

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Vývoj Stage tips-UHPLC-MS/MS metody pro
stanovení statinů v lidském séru**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, Csc.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Lukáš Otoupal

Školitel: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Název diplomové práce: **Vývoj Stage tips-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení statinů v lidském séru.**

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metody pro stanovení klinicky významných statinů v lidském séru. Pro extrakci statinů byla zvolena a optimalizována extrakce s využitím Stage tips pipetovacích špiček. Statiny byly proměřeny na ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu. Byl optimalizován nejen postup extrakce, ale také základní parametry hmotnostního spektrometru. Chromatografická separace byla převzata z dříve publikované práce.

Optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru byla započata výběrem prekurzorových iontů, následně optimalizací jednotlivých parametrů iontového zdroje a v konečné fázi volbou vhodného ionizačního módu, SRM přechodu a kolizní energie pro každý analyt. Pro ověření vhodnosti LC-MS metody byla změřena opakovatelnost metody ($RSD \leq 1$ pro retenční čas a $RSD \leq 10$ pro plochu píku), linearita (korelační koeficient $\geq 0,997$) a citlivost (LOQ v rozsahu 5×10^{-10} - 1×10^{-9} g/ml).

Při vývoji Stage tips metody byla provedena nejprve optimalizace na směsném standardním roztoku (výběr vhodného elučního a promývacího činidla a volba objemu vzorku a elučního činidla) a následně byl vyvinutý postup aplikován na spikované lidské sérum. Protože vybraný postup poskytl velmi nízké výtěžnosti jednotlivých statinů, byla provedena další a podrobnější optimalizace postupu na spikovaném séru. V dalších krocích vývoje bylo zjištěno, že použitý komerční sorbent Stage tips není vhodný pro extrakci statinů z lidského séra, a proto byly otestovány také sorbenty laboratorně vyráběné. Přestože nebyla optimalizovaná extrakce vhodná pro všechny stanovované statiny z důvodů nízkých výtěžností, byl vybrán nejvhodnější postup, který umožnil stanovení většiny statinů. Nalezení vhodného sorbentu pro všechny statiny bude náplní dalšího testování laboratorně vyráběných sorbentů.

Klíčová slova: statin, UHPLC-MS/MS, Stage tips, extrakce pomocí pipetovacích špiček, PT-SPE

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Lukáš Otoupal

Supervisor: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Title of Thesis: **Development of Stage tips-UHPLC-MS/MS method for determination of statins in human serum**

This diploma thesis deals with development of a method for determination of statins in human serum. Extraction by Stage tips pipette tips was chosen and optimized for their extraction. The measurement was performed by the ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometer. The extraction procedure and important mass spectrometer parameters were optimized. Previously developed LC method for determination of statins was used for the analysis.

The optimization of the mass spectrometer parameters was started by the selection of precursor ions, consequently the ion source parameters were tuned and finally appropriate ionization mode, SRM transition and collision energy for each analyte were chosen. The suitability of the LC-MS method was verified by the repeatability method ($RSD \leq 1$ for the retention time and $RSD \leq 10$ for the peak area), linearity (correlation coefficient $\geq 0,997$) and sensitivity (LOQ in the range of 5×10^{-10} - 1×10^{-9} g/ml).

Firstly, the optimization employing mixed standard solution (elution and washing solvent, sample and elution volume) was performed during Stage tips method development. Subsequently, the developed method was applied to spiked human serum samples. As the selected procedure provided a very low recovery for individual statins, more detailed optimization on the spiked human serum was performed. In further development steps it was found that commercial sorbent used Stage tips are not suitable for the extraction of statins from human serum. Due to this reason the laboratory produced sorbents were also tested. Although optimized extraction procedure was not suitable for all determined statins due to the low recovery, the most suitable procedure for majority of statins was selected and the suitability of laboratory produced sorbent was proved. Searching for the more suitable sorbent for all statins will be covered in another testing of laboratory produced sorbents.

Keywords: statins, UHPLC-MS/MS, Stage tips, extraction by the pipette tips, PT-SPE

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

V Hradci Králové 16. 5. 2016

.....

Lukáš Otoupal

Děkuji RNDr. Haně Vlčkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, cenné rady, připomínky, pomoc a čas, který mi věnovala při vypracování diplomové práce. Poděkování patří také všem pracovníkům Katedry analytické chemie, zejména Mgr. Pavlu Svobodovi za vstřícné jednání a příjemnou atmosféru. Také bych chtěl poděkovat mojí rodině a přítelkyni za trpělivost a podporu při studiu.

Obsah

1.	Úvod	11
2.	Cíl a zadání diplomové práce	13
3.	Teoretická část	15
3.1	Statiny	16
3.1.1	Chemická struktura statinů	17
3.1.2	Mechanismus účinku statinů	21
3.1.3	Farmakokinetika statinů	21
3.1.4	Lékové interakce na úrovni cytochromů P450	23
3.2	Chromatografické metody	23
3.2.1	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)	24
3.3	Hmotnostní spektrometrie - MS	26
3.3.1	Iontové zdroje	27
3.3.2	Hmotnostní analyzátory	30
3.3.3	Detektory hmotnostního spektrometru	33
3.4	Metody přípravy vzorků	34
3.4.1	Srážení proteinů (PP)	35
3.4.2	Extrakce na tuhou fázi (SPE)	35
3.4.3	Extrakce pomocí pipetovacích špiček (PT-SPE)	37
3.4.4	Disperzní extrakce pomocí pipetovacích špiček (DPX)	37
4.	Experimentální část	39
4.1	Použité chemikálie	40
4.2	Použité přístroje a materiály	40
4.3	Příprava standardů	41
4.4	Příprava roztoků	42
4.5	Chromatografické podmínky	43
4.6	Optimalizace podmínek pro MS detekci	43
4.6.1	Výběr prekurzorových iontů	43
4.6.2	Optimalizace podmínek iontového zdroje	43
4.6.3	Výběr produktových iontů a optimalizace iontových přechodů	44
4.7	Finální postup metody přípravy vzorků	44

4.8	Opakovatelnost metody	46
4.9	Ověření linearity a citlivosti metody	46
5.	Výsledky a diskuse	47
5.1	Optimalizace podmínek MS detekce.....	48
5.1.1	Výběr prekurzorových iontů (MS sken).....	48
5.1.2	Optimalizace parametrů iontového zdroje (SIM mód)	48
5.1.3	Výběr produktových iontů a výběr iontových přechodů.....	49
5.2	Citlivost, linearita a opakovatelnost LC-MS metody.....	51
5.3	Optimalizace metody přípravy vzorků.....	54
5.3.1	Výběr vhodného elučního činidla	54
5.3.2	Optimalizace objemu elučního činidla	56
5.3.3	Výběr vhodného promývacího činidla	58
5.4	Ověření vyvinutého postupu Stage tips extrakce na spikovaném lidském séru	60
5.4.1	Ověření vhodnosti filtru použitého pro filtraci eluátu.....	61
5.4.2	Srážení proteinů (precipitace) před Stage tips extrakcí.....	62
5.4.3	Možnost využití laboratorně připravených pipetovacích špiček plněných sorbentem	63
6.	Závěr	66
7.	Použitá literatura.....	70

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
AmAc	octan amonný
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
AT	atorvastatin
ATL	atorvastatin lakton
BEH	bridged etylene hybrid
CAP	napětí na kapiláře
CE	kolizní energie
CG	průtok plynu na vstupním kuželu
c_m	koncentrace složky v mobilní fázi
c_s	koncentrace složky ve stacionární fázi
CV	napětí na vstupním kuželu
CYP3A4	cytochrom P450 izoformy 3A4
Desolv T	desolvační teplota
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
DM	diabetes mellitus
DPX	disperzní extrakce pomocí pipetovacích špiček
ESI	ionizace elektrosprejem
EXTR	napětí na extraktoru
GASSF	průtok desolvačního plynu
GC	plynová chromatografie
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol
HF-LPME	extrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDL	lipoprotein se střední hustotou
K_D	distribuční konstanta
KVO +	přítomnost kardiovaskulárního onemocnění

LC	kapalinová chromatografie
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MAU	mikroalbuminurie
MEPS	mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu
MIP	molekulárně vtištěné polymery
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NL	skan neutrálních ztrát
PI	skan iontů prekurzoru
PP	srážení proteinů
PR	skan produktových iontů
PSI	anglosaská jednotka tlaku
PTFE	polytetrafluorethylen
PT-SPE	extrakce pomocí pipetovacích špiček
PTV	pitavastatin
PTVL	pitavastatin lakton
PV	pravastatin
PVL	pravastatin lakton
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor
RAM	materiály s omezeným přístupem
RF	napětí na hexapólu
RSD	relativní směrodatná odchylka
RV	rosuvastatin
RVL	rosuvastatin lakton
SBSE	sorpční extrakce míchadlem
SDME	extrakce do jediné kapky rozpouštědla
SIM	selektivní záznam vybraného iontu
Source T	teplota ve zdroji
SPE	extrakce na tuhou fázi

SPME	mikroextrakce na tuhou fázi
SRM	záznam vybrané reakce
SST	test způsobilosti systému
SV	simvastatin
SVA	simvastatin kyselina
TC	celkový cholesterol
TFC	chromatografie s turbulentním průtokem
TG	triglyceridy
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

1. Úvod

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metody pro stanovení statinů v lidském séru. Pro extrakci statinů byla zvolena a optimalizována extrakce s využití Stage tips pipetovacích špiček. Statiny byly proměřeny na ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografii ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu.

Statiny jsou často používané léčivé látky, které slouží ke snížení cholesterolu v krvi. Jejich účinek spočívá v inhibici enzymu 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reduktázy, čímž dochází ke snížení syntézy cholesterolu v těle a následnému zmnožení LDL-receptorů v játrech. Výsledným efektem je tedy zvýšené vychytávání cholesterolu z krve.

Protože biologický materiál představuje složitou matici obsahující nejen proteiny, ale také další kontaminanty, nepostradatelnou součástí metody je úprava vzorků před analýzou. Obecně nejpoužívanější technikou je v současné době proteinová precipitace a extrakce na tuhou fázi. Nicméně v poslední době se trendem v oblasti přípravy vzorků stala miniaturizace množství vzorku a rozpouštědel a také minimalizace finanční a časové náročnosti. Nami vybraná technika úpravy vzorku, extrakce pomocí pipetovacích špiček funguje na stejném principu jako SPE a zároveň splňuje současné trendy v oblasti přípravy vzorků. Z těchto důvodů se jeví jako velmi perspektivní.

2. Cíl a zadání diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení pěti klinicky významných statinů a jejich interkonverzních produktů v lidském séru pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Jako technika úpravy vzorků byla zvolena extrakce pomocí pipetovacích špiček.

Chromatografické podmínky byly převzaty z dříve vyvinuté metody, nicméně optimalizace nastavení hmotnostního spektrometru byla provedena. Celá LC-MS/MS metoda byla ověřena na základě opakovatelnosti metody, linearity a citlivosti.

Hlavním cílem bylo optimalizovat postup pro extrakci statinů z lidského séra s využitím komerčně dostupných Stage tips pipetovacích špiček a zároveň potvrdit nebo vyvrátit jejich vhodnost pro tyto účely. V první fázi byla na standardním směsném roztoku provedena optimalizace složení elučního a promývacího činidla a zároveň zvoleny vhodné objemy vzorku a elučního činidla. Následně byl zvolený postup aplikován na spikované lidské sérum a provedena další a podrobnější optimalizace. Na závěr byl na základě výtěžnosti jednotlivých analytů stanoven nejvhodnější postup pro komerčně vyráběný Stage tips sorbent.

Na základě výsledků bylo také v rámci této diplomové práce provedeno předběžné testování laboratorně vyráběných pipetovacích špiček. A následně byla porovnána vhodnost obou typů špiček (komerčních a laboratorně vyráběných) pro extrakci statinů z lidského séra.

3. Teoretická část

3.1 Statiny

Statiny patří mezi léčiva snižující koncentraci lipidů v plazmě. Lipidy jsou tvořeny zejména triacylglyceroly a cholesterolem, ale také například fosfolipidy. Triacylglyceroly představují energetické zásoby v organismu a cholesterol je významný zejména jako stavební jednotka biologických membrán. Oba tyto lipidy jsou nezbytné a esenciální složky organismu. Protože se jedná o látky ve vodě nerozpustné, nemohou být transportovány krví volně a jsou tedy transportovány ve formě lipoproteinů. Jednotlivé typy lipoproteinů se liší množstvím a složením lipidů (Tab. 1). Hodnoty jednotlivých lipidů v krvi požadovaných při léčbě statiny v závislosti na typu léčeného onemocnění jsou uvedeny v Tab. 2 [1][2].

	Složení v procentech [%]			
	Triglyceridy	Cholesterol	Fosfolipidy	Proteiny
Chylomikrony	90	5	4	1
VLDL	60	15	15	10
LDL	10	42	22	26
HDL	5	20	30	45

Tab. 1: Typy a složení lipoproteinů v krvi [2]

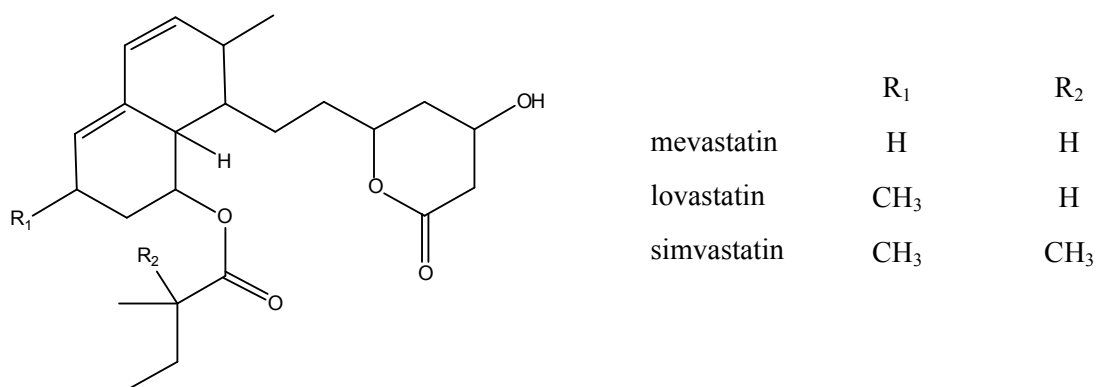
Parametr	Populace obecně	Riziko < 5 %, DM2, DM1 + MAU	KVO +
TC (mmol/l)	< 5,0	< 4,5	< 4,0
LDL-C (mmol/l)	< 3,0	< 2,5	< 2,0
HDL-C (mmol/l)	muži	> 1,0	
	ženy	> 1,2	
TG (mmol/l)		< 1,7	

TC: celkový cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, TG: triglyceridy, DM2: diabetes mellitus 2. typu, DM1 :diabetes mellitus 1. typu, MAU: mikroalbuminurie, KVO +: přítomnost kardiovaskulárního onemocnění

Tab. 2: Cílové hodnoty krevních lipidů podle celkového kardiovaskulárního rizika [2]

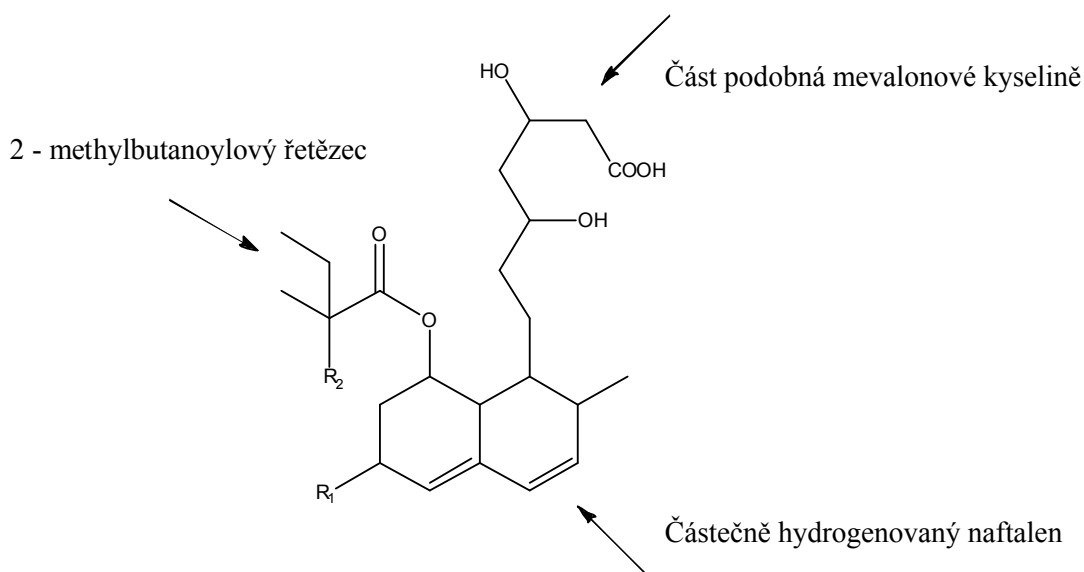
3.1.1 Chemická struktura statinů

Nejstarší známý inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, který sloužil pouze jako předloková struktura, ale nikdy nebyl v klinické praxi použit, je mevastatin (Obr. 1). Další dva statiny, které již byly využívány v klinické praxi, jsou lovastatin a simvastatin. Jejich struktury jsou znázorněny na Obr. 1. Tyto tři původní statiny společně s pravastatinem mají mikrobiologický, tedy přírodní původ [3][5].



