Ph.D., High Resolution vs Low Resolution, *UCDavisChemWiki*, http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Introductory_Mass_Spectrometry/High_Resolution_vs_Low_Resolution. (2.4.2016).
19) Grebe KG S., Singh J. S., LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here?, *The Clinical Biochemist Reviews*, 32, 5-31, 2011.
20) Coufal P., Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra analytické chemie, Extrakce, https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf. (3.4.2016).
21) Klener P., Klener P. jr. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2010.
22) Blažková I., Ryvolová M., Jílková E., Křížková S., Moderní zobrazovací techniky pro antracyklínová cytostatika - literární přehled, *Klinická Onkologie*, 4, 239-244, 2013.
23) Hrstková H., Elbl L. Cytostatika u dětí a kardiovaskulární systém, *Zdraví Euro/ Postgraduální medicína,*2008. http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/cytostatika-u-deti-a-kardiovaskularni-system-367846. (15.4.2016)
24) Swift P. L., Cutts M. S., Nudelman A., Levovich I., The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic Inhibitor sobuzoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61, 739-749, 2007.
25) Toshiharu Narita, Yuji Koide, Shin-ichi Yaguchi, Antitumor activity and schedule depence of orally administered MST-16, a novel derivative of bis(2,6-dioxopiperazine), *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 28, 235-240, 1991.
26) Pauwels S., Leen Antonio, Jans I., Anneleen Lintermans, Sensitive routine liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for serum estradiol and estrone without derivatization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 8569-8577, 2013.