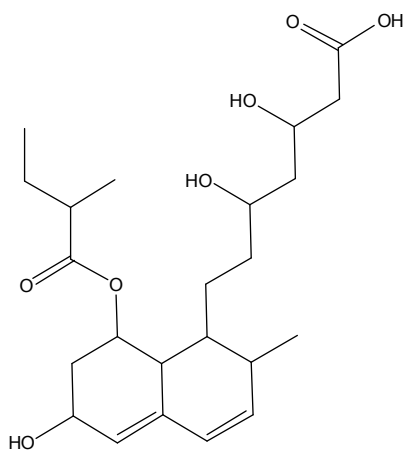
Obr. 1: Struktura tří statinů ze „starší generace“ [3]

Tato skupina inhibitorů HMG-CoA reduktázy (tedy lovastatin a simvastatin) obsahují v molekule částečně hydrogenované naftalenové jádro, které se váže na hydrofobní část receptoru. Na tento skelet je esterově vázán postranní 2-methylbutanylový zbytek a to prostřednictvím dvou uhlíkatého spojovacího řetězce seskupením, které je strukturou podobné mevalonové kyselině. Právě tato část je zodpovědná za kompetitivní inhibici HMG-CoA reduktázy. Tyto statiny jsou podávány jako proléčiva, jejichž aktivní část molekuly má charakter laktonového kruhu, ten se hydrolyzuje a uvolňuje se seskupení odpovídající 3,5-dihydroxyvalerové kyselině. Další statin strukturně podobný „starší generaci“ statinů, který také obsahuje částečně hydrogenované naftalenové jádro, je pravastatin (Obr. 3). Na rozdíl od předchozích statinů není podáván jako proléčivo.

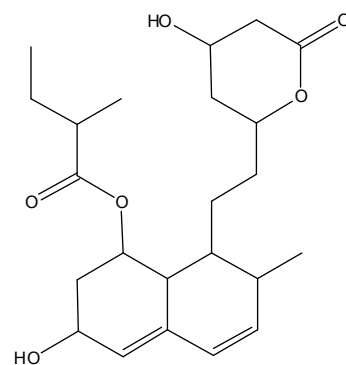


Obr. 2: Aktivní forma statinů (upraveno podle [3])

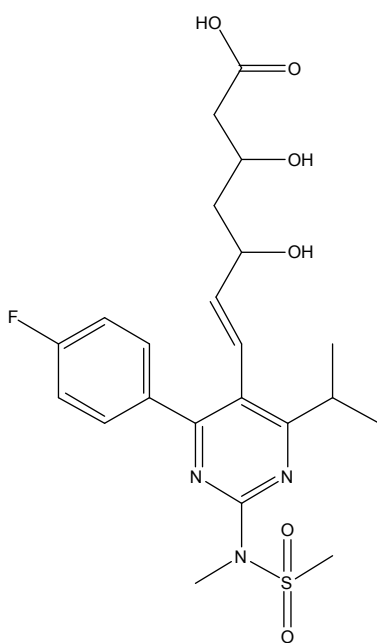
Seskupení 3,5-dihydroxyvalerové kyseliny, které je charakteristické pro všechny statiny a je z něho vytvářen laktonový kruh, je přítomno i u novějších statinů, ale hydrogenované naftalenové jádro je nahrazeno strukturou jinou. U Fluvastatinu je tato struktura nahrazena indolovým skeletem. Rosuvastatin (Obr. 5) obsahuje hydrofilní polarizovanou methylsulfoamidovou skupinu, která je navázána na pyrimidin. Díky této skupině rosuvastatin silně inhibuje HMG-CoA reduktázu. Pitavastatin (Obr. 7) má aromatickou část tvořenou substituovaným chinolinem. Atorvastatin (Obr. 9) má aromatická část tvořenou složitě substituovaným pyrrolem. Výše uvedené novější statiny se nepoužívají jako proléčiva, aktivní část molekuly mají otevřenou, používají se ve formě solí a jejich struktury mají syntetický původ [3][4][5].



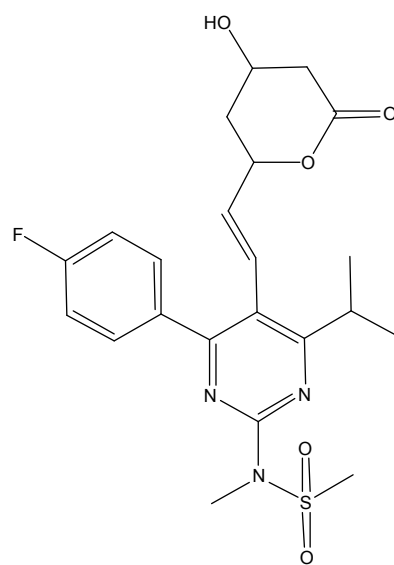
Obr. 3: Pravastatin



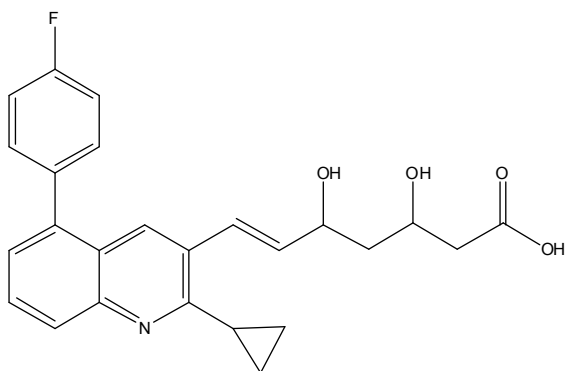
Obr. 4: Pravastatin lakton



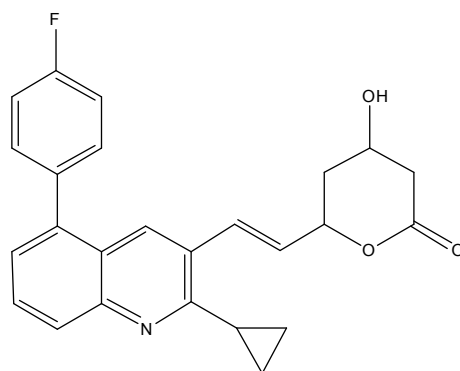
Obr. 5: Rosuvastatin



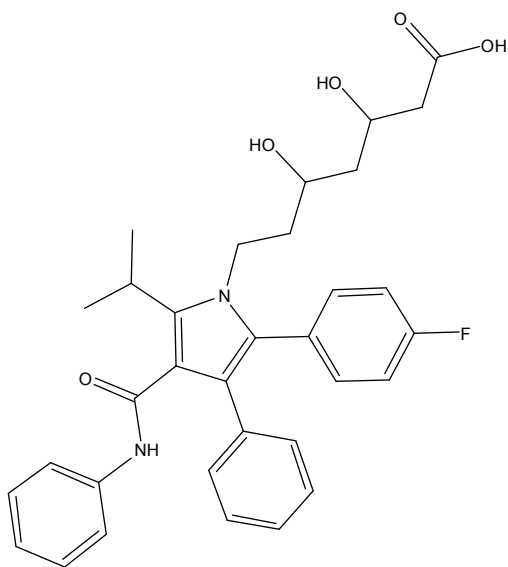
Obr. 6: Rosuvastatin lakton



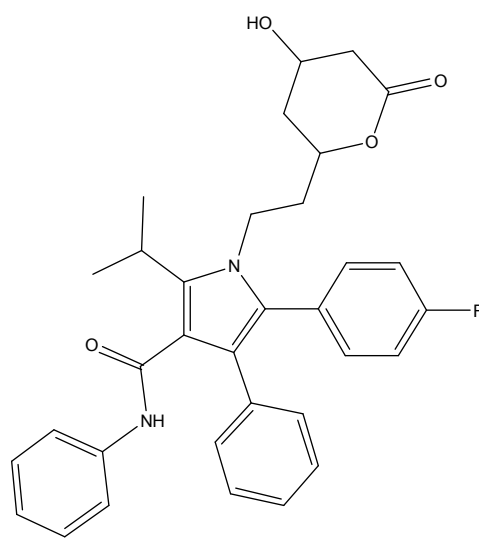
Obr. 7: Pitavastatin



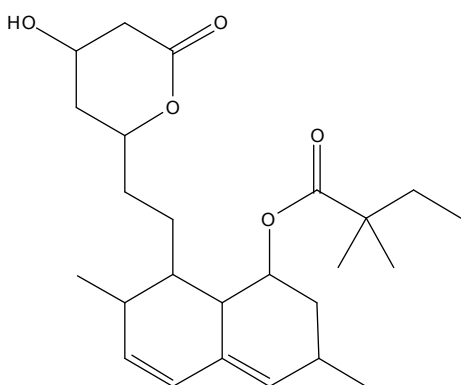
Obr. 8: Pitavastatin lakton



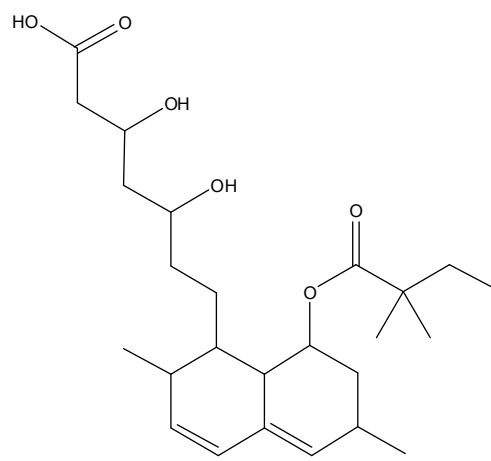
Obr. 9: Atorvastatin



Obr. 10: Atorvastatin lakton



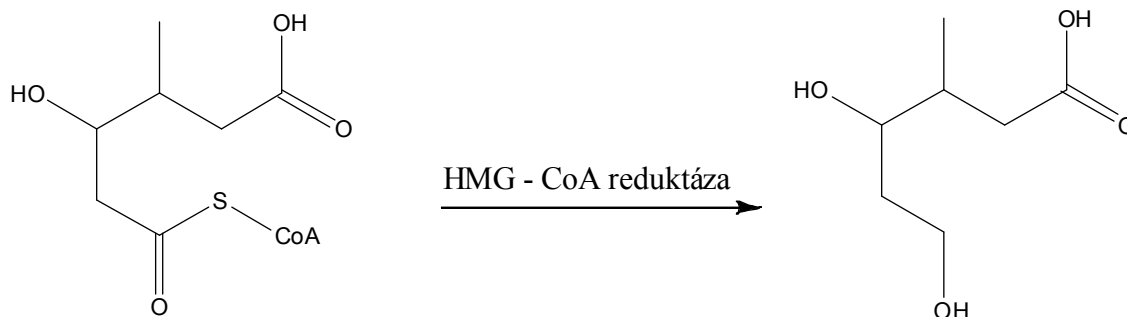
Obr. 11: Simvastatin



Obr. 12: Simvastatin kyselina

3.1.2 Mechanismus účinku statinů

Syntéza cholesterolu je velmi složitý proces zahrnující více než 25 kroků. Limitující reakce syntézy cholesterolu a rychlost celého procesu je určována převedením aktivované kyseliny HMG-CoA na kyselinu mevalonovou [3][5].



Obr. 13: Limitující reakce syntézy cholesterolu [5]

Tuto reakci katalyzuje HMG-CoA reduktáza, která je lokalizovaná v játrech na hladkém endoplazmatickém retikulu. Látky, které jsou strukturně podobné, mohou tento enzym inhibovat. Tím se sníží syntéza cholesterolu a dochází k zmnožení lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) receptorů jaterních buněk a tím pádem ke zvýšení vychytávání cholesterolu z krve. Jaterní buňky zřejmě vychytávají i částice lipoproteinů se střední hustotou (IDL). Tím se urychlí eliminace částic LDL a také se sníží jejich produkce (až o 40 %). Koncentrace lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) mírně stoupne (až o 15 %) a koncentrace triglyceridů klesne až o 25 % [5].

3.1.3 Farmakokinetika statinů

Biologická dostupnost statinů není úplná, protože je zde významný efekt prvního průchodu játry. Tento fakt vede k žádoucímu zacílení účinku statinů na játra, kde je cholesterol syntetizován. Biologická dostupnost statinů po perorálním podání se pohybuje od 12 % pro atorvastatin až po 90 % pro fluvastatin. Podání statinů není nijak zvlášť ovlivněno přítomností potravy. Statiny podávány v laktonové formě (lovastatin a simvastatin) přestupují z krve vrátnicovou žílou do jater a tam jsou přeměněny na účinnou formu. Po podání pravastatinu, fluvastatinu, rosuvastatinu, pitavastatinu a atorvastatinu se účinné látky nahromadí přímo v hepatocytech působením aktivního membránového mechanismu. Statiny jsou vylučovány močí jen z 10 - 20 %, zbytek je

vylučován stolicí. Biologický poločas rosuvastatinu je 20 hodin, atorvastatinu 14 hodin. U ostatních statinů se pohybuje okolo 4 hodin. Nejvyšších plazmatických hladin dosahují statiny 2 - 4 hodiny po podání. Inhibitory HMG-CoA reductázy jsou podávány jednou denně, nejlépe večer, jelikož aktivita této reductázy je v noci nejvyšší. U rosuvastatinu a atorvastatinu není podání večer nutné, avšak důležité je, aby všechny statiny byly podávány každý den ve stejnou dobu. Dávkování jednotlivých statinů je uvedeno v Tab. 3 [5][6].

Lovastatin	20 - 80 mg / den
Simvastatin	10 - 40 mg / den
Fluvastatin	20 - 40 mg / den
Pravastatin	10 - 40 mg / den
Atorvastatin	10 - 40 mg / den
Rosuvastatin	10 - 40 mg / den

Tab. 3: Dávkování inhibitorů syntézy cholesterolu [5][6]

Statiny se používají na snížení hypercholesterolemie. Důsledkem tohoto účinku je prevence ischemické choroby srdeční. Také mají pozitivní účinek při prevenci reinfarktů i k udržení koronárních otevřených bypassů. Rovnovážný stav účinku se dostaví s latencí několika týdnů. Je nutno dávkování individuálně přizpůsobit účinkům.

Mezi nežádoucí účinky statinů patří jak necharakteristické účinky, jako jsou trávicí poruchy, kožní potíže a bolesti hlavy, tak nežádoucí účinky charakteristické, mezi které patří poruchy jaterních funkcí a kosterního svalstva. Vzácně může dojít ke ztrátě kreatinin fosfokinázy a vývoji rhabdomyolýzy (cca u 0,1 % pacientů), která může dále způsobit myoglobinemii a následně až selhání ledvin. Tyto účinky se objevily zejména po kombinaci statinů s fibráty, deriváty kyseliny nikotinové a také s cyklosporinem A. Z těchto důvodů je vhodné provádět důslednou kontrolu aktivity kreatinin fosfokinázy a transamináz. V případě nárůstu těchto hodnot na trojnásobek je třeba terapii statiny přerušit. [5][6].

3.1.4 Lékové interakce na úrovni cytochromů P450

Statiny, jako inhibitory HMG-CoA reductázy jsou biotransformovány v játrech především CYP3A4 (cytochrom P450 izoformy 3A4). Riziko nežádoucích účinků se zvyšuje při současném podávání statinů s látkami, které silně interagují s CYP3A4. Farmakokinetické interakce byly potvrzeny u současného podávání atorvastatinu, cerivastatinu, simvastatinu a lovastatinu a typických substrátů inhibitorů CYP3A4:

- Cyklosporin A
- Azolová antimykotika (ketokonazol, itrakonazol)
- Inhibitory lidského virusu imunitní nedostatečnosti (HIV) - proteázy (ritonavir)
- Makrolidová antibiotika (erytromycin, klarithromycin, azithromycin)
- Blokátory vápníkového kanálu (diltiazem, verapamil)
- Antiarytmikum (amiodaron)
- Grapefruitová šťáva

Pokud by došlo k současnému podání inhibitorů CYP3A4 s uvedenými statiny, byla by plazmatická koncentrace v důsledku inhibice metabolismu statinů až dvanáctkrát vyšší. Tím se velmi výrazně zvýší pravděpodobnost výskytu závažných nežádoucích účinků. Proto je důležité tyto interakce hlídat. U novějšího statinu, rosuvastatinu, je metabolická činnost CYP3A4 velmi nízká a další z novějších statinů, pitavastatin, nemá dosud metabolickou činnost CYP3A4 prokázanou [6][7][8].

3.2 Chromatografické metody

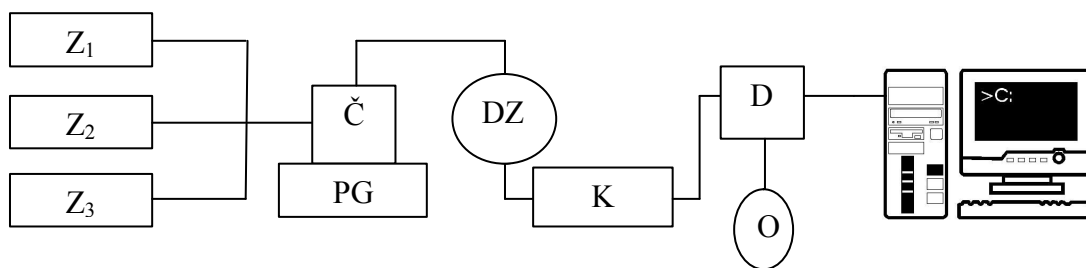
Chromatografické metody jsou široce používány v analýze léčiv. Jedná se o separační metody, které umožňují kvalitativní i kvantitativní hodnocení látek. Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, stacionární tedy nepohyblivou a mobilní tedy pohyblivou. Během chromatografického procesu dochází k postupnému a mnohonásobnému ustalování rovnováhy dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Distribuce jednotlivých látek mezi dvě fáze je dána distribuční konstantou K_D , pro kterou platí vztah $K_D = c_s / c_m$, kde c_s je koncentrace složky ve stacionární fázi a c_m v mobilní fázi. Čím je vyšší K_D látky, tím déle je zadržována ve stacionární fázi a tudíž má vyšší retenci. Na základě různé retence látek dochází k separaci jednotlivých složek analyzovaných směsí [9][10].

Chromatografické metody lze rozdělit podle charakteru mobilní fáze na plynovou chromatografii (GC) a kapalinovou chromatografii (LC). V případě plynové chromatografie je mobilní fáze inertní plyn a v případě kapalinové chromatografie kapalina. LC může být dále dělena na základě prostorového uspořádání: LC v plošném uspořádání, kam patří např. tenkovrstvá chromatografie (TLC) a LC v kolonovém uspořádání, kam se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) [10].

3.2.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metod, která nachází velké uplatnění nejen v oblastech bioanalýzy, analýzy léčiv, ale také v analýze potravin a agrochemikálií. Technologie UHPLC vychází z techniky HPLC. Mobilní fáze je kapalina a stacionární fáze je buď pevná látka anebo kapalina ukotvená na pevném nosiči. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. Chromatografická separace je dána souborem interakcí analytu mezi mobilní fází a stacionární fází, kdy analyt je unášen mobilní fází a na základě retence jednotlivých látek ve stacionární fází dochází k jejich separaci.

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí a jeho konstrukce je znázorněna na Obr. 14. Ze zásobníků mobilní fáze (Z_1 , Z_2 , Z_3) je pomocí vysokotlakého čerpadla (Č) mobilní fáze čerpána přes analytickou kolonu do detektoru (D). Programovací jednotka (PG) neboli směšovač mobilní fáze umožňuje užití vícesložkové mobilní fáze a tedy smísení jednotlivých rozpouštědel mobilní fáze. Dávkovací zařízení (DZ) umístěné před analytickou kolonou umožňuje automatický nástřik vzorku do toku mobilní fáze. Srdcem celého chromatografického systému je analytická kolona (K), která umožňuje separaci směsi látek na jednotlivé složky, které jsou následně unášeny mobilní fází do detektoru. Detektor (D) indikuje průtok separované složky detekční celou a přenáší vhodně upravený signál do počítače, který ho zpracuje. Počítač zároveň slouží k řízení chodu celého UHPLC systému. Použitý roztok se vyloučí jako odpad (O) [9][10][11].



Obr. 14: Schéma UHPLC (upraveno podle [10])

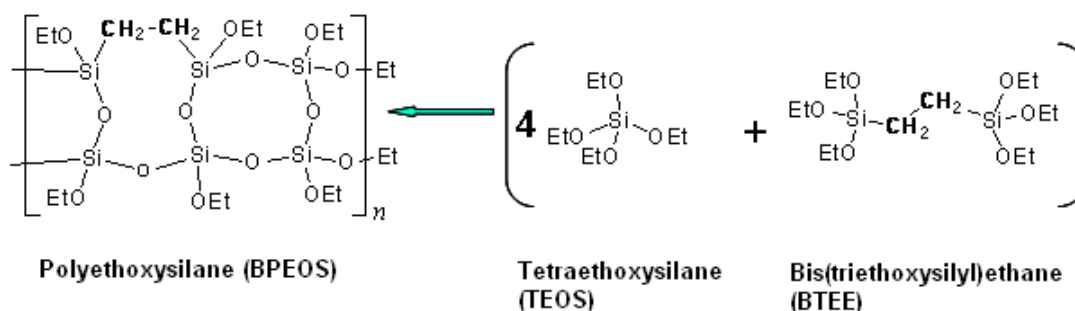
UHPLC používá chromatografické kolony s částicemi menšími než 2 μm , což významně zvyšuje separační účinnost a zároveň velmi výrazně zvyšuje zpětný tlak systému. UHPLC dále poskytuje další výhody jako je vyšší citlivost, kratší doba analýzy, vyšší produktivita, menší spotřeba rozpouštědel a tedy nižší náklady na provoz [9][13][15].

Přestože jednotlivé součásti UHPLC jsou shodné jako u klasického LC systému, z výše zmíněných důvodů bylo nutné provést určité modifikace, týkající se zejména mechanické odolnosti, tedy užití tlaku odolných spojení (zpětný tlak až 15000 psi), použití robustnějšího čerpadla, speciálního způsobu dávkování (nižší objemy dávkování), rychlejšího sběru dat, užití speciální průtokové cely a minimalizace mrtvého objemu systému. První komerčně dostupný UHPLC systém byl roku 2004 přestaven firmou Waters. V posledních několika letech tato technika zaznamenává velmi široké použití, o čemž svědčí i stále se zvyšující počty publikací. [9][12][13][14].

3.2.1.1 Stacionární fáze a kolony pro UHPLC

UHPLC kolony jsou tvořeny sorbentem s částicemi menšími než 2 μm a z důvodu generace vysokého zpětného tlaku systému musí UHPLC sorbenty poskytovat velmi vysokou mechanickou stabilitu. Existují dva základní typy sorbentů: anorganický nosič tedy silikagel a organický nosič tedy polymer nebo uhlík. Oba tyto typy poskytují určité výhody a nevýhody. Sorbenty na bázi silikagelu vykazují vysokou účinnost, vyšší mechanickou odolnost a umožňují snadnou predikci retence analytů. Na druhou stranu mají omezenou pH stabilitu, což znesnadňuje zejména analýzu bazických látek. Sorbenty na bázi polymeru vykazují vyšší chemickou stabilitu a mohou tedy pracovat v široké oblasti pH. Nicméně jejich nevýhodou je nižší účinnost, špatná predikce retence látek a nižší mechanická odolnost. Z těchto důvodů byla vyvinuta třetí skupina sorbentů „hybridní“, které využívají výhodných vlastností obou předchozích sorbentů. Jedním z příkladů a zároveň první hybridní stacionární fáze je bridged ethylene hybrid

(BEH) sorbent (Obr. 15). Ethylenové můstky navázané na hydroxylové konce silikagelu zvyšují mechanickou a chemickou odolnost sorbentu. Tento sorbent tedy poskytuje stabilitu v širokém rozsahu pH (1-11(12) na základě navázaného ligandu) a vyšší odolnost vůči vymývání ligandu [9][16][17][18].

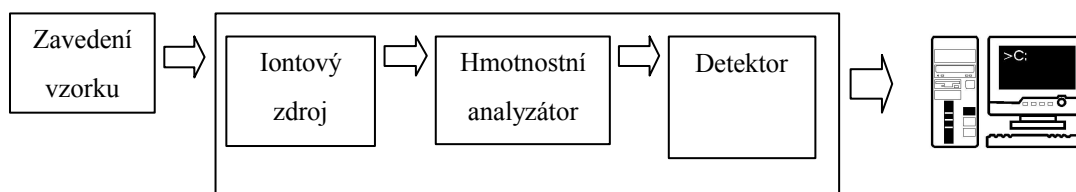


Obr. 15: Ethylenové můstky [18]

Velikost částic UHPLC BEH sorbentu je 1,7 μm a jsou vyráběny v celé řadě modifikací: C18, C8, Shield, Phenyl, Amide a HILIC. Postupně se zvyšujícím se zájmem o UHPLC techniku bylo na trh uváděno stále více typu UHPLC kolon a to jak hybridních (Altima HP a Pathfinder), tak na bázi silikagelu (Platinum, Nucleodur, Hypersil Gold a Zorbax). V současné době je také dostupná široká škála UHPLC kolon s různým průměrem, délkou a s navázanými různými ligandy [16][17][19].

3.3 Hmotnostní spektrometrie - MS

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS) má široké použití např. ve fyzice, chemii, medicínské chemii, farmacii a je používána ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Tato metoda funguje na principu převedení molekul na ionty, rozdělení těchto iontů probíhá podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následném záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Hlavní výhodou této techniky je zejména vysoká citlivost a nevýhodou vysoká pořizovací cena. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí a to z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě části. Tento proces se nazývá ionizace. Hmotnostní analyzátor rozděluje ionty v plynné fázi za vysokého vakua podle m/z a detektor slouží k detekci separovaných iontů a určení jejich relativní intenzity [20][21][22].



Obr. 16: Schéma hmotnostního spektrometru (upraveno podle [22])

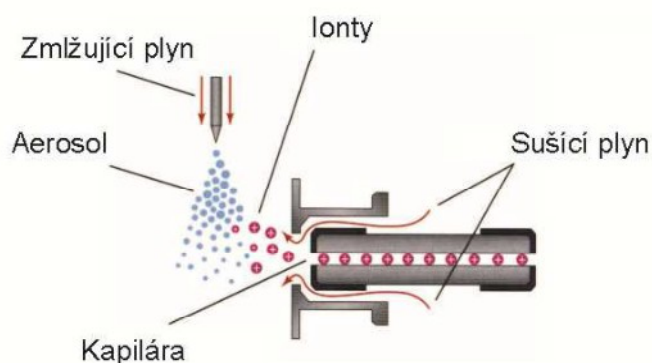
3.3.1 Iontové zdroje

Iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice tedy ionty. Tyto techniky můžeme rozdělit na tvrdé ionizační techniky a měkké ionizační techniky. Při tvrdé ionizaci dochází ke vzniku molekul s velkým přebytkem ionizační energie, který se projevuje fragmentací molekulárního iontu a vznikem iontů s lichým počtem elektronů. Nejtvrdší a zároveň nepoužívanější tvrdou ionizační technikou je elektronová ionizace (EI), používá se zejména ve spojení GC-MS. Při měkké ionizaci získá ionizovaná molekula mnohem menší množství energie, než je tomu u tvrdé ionizační techniky. Z těchto důvodů je v MS spektrech pozorováno minimální množství fragmentových iontů a jsou patrné zejména protonované a deprotonované molekuly. Měkké ionizační techniky jsou užívány hlavně ve spojení LC-MS. Mezi nejrozšířenější typy patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), která představuje velmi šetrnou ionizační techniku používanou zejména pro analýzu biomolekul. Protože neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, výběr optimálního způsobu ionizace je závislý zejména na vlastnostech analytů, jako je např. polarita, těkavost, molekulová hmotnost, tepelná stabilita a prostorové uspořádání molekul [20][23][24].

3.3.1.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

Ionizace elektrosprejem je ionizační technika pracující za atmosférického tlaku a používá se hlavně ve spojení LC-MS. Analyt rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, kterým je např. metanol, acetonitril nebo jejich kombinace s vodnou fází vstupuje kovovou kapilárou do iontového zdroje. Na vstupní kapiláru je přiváděno silné elektrické pole, čímž dochází k nabití molekul analytu. Pomocí zmlžovacího plynu

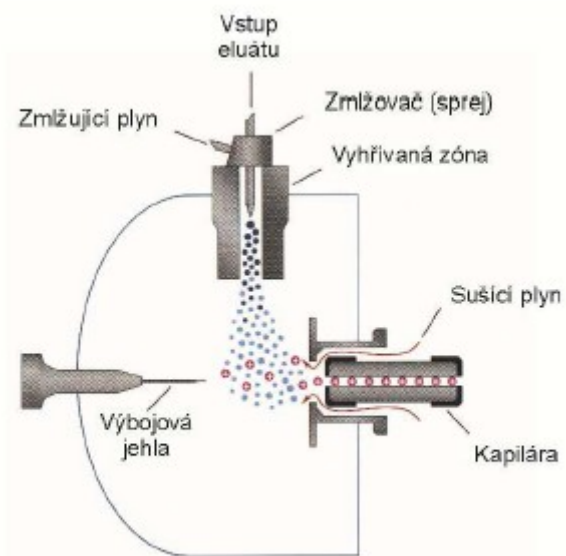
dochází ke zmlžení roztoku vzorku a vzniku elektricky nabitých kapiček. Sušící plyn usnadňuje odpařování rozpouštědla z povrchu kapiček, čímž dochází ke zvětšování povrchového napětí uvnitř kapky. Po překročení kritické hodnoty povrchového náboje dochází ke Coulombické explozi. Při tomto opakovaném jevu dochází postupně k odštěpování jednotlivých iontů anebo k rozštěpení na menší nabité kapičky. Posledním krokem je transport iontů z atmosférické oblasti zdroje do vakua a hmotnostního analyzátoru [23][24].



Obr. 17: Ionizace elektrosprejem (ESI) [23]

3.3.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

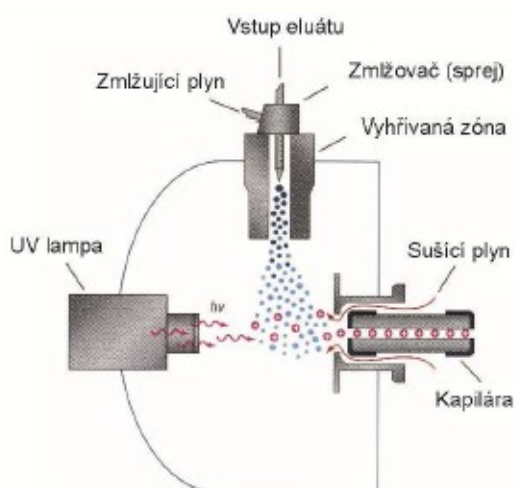
APCI je ionizační technika, která probíhá za atmosférického tlaku při vysokých teplotách (250 - 400 °C). Je vhodná pro nepochopitelné až středně polární látky. Na rozdíl od ESI ionizace probíhá v plynné fázi a jako zdroj napětí slouží výbojová jehla. Protože mobilní fáze je v nadbytku při koronovém výboji, dochází nejprve k její ionizaci a až následně pomocí ion-molekulárních reakcí dochází k ionizaci analytu. Přítomný protiproud sušícího plynu slouží hlavně k rozbití případných nekovalentních klastrů [23][24].



Obr. 18: Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [23]

3.3.1.3 Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

Ionizační technika APPI pracuje na stejném principu jako APCI. Uspořádání iontového zdroje je tedy velmi podobné. Na rozdíl od APCI je jako zdroj napětí použita lampa s ultrafialovým zářením (UV). Dochází k interakci fotonů s analytem v plynném stavu a následné fotoexcitaci a ionizaci analytu. Tato metoda je používána zejména pro nepolární až středně polární látky [23][24].



Obr. 19: Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [23]

3.3.2 Hmotnostní analyzátory

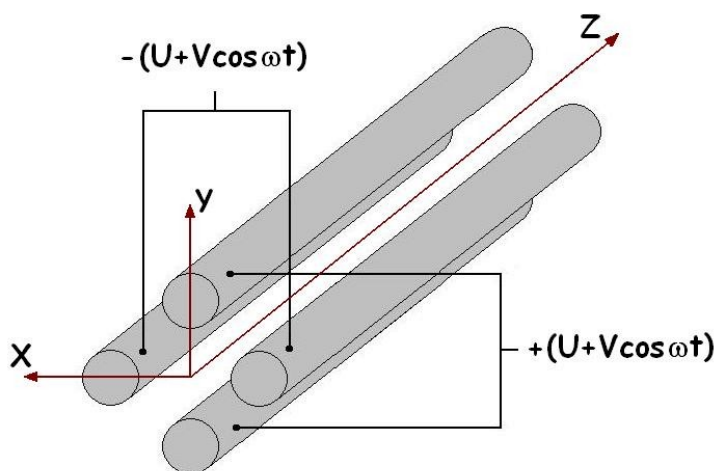
Hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle m/z . Analyzátor se nachází mezi iontovým zdrojem a detektorem. Z toho vyplývá, že molekuly již byly přeměněny na ionty. Dělení iontů podle m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:

- Zakřivení dráhy letu iontů v elektrickém nebo magnetickém poli (magnetický sektorový analyzátor)
- Různá stabilita oscilací iontů v dvoj - nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupólový analyzátor a iontová past)
- Různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu)
- Různá absorpce energie při cyklonálním pohybu iontů v kombinovaném elektrickém a magnetickém poli (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací)

V současné době mezi nejčastěji používané analyzátory patří kvadrupólový analyzátor, analyzátor doby letu a iontová past [25].

3.3.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu, na něž je vkládáno určité napětí. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na dvě zbývající tyče je vloženo záporné stejnosměrné napětí. Zároveň na všechny čtyři tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Vstupující ionty, které jsou přivedeny do středu kvadrupólu začnou oscilovat. Tato oscilace je stabilní pouze pro ionty s určitým poměrem m/z a jen tyto ionty kvadrupólem projdou do detektoru. Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Skenováním jsou propuštěny postupně všechny ionty z požadovaného rozsahu spektra. Nebo kvadrupólový analyzátor můžeme přepnout do režimu selektivního záznamu iontu (SIM), který má výhodu výrazně vyšší citlivosti. Nicméně nevýhodou je ztráta informace o hmotnostním spektru daného vzorku, dostupný je pouze záznam intenzity jednoho nebo více iontů v závislosti na čase. SIM režim je vhodnější pro kvantitativní a stopovou analýzu, pokud známe strukturu stanovovaného analytu [25][27][29].



Obr. 20: Kvadrupólový analyzátor [26]

Trojitý kvadrupólový analyzátor (QqQ) je tvořen třemi kvadrupóly, které jsou seřazeny za sebou. Prostřední kvadrupól slouží jako kolizní cela, ve které pomocí kolizního plynu dochází k excitaci a následné fragmentaci iontů. Jednotlivé fragmenty jsou následně analyzovány ve třetím kvadrupólu. QqQ nachází využití zejména ve kvantitativní analýze a při MS/MS experimentech.

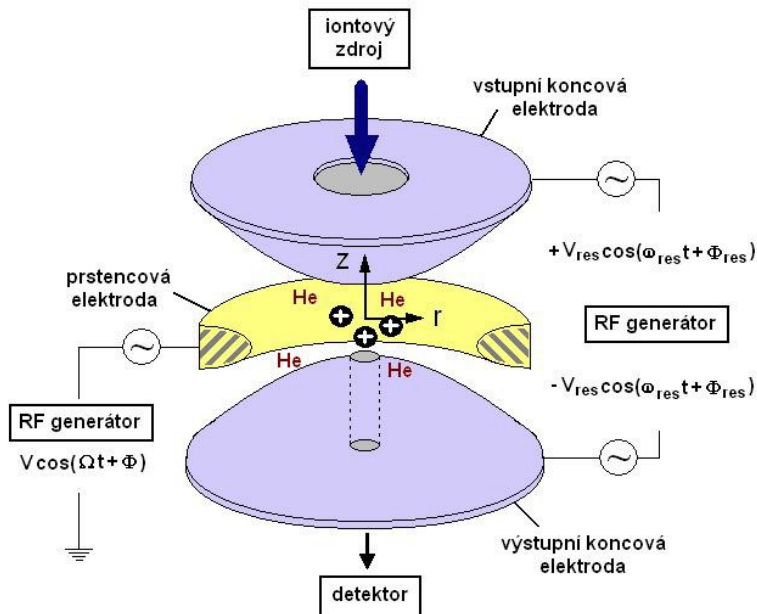
Trojitý kvadrupól umožňuje měření různých typů skenů, jako je sken produktových iontů (PR), sken iontů prekurzoru (PI), sken neutrálních ztrát (NL) a sken iontových reakcí (SRM). PR měří produktové ionty po fragmentaci vybraného iontu prekurzoru, slouží k identifikaci a k poskytování informací o struktuře látky. PI, který pro vybraný produktový fragmentový iont zjišťuje původní iont prekurzoru, poskytuje informace o struktuře látky. V NL dochází ke ztrátě stejné neutrální částice o určité m/z , slouží k detekci látek se stejnou funkční skupinou. U SRM je potřeba, aby byly prekurzory předem známy, oproti SIM má vyšší selektivitu [25][27].

3.3.2.2 Iontová past

Existují dva typy iontové pasti:

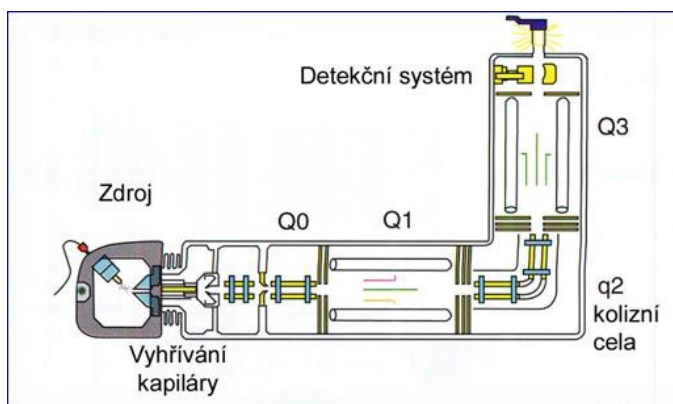
3D iontová past (sférická) je tvořena jednou prstencovou a dvěma koncovými elektrodami, na které je vloženo napětí. Do iontové pasti jsou vstupním otvorem koncové elektrody přivedeny ionty krátkým napěťovým pulzem. Vhodnými poměry napětí vloženého na prstencovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Ionty jsou postupnou změnou napětí podle jejich poměru m/z vypuzovány

výstupním otvorem na detektor. Dovnitř pasti se zavádí helium, které tlumí oscilace, tím dochází ke zvýšení rozlišení a zlepšení záchytu iontů. 3D iontová past se používá k izolaci iontů, fragmentaci a měření produktových iontů [25][27][29].



Obr. 21: 3D iontová past (sférická) [26]

Lineární iontová past je typem kvadrupólu na jehož koncích jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem, který umožňuje uchovávání iontů. Vyznačuje se vysokou kapacitou, která je až 50 x vyšší oproti 3D iontové pasti. Má také vyšší účinnost plnění a detekce iontů [25].



Obr. 22: Lineární iontová past [28]

3.3.2.3 Analyzátor doby letu

Principem analyzátoru je měření doby letu iontů, která je potřeba na překonání určité dráhy. Nejdříve jsou ionty urychleny vysokonapěťovým pulsem a následně vstupují do oblasti bez elektrického pole, tedy do letové trubice. V letové trubici získávají ionty o různé m/z různou rychlost a následně tedy na konec letové trubice dopadají v různých časech. Protože všechny ionty mají stejnou kinetickou energii, ionty s větším poměrem m/z potřebují na překonání letové dráhy delší čas než ionty, které mají poměr m/z menší. Jedná se o typický pulzní analyzátor, ve kterém hmotnostní rozsah m/z není teoreticky omezen. Často se používá ve spojení s MALDI ionizací, jeho předností je vysoká rychlost [25][29].



Obr. 23: Analyzátor doby letu [26]

3.3.3 Detektory hmotnostního spektrometru

Elektronový násobič jedná se v podstatě o fotonásobič bez ochranné baňky. Ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyrazí elektrony a ty jsou dále zesíleny systémem dynod nebo také opakovanými kolizemi na průběžně zakřivené dynodě. Představuje nejběžnější typ detektoru.

Fotonásobič funguje tak, že ionty dopadají na konverzní dynodu, tím se uvolní elektrony a dopadem na fosforovou destičku se uvolní fotony, které se zesílí ve fotonásobiči.

Faradayova klec funguje tak, že dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která emituje elektrony a indukuje se proud, který je následně zesílen a zaznamenán [25].

3.4 Metody přípravy vzorků

Příprava vzorků je jednou ze základních součástí každé analýzy biologických materiálů. Správnost jejího provedení ovlivňuje výsledek analýzy a to jak z kvantitativního, tak z kvalitativního hlediska. Příprava vzorku trvá obvykle 80 % času z celkové analýzy. Z těchto důvodů je krok přípravy vzorků nejnáročnější a nejnáchylnější ke vzniku chyb. Techniky přípravy vzorků je možné rozdělit na konvenční a moderní techniky. Jejich přehled je znázorněn v Tab. 4.

Technika	Doba extrakce [min]	Selektivita	Mnohakrokový proces	Auto-matizace	Spotřeba rozpouštědel
Konvenční techniky úpravy vzorku					
LLE	15 - 25	střední	Ano	+	vysoká
SPE	15 - 25	střední	Ano	+	relativně vysoká
PP	< 10	nízká	ne (centrifugace)	+	vysoká
Moderní techniky úpravy vzorku: mikroextrakce					
LLME	5 - 6	střední	absorpce/desorpce	-	velmi nízká
SPME	10 - 60	střední	sorpce/desorpce	+	ne
SBSE	30 - 240	střední	sorpce/desorpce	-	ne
MEPS	1 - 10	střední	Ano	+	velmi nízká
DPX	15 - 20	střední	Ano	+	velmi nízká
Moderní techniky úpravy vzorku: on-line techniky					
RAM	< 5	střední	ne (centrifugace)	+	ne
TFC	< 5	střední	Ne	+	ne
Kapilární SPME	20 - 30	střední	Ano	+	ne
Moderní techniky úpravy vzorku: vysoká selektivita					
MIP	15 - 20	vysoká	Ano	+	relativně vysoká

Tab. 4: Srovnání jednotlivých metod používaných při přípravě vzorku [17][31]

Mezi konvenční techniky patří extrakce na tuhou fázi (SPE), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a srážení proteinů (PP). SPE a LLE jsou pracné a časově náročné techniky. Na jejich principu vznikla celá řada moderních technik, jejichž cílem bylo snížit objem vzorku, zkrátit čas potřebný k přípravě, snížit objemy rozpouštědel a tím

snížit náklady. Dalšími požadavky kladenými na tyto moderní techniky jsou zvýšení účinnosti přípravy vzorku, dosažení vyšší výtěžnosti, zvýšení selektivity a zejména možnost automatizace. Tyto moderní techniky lze rozdělit na metody založené na SPE, mezi které patří mikroextrakce na tuhou fázi (SPME), sorpční extrakce míchadlem (SBSE), mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS), disperzní extrakce pomocí pipetovacích špiček (DPX) a extrakce pomocí pipetovacích špiček (PT-SPE). A moderní techniky založené na LLE, mezi které patří extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME), extrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna (HF-LPME), disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME). Do moderních technik můžeme také zařadit vysoce selektivní metody, jako například molekulárně vtištěné polymery (MIP) a on-line techniky, mezi které patří materiály s omezeným přístupem (RAM), chromatografie s turbulentním průtokem (TFC) a kapilární SPE [17][30][31][32].

3.4.1 Srážení proteinů (PP)

Je velmi široce využívaná metoda, která slouží k odstranění proteinů ze vzorku. Nejčastěji využívá srážecí reakce s organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou (např. acetonitril, metanol), solemi vícemocných iontů (např. síran zinečnatý, wolframan sodný) nebo silnými kyselinami (trifluoroctová, chlorovodíková). Precipitace spočívá v přidavku precipitačního činidla a následném odstranění sraženiny pomocí filtrace nebo centrifugace. Metoda srážení proteinů je považována za nejrychlejší a nejjednodušší postup extrakce, kterou lze použít jak pro hydrofilní tak i hydrofobní sloučeniny. Náklady na tuto metodu jsou minimální, nicméně účinnost této techniky je často nedostatečná [17][31][32].

3.4.2 Extrakce na tuhou fázi (SPE)

SPE metoda byla představena v sedmdesátých letech minulého století a v porovnání s PP poskytuje podstatně vyšší účinnost přečištění. Pevná fáze neboli sorbent je umístěn ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce. Principem této techniky je selektivní zadržování cílených analytů na pevné fázi, z čehož vyplývá, že pro úspěšnou extrakci musí mít analyt vyšší afinitu k tuhé fázi než k matici ve vzorku. SPE umožňuje nejen efektivní a selektivní přečištění vzorku, ale také zakoncentrování analytů, což je umožněno zejména díky dostupnosti širokého spektra různých sorbentů.

Dalšími značnými výhodami této metody je její možnost automatizace, vysoká výtěžnost a relativně nízká spotřeba rozpouštědel. Nicméně na druhou stranu také má některé velmi podstatné nevýhody, jako je vysoká časová a finanční náročnost a špatná reprodukovatelnost výroby SPE kolonek mezi šaržemi [17][32][33].

Provedení SPE se skládá z pěti kroků:

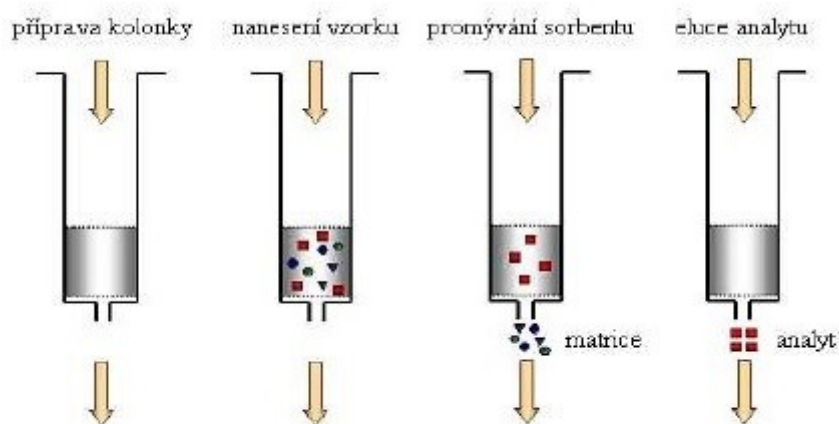
Aktivace sorbentu je provedena vhodným rozpouštědlem např. acetonitrilem nebo metanolem a dochází k aktivaci vazebných míst v sorbentu.

Kondicionace SPE je provedena rozpouštědlem podobného složení jako vzorek např. voda nebo pufr. Tím dojde k úpravě podmínek (např. pH) v sorbentu tak, aby vzorek byl nanesen do stálého a podobného prostředí.

Po nadávkování vzorku dochází ke specifickým reakcím mezi naneseným vzorkem a sorbentem. Stanovované analyty se selektivně sorbují a ostatní látky, tedy složky matrice, prochází volně kolonou.

Promývání probíhá vhodným rozpouštědlem s cílem odstranění zbytků matrice ze sorbentu. Stanovované látky by měly zůstat navázané na sorbentu.

Eluce dochází k vymytí analytů elučním činidlem, tedy k selektivní desorpci stanovovaných látek z pevné fáze [32][33].



Obr. 24: Extrakce na tuhou fázi (SPE) [34]

3.4.3 Extrakce pomocí pipetovacích špiček (PT-SPE)

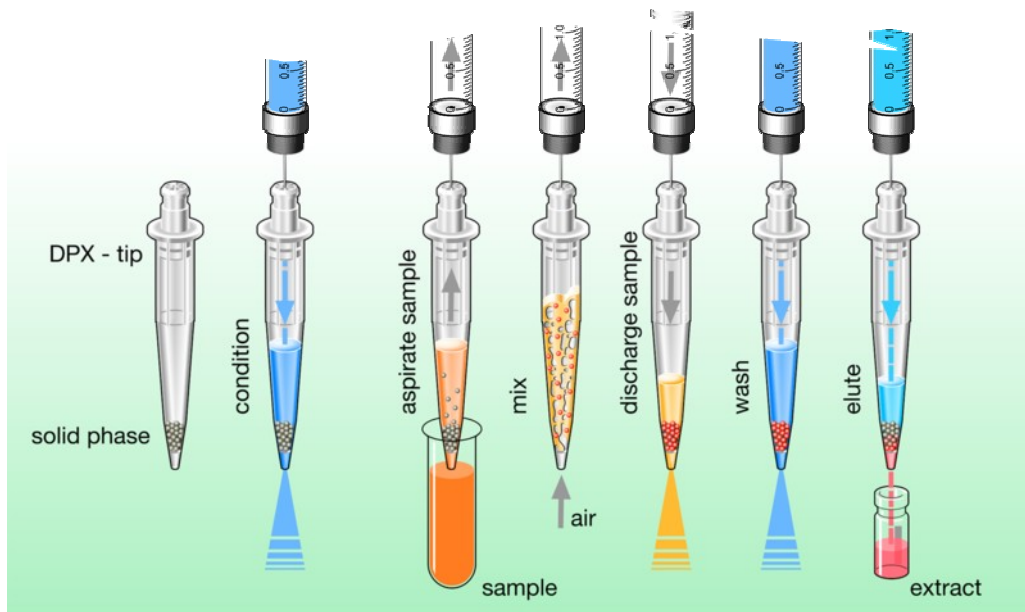
Tato metoda představuje miniaturizovanou verzi konvenční SPE, což znamená, že princip a jednotlivé kroky extrakce (aktivace sorbentu, kondicionace SPE, dávkování vzorku, promývání a eluce) jsou shodné. Techniky se liší pouze množstvím a umístěním sorbentu, který je v případě PT-SPE umístěn v pipetovací špičce. Tato technika kombinuje výhody SPE a mikroextrakce, tedy snížení objemu vzorku, snížení spotřeby rozpouštědel a snížení času potřebného k analýze. Metoda se používá zejména pro přečištění, zakoncentrování a selektivní izolaci proteinů a peptidů a to např. v oblasti genomiky, proteomiky a metabolomiky [35][36][37].



Obr. 25: Pipetovací špičky naplněné sorbentem [39]

3.4.4 Disperzní extrakce pomocí pipetovacích špiček (DPX)

Princip této techniky vychází také z SPE. Na rozdíl od PT-SPE je sorbent v pipetovací špičce umístěn volně mezi dvěma fritami, jedná se tedy o disperzní typ extrakce. Turbulentní vzduchová bublina tvoří mixováním suspenzi rozpouštědla a sorbentu se vzorkem, a proto díky tomuto opakovanému kontaktu analytu s extrakční fází dochází ke zvýšení účinnosti extrakce. Metoda se používá např. k analýze návykových látek, k terapeutickému monitorování léčiv a farmakologickým studiím [31][32][38].



Obr. 26: Disperzní extrakce pomocí pipetovacích špiček (DPX) [40]

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- Ultračistá voda, která byla vyrobena na Farmaceutické fakultě v HK zařízením MILLI-Q, Millipore
- Acetonitril, LC-MS chromasolv® $\geq 99\%$ (Fluka Analytical, Česká republika)
- Kyselina octová, LC-MS $\geq 99\%$ (Fluka Analytical, Česká republika)
- Kyselina mravenčí, LC-MS $\geq 99\%$ (Fluka Analytical, Česká republika)
- Hydroxid amonný, LC-MS $\geq 25\%$ (Fluka Analytical, Česká republika)
- Sérum: LYO HUMAN, (Erba Lachema s.r.o., Česká republika)

4.2 Použité přístroje a materiály

- Acquity Ultra Performance LC, WATERS, Česká republika
 - ACQ- binary solvent manager - čerpadlo
 - ACQ- sample manager - autosampler
 - ACQ- columnn manager - kolonový termostat
 - ACQ- PDA detektor - detektor s diodovým polem
- Hmotnostní spektrometr - Quatro Micro, WATERS, Česká republika
- Chromatografická kolona - Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 μl 2,1 x 50 mm), WATERS, Česká republika
- Analytické váhy: Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- Automatické pipety: BIOHIT, Fisher Scientific, Česká republika
- Ultrazvuková vodní lázeň: Sonorex Digitec, BANDELIN electronic, Německo
- Vakuová pumpa: CHROMSERVIS WAFY s.r.o., Slovensko
- pH metr HANNA instruments pH 212, Fisher Science, Česká republika
- Sušení dusíkem: SUPELCO VISIPREP 24TM DL
- Centrifuga: Benchmark My FugeTM Mini, Čína
- Magnetická míchačka: IKA MS 3 basic, USA
- PTFE Filtry: 4mm x 2 μl ISO - DISCTM Filters, SUPELCO Analytical, USA
- PTFE Filtry: 4mm x 2 μl Whatman
- Stage tips C18, Thermo Fisher Scientific, Česká republika
- Injekční stříkačka: TERUMO SYRINGE
- Jehly: MEDOJECT 1,2 x 40mm

4.3 Příprava standardů

Zásobní roztoky standardů

Zásobní roztoky byly připraveny navážením 0,5 mg standardní látky a následným rozpuštěním v příslušném rozpouštědle (Tab. 5). Atorvastatin a laktonové formy statinů byly rozpuštěny v acetonitrilu (ACN), naopak statiny ve formě kyseliny byly rozpuštěny ve směsi acetonitrilu a 0,5 mM octanu amonného (AmAc), pH = 4, tedy v mobilní fázi. Roztok mobilní fáze byl připraven smísením 70 ml 0,5 mM AmAc, pH = 4 a 30 ml acetonitrilu. Koncentrace vzniklých roztoků byla 1×10^{-3} g/ml.

Název	Zkratka	Rozpouštědlo
Pravastatin	PV	Mobilní fáze
Pravastatin lakton	PVL	Acetonitril
Rosuvastatin	RV	Mobilní fáze
Pitavastatin	PTV	Mobilní fáze
Rosuvastatin lakton	RVL	Acetonitril
Atorvastatin	AT	Acetonitril
Pitavastatin lakton	PTVL	Acetonitril
Atorvastatin lakton	ATL	Acetonitril
Simvastatin kyselina	SVA	Mobilní fáze
Simvastatin	SV	Acetonitril

Tab. 5: Výběr rozpouštědla pro jednotlivé statiny

Směsné roztoky standardů

Směsný standardní roztok o koncentraci 10^{-4} g/ml byl připraven smísením jednotlivých zásobních roztoků statinů o koncentraci 10^{-3} g/ml. Z každého zásobního roztoku bylo napipetováno 100 μ l, čímž byl získán 1 ml směsného roztoku obsahující všechny analyzované statiny o koncentraci 10^{-4} g/ml.

Postupným ředěním směsného roztoku o koncentraci 10^{-4} g/ml pomocí pufru 0,5 mM AmAc, pH = 4 byly připraveny další směsné roztoky statinů o koncentraci 10^{-5} g/ml a 5×10^{-7} g/ml.

Spikované sérum

Vzorek spikovaného lidského séra o koncentraci 5×10^{-7} g/ml byl připraven smísením 50 μ l směsného roztoku statinů o koncentraci 10^{-5} g/ml a 950 μ l lyofilizovaného séra, připraveného rozpuštěním lyofilizátu séra v 5 ml ultračisté vody a její homogenizací.

4.4 Příprava roztoků

0,5 mM octan amonný, pH = 4

71,3 μ l kyseliny octové bylo napipetováno do kádinky s přibližně 200 ml ultračisté vody. Za stálého míchání pomocí magnetického míchadla bylo pH = 4 roztoku dosaženo pomocí zředěného roztoku amoniaku. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku. Takto připravený roztok 5 mM AmAc, pH = 4 byl následně zředěn 10 x pomocí ultračisté vody. Byl získán roztok 0,5 mM AmAc, pH = 4. Roztok byl připravován před měřením každý den čerstvý.

Směs rozpouštědel odpovídající počátečnímu složení mobilní fáze

Roztok byl připraven smísením 0,5mM AmAc, pH = 4 a acetonitrilu v poměru 70 : 30.

0,01 M octan amonný, pH = 4,5

1,140 ml kyseliny octové bylo napipetováno do kádinky s přibližně 150 ml ultračisté vody. Pomocí hydroxidu sodného bylo dosaženo pH = 4,5. Obsah kádinky byl následně kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky a doplněn ultračistou vodou po rysku. Takto připravený roztok 0,1 M AmAc, pH = 4,5 byl 10 x zředěn ultračistou vodou pro získání výsledného roztoku 0,01 M AmAc, pH = 4,5.

Promývací činidla

Pro výběr promývacího činidla byly připraveny roztoky různé koncentrace ACN a pufru 0,01 M AmAc pH = 4,5 (0, 5 a 10% ACN). 5% ACN byl připraven smísením 5 dílů ACN a 95 dílů pufru, 10 % ACN smísením 10 dílů ACN a 90 dílů pufru. Byl použit také čistý pufr.

Eluční činidla

Pro výběr elučního činidla byly připraveny roztoky 100 %, 95 %, 90 % a 85% ACN. Roztoky byly připraveny smísením příslušného podílu ACN a pufru 0,01 M AmAc, pH = 4,5, např. 95 % ACN byl připraven z 95 dílů ACN a 5 dílů pufru. Ostatní koncentrace byly připraveny stejným způsobem.

4.5 Chromatografické podmínky

Chromatografické podmínky byly převzaty z dříve publikované multistatinové metody [41]. Vhodnost podmínek byla ověřena na směsném roztoku standardů.

Separace statinů byla provedena na koloně BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m) s využitím gradientové eluce. Jako mobilní fáze byla zvolena směs 0,5 mM octanu amonného, pH = 4 a acetonitrilu v počátečním poměru 70 : 30. Podrobnější informace o chromatografických podmínkách naleznete v publikaci [41].

4.6 Optimalizace podmínek pro MS detekci

4.6.1 Výběr prekurzorových iontů

Výběr prekurzorových iontů byl proveden pomocí skenu prekurzorových iontů v negativním i pozitivním ESI módu. Byla použita koncentrace 5×10^{-5} g/ml. Hodnocena byla intenzita odezvy protonovaných a deprotonovaných molekul.

4.6.2 Optimalizace podmínek iontového zdroje

Optimalizace parametrů iontového zdroje byla provedena v SIM módu v pozitivním i negativním módu. Optimalizovány byly tyto parametry iontového zdroje: napětí na kapiláře (CAP), napětí na extraktoru (EXTR), napětí na hexapólu (RF), průtok desolvačního plynu (GASSF), průtok plynu na vstupním kuželu (CG), teplota ve zdroji (Source T), desolvační teplota (Desolv T) a napětí na vstupním kuželu (CV). Testované rozmezí jednotlivých parametrů je uvedeno v Tab. 6.

Parametry iontového zdroje	ESI ⁺	ESI ⁻
Napětí na kapiláře	0,5 - 3,5 kV	0,5 - 3,5 kV
Napětí na extraktoru	0 - 10 V	0 - 10 V
Napětí na hexapólu	0 - 5 V	0 - 5 V
Průtok desolvačního plynu	200 - 800 l/hod	200 - 800 l/hod
Průtok plynu na vstupním kuželu	50 - 170 l/hod	50 - 170 l/hod
Teplota ve zdroji	90 - 150 °C	90 - 150 °C
Desolvační teplota	100 - 450 °C	100 - 450 °C
Napětí na vstupním kuželu	5 - 45 V	5 - 45 V

Tab. 6: Testovaná rozmezí jednotlivých parametrů iontového zdroje

4.6.3 Výběr produktových iontů a optimalizace iontových přechodů

Výběr produktových iontů byl proveden pomocí skenu produktových iontů, kdy jsou analyty fragmentovány pomocí zvolené kolizní energie. Ze skenu produktových iontů byly vybrány tři fragmenty s největší intenzitou pro každý prekurzorový iont. Pomocí SRM přechodů byl proveden výběr nejintenzivnějšího iontového přechodu a nevhodnější kolizní energie pro každý analyt.

4.7 Finální postup metody přípravy vzorků

Pro extrakci statinů z lidského séra bylo využito mikroextrakční techniky pomocí Stage tips pipetovacích špiček, které předcházela proteinová precipitace.

Proteinová precipitace byla provedena pomocí ACN. K 100 µl vzorku bylo přidáno 200 µl ACN a pomocí vortexu důkladně zamícháno. Inkubace této směsi probíhala 10 minut v klidu. Poté byla provedena centrifugace po dobu 10 minut a byl odebrán supernatant. Tento supernatant byl následně naředěn pufrům 0,01 M AmAc, pH = 4 na celkový objem 2 ml. Připravený roztok byl zamíchán na vortexu.

Stage tips extrakce je mikroextrakční technika, která byla provedena pomocí pipetovacích špiček naplněných sorbentem. Pipetovací špička se sorbentem byla upevněna v ependorfce. Aktivace sorbentu byla provedena nanesením 150 µl ACN. Centrifugace po dobu dvou minut umožnila průchod acetonitrilu sorbentem. Pro kondicionaci sorbentu bylo na sorbent aplikováno 150 µl 0,01 M AmAc, pH = 4,5 a 2 min centrifugováno. Na takto připravený sorbent bylo postupně nanášeno 2 ml vzorku

připraveného precipitací a pokaždé 2 min centrifugováno. Jako promývací činidlo bylo použito 100 µl 0,01 M AmAc pH = 4,5 a 100 µl směsi ACN a 0,01 M AmAc, pH = 4,5 v poměru 5 : 95. Po každé aplikaci roztoku následovala opět 2 min centrifugace. Před elučním krokem musela být pipetovací špička se sorbentem vložena do nové ependorfky, pro získání čistého eluátu. Jako eluční činidlo bylo zvolena 100 µl směsi ACN a 0,01 M AmAc, pH 4,5 v poměru 95 : 5. Opět 2 min centrifugace. Eluát byl odpařen pomocí dusíku do sucha a poté znovu rozpuštěn ve 100 µl mobilní fáze (0,5 mM AmAc, pH = 4 a acetonitril v poměru 70 : 30) a zamíchán, po dobu 5 min ultrazvukován a následně zfiltrován. Postup je pro přehled uveden v Tab. 7. Vzorky standardů i séra jednotlivých hodnot byly připravovány do dvou a více vialek, následně na nich byl proveden postup extrakce a poté každá vialka byla proměřena dvakrát. Pro hodnocení výtěžnosti extrakce byl zároveň měřen roztok standardů odpovídající koncentrace, který nebyl podroben extrakci. Výtěžnost byla hodnocena jako procentuální odchylka plochy píku jednotlivých analytů ve vzorku upraveném extrakční technikou a standardního roztoku bez aplikace extrakční techniky.

Krok	Objem	Činidlo
Kondicionace	3 x 50 µl	100% ACN
Kondicionace	3 x 50 µl	100% 0,01 M AmAc pH = 4,5
Aplikace vzorku	100 µl(ve 2 ml 0,5 mM AmAc pH = 4	vzorek
Promytí	100 µl	100% 0,01 M AmAc pH = 4,5
Promytí	100 µl	95% 0,01 M AmAc pH = 4,5 / 5% ACN
Eluce	100 µl	5% 0,01 M AmAc pH = 4,5 / 95% ACN
Sušení		dusík
Přidání	100 µl	mobilní fáze

Tab. 7: Finální postup mikroextrakční techniky pomocí Stage tips

4.8 Opakovatelnost metody

Po optimalizaci LC-MS metody byla ověřena opakovatelnost metody (retenčního času a plochy píků). Měření bylo provedeno na čtyřech koncentračních hladinách (5×10^{-9} g/ml, 1×10^{-8} g/ml, 1×10^{-7} g/ml a 1×10^{-6} g/ml), za stejných podmínek, na stejném přístroji v krátkém časovém intervalu. Z celkového počtu deseti měření byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD) retenčních časů a plochy píků.

4.9 Ověření linearity a citlivosti metody

Linearita a citlivost metody byla ověřena pomocí kalibračních křivek. Kalibrační křivky byly měřeny v koncentračním rozsahu 10^{-6} - 10^{-10} g/ml a byly tvořeny celkem 9 body. Linearita byla hodnocena pomocí korelačního koeficientu. Citlivost byla stanovena na základě limitu kvantifikace (LOQ) a limitu detekce (LOD). Limit kvantifikace byl určen poměrem signálu k šumu, který odpovídal minimální hodnotě 10. Limit detekce byl zjištěn výpočtem z limitu kvantifikace ($LOD = LOQ/3,3$).

5. Výsledky a diskuse

5.1 Optimalizace podmínek MS detekce

Jako ionizační techniku byla zvolena ionizace elektrosprejem a to v pozitivním i negativním módu. Jako hmotnostní analyzátor byl využit trojitý kvadrupól.

5.1.1 Výběr prekurzorových iontů (MS sken)

Pro jednotlivé testované látky byl vybrán prekurzorový ion v pozitivním $[M+H]^+$ a také v negativním módu $[M-H]^-$. U některých statinů byly v pozitivním módu pozorovány adukty se sodíkem $[M+Na]^+$ a v negativním módu adukty s octanem $[M+CH_3COO]^-$. Přestože tyto adukty poskytovaly vysokou odezvu, z důvodu špatné opakovatelnosti metody není vhodné je zvolit jako prekurzorové ionty.

Léčivo	Pozitivní mód ESI		Negativní mód ESI	
	Prekurzorový ion $[M+H]^+$	Aduky sodíku $[M+Na]^+$	Prekurzorový ion $[M-H]^-$	Aduky octanu $[M+CH_3COO]^-$
Pravastatin	425,0	447,2	423,1	–
Pravastatin lakton	407,2	429,2	–	465,1
Rosuvastatin	482,2	504,2	480,0	–
Pitavastatin	422,1	–	420,0	–
Rosuvastatin lakton	464,2	–	463,2	–
Atorvastatin	559,3	581,3	557,2	–
Pitavastatin lakton	404,1	–	–	462,0
Atorvastatin lakton	541,3	–	–	599,2
Simvastatin kyselina	437,2	459,3	435,1	–
Simvastatin	419,2	441,2	–	477,2

Tab. 8: Přehled prekurzorových iontů a jejich aduktů v pozitivním a negativním módu.

5.1.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje (SIM mód)

Optimalizace parametrů iontového zdroje byla provedena v pozitivním i negativním módu. Pro hodnocení jednotlivých parametrů iontového zdroje bylo využito SIM módu. Výběr optimálních hodnot byl proveden zejména s ohledem na citlivost, hodnocena byla tedy plocha píku. Pro následující parametry musela být vybrána jednotná hodnota pro všechny statiny: napětí na kapiláře (CAP), napětí na

extraktoru (EXTR), napětí na hexapólu (RF), průtok desolvačního plynu (GASSF), průtok plynu na vstupním kuželu (CG), teplota ve zdroji (Source T), desolvační teplota (Desolv T). Napětí na vstupním kuželu (CV) a kolizní energie (CE) byly stanoveny individuálně pro každý statin. Optimální hodnoty jsou uvedeny v Tab. 9 a 10.

Parametry iontového zdroje	ESI ⁺	ESI ⁻
Napětí na kapiláře	2,5 kV	2,5 kV
Napětí na extraktoru	1 V	1 V
Napětí na hexapólu	0,5 V	0,5 V
Průtok desolvačního plynu	650 l/hod	650 l/hod
Průtok plynu na vstupním kuželu	70 l/hod	70 l/hod
Teplota ve zdroji	130 °C	130 °C
Desolvační teplota	450 °C	450 °C

Tab. 9: Optimální hodnoty parametrů iontového zdroje (jednotné pro všechny analyty)

Léčivo	CV ESI ⁺	CV ESI ⁻
Pravastatin	–	35 V
Pravastatin lakton	20 V	–
Rosuvastatin	–	35 V
Pitavastatin	45 V	30 V
Rosuvastatin lakton	45 V	–
Atorvastatin	35 V	45 V
Pitavastatin lakton	45 V	–
Atorvastatin lakton	35 V	–
Simvastatin kyselina	15 V	35 V
Simvastatin	25 V	–

Tab. 10: Optimální hodnoty napětí na vstupním kuželu (CV) pro jednotlivé analyty

5.1.3 Výběr produktových iontů a výběr iontových přechodů

Fragmentací byla získána hmotností spektra produktových iontů, přičemž parametry iontového zdroje už byly nastaveny na optimální hodnoty. Pro každou látku byly vybrány 3 nejintenzivnější fragmenty a pro ně byl testován vliv hodnoty kolizní

energie. V závěru byl ze 3 fragmentů vybrán ten nejintenzivnější, dále byla zvolena nejoptimálnější kolizní energie a ionizační mód. Všechny laktonové formy statinů a některé kyselé formy byly proměřeny v pozitivním módu (pravastatin lakton, pitavastatin, rosuvastatin lakton, atorvastatin, pitavastatin lakton, atorvastatin lakton, simvastatin kyselina, simvastatin), naopak v negativním módu bylo možné proměřit pouze kyselé formy statinů (pravastatin, rosuvastatin, pitavastatin, atorvastatin, simvastatin kyselina). Z toho vyplývá, že pitavastatin, atorvastatin a simvastatin kyselina byly měřeny v pozitivním i negativním módu. Optimalizace kolizní energie byla provedena v rozsahu 5 - 40V v SRM módu. Na základě této optimalizace byl vybrán iontový přechod a ionizační mód pro každý analyt. Jednotlivé fragmenty a optimální kolizní energie jsou uvedeny v Tab. 11 a 12. Šedivě zvýrazněný je produktový ion vybraný pro SRM přechod.

Léčivo	Retenční čas [min]	Prekurzorový ion [M+H] ⁺	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	CE [V]
PVL	2,08	407.2	183,0	209,0	227,1	15
PTV	3,38	422.1	290,4	362,0	317,8	25
RVL	3,66	464.2	270,6	284,4	257,2	35
AT	4,41	559.3	440,6	466,3	422,2	20
PTVL	5,16	404.1	290,3	316,4	344,5	25
ATL	5,37	541.3	448,4	422,1	380,2	15
SVA	5,74	437.2	242,9	199,1	173,0	10
SV	7,25	419.2	199,0	303,1	285,1	10

Tab. 11: Jednotlivé fragmenty a optimální kolizní energie jednotlivých statinů v pozitivním módu

Léčivo	Retenční čas [min]	Prekurzorový ion [M-H] ⁻	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	CE [V]
PV	1,24	423,1	101,2	303,1	321,4	25
RV	2,37	480,0	340,2	418,3	298,1	15
PTV	3,38	420,0	290,1	315,9	358,3	15
AT	4,41	557,2	396,9	453,1	521,6	30
SVA	5,74	435,1	319,4	115,3	283,1	15

Tab. 12: Jednotlivé fragmenty a optimální kolizní energie jednotlivých statinů v negativním módu

5.2 Citlivost, linearita a opakovatelnost LC-MS metody

Zcela na závěr vývoje LC-MS metody byla proměřena opakovatelnost metody, linearita a byla stanovena citlivost metody, čímž byla ověřena vhodnost celé LC-MS metody. Opakovatelnost metody byla měřena na čtyřech koncentračních hladinách (5×10^{-9} g/ml, 1×10^{-8} g/ml, 1×10^{-7} g/ml a 1×10^{-6} g/ml) v deseti opakováních. Průměr retenčních časů a ploch píků a jejich odpovídající relativní směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tab. 13 - 16.

Linearita a citlivost byla stanovena z kalibrační křivky, která byla změřena v koncentračním rozmezí 1×10^{-10} - 1×10^{-6} g/ml. Linearita byla vyhodnocena pomocí korelačních koeficientů, které dosahovaly hodnot v rozsahu 0,9978 - 0,9998 pro všechny statiny. Citlivost byla vyhodnocena pomocí LOQ a LOD. Limit kvantifikace se pro všechny hodnocené statiny pohyboval v rozmezí 5×10^{-10} - 1×10^{-9} g/ml. Z těchto hodnot byly vypočítány i hodnoty LOD. Všechny hodnoty korelačních koeficientů, LOQ, LOD a jednotlivé rovnice kalibračních křivek jsou uvedeny v Tab. 17.

Léčivo	Retenční čas (průměr)	Retenční čas (RSD %)	Plocha píku (průměr)	Plocha píku (RSD %)
PV	1,08	0,75	1422,38	3,81
PVL	2,01	0,43	200,10	7,59
RV	2,06	0,52	77,46	9,28
PTV	3,07	0,25	680,51	6,86
RVL	3,52	0,55	23,67	8,59
AT	3,93	0,12	827,05	6,46
PTVL	5,04	0,12	909,75	9,05
ATL	5,23	0,12	552,02	5,27
SVA	5,13	0,27	120,14	6,75
SV	7,05	0,16	1422,38	3,81

Tab. 13: Průměry retenčních časů, průměry ploch píků a RSD (%) na koncentrační hladině 5×10^{-9} g/ml

Léčivo	Retenční čas (průměr)	Retenční čas (RSD %)	Plocha píku (průměr)	Plocha píku (RSD %)
PV	1,04	0,12	119,93	4,32
PVL	2,01	0,42	462,34	6,05
RV	2,06	0,40	183,38	4,10
PTV	3,06	0,18	1778,60	4,63
RVL	3,52	0,30	38,64	8,74
AT	3,92	0,13	1910,69	2,48
PTVL	5,04	0,09	2290,25	4,43
ATL	5,23	0,10	1291,16	6,06
SVA	5,12	0,22	290,57	7,71
SV	7,04	0,12	2602,80	2,71

Tab. 14: Průměry retenčních časů, průměry ploch píků a RSD (%) na koncentrační hladině 1×10^{-8} g/ml

Léčivo	Retenční čas (průměr)	Retenční čas (RSD %)	Plocha píku (průměr)	Plocha píku (RSD %)
PV	1,07	0,45	1366,81	2,00
PVL	2,00	0,24	5358,02	3,16
RV	2,06	0,19	1987,84	2,50
PTV	3,06	0,00	19935,05	5,53
RVL	3,52	0,17	658,13	4,70
AT	3,93	0,11	21177,24	1,71
PTVL	5,04	0,10	26773,04	2,42
ATL	5,22	0,10	16793,30	2,17
SVA	5,12	0,09	3254,78	2,36
SV	7,04	0,07	23774,89	1,36

Tab. 15: Průměry retenčních časů, průměry plochy píků a RSD (%) na koncentrační hladině 1×10^{-7} g/ml

Léčivo	Retenční čas (průměr)	Retenční čas (RSD %)	Plocha píku (průměr)	Plocha píku (RSD %)
PV	1,07	0,39	13835,95	2,14
PVL	2,00	0,21	56777,77	2,59
RV	2,06	0,00	21664,93	2,86
PTV	3,06	0,14	161152,54	7,33
RVL	3,52	0,18	13368,01	2,50
AT	3,92	0,12	201232,11	3,55
PTVL	5,04	0,09	211539,43	6,57
ATL	5,23	0,09	253014,91	4,88
SVA	5,11	0,07	33215,62	4,67
SV	7,04	0,07	206026,55	1,89

Tab. 16: Průměry retenčních časů, průměry plochy píků a RSD (%) na koncentrační hladině 1×10^{-6} g/ml

Léčivo	Korelační koeficient	LOQ (g/ml)	LOD (g/ml)	Rovnice kalibrační křivky
PV	0,9998	5×10^{-9}	$1,5 \times 10^{-9}$	$y = 13,3334x - 27,7502$
PVL	0,9995	5×10^{-9}	$1,5 \times 10^{-9}$	$y = 58,2072x - 84,6891$
RV	0,9996	5×10^{-9}	$1,5 \times 10^{-9}$	$y = 24,6104x - 37,8138$
PTV	0,9984	1×10^{-9}	3×10^{-10}	$y = 165,237x + 55,1937$
RVL	0,9991	5×10^{-9}	$1,5 \times 10^{-9}$	$y = 27,6609x - 413,695$
AT	0,9986	1×10^{-9}	3×10^{-10}	$y = 192,196x + 988,540$
PTVL	0,9997	1×10^{-9}	3×10^{-10}	$y = 201,996x + 4,78212$
ATL	0,9978	5×10^{-10}	$1,5 \times 10^{-10}$	$y = 256,034x - 3095,65$
SVA	0,9992	1×10^{-9}	3×10^{-10}	$y = 27,7732x + 12,4787$
SV	0,9995	5×10^{-9}	$1,5 \times 10^{-9}$	$y = 251,422x + 678,456$

Tab. 17: Linearita a citlivost metody

5.3 Optimalizace metody přípravy vzorků

Jako metoda přípravy vzorků byla zvolena miniaturizovaná forma SPE pomocí pipetovacích špiček naplněných sorbentem, tzv. Stage tips metoda. Optimalizace postupu mikroextrakce zahrnuje stejné kroky jako optimalizace SPE. V první fázi vývoje metody byla provedena optimalizace objemu a složení elučního a promývacího činidla a to na směsném standardním roztoku o koncentraci 5×10^{-7} g/ml. V další fázi vývoje byl vyvinutý postup aplikován na spikované lidské sérum. Komerčně dostupný Stage tips sorbent C18 byl použit pro optimalizaci extrakce. Nejdříve byl testován sériově vyráběný, tedy komerčně dostupný sorbent C 18 a následně kvůli velmi nízkým výtěžnostem analytů ze spikovaného séra byly vyzkoušeny laboratorně připravené sorbenty C 18, SBD a (C 18 + SBD), které se lišily nejen typem sorbentu, ale zejména jeho množstvím.

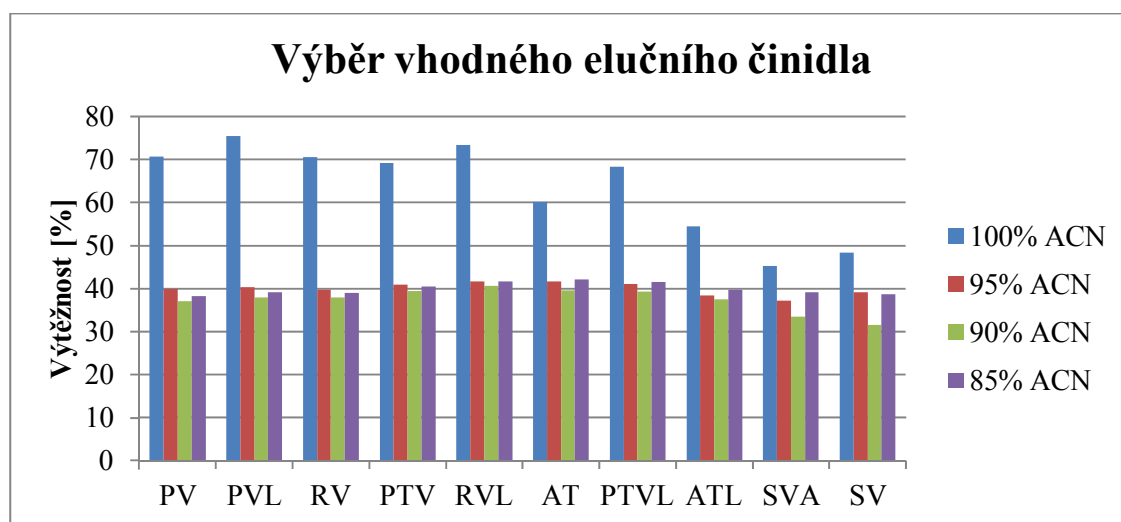
5.3.1 Výběr vhodného elučního činidla

Pro výběr optimálního složení elučního činidla byly testovány následující roztoky 100 %, 95 % 90 % a 85 % ACN, který byl ředěn puftrem 0,01 M AmAc, pH = 4,5. Pro aktivaci Stage tips kolony bylo použito $3 \times 50 \mu\text{l}$ ACN a pro jeho kondicionaci $3 \times 50 \mu\text{l}$ puftrem 0,01 M AmAc, pH = 4,5. Podrobný postup je uveden v kap. 4.7. Poté

bylo naneseno 50 μ l vzorku o koncentraci 5×10^{-7} g/ml a pro eluci jednotlivých analytů bylo využito 50 μ l elučního činidla různého složení. Ze zkoušených roztoků bylo nejlepších výtěžností dosaženo pomocí 100 % ACN, kdy méně koncentrované roztoky ACN neposkytly dostatečnou výtěžnost pro jednotlivé analyty. Výtěžnosti statinů v závislosti na typu elučního činidla jsou uvedeny v Tab. 18 a Obr. 27.

Léčivo	100% ACN	95% ACN	90% ACN	85% ACN
PV	71	40	37	38
PVL	75	40	38	39
RV	70	40	38	39
PTV	69	41	40	41
RVL	73	42	41	42
AT	60	42	40	42
PTVL	68	41	39	42
ATL	54	38	38	40
SVA	45	37	34	39
SV	48	39	32	39

Tab. 18: Výtěžnost [%] jednotlivých statinů v závislosti na koncentraci ACN



Obr. 27: Výběr vhodného elučního činidla v závislosti na koncentraci ACN

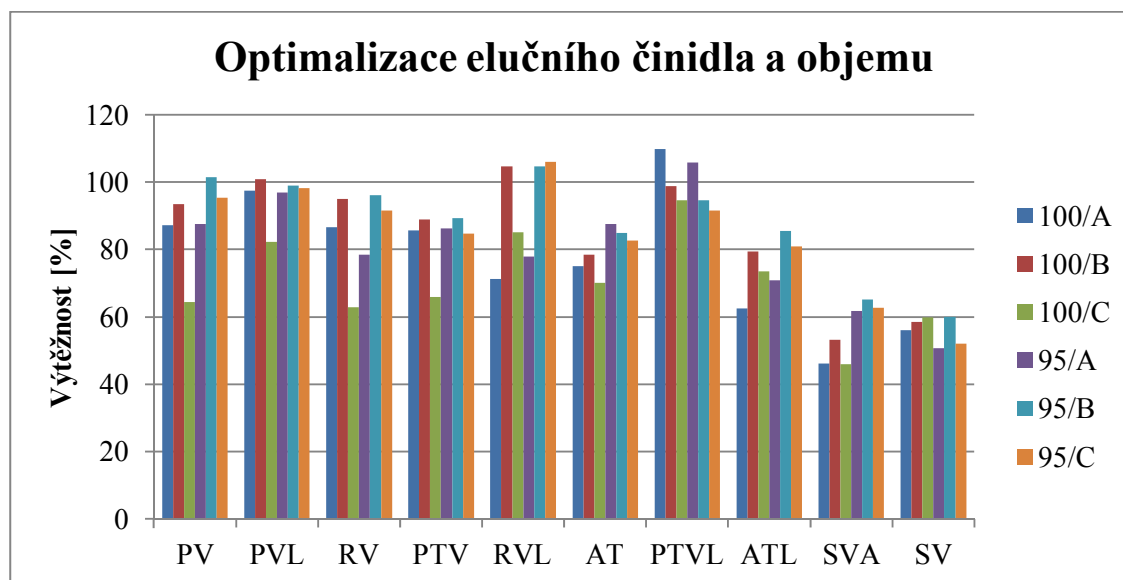
5.3.2 Optimalizace objemu elučního činidla

Pro extrakci všech statinů se jako nejvýhodnější eluční činidlo ukázal 100 % ACN. Nicméně na základě předchozích zkušeností byl pro další optimalizaci objemu vzorku a elučního činidla použit nejen 100 % ACN, ale i 95 % ACN. Testovány byly 3 kombinace objemů: A (50 μ l vzorku a 100 μ l elučního činidla), B (100 μ l vzorku a 100 μ l elučního činidla) a C (100 μ l vzorku a 200 μ l elučního činidla). Kombinace 50 μ l vzorku a 50 μ l elučního činidla nebyla testována z důvodů špatné manipulace s tak nízkým objemem eluátu a z důvodů nižších výtěžností v průběhu optimalizace složení elučního činidla. Protože nebyly patrné výrazné rozdíly výtěžností analytů pro jednotlivé kombinace objemů vzorku a elučního činidla, byla z důvodu eliminace ředění zvolena kombinace 100 μ l vzorku a 100 μ l elučního činidla. 100% ACN a 95% ACN vykazoval velmi podobné výtěžnosti pro jednotlivé statiny. Pro většinu statinů okolo 90 %, pouze pro simvastatin 60 % a simvastatin kyselinu 65 %. Z důvodů stability byl 95 % ACN vybrán jako optimální eluční činidlo. Výtěžnosti jednotlivých analytů v závislosti na typu elučního činidla a použitém objemu jsou uvedeny v Tab. 19 a Obr. 28.

Léčivo	100/A	100/B	100/C	95/A	95/B	95/C
PV	87	94	64	88	101	95
PVL	98	101	82	97	99	98
RV	87	95	63	78	96	92
PTV	86	89	66	86	89	85
RVL	71	105	85	78	105	106
AT	75	79	70	87	85	83
PTVL	110	99	95	106	95	92
ATL	63	79	73	71	86	81
SVA	46	53	46	62	65	63
SV	56	58	60	51	60	52

	vzorek	eluční č.
A	50 µl	100 µl
B	100 µl	100 µl
C	100 µl	200 µl

Tab. 19: Výtěžnost [%] statinů v závislosti na použitém objemu vzorku a elučního činidla v závislosti na koncentraci ACN



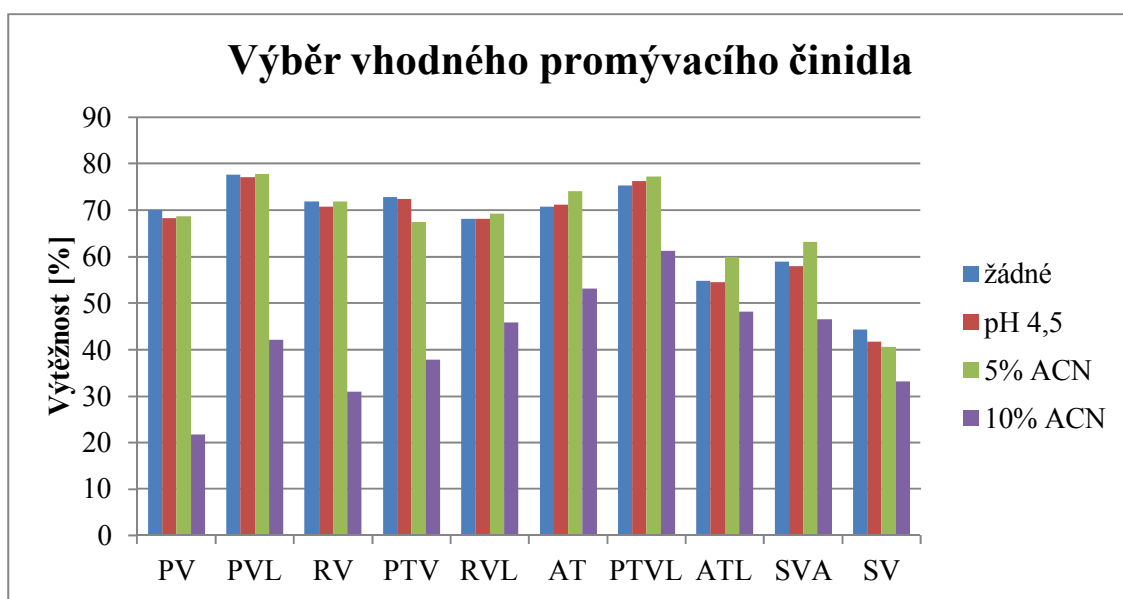
Obr. 28: Optimalizace objemu vzorku a objemu a složení elučního činidla

5.3.3 Výběr vhodného promývacího činidla

Promývací činidlo sloužící k odstranění balastních látek bylo optimalizováno na komerčním Stage tips sorbentu C18. Pro extrakci bylo použito 100 μ l standardního směsného roztoku o koncentraci 5×10^{-7} g/ml. Jednotlivé analyty byly eluovány 100 μ l směsí ACN a pufru 0,01 M AmAc, pH = 4,5 v poměru 95 : 5. Výběr vhodného promývacího činidla byl proveden na základě výtěžnosti analytů a jejich ztrát v průběhu promývacího kroku. Objem promývacího činidla byl zvolen 100 μ l, což odpovídá objemu vzorku. Na základě předchozích zkušeností s extrakcí statinů byly testovány promývací činidla obsahující směs ACN a pufru 0,01 M AmAc, pH = 4,5 v různém poměru, tedy v rozmezí 0 - 10% ACN. Při optimalizaci promývacího činidla bylo potvrzeno, že zvyšující koncentrace ACN způsobuje snížení výtěžnosti a tedy zvýšení ztrát analytů v průběhu promývacího kroku. Při užití 10% ACN docházelo k výraznému nežádoucímu vymytí analytů ze sorbentu, což při použití 5% ACN a čistého pufru nebylo patrné. Z těchto důvodů byl jako promývací činidlo zvolen čistý pufr 0,01 M AmAc, pH = 4,5 zejména pro eliminaci solí ze vzorku a 5% ACN pro odstranění ostatních balastních látek. V Tab. 20 a Obr. 29 jsou znázorněny výtěžnosti analytů při použití jednotlivých promývacích činidel. Výsledky měření promývacích frakcí nejsou v tabulce uvedeny, jelikož hodnoty pro čistý pufr a 5% ACN byly nulové, pouze pro 10 % ACN dosahovaly vyšších hodnot. Tyto výsledky společně s výsledky v Tab. 20 potvrdily tedy ztrátu analytů v promývacím kroku pouze pro 10% ACN.

Léčivo	žádné	pH 4,5	5% ACN	10% ACN
PV	70	68	69	22
PVL	78	77	78	42
RV	72	71	72	31
PTV	73	72	67	38
RVL	68	68	69	46
AT	71	71	74	53
PTVL	75	76	77	61
ATL	55	54	60	48
SVA	59	58	63	47
SV	44	42	41	33

Tab. 20: Výtěžnosti [%] jednotlivých statinů při použití různých promývacích činidel



Obr. 29: Optimalizace promývacího činidla

5.4 Ověření vyvinutého postupu Stage tips extrakce na spikovaném lidském séru

Po optimalizaci složení elučního a promývacího činidla a po optimalizaci objemu vzorku byl navržen vhodný postup pro extrakci statinů pomocí pipetovacích špiček Stage tips C18. Tento optimální postup byl aplikován na spikované lidské sérum. Pro ověření postupu bylo připraveno spikované lidské sérum s koncentrací statinů 5×10^{-7} g/ml. Na závěr byl eluát přefiltrován pomocí polytetrafluorethylenového (PTFE) filtru o rozměrech 4 mm x 0,2 μ m. Celý postup byl zároveň také ověřen na směsném standardním roztoku připraveném v 0,5 mM AmAc, pH = 4 o koncentraci analytů 5×10^{-7} g/ml. Vhodnost postupu byla potvrzena pouze pro směsný standardní roztok, výtěžnost analytů v rozsahu 70 - 90 %. Nicméně výtěžnost statinů ze vzorku spikovaného lidského séra se pohybovala pouze okolo 10 %, a proto daný postup nebylo možné použít pro extrakci statinů z matrice. Porovnání výtěžností obou vzorků je uvedeno v Tab. 21.

Léčivo	A	B
PV	76	10
PVL	81	18
RV	79	3
PTV	83	2
RVL	84	12
AT	77	4
PTVL	93	12
ATL	74	7
SVA	73	3
SV	71	9

Tab. 21: Porovnání výtěžností [%] analytů ze směsného standardního roztoku připravených v 0,5 mM AmAc, pH = 4 (A) a ze spikovaného lidského séra (B) upravené vyvinutým Stage tips postupem

V dalších krocích byl hledán nový postup, jak odstranit problematický krok způsobující nízkou výtěžnost statinů ze spikovaného séra. V první řadě byl vyzkoušen

jiný typ filtru pro přečištění eluátu pro vyvrácení možnosti záchytu analytů na filtračním disku. V další fázi byl zařazen krok odstraňující proteiny ze vzorku, které by mohly být zodpovědné za nízkou výtěžnost statinů.

5.4.1 Ověření vhodnosti filtru použitého pro filtraci eluátu

Z důvodů nízkých výtěžností statinů při extrakci analytů ze spikovaného séra, byly vyzkoušeny dva typy filtrů pro přečištění eluátu: filtr ISO-DISC o rozměrech 4 mm x 0,2 μm a filtr Whatman o stejných rozměrech. Byly porovnány výtěžnosti statinů při použití těchto dvou filtrů a zároveň pro vyvrácení záchytu analytu na filtru byla provedena i filtrace eluátu získaného extrakcí směsného standardního roztoku. Z výsledků uvedených v Tab. 22 je patrné, že filtr ISO-DISC poskytl o něco vyšší výtěžnosti statinů (cca 10 - 30%) v porovnání s druhým testovaným filtrem, nicméně stále nebylo dosaženo akceptovatelných hodnot. Na druhou stranu byla na základě výsledků výtěžností analytů ze směsného standardního roztoku s filtrací a bez filtrace vyvrácena možnost záchytu statinů na filtru.

Léčivo	A	B	C	D
PV	78	80	2	26
PVL	83	81	7	42
RV	76	84	1	8
PTV	80	87	1	4
RVL	83	70	4	28
AT	72	75	1	9
PTVL	89	78	5	17
ATL	68	57	3	11
SVA	65	65	1	6
SV	62	54	5	13

A	Směsný standardní roztok pH = 4 bez filtrace
B	Směsný standardní roztok pH = 4 s filtrací
C	Spikované lidské sérum s filtrací (filtr Whatman)
D	Spikované lidské sérum s filtrací (filtr ISO-DISC)

Tab. 22: Výtěžnost [%] jednotlivých statinů v závislosti na použitém filtru

5.4.2 Srážení proteinů (precipitace) před Stage tips extrakcí

Další faktor, který by mohl ovlivnit výtěžnost statinů při jejich extrakci ze spikovaného lidského séra je přítomnost proteinů. Z těchto důvodů byl vyzkoušen postup zahrnující proteinovou precipitaci pomocí ACN s cílem uvolnění analytu z vazby na protein a s cílem odstranění proteinů. Byly porovnávány výtěžnosti statinů při zařazení PP a bez PP a to jak pro směsný standardní roztok, tak pro spikované lidské sérum. Zařazení PP přineslo zvýšení výtěžnosti některých statinů (pitavastatin lakton, atorvastatin lakton, atorvastatin, simvastatin a simvastatin kyselina) ze spikovaného lidského séra. Nicméně na výtěžnosti statinů ze směsného standardního roztoku byly patrné nižší výtěžnosti při zařazení PP, pravděpodobně způsobené ztrátami při proteinové precipitaci. Z těchto výsledků tedy plyne, že zařazení PP kroku umožní uvolnění statinů z vazby na proteiny a eliminuje proteiny, na druhou stranu tento krok způsobí také určitou ztrátu statinů. Porovnání jednotlivých výtěžností v závislosti na použití PP je uvedeno v Tab. 23.

Léčivo	A	B	C	D
PV	50	4	6	2
PVL	60	13	14	7
RV	51	8	2	3
PTV	51	14	1	11
RVL	62	22	10	15
AT	65	36	3	33
PTVL	70	40	12	38
ATL	59	31	7	38
SVA	49	32	2	40
SV	35	25	11	39

A	Směsný standardní roztok bez PP
B	Směsný standardní roztok s PP
C	Spikované lidské sérum bez PP
D	Spikované lidské sérum s PP

Tab. 23: Výtěžnosti [%] jednotlivých statinů v závislosti na zařazení kroku proteinové precipitace

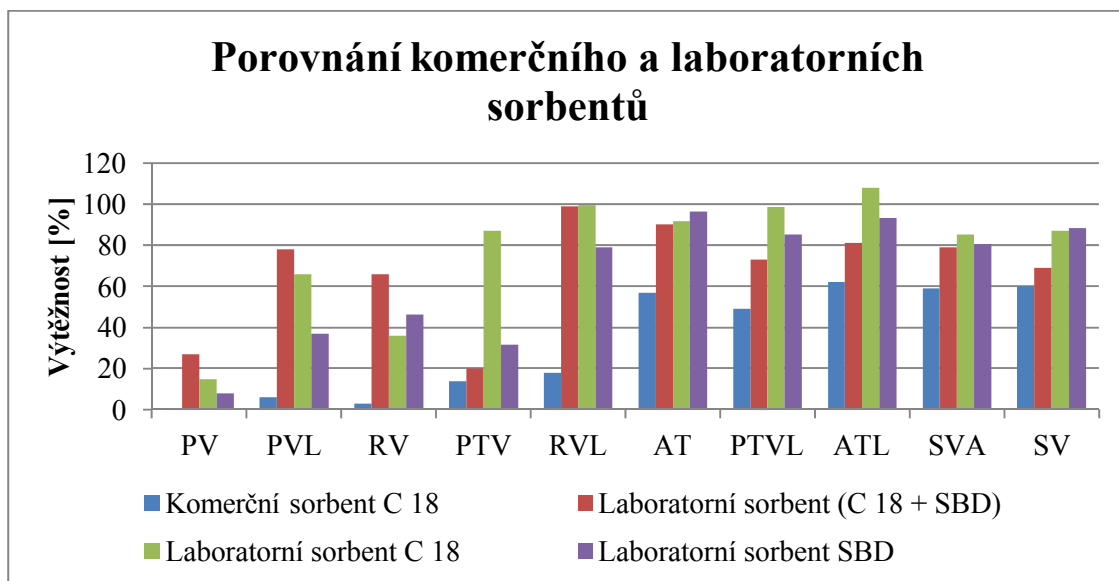
5.4.3 Možnost využití laboratorně připravených pipetovacích špiček plněných sorbentem

Jako poslední možnost pro zvýšení výtěžnosti statinů z lidského séra za využití této extrakční techniky byly vyzkoušeny laboratorně vyrobené pipetovací špičky plněné sorbentem. Hlavní výhodou těchto špiček je možnost výroby tzv. na míru - volba typu sorbentu a jeho množství i porozity. Popis postupu výroby byl publikován v článku [42]. Testovány byly tři typy laboratorně připravených sorbentů: C 18, SBD a kombinace obou dvou (C 18 + SBD). Hlavní rozdíl těchto laboratorně připravených sorbentů byl nejen v jejich typu, ale také v množství sorbentu. V první fázi testování laboratorních sorbentů byl použit vyvinutý extrakční postup bez PP, nicméně z důvodu ucpávání sorbentu musel být krok PP zařazen. Z výsledků znázorněných v Tab. 24 a Obr. 30 je patrné, že všechny testované laboratorní sorbenty poskytovaly vyšší výtěžnost s porovnáním komerčně dostupného Stage tips sorbentu C18. Z testovaných

laboratorních sorbentů byl jako nejméně vhodný sorbent SBD. Laboratorní sorbent kombinovaný (C 18 + SBD) a C18 poskytovaly odlišné výtěžnosti zejména pro některé polární analyty jako je PVL, RV a PTV, Tab. 24 a Obr. 30. Z těchto výsledků bylo patrné, že nebylo možné z těchto dvou sorbentů vybrat optimální variantu, nicméně sorbent C18 je použitelný pro extrakci statinů z lidského séra s výjimkou PV. Protože jiné laboratorně vyráběné sorbenty připravené ve spolupráci s Univerzitou Palackého nebyly v době vypracování diplomové práce dostupné, podrobnější testování sorbentů (C8, kombinace C8 a SBD) nebylo zahrnuto do této diplomové práce [42].

Léčivo	Komerční sorbent	Laboratorní sorbent	Laboratorní sorbent	Laboratorní sorbent
	C 18	(C 18 + SBD)	C 18	SBD
PV	1	27	15	8
PVL	6	78	66	37
RV	3	66	36	46
PTV	14	20	87	32
RVL	18	99	100	79
AT	57	90	92	96
PTVL	49	73	98	85
ATL	62	81	108	93
SVA	59	79	85	81
SV	60	69	87	88

Tab. 24: Porovnání výtěžností [%] jednotlivých statinů pro jednotlivé typy laboratorně připravených sorbentů v porovnání s komerčním sorbentem C18



Obr. 30: Porovnání výtěžnosti [%] jednotlivých statinů pro jednotlivé typy laboratorně připravených sorbentů v porovnání s komerčním sorbentem C18

6. Závěr

Byla vyvinuta LC-MS metoda pro stanovení pěti statinů a jejich metabolitů v lidském séru. Optimalizované parametry pro nastavení iontového zdroje a celkového nastavení hmotnostního spektrometru je uvedeno v Tab. 25 a 26.

Parametry iontového zdroje	ESI ⁺	ESI ⁻
Napětí na kapiláře	2,5 kV	2,5 kV
Napětí na extraktoru	1 V	1 V
Napětí na hexapólu	0,5 V	0,5 V
Průtok desolvačního plynu	650 l/hod	650 l/hod
Průtok plynu na vstupním kuželu	70 l/hod	70 l/hod
Teplota ve zdroji	130 °C	130 °C
Desolvační teplota	450 °C	450 °C

Tab. 25: Optimalizované hodnoty pro nastavení iontové zdroje

Léčivo	Mód ionizace	Prekurzorový ion	Fragment	CV [V]	CE [V]
PV	ESI ⁻	423,1	101,2	35	25
PVL	ESI ⁺	407,2	183,0	20	15
RV	ESI ⁻	480,0	418,3	35	15
PTV	ESI ⁺	422,1	290,4	45	25
RVL	ESI ⁺	464,2	270,6	45	35
AT	ESI ⁺	559,3	440,6	35	20
PTVL	ESI ⁺	404,1	290,3	45	25
ATL	ESI ⁺	541,3	448,4	35	15
SVA	ESI ⁻	435,1	319,4	35	15
SV	ESI ⁺	419,2	199,0	25	10

Tab. 26: Konečný výběr módu ionizace, prekurzorového iontu, fragmentu, napětí na vstupním kuželu (CV) a kolizní energie (CE)

Vhodnost vyvinuté LC-MS metody pro stanovení statinů v lidském séru byla potvrzena na základě měření opakovatelnosti, linearity a citlivosti metody. Po proměření opakovatelnosti (SST) byly splněny limity pro RSD retenčního času (RSD <

1 %) a také pro RSD plochy píku (RSD < 10 %). Metoda je lineární v kalibračním rozsahu 10^{-10} - 1×10^{-6} . Hodnoty LOQ byly v rozsahu 5×10^{-10} - 1×10^{-9} g/ml.

Postup extrakce statinů pomocí Stage tips pipetovacích špiček z lidského séra byl optimalizován nejprve na směsném standardním roztoku a následně byl vyvinutý postup aplikován na spikované lidské sérum. Pro extrakci byl zvolen komerčně dostupný Stage tips sorbent C18 a optimální postup vyvinutý na směsném standardním roztoku je uveden v Tab. 27. Nicméně na spikovaném lidském séru bylo ověřeno, že není možné použít komerční sorbent bez předchozí proteinové precipitace séra z důvodu nízké výtěžnosti statinů a z důvodů ucpávání komerčního sorbentu. Nicméně i přesto nebylo dosaženo dostatečných výtěžností statinů (viz Tab. 24), a proto bylo potvrzeno, že komerčně dostupné Stage tips sorbenty nejsou vhodné pro extrakci statinů z lidského séra.

Krok	Objem	Činidlo
Kondicionace	3 x 50 μ l	100% ACN
Kondicionace	3 x 50 μ l	100% 0,01 M AmAc pH = 4,5
Aplikace vzorku	100 μ l (ve 2 ml 0,5 mM AmAc pH = 4)	vzorek
Promytí	100 μ l	100% 0,01 M AmAc pH = 4,5
Promytí	100 μ l	95% 0,01 M AmAc pH = 4,5 / 5% ACN
Eluce	100 μ l	5% 0,01 M AmAc pH = 4,5 / 95% ACN
Sušení		dusík
Přidání	100 μ l	mobilitní fáze

Tab. 27: Optimální postup extrakce pomocí Stage tips pipetovacích špiček

Protože tato technika extrakce umožňuje laboratorní přípravu sorbentem plněných špiček, byl stejný extrakční postup aplikován na laboratorně připravované sorbenty C18, SBD a jejich kombinaci (C18 + SBD), které byly získány ve spolupráci s Univerzitou Palackého v Olomouci. Z těchto tří testovaných sorbentů nebyl vybrán univerzální sorbent pro extrakci všech testovaných statinů. Nicméně vyvinutý postup poskytuje akceptovatelné výtěžnosti pro většinu statinů s výjimkou PV s využitím laboratorně připraveného sorbentu C18. Přestože nebyl nalezen optimální laboratorně vyráběný sorbent pro extrakci všech testovaných statinů z lidského séra, byla potvrzena

vhodnost takto připravených sorbentů pro tuto analýzu. Protože v době vypracování diplomové práce nebyly dostupné další typy laboratorně připravených sorbentů, další experimenty zabývající se podrobnějším výběr optimálního sorbentu už nejsou součástí této diplomové práce.

7. Použitá literatura

- [1] Heinz Lüllmann, Klaus Mohr, Lutz Hein: *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3908-3.
- [2] <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/963135a9-b3e7-44ae-aa9a-6682ee95efc9/S-21-trejtmar-farmakoterapie-dyslipidemii.aspx?disposition=attachment> (25.6.2015)
- [3] Jiří Hartl, Martin Doležal, Jana Krinková, Miroslav Miletín, Veronika Opletalová: *Farmaceutická chemie III*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-0195-3.
- [4] Helena Vaverková, Rosuvastatin, *Remedia* 4 (2008) 324-330.
- [5] Heinz Lüllmann, Klaus Mohr, Martin Wehling: *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2., české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [6] Jiří Vlček, Daniela Fialová a kol.: *Klinická farmacie I*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3169-8.
- [7] Lucie Kousalová, Jana Beranová, Pavel Anzenbacher, Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 - Část I. Interakce na úrovni CYP3A4, *Klin Farmakol Farm* 17 (2003) 151-157.
- [8] <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/90a83028-301e-45cb-9589-71ca1c644583/05-staud-metabolismus.aspx?disposition=attachment> (16.7.2015)
- [9] Lucie Nováková, Michal Douša: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. vyd. 1., Klatovy: Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [10] Jiří Klimeš a kol.: *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.
- [11] <http://www.hplc.cz> (21.7.2015)

- [12] HO, Win Fung, Brian Stuart, Elizabeth Richards, High performance liquid chromatography, Cambridge: Royal Society of Chemistry 3 (2003) 35-60.
- [13] Szabolcs Fekete et al., Current and future trends in UHPLC, TrAC trends in analytical chemistry 63 (2014) 60-110.
- [14] <https://www.chromservis.eu/i/uhplc?lang=EN> (24.7.2015)
- [15] Adisorn Jettanajit, Thumnoon Nhujak, Determination of mycotoxins in brown rice using QuEChERS sample preparation and UHPLC-MS-MS, Journal of Chromatographic Science 65 (2016) 244-269.
- [16] Jana Olšovská, Marie Jurková, New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials, Kvasný.prum 2 (2012) 58-70.
- [17] Lucie Nováková, Hana Vlčková, A Review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation, Analytica Chimica Acta 656 (2009) 8-35.
- [18] http://www.hplc.cz/UPLC/sorbent_uplc.html (26.7.2015)
- [19] [http://www.waters.com/waters/en_CZ/ACQUITY-UPLC Columns/nav.htm?locale=en_CZ&cid=513206](http://www.waters.com/waters/en_CZ/ACQUITY-UPLC%20Columns/nav.htm?locale=en_CZ&cid=513206) (27.7.2015)
- [20] Chhabil Dass: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2007. ISBN 978-0-471-68229-5.
- [21] http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf (27.7.2015)
- [22] <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/487a54bc-5cec-4485-8dbc-d142f74443d6/Metody-vysokofrekvencni-spektroskopie.aspx?disposition=attachment> (28.7.2015)

- [23] http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf (28.7.2015)
- [24] Renáta Norková, Jana Jaklová, Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí, Chem. Listy 107 (2013) 949-955.
- [25] http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf (29.7.2015)
- [26] http://www.mu-j-web.cz/MC230P43/files/04_MC230P43_2015.pdf (30.7.2015)
- [27] http://holcapek.upce.cz/teaching/07_MS_identifikace_kvantita.pdf (15.4.2016)
- [28] <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/JVATM.htm> (8.4.2016)
- [29] Agilent Technologies: *Basics of LC/MS Primer*. U. S. A., 2001 (online). Dostupné na WWW: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf> (8.4.2016)
- [30] Tomáš Horák, Jiří Čulík, Marie Jurková, Pavel Čejka, Vladimír Kellner, Josef Dvořák, Danuša Hašková, Possibilities of utilization of modern sample preparation methods for gas chromatographic analysis of bevarages and especially beer, Kvasny.prum. 9 (2010) 56-65.
- [31] http://www.pragolab.cz/files/udalosti/2014-10/01_LNovakova.pdf (23.2.2016)
- [32] Lucie Nováková, Michal Douša: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. vyd.1., Klatovy: Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [33] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf> (3.8.2015)
- [34] https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/navody_na_cviceni_izolace_leciv_pomoci_spe.pdf (12.5.2016)

- [35] Chika Hasegawa, Takeshi Kumazawa, Xiao-Pen Lee, Akemi Marumo, Natsuko Shinmen, Hiroshi Seno, Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood, *Anal Bioanal Chem* 389 (2007) 563-570.
- [36] Nani Wang, Xiaowen Huang, Xuping Wang, Yang Zhang, Renjie Wu, Dan Shou, Pipette tip solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of flavonoids from *Epimedium herba* in rat serum and application of the technique to pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B*, 990 (2015) 64-72.
- [37] Qing Shen, Wei Dong, Yixuan Wang, Like Gong, Zhiyuan Dai, Hon-Yeung Cheung, Pipette tip solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry based rapid analysis of picrosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 80 (2013) 136-140.
- [38] <http://www.richrom.com/application/v2/public/upload/0/default/163.pdf> (6.8.2016)
- [39] http://www.proxeon.com/productrange/sample_preparation_and_purification/stage_tips/index.html (6.8.2015)
- [40] http://www.richrom.com/en_GB/pages/show/id/56 (16.4.2016)
- [41] Hana Vlčková, Pavel Svoboda, Ondřej Novák, Petr Solich, Lucie Nováková, Development of MEPS-UHPLC-MS/MS multistatin methods for clinical analysis, *Bioanalysis* 8 (2016) 333-349.
- [42] Jana Svačinová, Ondřej Novák, Lenka Plačková, René Lenobel, Josef Holík, Miroslav Strnad, Karel Doležal, A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction, *Plant methods* 8 (2012) 1-14.

